

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANA BİLİM DALI

**İSKEMİK İNME HASTALARINDA PENUMBRA/İNFARKT ALANININ
TESPİTİNDE ISI ŞOK PROTEİN- 70 (HSP-70), NÖRON SPESİFİK ENOLAZ
(NSE) VE S-100B PROTEİNLERİNİN DEĞERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Esmâ KIZILAY

TRABZON-2020

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANA BİLİM DALI

**İSKEMİK İNME HASTALARINDA PENUMBRA/İNFARKT ALANININ
TESPİTİNDE ISI ŞOK PROTEİN- 70 (HSP-70), NÖRON SPESİFİK ENOLAZ
(NSE) VE S-100B PROTEİNLERİNİN DEĞERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Esmâ KIZILAY

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Süleyman TÜREDİ

TRABZON-2020

TEŞEKKÜR

Öncelikle pek çok konudaki yaklaşım tarzı ile bana yol gösteren, tecrübesi sayesinde yeni ufuklar açan, araştırmamız sırasında göstermiş olduğu hoşgörü ile kalbimde taht kuran, tez danışmanım, mentorum Prof. Dr. Süleyman Türedi'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca, acil serviste, biyokimya laboratuvarında, radyoloji ve nöroloji kliniğinde hastalarla ilgili bilgi toplamama yardımcı olan, işlerimi biraz olsun kolaylaştıran, çalışmaya en ufak katkısı olan tüm çalışma arkadaşlarıma, hocalarıma ve personelimize teşekkür ederim.

Bu süreçte yanımda olan, her zaman desteklerini hissettiğim, zor anlarımda beni güldüren, yapamayacağımı düşündüğümde motive eden biricik arkadaşlarıma ve aileme şükranlarımı sunarım.

Ayrıca tezimi bütçe konusunda destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Dr.Esma KIZILAY

ÖZET

İskemik İnme Hastalarında Penumbra/İnfarkt Alanının Tespitinde Isı Şok Protein- 70 (Hsp-70), Nöron Spesifik Enolaz (NSE) Ve S-100B Proteinlerinin Değeri

Amaç: Çalışmamızda akut iskemik inme kliniğiyle başvuran hastalarda penumbra/infarkt hacminin NSE/HSP70 oranı ve S100B/HSP70 oranı ile olan ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamız prospektif, gözlemsel ve tanımlayıcı bir araştırma olarak planlandı. Araştırmaya 1 Eylül 2019-1 Nisan 2020 tarihleri arasında KTÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Acil Servisi'ne inme semptomları ile başvuran 166 hastadan çalışma kriterlerine uyan 135 hasta dahil edildi. Hastalar güncel inme tedavi klavuzuna göre tedavi edildikten sonra en kısa zamanda hastalara beyin MR perfüzyon ve difüzyon çekildi. Görüntüleme ile eş zamanlı olarak alınan Kan örneklerinden NSE, S100B ve HSP70 seviyeleri değerlendirildi. Görüntüleme verilerine göre penumbra/infarkt hacmi, kan örneklerindeki biyobelirteç seviyelerine göre NSE/HSP70 ve S100B/HSP70 oranları karşılaştırıldı.

Bulgular: Sonuçlarımıza göre ne penumbra hacmi nede infarkt hacmi ile HSP-70, NSE veya S100B arasında anlamlı bir korelasyon izlenmedi (tüm korelasyonlar için $p>0.05$). Penumbra/infarkt hacim oranıyla HSP-70/NSE ve HSP-70/S100B oranları arasında da korelasyon yoktu ($p>0.05$).

Sonuç: Akut iskemik inme hastalarında penumbra ve infarkt hacmini HSP-70, NSE ve S100 B düzeyleri yansıtmaz ve penumbra/infarkt oranı ile NSE/HSP70 oranı ve S100B/HSP70 oranı arasında ilişki olmadığından akut iskemik inme tanı ve tedavisinde bu oranların kullanılması uygun değildir.

Anahtar kelimeler: İnme, İskemi, penumbra, infarkt, Strok, HSP-70, NSE, S100 B

SUMMARY

The Value of Heat Shock Protein-70 (Hsp-70), Neuron Specific Enolase (NSE) and S-100B Proteins in Detection of Penumbra / Infarct Area in Ischemic Stroke Patients

Objective: In our study, we aimed to evaluate the relationship between penumbra / infarct volume with NSE / HSP70 ratio and S100B / HSP70 ratio in patients presenting with acute ischemic stroke.

Method: Our study was planned as a prospective, observational and descriptive study. 135 patients who met the study criteria out of 166 patients who applied to the Emergency Service of KTÜ Medical Faculty Hospital between September 1, 2019 and April 1, 2020 with stroke symptoms were included in the study. After the patients were treated according to the current stroke treatment guideline, brain MRI perfusion and diffusion were performed as soon as possible. NSE, S100B and HSP70 levels were evaluated from blood samples taken simultaneously with imaging. According to imaging data, penumbra / infarct volume, NSE / HSP70 and S100B / HSP70 ratios were compared according to biomarker levels in blood samples.

Results: According to our results, there was no significant correlation between neither penumbra volume nor infarct volume and HSP-70, NSE or S100B ($p > 0.05$ for all correlations). There was also no correlation between the penumbra / infarct volume ratio and the HSP-70 / NSE and HSP-70 / S100B ratios ($p > 0.05$).

Conclusion: HSP-70, NSE and S100 B levels do not reflect penumbra and infarct volume in patients with acute ischemic stroke, and the use of these ratios is not appropriate in the diagnosis and treatment of acute ischemic stroke since there is no relationship between the penumbra / infarct ratio and the NSE / HSP70 ratio and the S100B / HSP70 ratio.

Anahtar kelimeler: Ischemia, infarct, penumbra, stroke, HSP-70, NSE, S100 B

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnme Tanımı	4
2.2. İskemik İnmede Kullanılan Biyobelirteçler	5
2.2.1. NSE (Nöron Spesifik Enolaz).....	7
2.2.2. S100B	8
2.2.3. HSP70.....	9
3. MATERYAL ve METOD	11
3.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri.....	11
3.2. Çalışmadan Dışlama Kriterleri.....	12
3.3. Verilerin Toplanması ve Kayıt.....	13
3.4. İstatiksel Analiz.....	20
4. BULGULAR.....	21
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	33
7. KAYNAKLAR	34

KISALTMALAR LİSTESİ

BT/CT:	Bilgisayarlı tomografi
DWI-MR:	Difüzyon ağırlıklı magnetik rezonans görüntülemesi
İv:	intravenöz
r-TPA:	Doku Plazminojen Aktivatörü
ADC:	görünür difüzyon katsayısı
FLAIR:	fluid attenuation inversion recovery
DAG:	difüzyon ağırlıklı görüntüleme
MRP/PWI-MR:	Perfüzyon ağırlıklı magnetik rezonans görüntüleme
ER:	Endoplazmik retikulum
BNP:	Brain natriüretik peptid
CRP: C	reaktif protein
MMP-9:	Matrix Metalloproteinaz-9
VCAM-1:	Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü-1
ICAM:	Hücrelerarası Adhezyon Molekülü
GFAP:	Glial fibriler asidik protein
NSE:	Nöron Spesifik Enolaz
S100B:	Kalsiyum bağlayıcı protein
HSP:	ısı şok proteini
GIA/TIA:	geçici iskemik atak
İKK:	intrakranyal kanama
BOS:	beyin omurilik sıvısı
PET:	Pozitron Emisyon Tomografisi
MCA:	orta serebral arter
KBB:	kan beyin bariyeri

SSS:	Santral sinir sistemi
ACA:	Anterior serebral arter
KTÜ:	Karadeniz Teknik Üniversitesi
GKS:	Glaskow Koma Skoru
NIHSS:	Ulusal Sağlık İnme Ölçeği
SKB:	Sistolik Kan Basıncı
DKB:	Diastolik Kan Basıncı
ICA:	İnternal Karotis arter



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekik 1:	Çalışma Akış Şeması.....	12
Şekik 2.	NSE Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği	16
Şekik 3.	HSP70 Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği	18
Şekik 4.	S100B Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği.....	19



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1:	Çalışma Grubuna Ait Temel Klinik ve Demografik Özellikler	22
Tablo 2:	Penumbra Olan ve Olmayan Vakalara Ait HSP, NSE ve S100B Düzeyleri	24
Tablo 3:	Penumbra Olmayan Vakalar Dışlanarak, Penumbra Hacmi, İnfarkt Hacmi Ve Biyomarkerlar Arasındaki Korelasyon	24
Tablo 4:	Penumbra/İnfarkt Hacmini Oranı ve HSP-70/NSE ve HSP-70/S100B Oranlarına Ait Korelasyon Sonuçları	24

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akut iskemik inme önemli mortalite ve morbidite ile sonuçlanan acil bir klinik durumdur. Erken tanı ve uygun reperfüzyon tedavileri ile iskemik inmeye bağlı morbidite ve mortalite önemli derecede azaltılabilir (1-4). İskemik inme yönetiminde akut dönemde bilgisayarlı tomografi (BT) tanı koydurucu değildir. Ancak iskemik inme düşünülen hastalarda başvuru anında alınan BT hemorajik inme ile ayrımını sağlar ve hastaların reperfüzyon tedavisi alıp almayacakları konusunda yol gösterir (5). Aynı anda yapılan serebral BT anjiyografi ise büyük damarlarda okluzyon saptanması halinde endovasküler reperfüzyon tedavi ihtiyacına yol gösterir (6,7). Günümüzde akut iskemik inme tanısında başvurulabilecek daha etkin ve altın standart kabul edilebilecek yöntem Difüzyon ağırlıklı magnetik rezonans incelemesidir (DWI MR) (8,9). Bu işlem ise maliyeti, her zaman ve her merkezde ulaşılabilir olmaması, hastanın acil servis dışına transportunun gerekmesi ve zaman alıcı olması nedeniyle rutin olarak reperfüzyon tedavileri öncesinde tanı amacıyla önerilmemektedir (10,11). İskemik inme hastalarının tedavisi, güncel kılavuzlara göre klinik bulgular ve BT/CT anjiyografi bulguları esas alınarak yapılmaktadır (12). İskemik inme hastalarında sistemik tromboliz için IV (intravenöz) r-tPA kullanılmakta ve kullanımı için önerilen ideal süre inme sonrası semptomların başlangıcından itibaren ilk 3 saattir. Ancak 4,5 saate kadar uzatılabilir (1,13-15). Endovasküler tedavi için ideal zaman aralığı ise ilk 6 saat olmakla birlikte 12-24 saate kadar uzatılabilir (16-18). Reperfüzyon tedavisi yapılmadan geçen her dakika hastanın mortalite ve morbidite oranlarına olumsuz katkı yapar (15). Dolayısı ile akut iskemik inme yönetimi zamanla yarışılan bir tanı ve tedavi süreci olup güncel rehberler tarafından bu tanı ve tedavi yaklaşımları belirli sürelerle sınırlandırılmıştır (12).

Akut iskemik inme yönetiminde uygulanan tanı ve tedavi algoritmi, her ne kadar güncel yaklaşım bu şekilde olsa da bazı önemli eksikliklere sahiptir. Bunlardan bir tanesi, iskemik inme tanı ve tedavi yaklaşımında köşe taşı olan bilginin - semptomların başlangıç zamanının- hasta ve hasta yakınlarından alınmasıdır. Hasta ve hasta yakınlarının verdiği semptomların başlangıç süresi ile ilgili bilginin

doğruluğunu tespit etmek oldukça güçtür ve tüm tanı ve tedavi sürecinin bu bilgi esas alınarak planlanması tartışmalıdır. Çünkü hastaların bir kısmı inme geçirdikleri sırada yalnızdırlar veya uykudadırlar. Hatta hasta yakınlarının yanında semptomlar başlasa dahi bu semptomların iskemik bir inmeye ait olduğunun hasta yakınları tarafından saptanması ve kritik öneme sahip başlangıç süresinin doğru olarak tespit edilmesi her zaman mümkün değildir. Ülkelerin sosyokültürel ve kişilerin entelektüel düzeyleri bu sürece belirgin etki edebilir. Dolayısı ile hangi hastaların reperfüzyon tedavisi alacağına yön verecek daha objektif yöntemlere ihtiyaç söz konusudur. Bunların yanı sıra, reperfüzyon tedavisi esas olarak infarktın henüz olgunlaşmadığı alan ve penumbra alanı üzerine etkilidir. Dolayısı ile penumbranın varlığı ve büyüklüğünün (penumbra hacmi/infarkt hacmi veya etkilenen doku hacmi) işlem öncesinde tespit edilmesi reperfüzyon tedavisinin etkinliğini işlem öncesinde belirleyebilir, reperfüzyon tedavisine aday hastaları doğru tespit edebilir, hangi hastaların reperfüzyon tedavilerinden fayda göreceğini, hangi hastalarda ise reperfüzyon tedavileri ile komplikasyonlar (kanama, beyin ödemi) gelişebileceğini öngörebilir.

Günümüzde iskemik inme hastalarında rutin uygulamada DWI MR da ADC (görünür difüzyon katsayısı), FLAIR (fluid attenuation inversion recovery), DAG (difüzyon ağırlıklı görüntüleme) sekanslarına bakılarak infarkt kesin tanısı konulmaktadır (19). Ancak, rutin kullanılan DWI MR penumbranın belirlenmesi için yeterli değildir. Penumbranın tespit edilmesi için CT perfüzyon veya MR perfüzyon (MRP/PWI MR) kullanılabilir (20). Çalışmamızda infarkt hacmi ve penumbra hacmi hesaplanması hedeflenmektedir. Bu değerlendirmeler deneyimli bir nöroradyolog tarafından bilgisayar ortamında C.G. Filippi ve arkadaşları tarafından uygulanan metod ile hesaplanacaktır. (21)

Günümüz iskemik inme yaklaşımındaki eksiklikleri giderebileceği öngörüsü ile biyobelirteçler üzerinde birçok araştırma gerçekleştirilmektedir. Iskemik inme patofizyolojisinde yer alan koagülasyon, inflamasyon, oksitadif hasar (reaktif oksijen radikalleri, mitokondrial hasar) ve ER stresi, ortaya çıkan nöronal/glial hasar süreçleri göz önüne alınarak bazı biyomarkerlar hakkında kısıtlı sayıda ve özellikle çalışma gerçekleştirilmiş ancak halen iskemik inme tanı ve tedavi yaklaşımında rutin kullanıma girecek yeterlikte bilgi birikimi sağlanmamıştır. Ancak erken dönemde

tanı koydurabilen güvenilir bir biyobelirteç inme yönetim algoritmasını değiştirebilir. İskemik inmeyle ilişkilendirilen bazı biyobelirteçler; BNP (Brain Natriüretik Peptid), D-dimer, von Willebrand Faktör, CRP (C-reaktif protein), MMP-9 (Matrix Metalloproteinaz-9), VCAM-1 (Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü-1), ICAM (Hücrelerarası Adhezyon Molekülü), GFAP (Glial fibriler asidik protein), NSE (Nöron Spesifik Enolaz), S100B (Kalsiyum bağlayıcı protein)'dir. Literatüre baktığımızda İskemik inmeli hastalarda infarkt volümünü öngörmeye NSE ve S100B biyobelirteçleri kullanılabilir (22).

Literatüre baktığımızda iskemik penumbra volümü ile ilişkilendirilen bir biyobelirteç henüz bildirilmemiştir. Böyle bir belirteç akut iskemik inme yönetimini değiştirebilir. Serebral kan akımının azaldığı iskemik dokulardan salınan pek çok molekül tanımlanmıştır (23). Penumbra dokuda glikoz daha yüksek, glutamat daha düşük olma eğilimindedir (24,25). İskemiye rağmen hayatta kalan hücreler, strese yanıt olarak ısı şok proteinleri (HSP-27, HSP-70, HSP-72), α -B-kristalin, hemoksijenaz-1, nöregulin-1, siklooksijenaz-2 gibi proteinler eksprese ederler (26). HSP70; hücrelerin çekirdeğinde bulunan, protein katlanmasında rol alan bir sitoprotektif proteindir (27). Yapılan deneysel çalışmalar HSP-70 düzeylerinin iskemik penumbranın bir göstergesi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (28, 29).

Sonuç olarak özetle, iskemik inme yönetiminde tedavinin en önemli basamağı olan reperfüzyon tedavilerine aday olacak hastaların belirlenmesi, reperfüzyon tedavilerinden fayda görecektir hastaların belirlenmesi, reperfüzyon tedavisi sonrası kanama gibi komplikasyonlar gelişebilecek hastaların öngörülmesi açısından kullanılan geçerli bir biyobelirteç mevcut değildir. Çalışmamızda bu amaçla penumbrayı yansıtacağını düşündüğümüz HSP-70 ve infarkt alanını yansıtacağını düşündüğümüz NSE ve S100B biyobelirteçleri incelenecek ve elde edilecek HSP-70/NSE veya HSP-70/S100B oranlarının, PWI-DWI MR incelemeleri altın standart olarak kullanılarak yapılacak penumbra/infarkt oranını yansıtacağı hipotezi ile bu araştırma planlanmıştır. Eğer hipotezimiz doğru ve geçerli ise elde edilecek oran iskemik inme hastalarının tanı ve tedavilerine yön verebilir, hasta ve hasta yakınlarından alınan ve güvenilirliği tartışmalı semptomların başlangıç süresine göre yapılan iskemik inme yönetimi yerine bu oran tabanlı iskemik inme yönetim algoritmi klinik kullanıma girebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnme Tanımı

İnme, dünyada hastalıklardan dolayı ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelmektedir (30). İnme önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir.

Geleneksel tanımıyla inme; ani başlayan, 24 saatten uzun süren, spinal kord, beyin veya retinadaki hasar sonucunda meydana gelen fokal nörolojik disfonksiyon olarak tanımlanabilir. Semptomların 24 saatten uzun sürmesi ile Geçici iskemik ataktan (GİA) ayrılır. İnmenin güncel tanımı ise ani başlayan, spinal kord, beyin veya retinadaki hasarın görüntüleme yöntemleri (CT/MRI) veya otopsi ile kanıtlandığı (hemoraji/infarkt) fokal/global nörolojik disfonksiyondur (31). Kliniğe neden olan vasküler orijin dışında, başka patolojinin olmaması gerekir. Güncel tanımıyla inme, sessiz beyin infarktlarını da kapsamaktadır.

Sessiz inme; herhangi bir klinik semptom olmadan, görüntüleme yöntemleriyle (MRI) infarkt saptanmasıdır. Bu infarktların çoğu subkortikal beyaz cevherdedir, %10 kadarı kortikaldir. Epidemiyolojik çalışmalar inmelerin %30'unun sessiz inme olduğunu göstermektedir (32). Sessiz inmeler gelecekteki semptomatik inmeler için 2 kat risk oluşturmaktadır (33).

Geçici iskemik atak; görüntüleme yöntemleriyle infarkt/hemoraji tespit edilmeyen, geçici fokal nörolojik disfonksiyon (beyin, spinal kord, retinayı ilgilendiren) epizodu olarak tanımlanabilir (34,35). GİA'yı inmeden ayırabilmek için, görüntüleme yöntemleriyle end organ hasarının (infarkt/hemoraji) olmadığı kanıtlanmalıdır.

İnme, bir serebrovasküler hastalıktır. Serebrovasküler hastalıklar beyin damarlarıyla ilgili çeşitli patolojiler sonucunda ortaya çıkarlar. Bu patolojileri kabaca 4 gruba ayırabiliriz.

Bu patolojiler;

1. Beyin damarları içindeki bir patolojiden (atheroskleroz, inflamasyon, arteriyel diseksiyon, anevrizmatik dilatasyon, venöz tromboz) kaynaklanabilir.
2. Beyin dışındaki bir odağın (kalpten gelen bir emboli) beyin damarlarını etkilemesi sonucunda oluşabilir.
3. Azalmış perfüzyon basıncı/ artmış kan viskozitesi nedeniyle azalmış serebral kan akımı nedeniyle oluşabilir.
4. Beyin damarlarının rüptüre olması sonucunda (subaraknoid kanama, intraserebral kanama) gelişebilir.

İlk üç oluşum mekanizması iskemik inme ile sonuçlanırken, dördüncüsü hemorajik inme ile sonuçlanır. İnmelerin %80'i iskemik inme, %20'si hemorajik inmedir (35). Hemorajik inme; subaraknoid kanama ve intrakranyal hemorajidir (İKK).

İskemik inme; 3 ana nedenden kaynaklanır. Trombotik, embolik ve sistemik hipoperfüzyon nedenlidir. Trombotik inme; bir arterde trombüs oluşması sonucu arterin distalinde kan akımının azalması sonucunda, arterin beslediği alanda iskemik oluşması sonucunda gelişir (35).

2.2. İskemik İnmede Kullanılan Biyobelirteçler

İskemik inme; tanısının hızlıca konulması ve tedavisine en kısa sürede başlanması gereken nörolojik bir acildir. Günümüz tedavi yaklaşımları nörogörüntüleme yöntemleri ve kliniğin birlikte değerlendirilmesiyle oluşturulmuş algoritmalarla oluşur. Tedavi yaklaşımlarına yön verecek, algoritmaya girmiş herhangi bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Hastaların iskemik inme mi geçirdiği yoksa inmeyi taklit eden ama patolojisi tamamen farklı olan hastalığa mı sahip olduğunu ayırt etmemize yarayan, reperfüzyon tedavisinden fayda görecektir hastaları belirleyebilen, kısa sürede miktarı ölçülebilen, tedaviye faydası olacak bir biyobelirteç olması tedavi algoritmini tamamen değiştirebilir.

Biyobelirteçler, tespit edilebilen, objektif olarak tekrar tekrar ölçülebilen, belirli fizyolojik karakterleri olan biyolojik maddelerdir. Biyobelirteçler, fizyolojik/patolojik süreçlerin veya terapötik müdahalelerin farmakolojik cevaplarının göstergeleri olarak kullanılabilirler. Biyobelirtecın duyarlılığı (sensitivite), hastalığın varlığını tespit etme yeteneği olarak tanımlanırken, biyobelirtecın özgüllüğü (spesifite) ise hastalık olmadığı zaman hastalığı dışlama yeteneği olarak tanımlanır (36).

Bir biyobelirtecın iskemik inmede yararlı olabilmesi için; inme riskini belirleyebilmesi, patolojik mekanizmayı aydınatabilmesi, akut dönemde inme tanısını koyabilmesi, inme mimiklerini iskemik inmeden ayırt edebilmesi, inmenin prognozunu tahmin edebilmesi, komplikasyon gelişimini öngörebilmesi vs. gibi özelliklere sahip olabilmesi gerekir. İnmenin kompleks yapısı düşünüldüğünde tek bir biyobelirtecın tüm bu özelliklere sahip olması beklenmemelidir. Günümüzde bu özelliklerden herhangi birine sahip bir iskemik inme biyobelirteci tespit edebilmek için biyobelirteçler üzerinde birçok araştırma gerçekleştirilmektedir. Şimdiye kadarki araştırmalarda kullanılan biyobelirteçler; ya inmenin patofizyolojisinde yer aldığı için ya postmortem BOS (Beyin omurilik sıvısı)’da saptandığı için ya da proteomik analiz yapılarak seçilmiştir. İskemik inme patofizyolojisinde yer alan koagülasyon, inflamasyon, oksitadif hasar (reaktif oksijen radikalleri, mitokondrial hasar) ve ER (Endoplazmik retikulum) stresi, ortaya çıkan nöronal/gliyal hasar süreçleri göz önüne alınarak bazı biyomarkerlar hakkında kısıtlı sayıda ve özellikte çalışma gerçekleştirilmiş ancak halen iskemik inme tanı ve tedavi yaklaşımında rutin kullanıma girecek yeterlikte bilgi birikimi sağlanmamıştır. İskemik inmeyle ilişkilendirilen bazı biyobelirteçler; BNP, d-dimer, fibrinojen, von Willebrand Faktör (vWF), CRP, MMP-9, VCAM, ICAM-1, GFAP, NSE, S100B, kaspaz -3, kopeptin’dir (36).

Literatüre baktığımızda iskemik inmeli hastalarda infarkt volümünü öngörmeye NSE ve S100B biyobelirteçleri kullanılabilir (22, 37). 12 çalışmayı ve 597 hastayı içeren bir sistematik çalışmanın sonucunda; NSE’nin iskemik inmenin tanısında limitli bir yeri olduğu ancak NSE değerlerinin inme geçiren hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, yüksek NSE değerlerinin infarkt volümü ile korele olduğu, yüksek NSE değerlerinin nörolojik defisit derecesiyle korele

olduğu görülmüştür (38). Serum S100B düzeylerinin iskemik inmeli hastalarda infarkt volümü ile korele olduğu görülmüştür (39). Ayrıca yüksek Serum S100B düzeylerinin TPA alan iskemik inmeli hastalarda hemorajik transformasyonu öngörmede bir risk faktörü olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (40).

Reperfüzyon tedavilerinin hedefi olan iskemik penumbra, günümüzde MRI veya PET (Pozitron Emisyon Tomografisi) ile tespit edilebilmektedir, ancak bu teknikler her merkezde bulunmaz ve değerlendirilmeleri zordur. Penumbranın tespiti için daha kolay bulunabilen, daha az maliyetli bir biyobelirteç olsa, inme yönetimini değiştirebilir. Günümüzde penumbrayı tespit edebilen bir biyobelirteç henüz mevcut değildir. Akut iskemik inmeli hastalarda penumbra (kurtarılabılır beyin dokusu) volümü ile korele bir biyobelirteç inme yönetimini değiştirebilir. Serebral kan akımının azaldığı iskemik dokulardan salınan pek çok molekül tanımlanmıştır (23). Penumbra dokuda glikoz daha yüksek, glutamat daha düşük olma eğilimindedir (24,25). İskemiye rağmen hayatta kalan hücreler, strese yanıt olarak ısı şok proteinleri (HSP-27, HSP-70, HSP-72), α -B-kristalin, hemoksijenaz-1, nöregulin-1, siklooksijenaz-2 gibi proteinler eksprese ederler (26). HSP70; hücrelerin çekirdeğinde bulunan, protein katlanmasında rol alan bir sitoprotektif proteindir (27). Yapılan deneysel çalışmalar HSP-70 düzeylerinin iskemik penumbranın bir göstergesi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (28, 29).

2.2.1. NSE (Nöron Spesifik Enolaz)

Glikolitik enzimlerden biri olan enolaz (2- fosfo D- gliserat hidrolaz), 2-fosfogliseratın fosfoenolpruvata dönüşmesinde katalizör rol oynar. Enolaz, 78.000 moleküler ağırlığı olan, üç alt birimden (alfa, beta, gama) oluşan dimerik bir proteindir. Nöroendokrin ve nöronal hücrelerde yüksek konsantrasyonda bulunan gama gama alt ünitesinin diğer adı nöron spesifik enolaz (NSE) olarak bilinir. NSE, eritrositlerde de az miktarda bulunur. İskemik inme geçiren hastalarda infarkt volümünün tahminini sağlar. Uzun süreli depolama kandaki seviyesini etkilemez. Eritrositlerin içinde de bulunduğundan örnek alınırken hemolizden kaçınmak gerekir (36,41).

NSE'nin akut iskemik inmeli hastalarda çalışıldığı pek çok çalışma mevcuttur. Baron ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada, MCA (Orta

serebral arter) okluzyonu sonrası gelişen infarktlı doku hacminin BOS'taki NSE seviyeleriyle korele olduğu gösterilmiştir. NSE seviyelerinin okluzyondan sonraki 2. Saatte artmaya başladığı ve bu artışın 2,5 gün boyunca devam ettiği görülmüştür (42,43).

NSE infarkt büyüklüğünü gösteren protein yapılı bir enzimdir. Normalde plazmada çok az miktarda bulunur. Beyin dokusunda iskemik bir hasar olduğunda, BOS'a ve KBB (Kan Beyin Bariyeri)'yi aşarak plazmaya geçer ve plazmada miktarı yükselir. İnfarkta bağlı hasar devam ettiği sürece, serum NSE seviyelerinin artması beklenir (44). İskemik inme ve trvamtik beyin hasarı gibi bazı nörolojik hastalıklarda NSE'nin yükseldiği gösterilmiştir. NSE yükselmesi inme hastalarının küçük bir kesiminde ilk 24 saatte gözlenir. İlk 72 saatte olan NSE yükselmeleri ise inmenin şiddeti ve nörolojik hasar ile koreledir. Yüksek NSE seviyeleri, başvuru anındaki inmenin şiddetiyle de pozitif olarak koreledir (45).

2.2.2. S100B

S100B, glial hücrelerle ilişkili protein yapılı bir biyobelirteçtir. Hücre döngüsünün ilerlemesi ve farklılaşmasını sağlayan kalsiyum bağlayıcı proteindir. Astrosit- nöron iletişiminden sorumludur. Hücre içi sinyal iletimini sağlar. SSS'nin geliştirilmesi, büyümesi ve onarımında görev alır. Astrositlerde, Schwann hücrelerinde, adipozitlerde ve melanositlerde bulunur. İnme prognozunda, infarkt ve hematoma volümü nün tahmininde kullanılabilir. Trombolitik tedavi sonrası hemorajik transformasyon gelişim riskini öngörebilir. İnmenin şiddeti ile koreledir. Uzun süreli depolama örnek bütünlüğünü bozabilir (36).

SSS (Santral sinir sistemi) dokusundaki bir hasar sonucunda, glutamat eksitotoksitesisi gelişir, S100B salınımı olur. S100B astrositlerin diferansiyasyonunda, nöron hücresinin ölümünde veya hayatta kalmasında kompleks rol oynar. S100B serumda sadece iskemik inmede saptanmaz aynı zamanda travmatik beyin hasarı ve intrakranyal hemoraji gibi SSS hasarının görüldüğü durumlarda da serumda artar. Birçok çalışma S100B'nin iskemik inmeli hastalarda, TIA ve İKK'sı olan hastalardan daha fazla arttığını göstermiştir. Yine S100B seviyeleri iskemik inmeli hastalarda, sağlıklı kontrollere göre daha fazladır (22).

S100B, travmatik beyin hasarı sonrasında 1-2 gün içinde yükselir. İskemik inmede semptom başlamasından saatler sonra yükselir, 48 saatte pik yapar (22). S100B'nin plazma seviyesinin $> 0,35 \mu\text{g/L}$ olması; 12 saatte malign infarkt gelişimi olacağını %75 sensitivite ve %80 spesifite, 24 saatte malign infarkt gelişeceğini %94 sensitivite ve %83 spesifite ile öngörmemize yarar (46).

2.2.3. HSP70

İskemik inmeyle ilgili yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, beyin iskemi sonrası kendisini korumak amacıyla stres yanıtı verir. Bu stres yanıtının en çok incelenen kısmı Heat Shock proteinleri (Hsp) ailesidir. Bu aile ilk olarak ölümcül olmayan ama yüksek miktarda ısıya maruz kalındığında tanımlanmıştır. Bu aileden en çok bilineni Hsp70'dir. Bu proteinin hücre içerisinde protein katlanmasında, bozulmasında ve translokasyonunda sitozolik bir şaperon olarak görev aldığı düşünülmektedir. Bu görevler sayesinde hasar görmüş proteinlerin birikmesini önler, yeni sentezlenmiş proteinlerin polipeptidlerinin birleştirilmesine yardımcı olur (47).

Son iki dekad boyunca yapılan iskemik inme çalışmalarında Hsp70'in apoptoz, nekroz ve pek çok hücre ölümü mekanizmalarında hücreyi ölümden koruduğu gözlenmiştir. Hatta deneysel inme çalışmalarında apoptozu durdurduğu gösterilmiştir (48). Son çalışmalarda Hsp70'in inflamatuvar yolakları module ettiği gösterilmiştir. Deneysel inme modellerinde, Hsp70'in fazla oluşumunun, akut iskeminin muhtemel hasarlarından hücreyi koruduğu gösterilmiştir. Normalde homeostatik koşullarda Hsp70 miktarı azdır, ancak hasar sonrası Hsp70'in fazla miktarda yapımının arttığı görülür. Deneysel inme modellerinde Hsp70'in nöroproteksiyona neden olduğu gösterilmiştir (47).

Hsp70'in fazla yapımı ile iskemik inmeye toleransın artışı arasında güçlü bir bağ vardır. Sharp ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 10 dakikalık fokal serebral iskemi sonrasındaki 24 saat boyunca MCA sulama alanında Hsp70 yapımının arttığı görülmüştür. MCA okluzyonundan 1,5 saat sonra, MCA sulama alanının çoğu bölgesinde enfarkt geliştiği ama MCA sulama alanı ile ACA (Anterior serebral arter) sulama alanının kesiştiği yerlerde (sınır) belli miktarda Hsp70 indüksiyonunun olduğu görüldü. MCA okluzyonundan 10dk sonra, tüm MCA sulama alanında Hsp70

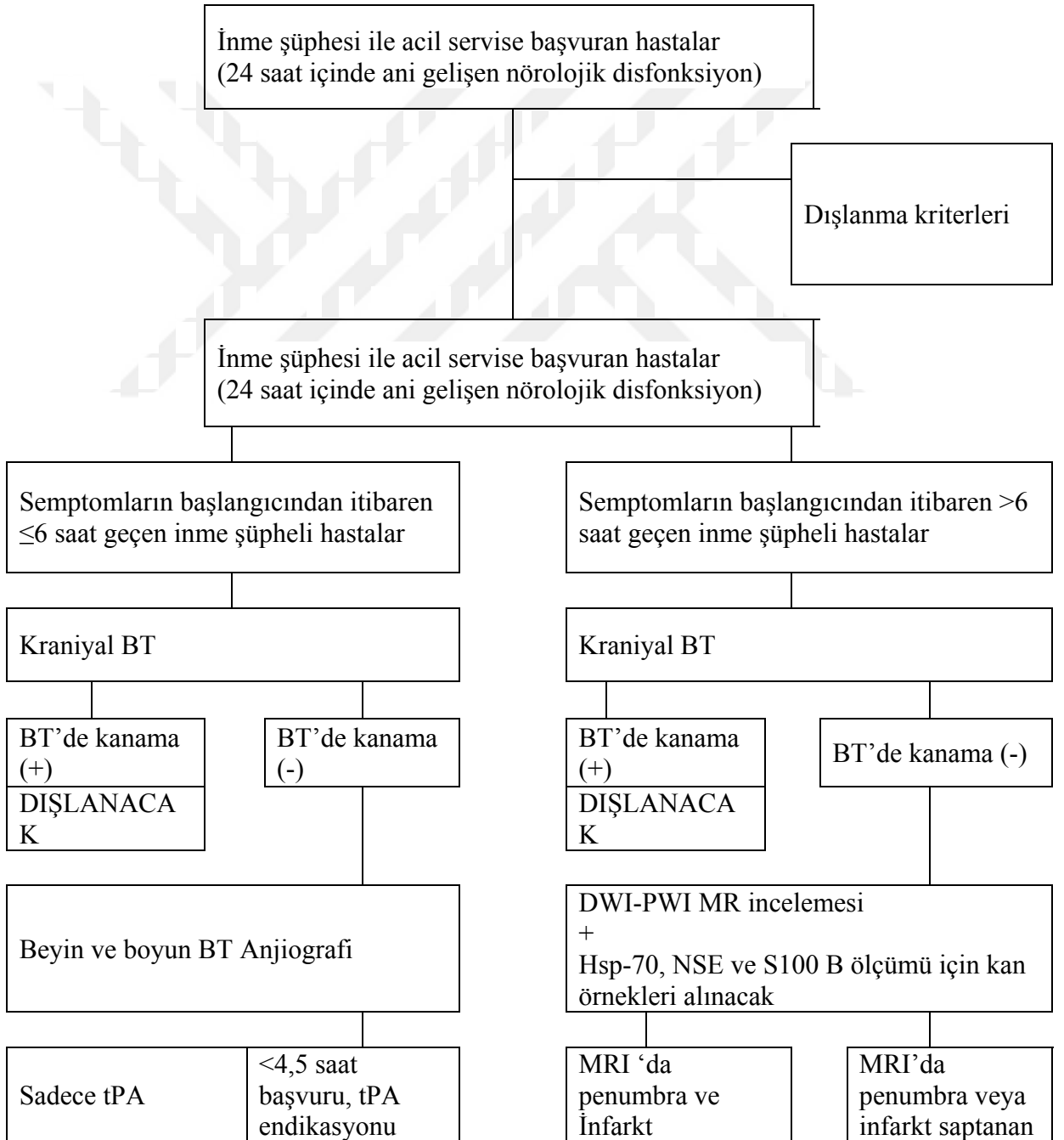
miktarının arttığı görüldü, 2 saat sonra ise MCA ile ACA'nın sulama alanlarının kesiştiği yerlerin genişlediği görüldü. Bunun sonucunda Hsp70'in penumbra nöronlarında daha fazla indüklendiği ve nöroproteksiyon sonucu penumbranın daha uzun ömürlü olduğu düşünülmektedir (49).

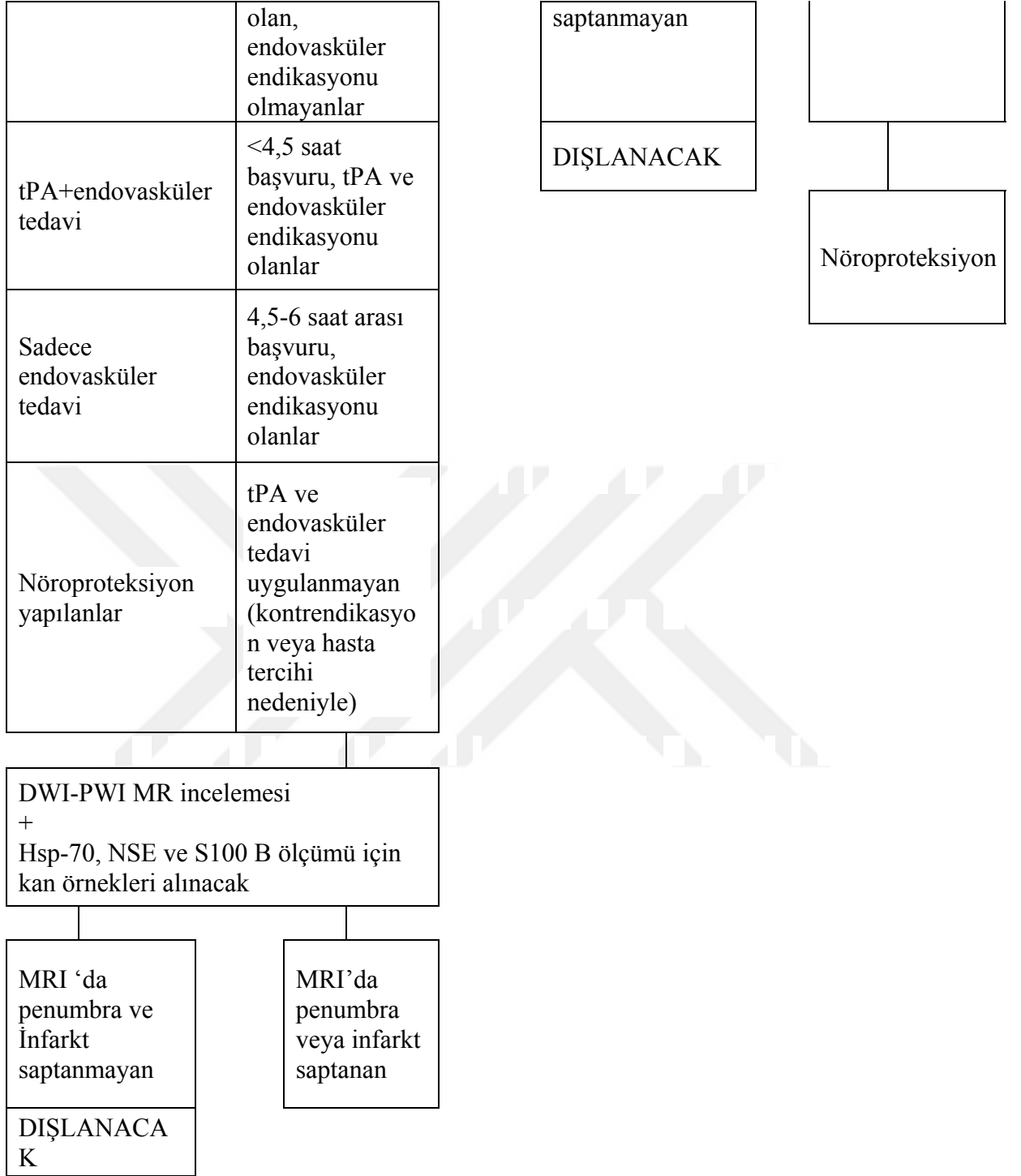


3. MATERYAL ve METOD

3.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp fakültesi hastanesi Acil servisine iskemik inme semptomları başvuran ve inme ön tanısı ile Şekil 1’de gösterilen algoritme göre takip edilen ve dışlama kriterleri olmayan 18 yaş üstü tüm hastalar etik kurul onayı alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi.





Şekik 1: Çalışma Akış Şeması

3.2. Çalışmadan Dışlama Kriterleri

Şekik 1’de gösterildiği üzere, BT’de kanama saptanan, 6 saat sonraki DWI MRI incelemesinde penumbra ve infarkt saptanmayan (inme benzeri klinik ve TIA) hastalar, çalışma için onam vermeyen hastalar, çalışma formunda eksik bilgisi olan (örneğin dış merkezden gelip görüntüleme tetkiklerine ulaşamagımız vs.) hastalar,

akut böbrek yetmezliği/ karaciğer yetmezliği gibi hastalıkları olan biyobelirteçlerin serum düzeylerini değiştirebileceğini düşündüğümüz hastalar, gebe ve 18 yaşın altında olan hastalar çalışma dışında tutuldu. Buna ek olarak; kalp pili, protez gibi nedenlerle DWI-PWI MRI incelemesi yapılamayan hastalar da çalışma dışında tutuldu.

3.3. Verilerin Toplanması ve Kayıt

Prospektif, gözlemsel, tanımlayıcı bir araştırma olarak planlanan araştırma KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Acil Servisinde gerçekleştirildi. Çalışma için dahil olma kriterlerine uygun olan hastalardan bir çalışma formu yardımıyla çalışmanın verileri toplandı. Veriler toplandıktan sonra Microsoft Excell sistemine kaydedildi.

Çalışmanın protokolü:

Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik ve klinik bilgileri oluşturulan çalışma formu ile kayıt altına alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalara 2018 AHA/ASA rehberine uygun olarak geliştirilmiş ve Şekik 1’de özetlenmiş KTÜ Tıp fakültesi hastanesi akut iskemik inmeli hastaya rutin tanı ve tedavi yaklaşımı uygulandı.

2018 AHA/ASA yaklaşımına göre; klinik bulguları itibari ile inme geçirdiği düşünülen tüm hastalara Beyin BT çekildi, BT’de kanaması olan hastalar çalışmadan dışlandı. Beyin BT’de kanama görülmeyen hastalar semptom başlangıç sürelerine göre AHA/ASA güncel tedavi kılavuzuna göre tedavi edildi. Semptom başlangıç süresi bilgisi hasta oryante ve koopere ise hastadan, değil ise yakınından alındı. Semptom başlangıcından itibaren hastaneye başvurana kadar ≤ 6 saat geçen hastalara Beyin BT Anjiyografi ve Boyun BT Anjiyografi çekildi ve bu hastalar tedavi yöntemlerine göre 4 gruba ayrıldı. Bu gruplar; 1) Sadece r-TPA tedavisini alan hastalar, 2) r-TPA+ endovasküler tedavi alan hastalar, 3) Sadece endovasküler tedavi alan hastalar 4) r-TPA ve endovasküler tedavi almayan nöroproteksiyon yapılan hastalar şeklinde oluşturuldu. Bu hastalardan tedavileri bittikten hemen sonra biyokimyasal markerların (NSE, S100B, HSP-70) ölçümü için kan alındı, akabinde bu hastalara DWI-PWI MRI çekildi. MRI’da penumbra veya infarkt saptanmayan

hastalar çalışmadan dışlandı. Semptom başlangıcından itibaren hastaneye başvurana kadar >6 saat geçen ve BT’de kanama görülmeyen hastalardan biyokimyasal markerların (NSE, S100B, HSP-70) ölçümü için hemen kan alındı, akabinde bu hastalara DWI-PWI MRI çekildi. MRI’da penumbra veya infarkt saptanmayan hastalar çalışmadan dışlandı. Ayrıca çalışmaya dahil edilen hastalardan akut böbrek yetmezliği/karaciğer yetmezliği gibi komorbid durumları olanlar, bu hastalıkların biyobelirteçlerin miktarını değiştirebileceğinden penumbra /infarkt alanı belirlenmesinde bağıl alan ölçülmesini etkilememesi için çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmamız için yapılan MRI incelemeleri ve kan örnekleme hastaların rutin tanı ve tedavi yaklaşımını değiştirmeyecek ve herhangi bir şekilde zaman kaybına veya ek bir inceleme yapılmasını gerektirmeyecek şekilde yapıldı.

Radyolojik incelemeler:

Tüm hastalara mevcut tedavilerini geciktirmeyecek ve etki etmeyecek şekilde en erken süre içinde DWI-PWI MRI incelemesi yapıldı. 3 Tesla (3T) MR cihazı (Magnetom Skyra; Siemens, Erlangen Germany) kullanılarak elde edilen difüzyon ve perfüzyon görüntülerde öncelikle infarkt core ve penumbra için her bir kesitte ROI bazlı manuel ölçümler yapıldı. Ölçümler infarkt ve penumbranın görüldüğü her bir kesitte tekrarlandı. ROI ile segmentasyon bittiği zaman cihazdan otomatik olarak hacim bilgileri alındı. Hastalardan infarkt koru gösterebilmek için difüzyon MR ile birlikte erken dönem inme işareti olan hiperintens arterleri gösterebilmek için FLAIR aksiyal kesitler alındı. Sonrasında intravenöz gadolinyum (0.1 mmol/kg) kullanılarak kontrastlı T2 star MR perfüzyon görüntüler elde edildi. Çalışmada infarkt core ve penumbra hacmi değerlendirmesi biyokimyasal ölçüm sonuçlarından kör, nöroradyoloji konusunda deneyimli bir nöroradyolog tarafından bilgisayar ortamında C.G. Filippi ve arkadaşları tarafından uygulanan metod ile hesaplandı (32).

Laboratuvar İncelemeleri:

Hasta grubunu oluşturan bireylerden onam formu eşliğinde seperatör jelli biyokimya tüpüne alınan kan örnekleri, oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek pıhtılaşmaları sağlandı. Sonrasında tüpler 1800×g’de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası serum kısımları dikkatlice kapaklı mikro hacimli tüplere aktarıldı ve

çalışılincaya kadar -80°C’de saklandı. Çalışma günü -80°C’de muhafaza edilen serumlar oda sıcaklığına getirilerek erimeleri sağlandı. Çözülen örnekler vortekslenerek homojen hale getirildi ve biyokimyasal parametrelerin ölçümü başlatıldı.

NSE Seviyelerinin Belirlenmesi

Serum örneklerindeki NSE seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (USCN, Cat No: SEA537Hu, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

NSE standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı. Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100’er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C’de çalkalayıcıda (ShellLab/Sheldon S14-2, Cornelius, USA) 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında pleyt içeriği pleyt yıkayıcının (BioTek, Winooski, USA) aspirasyon özelliği ile uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100’er µL biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C’de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 3 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.

Her bir kuyucuğa 100’er µL streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C’de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.

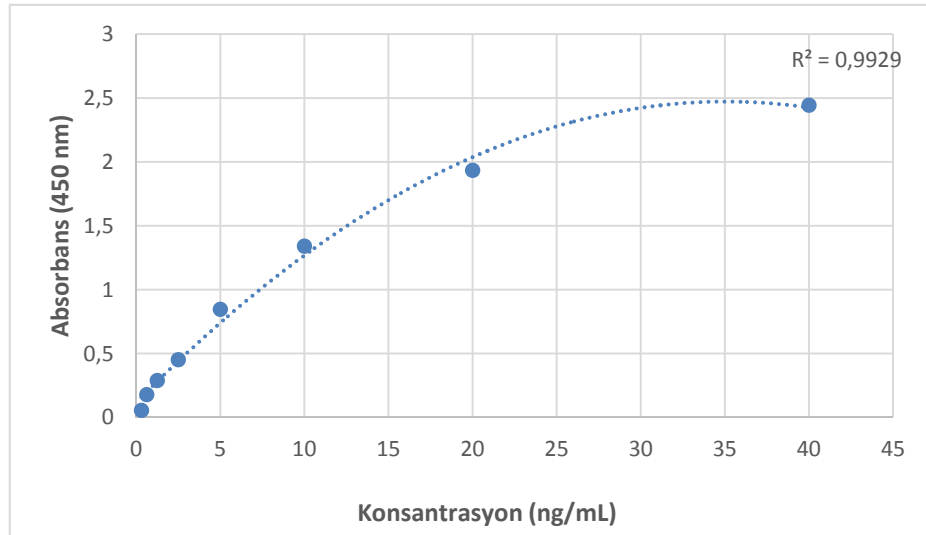
Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90’ar µL eklendi ve pleyt 37°C’de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

Referans dalga boyu olan 620 nm’deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun 0.9-0.95’e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa

50'şer µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.

Süre sonunda örnek ve standart absorbanları mikroplyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 450 nm dalga boyunda okundu.

Standart konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorban değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 1). Örneklerdeki NSE seviyeleri bu standart eğri kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar ng/mL birimi ile verildi. NSE ölçümü için intra-assay %CV değeri 3.3 olarak hesaplandı.



Şekil 2. NSE Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği

HSP70 Seviyelerinin Belirlenmesi

Serum örneklerindeki HSP70 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (USCN, Cat No: SEA873Hu, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

HSP70 standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı. Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda (ShellLab/Sheldon S14-2, Cornelius, USA) 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında pleyt içeriği pleyt yıkayıcının (BioTek, Winooski, USA) aspirasyon özelliği ile uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100'er µL biotinle işaretli antikör çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 3 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.

Her bir kuyucuğa 100'er µL streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

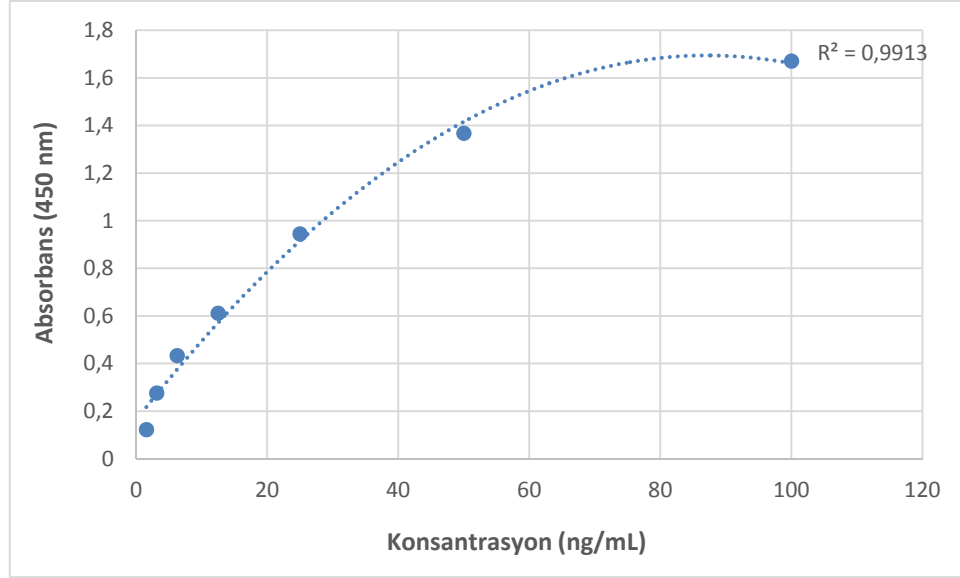
İnkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.

Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90'ar µL eklendi ve pleyt 37°C'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

Referans dalga boyu olan 620 nm'deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun 0.9-0.95'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.

Süre sonunda örnek ve standart absorbansları mikroyok okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 450 nm dalga boyunda okundu.

Standart konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu (**Şekil 3**). Örneklerdeki HSP70 seviyeleri bu standart eğri kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar ng/mL birimi ile verildi. NSE ölçümü için intra-assay %CV değeri 7.4 olarak hesaplandı.



Şekik 3. HSP70 Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği

Serum S100 B Seviyelerinin Belirlenmesi

Serum örneklerindeki S100B seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (USCN, Cat No: SEA567Hu, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

S100B standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı. Hem örneklerden hem de standartlardan her bir kuyucuğa 100'er µL olacak şekilde ilaveler yapıldı. Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda (ShellLab/Sheldon S14-2, Cornelius, USA) 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında pleyt içeriği pleyt yıkayıcının (BioTek, Winooski, USA) aspirasyon özelliği ile uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100'er µL biotinle işaretli antikor çözeltisi eklendi. Pleyt folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

Süre sonunda pleyt yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 3 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.

Her bir kuyucuğa 100'er µL streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi. Pleyt, tekrar folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

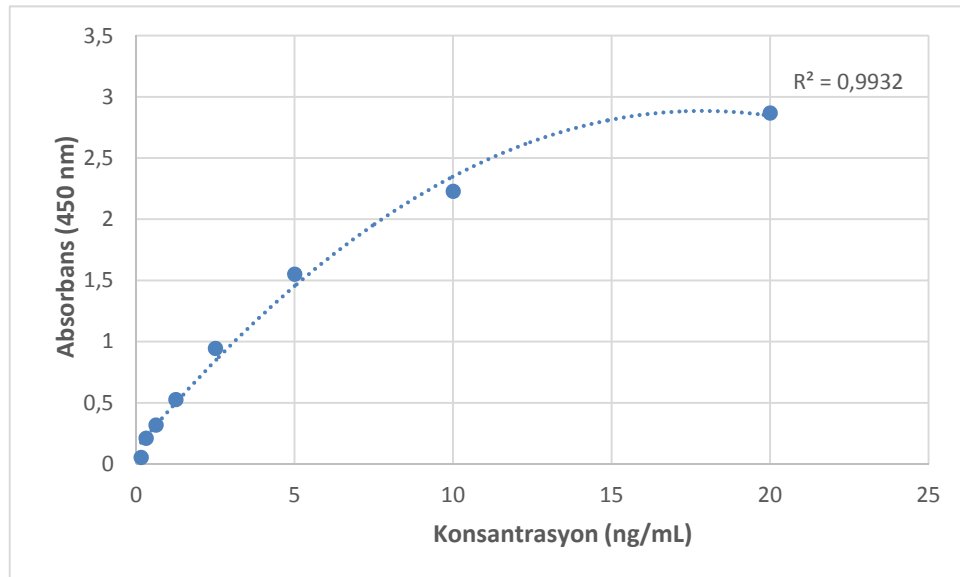
İnkübasyon sonrasında pleyt, yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı kullanılarak 5 kez yıkandı. Kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı.

Her bir kuyucuğa renklendirme için TMB substrat çözeltisinden 90'ar μL eklendi ve pleyt 37°C 'de çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

Referans dalga boyu olan 620 nm'deki ölçüm sonucunda, en yüksek standardın optik yoğunluğunun 0.9-0.95'e ulaşmasıyla birlikte her bir kuyucuğa 50'şer μL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.

Süre sonunda örnek ve standart absorbansları mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 450 nm dalga boyunda okundu.

Standart konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturuldu (**Şekik 4**). Örneklerdeki S100B seviyeleri bu standart eğri kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar ng/mL birimi ile verildi. S100B ölçümü için intra-assay %CV değeri 6.4 olarak hesaplandı.



Şekik 4. S100B Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği

3.4. İstatiksel Analiz

Çalışmanın örneklem merkezi KTÜ Farabi Hastanesi Acil servisi olarak belirlendi. KTÜ Farabi Hastanesi Trabzon ilinin 3.seviye acil merkezlerinden biri olup inme merkezi olarak görev yapan tek merkezdir. Örneklem büyüklüğü hesaplaması MedCalc programında gerçekleştirildi. Tanısal testler için AUC 0.90 olacak şekilde yapılan hesaplamada çalışmaya dahil edilecek minimum hasta sayısı 450 olarak hesaplandı. Fakat hesaplanan sürede ülkemizi ve tüm dünya ülkelerini etkisi altına alan COVID-19 pandemisi ve öngörülemeyen nedenlerden dolayı hedeflenen hasta sayısına ulaşılamayarak mevcut hasta sayısında çalışma sonlandırıldı.

Çalışmamızda veriler Windows exell programına kaydedildi ve istatistiksel analizler SPSS 23 ve MedCalc programlarında yapıldı. Belirlenen radyolojik P/EH oranı ile biyokimyasal P/EH oranı arasındaki ilişki ve uyum Pearson's korelasyon analizi ve Bland Altman analizi ile değerlendirildi. Tedaviden yarar sağlanan ve sağlanmayan, komplikasyon gelişen veya gelişmeyen gruplar gibi ikili grup karşılaştırmalarında normal dağılıma uyan verilerde T testi, normal dağılıma uymayan verilerde Mann Whitney U testi kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi, tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya 1 Nisan 2019-1 Nisan 2020 tarihleri arasında inme şüphesiyle başvuran 166 hasta dahil edildi. Çalışmada belirlenen dışlama kriterlerine sahip 31 vaka dışlandı. Bu vakalardan 12'si TİA olduğu için, 16 vaka MR incelemesinde ne infarkt nede penumbra alanı olmadığı için, 3 vaka çalışma formunda eksik bilgisi olması nedeniyle çalışma dışında tutuldu.

Çalışmanın Demografik ve Klinik Bulguları

Çalışmaya dahil edilen hastalara ait klinikve demografik özellikler **Tablo 1**'de yer almaktadır. Çalışmaya dahil edilen 135 hastanın 70'i kadın (%51.9) idi. Yaş ortalaması 74.5 ± 11.6 olarak saptandı. Çalışmaya dahil edilen hastaların başvuru vital bulgularından sistolik kan basıncı ortalaması 158.2 (28.4)' idi. Hastalar arasında başvuru anında en sık görülen fizik muayene bulgusu lateralize kuvvet kaybı (%79.3), en az görüleni ise nöbet semptomuydu %0,7).

Çalışmaya dahil edilen hastaların özgeçmişleri incelendiğinde; eşlik eden ek hastalıkların arasında en sık olan hipertansiyon (%65.2) olarak tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların başvuru GKS (Glaskow Koma Skoru)'si ortanca değeri 15 (8-15) olarak tespit edildi. Başvuru anındaki NİHSS (Ulusal Sağlık İnme Ölçeği) ortanca değeri 6 (0-22) olarak saptandı.

Tablo 1: Çalışma Grubuna Ait Temel Klinik ve Demografik Özellikler

Demografik Özellikler	
Yaş (Ort±SD)	74.5±11.6
Kadın	78.1±11.6
Erkek	70.8±10.6
Cinsiyet (n, %)	
Erkek	65 (48.1)
Kadın	70 (51.9)
Klinik Özellikler	
Vital Bulgular	
Ateş (C ⁰ , ort±SD)	36.2 (0.9)
SKB (mmHg, ort±SD)	158.2(28.4)
DKB (mmHg, ort±SD)	93.1 (19.5)
Nabız (vuru/dk, ort±SD)	82.4 (18.7)
Solunum Sayısı (nefes/dk, ort±SD)	21.8 (11.3)
SatO ₂ (% ,ort±SD)	98.1 (2.3)
Başvuru Semptom/Bulguları	
Lateralize uyuşukluk (n, %)	38 (28.1)
Lateralize kuvvet kaybı (n, %)	107 (79.3)
İhmal (n, %)	10 (7.4)
Lokal nörolojik defisit (n, %)	37 (27.4)
Görme kaybı (n, %)	5 (3.7)
Dizartri (n, %)	51 (37.6)
Motor afazi (n, %)	48 (35.6)
Duysal afazi (n, %)	39 (28.9)
Bilinç değişikliği (n, %)	32 (23.7)
Senkop (n, %)	8 (5.9)
Baş dönmesi (n, %)	4 (3.1)
Baş ağrısı (n, %)	3 (2.2)
Nöbet (n, %)	1 (0.7)
Özgeçmiş	
Hipertansiyon (n, %)	88 (65.2)
Diyabet (n, %)	30 (22.2)
Koroner arter hastalığı (n, %)	34 (25.2)
Atrial fibrilasyon (n, %)	18 (13.3)
Konjesif kalp yetmezliği (n, %)	10 (7.4)
Geçirilmiş serbrovasküler olay (n, %)	31 (23.0)
GKS (median (min-max))	15 (8-15)
NIHSS (median (min-max))	6 (0-22)

İnme hastasının yönetiminde kritik bir eşik olan semptomların başlangıç zamanı bilgisi 23 hastada kendisinden (%17.0), 94 hastada olaya şahitlik eden, olay sırasında hastanın yanında olan birinden (%69.9), 16 hastada ise olaya şahitlik etmeyen bir hasta yakınından (%11.9) alındığı tespit edildi. Bu önemli bilginin alındığı kişilerin 7'si okur yazar değil (%5.2), 26'sı okur yazar seviyesinde (%19.3), 31'i ilkokul mezunu (%23.1), 14'ü ortaokul mezunu (%10.4), 29'u lise mezunu (%21.5) ve 28'i üniversite mezunuydu (%20.7).

Çalışmaya dahil edilen hastaların başvuru anında çekilen BT'leri değerlendirildiğinde elde edilen verilere göre başvuru anında çekilen BT'lerin 22'sinde infrakt bulgusu (%16.3), 9'unda dens MCA bulgusu (%6.7), 17'sinde kortikal silinme (%12.6), 6'sında derin yapılarda silinme (%4.4), 3'ünde MCA 1/3 besleme alanında silinme (%2.2) ve 1'inde isular ribon silinme (%0.79) saptandı.

Çalışmaya katılan hastalardan 71'ine (%52.6) CT Anjiyografi işlemi uygulandı. 15 hastada (%11.1) MCA M1; 11 hastada (%8.1) MCA M2 ve 11 hastada (%8.1) ICA (İnternal Karotis arter) oklüzyonu saptandı.

Çalışmamızda 70 hastaya (%58.5) r-TPA uygulandı. r-TPA uygulanan hastaların 16'sında (%20.3) r-TPA sonrası kanama meydana geldi. Bu kanamalar ECASS-2 İntrakranial kanama sınıflamasına göre değerlendirildiğinde 5'i (%6.3) class 1; 3'ü (%3.8) class 2; 2'si (%2.5) class 3; 4'ü (%5.1) class 4 ve 2'si (%2.5) class 6 kanamalar şeklindeydi.

Ana Bulgular

Çalışmamızda 122 vakanın penumbra değerlendirmesi DWI MRI ile gerçekleştirildi. 34 vakada (%27.9) DWI MR incelemelerde hiç penumbra alanı saptanmazken 88 vakada (%72.1) çeşitli hacimlerde penumbra alanı mevcuttu. Penumbra olan ve olmayan vakalara ait HSP, NSE ve S100B düzeyleri **Tablo 2'de** sunuldu.

Tablo 2: Penumbra Olan ve Olmayan Vakalara Ait HSP, NSE ve S100B Düzeyleri

	Hsp70 düzeyleri (ng/ml)		NSE düzeyleri (ng/ml)		S100B düzeyleri (ng/ml)	
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR
Penumbra olan hastalar (n=88)	2744.1	1974.1	1028.5	780.1	607.5	890.7
Penumbra olmayan hastalar (n=34)	2388.5	1086.1	930.5	215.2	583.1	354.5
HSP karşılaştırması için p=0.29; NSE karşılaştırması için p=0.04; S100B karşılaştırması için p=0.45 (Mann Whitney U test)						

Penumbra olmayan vakalar dışlanarak, penumbra hacmi, infarkt hacmi ve biyomarkerlar arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar tablo 3’de sunuldu.

Tablo 3: Penumbra Olmayan Vakalar Dışlanarak, Penumbra Hacmi, İnfarkt Hacmi Ve Biyomarkerlar Arasındaki Korelasyon

	Penumbra hacmi		İnfarkt hacmi	
	r	p	r	P
HSP	0.17	0.104	0.09	0.374
NSE	0.17	0.109	0.01	0.924
S100B	0.01	0.901	-0.14	0.194
Spearman’s korelasyon analizi				

Penumbra/infarkt hacmini yansıtacağını düşündüğümüz HSP-70/NSE ve HSP-70/S100B oranlarına ait korelasyon sonuçları ise tablo 4’de sunuldu. Çalışmadaki veriler normal dağılıma uygun olmadığı için Spearman’s korelasyon analizi ile değerlendirildi. R değerleri sıfıra yakın olduğu için, hipotezimizde yer alan penumbra/infarkt hacim oranıyla HSP-70/NSE ve HSP-70/S100B oranları arasında korelasyon saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4: Penumbra/İnfarkt Hacmini Oranı ve HSP-70/NSE ve HSP-70/S100B Oranlarına Ait Korelasyon Sonuçları

	Penumbra/İnfarkt hacmi	
	r	P
HSP-70/NSE	-0.13	0.235
HSP-70/S100B	0.06	0.536
Spearman’s korelasyon analizi		

5. TARTIŞMA

İskemik inme tanısının erken dönemde (hiperakut) koyulması için hızlı, kolay ulaşılabilir, az maliyetli bir biyobelirteç olması iskemik inme yönetimini değiştirebilir. Bu amaçla iskemik inme ile ilişkisi araştırılan pek çok biyobelirteç mevcuttur. Ancak pek azı iskemik inme ile ilişkilendirilmiştir. İskemik inme ile ilişkilendirilen biyobelirteçlerden bazıları BNP, d-dimer, fibrinojen, von Willebrand Faktör (vWF), CRP, MMP-9, VCAM, ICAM-1, GFAP, NSE, S100B'dir (36,37). Bu biyobelirteçlerden NSE ve S100B iskemik inmeli hastalarda ölçülen infarkt hacmiyle korele bulunmuştur (39, 50-53). İskemik inmeli hastalarda penumbra dokusunun varlığı uzun zamandır biliniyordu ancak penumbranın görüntüleme yöntemleri ile gösterilebilmesi çok yakın zamanda gündeme gelen bir konudur. Dolayısıyla penumbranın varlığı ile biyobelirteçlerin ilişkisini araştıran kısıtlı çalışmalar mevcuttur (54-56). Her ne kadar penumbra ile HSP70 arasındaki ilişki gösterilmiş olsa da HSP70 serum düzeylerinin penumbra varlığıyla olan ilişkisi klinik çalışmalarla henüz ortaya konulmamıştır. Bu çalışmada iskemik inme geçiren ve çalışma dahil edilme kriterlerini sağlayan hastalarda PWI-DWI MR incelemeleri yapılarak hastalarda penumbra ve infarkt volümü hesaplanmış ve penumbra/infarkt hacmi adlı bir oran elde edilmiştir. Yine bu hastalardan kan örnekleri alınmış, penumbrayı yansıtacağı düşünülerek HSP-70 ve infarkt alanını yansıtacağı düşünülerek NSE ve S100B biyobelirteçleri hastaların kan örneklerinde incelenmiştir. Bu kan örneklerinden elde edilen değerlerle HSP-70/NSE ve HSP-70/S100B oranları hesaplanmıştır. HSP-70/NSE ve HSP-70/S100B oranlarının penumbra/infarkt hacmini yansıtabileceği hipotezi ile bu araştırma gerçekleştirilmiştir. Ancak HSP-70/NSE oranı ile penumbra/infarkt hacmi arasında ve HSP-70/S100B oranı ile penumbra/infarkt hacmi arasında tanısal amaçlı kullanılabilecek anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

İskemik inmeli hastalarda infarktı yansıtacağı öngörülerek pek çok biyobelirteç araştırılmıştır (36,37). Bu amaçla iskemik inmenin patofizyolojisi araştırılmış ve patofizyolojiyle ilişkisi olan biyobelirteçler incelenerek inmeyle olan bağlantıları anlamlandırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla bazı çalışmalar deneysel

inme modelleri oluşturarak hayvanların iskemiden etkilenen beyin dokularını incelemiş (28,54,55,57), bazı çalışmalar BOS'daki proteinleri incelemiş (58), bazı çalışmalar ise serumda bulunan iskemi ile ilişkili proteinleri incelemişlerdir (59). İskemik inmede araştırılan biyobelirteçlerden bazıları, inme riskini öngörme, bazıları inme prognozunu belirleme, bazıları infarkt volümünü belirleme (NSE, S100B), bazıları komplikasyon gelişimini öngörme, bazıları ise tedaviye yanıtı değerlendirme açısından incelenmişlerdir (36,37). İncelenen bu biyobelirteçlere bakıldığında genellikle infarkt varlığı ile ilişkili olup penumbra varlığını araştıran biyobelirteçler çok sınırlı sayıdadır (54,56). Bunun nedeni olarak penumbranın varlığının görüntüleme yöntemleri ile gösterilebilmesinin yakın zamanlarda ortaya çıkan bir bilgi olması düşünülebilir. Penumbra nöronlarında HSP70 ekspresyonunun arttığı bazı çalışmalarla gösterilmiş (23,47) olsa da herhangi bir çalışmada serum HSP70 düzeyi ile penumbra varlığının ilişkisi araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda infarkt volümü ve penumbra volümü ile ilişkili olabilecek biyobelirteçlerin (NSE, S100B, HSP70) araştırılmasının literatüre önemli bilgiler katacağı düşünülmektedir. Literatüre baktığımızda inmeyle ilişkilendirilen biyobelirteçlerden NSE ve S100B düzeyleri pek çok çalışmada infarkt varlığı ile ilişkili bulunmuştur (36,38, 60,61) . Anand ve arkadaşlarının 2005 de yaptıkları 12 çalışmalık bir incelemeye göre, iskemik inmeli hastalarda NSE seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca yine iskemik inmeli hastalardaki NSE seviyeleri infarkt volümü ile koreledir. Ancak bu incelemede NSE seviyeleri ile inme şiddeti ve fonksiyonel sonlanım arasındaki ilişki net olarak anlaşılamamıştır (38). Bu incelemede NSE serum düzeylerinin ölçülme zamanları çalışmadan çalışmaya farklılık göstermektedir. Pek çok çalışmada NSE düzeyleri inmenin geç döneminde (2.gün-1hafta) çalışılmıştır, ancak bir çalışmada NSE düzeylerinin semptom başlangıcından 4 saat sonra dahi yükselmeye başladığı gösterilmiştir (60). Monbailiu ve arkadaşlarının 2017 de yaptıkları 42 çalışmalık incelemeye göre, ilk 24 saatte başvuran iskemik inmeli hastalarda 25 biomarkerın iskemik inmeyi tanınması incelenmiş ve serum s100B düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur (61). Büttner ve arkadaşlarının 1997 de yaptıkları bir çalışmada; S100B serum düzeyleri, inme başlangıcından sonra 1-10.günlerde seri olarak bakılmış ve inme geçirenlerde kontrol grubuna göre anlamlı yüksek S100B seviyeleri gözlenmiştir (62). Bizim çalışmamızda penumbrayı da öngörebilmek ve inmenin

akut döneminde reperfüzyon tedavilerine etkisini inceleyebilmek amacıyla kan örnekleri inmenin erken evresinde, hastaların tedavisini etkilemeyecek en erken zamanda (1 saat-12saat) alınmıştır. Bizim çalışmamızdaki biyobelirteçlerin serum seviyelerinin infarkt hacmi ile korele bulunmamasının nedeni kan örneklerinin inmenin hiperakut döneminde alınmış olması olabilir. Literatüre baktığımızda NSE ve S100B biyobelirteçleri ile infarkt arasında korelasyon bulan bu çalışmalar genel olarak incelendiğinde hastaların infarkt açısından görüntülenmeleri inmenin geç evrelerine (1.gün- 1 hafta) denk gelmektedir (38,61). Bizim çalışmamızda ise penumbrayı tespit edebilmek için görüntüleme tetkikleri hastaların tedavilerini etkilemeyecek en erken dönemde (1 saat- 12 saatte) yapılmıştır. Çalışmamızda görüntüleme tetkiklerinin erken dönemde yapılmış olması çalışmamızdaki biyobelirteçlerle infarkt volümü arasında korelasyon bulunmamasının nedeni olabilir. Çalışmamızda inmenin hiperakut döneminde bakılan bu biyobelirteçlerin infarkt varlığı ile korele olmaması bu biyobelirteçlerin akut inme tedavisini yönlendirmede ve tanısını desteklemede kullanılamacağı öngörülebilir. Çalışmamızda olduğu gibi NSE ve S100B biyobelirteçlerinin akut inme tanısını desteklemediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (63,64,59). Gonzales ve arkadaşlarının 2012’de yaptığı bir çalışmada; 44 iskemik inme, 17 hemorajik inme, 11 inme benzeri kliniği olan toplam 79 hastanın semptom başlangıcından sonra 12-48. Saate alınan NSE ve S100B düzeylerinin sensitivite ve spesifiteleri değerlendirildiğinde, NSE ve S100B biyobelirteçlerinin akut iskemik inme tanısını desteklemediği görülmüştür (63). Unden ve arkadaşlarının 2009’da yaptıkları bir çalışmada, 83 iskemik inme ve 14 hemorajik inmesi olan toplam 97 hastada ilk 24 saatte bakılan NSE ve S100B seviyelerinin iskemik inme ve hemorajik inmeli hastalar arasında anlamlı farklılık oluşturmadığı gösterilmiştir (64). Literatüre baktığımızda HSP70’in iskemik inme ve hemorajik inmedeki yerini araştıran deneysel ve klinik çalışmalar mevcuttur (28,47,59,65). Choi ve arkadaşlarının 2018’de yaptıkları deneysel çalışmaya göre 10 tane farenin MCA’sı 30 dk boyunca, 10 tane farenin MCA’sı 60 dk boyunca oklude edilmiş, 5 tane fare ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. İskemiden 4 saat sonra bakılan HSP70 düzeyleri iki iskemik grupta da kontrol grubuna göre anlamlı artmıştır, ancak HSP70 düzeylerinin infarkt hacmi ile korele olmadığı gösterilmiştir (28). Bustamente ve arkadaşları 2017 de, 6 merkezde yaptıkları 1308 hastanın katıldığı bir çalışmada; inme semptom başlangıcı ilk 6 saat olan hastalarda içerisinde

NSE, S100B ve HSP 70'in de bulunduğu 21 biyobelirtecın inme tanısını koymadaki başarısını araştırmışlardır. Bizim alışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da hiçbir biyobelirteç HSP70 dahil, inmenin erken evresinde inme tanısını koymada yeterli bulunmamıştır. Bu alışma hem büyük bir örnekleme sahip olması hem de HSP70 in infarkt varlığını araştırması hem de biyobelirteçlerin inmenin erken döneminde bakılması açısından önemlidir (59).

Çalışmamızda penumbra alanı varlığı ile serum HSP70 düzeyleri arasında, penumbra alanı varlığı ile serum NSE düzeyleri arasında ve penumbra alanı varlığı ile serum S100B düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Literatüre baktığımızda her ne kadar biyobelirteçlerle infarkt varlığını araştıran pek çok çalışma olsa da penumbra varlığı ile biyobelirteçler arasındaki ilişkiyi araştıran kısıtlı miktarda çalışma mevcuttur (54-56). S100B ve NSE biyobelirteçleri ile i penumbra ilişkisinin araştırıldığı çok kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur (54,58,66). Pang ve arkadaşları 2019 Mayıs ayında ratların penumbra dokusunda 4568 protein, ratların serumlarında 1915 protein (ilerinde NSE ve S100B de bulunmakta) tanımlamışlardır ve bunların birbirleriyle ilişkisini araştırmışlardır (116). Bu araştırmanın sonucuna göre, 2 protein (Rhoa ve CDC42 proteinleri) penumbra ile ilişkilendirilmiş ve bu iki proteinin miktarı iskemi süresiyle korele bulunmuştur. Bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi NSE ve S100B serum düzeyleri ile penumbra varlığı arasında ilişki saptanmamıştır. Pang ve arkadaşlarının araştırması NSE ve S100B serum düzeylerinin penumbra ile ilişkisini direkt olarak araştırırken literatürdeki diğer çalışmalar sadece bu konuya indirekt olarak değinmiştir (58,66). Üstelik NSE, S100B proteinlerinin penumbra ile ilişkisini direkt olarak araştıran klinik bir çalışma mevcut değildir. Bizim alışmamızda NSE ve S100B ile penumbra varlığı arasındaki ilişkinin direkt olarak araştırılmasının literatüre önemli bilgiler kattığı düşünülmektedir. Literatüre baktığımızda HSP70 ile iskemik penumbra arasındaki ilişkiyi araştıran bazı çalışmalar mevcuttur. (23,47,57) Philip ve arkadaşlarının 2006'da yazdıkları bir makaleye göre, iskemik inmeli hastalarda, iskemi sonrasında penumbra nöronlarında hücreyi apoptozdan korumak amaçlı HSP70 protein indüksiyonu olduğu ancak infarkt alanında bu indüksiyonun gözlenmediğini bildirmişlerdir (23). Demyanenko ve arkadaşları 2016 da ratlar üzerinde fototrombotik infarkt sonrası penumbradaki proteinlerin sinyalinini inceleyen

deneysel bir araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada fototrombotik infarkt gelişen hemisferdeki protein sinyalleri ile iskemiden etkilenmeyen hemisferdeki protein sinyallerini incelemişlerdir. Araştırmanın sonucunda HSP70 ve HSP90 proteinlerinin penumbra azaldığını göstermişlerdir ve bunu penumbranın canlılığını koruyamama nedeni olarak yorumlamışlardır (57). Kim ve arkadaşlarının 2018 yılında HSP70'in iskemik inme hastalarında tedavi için hedef protein olabileceğini aktardıkları derlemede, HSP70'in penumbra nöronlarında fazla ekspresyon edildiğinin, HSP70'in birçok hücrede intrinsik ve ekstrinsik yol ile apoptozisi durdurduğunun üzerinde durmuşlardır (47). Penumbra nöronlarında HSP70 ekspresyonunun arttığı klinik çalışmalarla gösterilmiş olsa da HSP70 biyobelirtecinin serum düzeylerinin penumbra varlığı ile olan ilişkisinin araştırıldığı klinik çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle araştırmamız penumbra alanı ile HSP70 serum düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceleyen öncü bir çalışmadır. Literatürdeki penumbra varlığı ile biyobelirteçlerin ilişkisini inceleyen diğer çalışmalara baktığımızda bizim çalışmamızın aksine bazı çalışmalarda penumbra varlığıyla korele biyobelirteçlerin olduğunu görürüz (55,56). Li ve arkadaşları 2019 Mart'ta iskemik inmenin hiperakut döneminde ekspresyonu artan miRNA'ların penumbral doku ve serumdaki miktarlarının birbirleriyle ilişkisini incelemek amacıyla ratlar üzerinde bir araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada, deneysel olarak ratlar üzerinde oluşturulan MCA okluzyonundan 4 saat sonra, ratların kan örnekleri alınmış ve ratlar dekapite edilmişlerdir. Bunun sonucunda serumda bakılan miRNA-223- 3p düzeyinin penumbra dokuyla korele şekilde arttığı, let-7b-3p düzeyinin ise penumbral dokuyla korele olarak azaldığı gösterilmiştir (55). Lorenzano ve arkadaşları 2019 Ağustos'ta erken moleküler oksidatif stres biyobelirteçleri ile penumbra arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla prospektif bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada 216 hastada oksidatif stres biyobelirteçlerinin serum düzeyleri ölçülmüş ve penumbra alanının varlığını belirleyebilmek için PWI-DWI MR uyumsuzluğu hesaplanmıştır. Çalışmanın sonucuna göre F2-isoP ve ORAC serum düzeylerinin penumbra ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (56). Bu çalışma penumbra varlığının biyobelirteçlerle olan ilişkisini araştıran ilk klinik çalışma olması nedeniyle önemlidir. Literatürdeki penumbra varlığıyla ilişkili biyobelirteçlerin bulunup bulunmaması konusu çok yeni araştırılan bir konudur ve bu konunun aydınlatılabilmesi için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz biyobelirteçlerle penumbra alanının varlığı

arasında anlamlı ilişki olmamasının nedeni; hastaların serum örneklerinin iskemisinin erken döneminde alınmış olması nedeniyle iskemiye yanıt olarak penumbra alanındaki nöronların exprese ettiği biyobelirteçlerin kanda saptanamamış olması olabilir. KBB'nin bu biyobelirteçlerin kana geçişini yavaşlatması diğer bir neden olabilir. Çalışmaya katılan hastaların başvuru zamanının standart olmaması, görüntüleme tetkiklerinin standardize edilmemesi de anlamlılığa etki eden bir faktör olabilir.

Çalışmamızda; iskemik inmeyle başvuran hastalarda ölçülen penumbra hacmi ve infarkt hacmi değerlerinin ne HSP70 serum düzeyi ile ne NSE serum düzeyi ile ne de S100B serum düzeyi ile arasında herhangi bir anlamlı ilişki saptanmamıştır. İskemik inmeli hastalarda penumbra ve infarkt volümünü hesaplayabilmek için çeşitli yöntemlere başvurulabilir. Penumbra hacmini hesaplayabilmek amacıyla MR perfüzyon, CT perfüzyon, PET kullanılabilir (67). İnfarkt volümünü hesaplayabilmek amacıyla kontrastsız beyin BT, MR Difüzyon, Dupleks US kullanılabilir (50,68,69). Biz çalışmamızda penumbra ve infarkt volümünü hesaplayabilmek amacıyla difüzyon-perfüzyon MR tekniklerini kullandık. Literatüre baktığımızda infarkt volümü ile biyobelirteçler arasındaki ilişkiyi araştıran pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda en sık kullanılan ve infarkt volümü ile korele olduğu gösterilen biyobelirteçler NSE ve S100B'dir (39,50-53). Ahmad ve arkadaşları 2011 de infarkt volümü ile 5 biyobelirteç (NSE, S100B, GFAP, tau proteini, MBP) arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla 17 araştırmayı incelemişlerdir. Bu sistematik araştırmanın sonuçlarına göre, NSE ve S100B proteinlerinin her ikisinin de serum düzeylerinin subakut infarkt volümü ile korele olduğu gösterilmiştir. Bu araştırmaya göre biyobelirteç serum düzeyi ile infarkt volümü korelasyonu zaman geçtikçe artar, en yakın korelasyonun 24. Saatte olduğu gösterilmiştir (51). Foerch ve arkadaşlarının 2005'de yaptıkları bir çalışmada iskemik inme semptomlarıyla başvuran hastalardaki S100B düzeyleri 24, 48, 72, 96, 120. Saatte ölçülmüş, S100B serum düzeylerinin 24-48. Saatte pik yaptığı ve bunun beyin CT'deki infarkt volümü ile korele olduğu gösterilmiştir (39). Missler ve arkadaşlarının 1997'de yaptığı bir çalışmada iskemik inmeyle başvuran hastaların semptom başlangıçlarının 1,3,4,7,14. Günlerinde ölçülen NSE ve S100B serum düzeylerinin, 4.günde çekilen beyin BT'deki infarkt volümü ile korele olduğu

gösterilmiştir (52). Zaheer ve arkadaşlarının 2013’de yaptıkları bir çalışmada ise inme semptomları başlangıcının 1.gününde bakılan NSE düzeylerinin aynı gün çekilen beyin BT’deki infarkt volümü ile korele olduğu gösterilmiştir (53). Oh ve arkadaşlarının 2003’de yaptıkları bir çalışmada inme hastalarından 24.saatte alınan NSE düzeyleri, inme başlangıcından 1 hafta sonra çekilen MR difüzyon görüntülerindeki infarkt volümüyle kıyaslanmış ve aralarında anlamlı korelasyon olduğu gösterilmiştir (50). Bu araştırmalara bakıldığında serum biyobelirteç düzeylerinin genellikle seri şekilde alındığı ve görüntüleme tetkiklerinin genellikle infarktın oturduğu inmenin geç döneminde yapıldığını görürüz. Biz çalışmamızda tek bir kan örneği aldık ve kan örneği alındığı sırada (hiperakut dönemde) görüntüleme yaptık. Çalışmamızın yönteminin literatürdeki çalışmalardan farklı olması nedeniyle sonuçların literatür ile uyumsuz olduğunu düşünülebilir, bu da literatüre farklı bir bakış açısı katmaktadır. Literatüre baktığımızda infarkt volümü ile HSP70 arasındaki ilişkiyi araştıran kısıtlı deney çalışmalar mevcutken, bu ilişkiyi araştıran klinik çalışma bulunmamaktadır (28,70). Bizim çalışmamız bu ilişkiyi araştıran öncü bir klinik çalışmadır. Bu ilişkiyi direkt olarak araştıran Choi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmanın (28) yanı sıra Luo ve arkadaşlarının yaptığı HSP70 ile infarkt volümü arasındaki ilişkiyi indirekt olarak gösteren bir çalışma mevcuttur (70). Luo ve arkadaşları 2019 haziranda serebral iskemik hasar sonrasında farelere verilen L- glutaminin etki mekanizmasını anlamak amacıyla deneysel bir çalışma yapmışlardır. Bu araştırmanın sonucunda L-glutaminin serebral infarkt volümünü azalttığı ve farelerde nörolojik iyileşme olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada inme geçiren farelere L- glutamin verildikten sonra astrositlerde ve glial hücrelerde HSP70 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Dolayısıyla HSP70 ekspresyonunda artış, infarkt volümünde azalmaya neden olmaktadır (70). HSP70 ile infarkt volümü arasındaki negatif korelasyon bu çalışmada indirekt olarak araştırıldığı için bu bilginin literatüre kazandırılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Literatürde penumbra varlığı ile biyobelirteçler arasındaki ilişkinin araştırılması son yıllarda (2019) gündeme gelen bir konudur. Dolayısıyla bu konudaki çalışmalar oldukça azdır. Penumbra hacmi ve biyokimyasal belirteçler arasındaki ilişkiyi araştıran bir yayın henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle HSP70’in penumbrayı yansıttığı hipotezimiz çalışmaya özgün derğer katmaktadır. Bulgularımızın anlamsız olmasında birçok faktörün etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu faktörlerden birisi

hastaların başvuru zamanlarının standart olmaması, radyolojik görüntülerin standart zamanlarda çekilmemesi olabilir. Çalışmamızda kan örneklerinin erken alınması ve kullandığımız biyobelirteçlerin KBB'ini geçme süresinin uzun olmasından dolayı sonuçlarımız anlamsız gelmiş olabilir.

Çalışmamızda iskemik inmeli hastalarda ölçülen penumbra/infarkt hacmi oranı ile HSP70/NSE ve HPS70/S100B oranlarının arasında ilişki saptanmamıştır. Literatürde bazı biyobelirteç oranlarının inmeyle ilişkisi araştırılmıştır ancak hiçbir biyobelirteç oranı ile penumbra/infarkt hacmi oranı karşılaştırılmamıştır (71). Literatüre baktığımızda penumbra/infarkt oranı sadece bir klinik çalışmada kullanılmıştır (72). Wintermark ve arkadaşlarının 2007'de gerçekleştirdiği bu çalışma, inme semptom başlangıcı 3-9 saat arasında olan 42 hastanın dahil edildiği bir grupta reperfüzyon tedavi kararının CTA ve MRI perfüzyondaki penumbra/infarkt oranına göre verildiğinde, tedavide anlamlı farklılık olup olmamasının değerlendirildiği bir çalışmadır (72). Bu nedenle bu sonuçlar çalışmamıza özgünlük değeri katmaktadır. Bu oranın araştırılmasının nedeni; özellikle inmeyle uyanan hastalarda (wake-up stroke) hastaların rTPA'dan fayda görüp görmeyeceğini belirlemektir. Böylelikle gereksiz rTPA vermekten kaçınılarak intrakranyal kanama gibi mortal komplikasyonların önüne geçmek ve rTPA'dan fayda görecektik olanların prognozunu ve nörolojik sekel oranını azaltmak amaçlandı.

Araştırmamızda birtakım kısıtlılıklar bulunmaktadır. Bunlardan biri hedeflediğimiz hasta sayısına ulaşamamıştır. Bu durum analizlerimizde ortaya çıkan anlamsız sonuçlara sebebiyet vermiş olabilir. Bir diğer kısıtlılığımız hastalardan standart sürelerde kan örneği alınamaması ve radyolojik incelemelerin yapılamamasıdır. Dolayısıyla bu da biyokimyasal analiz sonuçlarımızı olumsuz etkileyen faktörlerdendir. Radyolojik ölçümlerin bazılarının standart bir uzman tarafından yapılmaması yine sonuçları etkileyen faktörlerden olabilir. Sonucu kısıtlılığımız ise kan örneklerinin çalışma süresinin sonunda biyokimyasal olarak analiz edilmesi yine bu değerlerin olumsuz çıkmasına sebep olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Penumbra alanının varlığının NSE, S100B ve HSP70 kan değerlerinin serumda ölçülmesiyle elde edilemeyeceği görülmektedir.

Penumbra hacmi ve infarkt hacmi ile NSE, S100B ve HSP70 serum düzeyleri arasında korelasyon yoktur.

Penumbra/infarkt hacmi oranıyla HSP70/NSE ve HSP70/S100B oranları arasında ilişki yoktur.



7. KAYNAKLAR

- 1) Wardlaw vd (2014). Thrombolysis for acute ischaemic stroke. Cochrane Database Syst Rev. 2014 Jul. ; 29(7):CD000213. doi: 10.1002/14651858.CD000213.pub3.
- 2) Whiteley WN vd (2014). Effect of alteplase within 6 hours of acute ischemic stroke on all-cause mortality (third International Stroke Trial). Stroke. 2014 Dec.; 45(12): 3612-7 doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006890. Epub 2014 Nov 4.
- 3) Desilles JP vd (2017). Successful Reperfusion With Mechanical Thrombectomy Is Associated With Reduced Disability and Mortality in Patients With Pretreatment Diffusion-Weighted Imaging-Alberta Stroke Program Early Computed Tomography Score ≤ 6 . Stroke. 2017 Apr.; 48(4):963-969. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.015202. Epub 2017 Feb 24.
- 4) Dávalos A vd (2017). Safety and efficacy of thrombectomy in acute ischaemic stroke (REVASCAT): 1-year follow-up of a randomised open-label trial. Lancet Neurol. 2017 May; 16(5):369-376. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30047-9. Epub 2017 Mar 16.
- 5) Wardlaw JM vd (2004). Immediate Computed Tomography Scanning of Acute Stroke Is Cost-Effective and Improves Quality of Life. Stroke. 2004; 35:2477-2483.
- 6) Graham BR vd (2018). Computed tomographic angiography in stroke and high-risk transient ischemic attack: Do not leave the emergency department without it! Int J Stroke. 2018 Jan.; 1:1747493018764172. doi: 10.1177/1747493018764172.
- 7) Ehrlich ME vd (2016). Safety of Computed Tomographic Angiography in the Evaluation of Patients With Acute Stroke: A Single-Center Experience. Stroke. 2016 Aug; 47(8):2045-50. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.013973. Epub 2016 Jun 30.
- 8) Chalela JA vd (2007). Magnetic resonance imaging and computed tomography in emergency assessment of patients with suspected acute stroke: a prospective comparison. Lancet. 2007; 369:293–298. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60151-2.
- 9) Hwang DY vd (2012). Comparative sensitivity of computed tomography vs. magnetic resonance imaging for detecting acute posterior fossa infarct. J Emerg Med. 2012 May; 42(5):559-65. doi: 10.1016/j.jemermed.2011.05.101. Epub 2012 Feb 2.

- 10) Brazzelli M vd (2009). Magnetic resonance imaging versus computed tomography for detection of acute vascular lesions in patients presenting with stroke symptoms. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Oct; 7;(4):CD007424. doi: 10.1002/14651858.CD007424.pub2.
- 11) Wardlaw J vd (2014). An assessment of the cost-effectiveness of magnetic resonance, including diffusion-weighted imaging, in patients with transient ischaemic attack and minor stroke: a systematic review, meta-analysis and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2014 Apr; 18(27):1-368, v-vi. doi: 10.3310/hta18270.
- 12) Powers WJ vd (2018). Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018; 49:e46-e99.
- 13) Wardlaw JM vd (2012). Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2012 Jun.; 23;379(9834):2364-72. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60738-7. Epub 2012 May 23
- 14) Wardlaw JM vd (2014). Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Jul; 29;(7):CD000213. doi: 10.1002/14651858.CD000213.pub3.
- 15) Hacke W vd (2004). Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*. 2004 Mar. ; 6;363(9411):768-74.
- 16) Saver JL vd (2016). Time to Treatment With Endovascular Thrombectomy and Outcomes From Ischemic Stroke: A Meta-analysis. *JAMA*. 2016 Sep.; 27;316(12):1279-88. doi: 10.1001/jama.2016.13647.
- 17) Nogueira RG vd (2018). Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med*. 2018 Jan; 4;378(1):11-21. doi: 10.1056/NEJMoa1706442. Epub 2017 Nov 11.
- 18) Albers GW vd (2018). Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med*. 2018 Feb.; 22;378(8):708-718. doi: 10.1056/NEJMoa1713973. Epub 2018 Jan 24.
- 19) Allen LM vd (2012). Sequence-specific MR imaging findings that are useful in dating ischemic stroke. *Radiographics*. 2012 Sep-Oct; 32(5):1285-97.
- 20) Sandhu GS vd (2012). Advanced Neuroimaging to Guide Acute Stroke Therapy. *Current Cardiology Reports*. 2012 Dec.; 14(6):741-753.
- 21) Filippi CG vd (2017). Computer-Assisted Volumetric Measurement of Core Infarct Volume in Pediatric Patients: Feasibility for Clinical Use and Development of Quantitative Metrics for Outcome Prediction. *AJNR*. 2015 Apr. ; 36 (4) 789-794.

- 22) Wiryadana KA vd (2017). Progress and potential roles blood biomarkers of ischemic stroke in clinical setting. *Indonesia Journal of Biomedical Science*. 2017 Jul. ; 11(2):19-29.
- 23) Weinstein FR vd (2004). Molecular Identification of the Ischemic Penumbra. *Stroke*. 2004; 35:2666–2670.
- 24) Frykholm P vd (2005). Relationship between cerebral blood flow and oxygen metabolism, and extracellular glucose and lactate concentrations during middle cerebral artery occlusion and reperfusion: a microdialysis and positron emission tomography study in nonhuman primates. *J Neurosurg*. 2005 Jun. ; 102(6):1076-84.
- 25) Kiewert C vd (2010). Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res*. 2010 Feb; 1312C: 101-107.
- 26) Sharp FR vd (2000). Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000 Jul.; 20(7):1011-32.
- 27) Daugaard M vd (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*. 2007; 581(19): 3702–3710.
- 28) Choi J vd (2018). S100 β , Matrix Metalloproteinase-9, D-dimer, and Heat Shock Protein 70 Are Serologic Biomarkers of Acute Cerebral Infarction in a Mouse Model of Transient MCA Occlusion. *J Korean Neurosurg Soc*. 2018 Sep; 61(5): 548–558.
- 29) Kinouchi H vd (1993). Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 kDa protein in neurons in the ‘penumbra’ following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Research*. 1993 Aug; 619(1-2):334-338.
- 30) Katan M (2018). Global Burden of Stroke. *Seminars of Neurology*. 2018 ;38 (02) 208-211
- 31) Hankey GJ (2017). Stroke. *The Lancet*. 2017; 389 (10069), 641–654. doi:10.1016/s0140-6736(16)30962-x
- 32) Ritter MA vd (2011). Silent brain infarcts. *Der Nervenarzt*. 2011; 82 (8):1043-1052 doi:10.1007/s00115-011-3312-9
- 33) Gupta A vd (2016). Silent Brain Infarction and Risk of Future Stroke. 2016 March; 47 (3): 719-725
- 34) Coupland A.P. vd (2017). The definition of stroke. *J of the Royal Society of Medicine*. 2017; 110 (1): 9-12

- 35) Caplan L.R. (2020). Overview of the evaluation of stroke. (internet) 2020 (Son g ncelleme Ocak 2020; 09.02.2020'de erişildi.) Erişim adresi: https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-evaluation-of-stroke?search=cerebrovascular%20disease&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H1
- 36) Makris K vd (2018). Blood biomarkers in ischemic stroke: potential role and challenges in clinical practice and research. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2018; 55(5): 294-328. doi:10.1080/10408363.2018.1461190
- 37) Ishida K (2019). Blood biomarkers for stroke (İnternet). 2019 (son g ncelleme Ağustos 2019, 30 Eyl l 2020 tarihinde erişildi. Erişim adresi: https://www.uptodate.com/contents/blood-biomarkers-for-stroke?search=stroke%20biomarker&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_typt=default&display_rank=1
- 38) Anand N vd (2005). Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis*. 2005; 20(4):213-9. Epub 2005 Aug 22.
- 39) Foerch C vd (2005). Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol*. 2005; 62(7):1130-4.
- 40) Foerch C vd (2007). Elevated serum S100B levels indicate a higher risk of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute stroke. *Stroke*. 2007; 38(9):2491-5. Epub 2007 Aug 2.
- 41) Stevens H vd (1999). Neurone-specific enolase and N-acetyl-aspartate as potential peripheral markers of ischaemic stroke. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 6–11.
- 42) Hatfield RH ve McKernan RM (1992). CSF neuron-specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in a rat stroke model. *Brain Res* 1992; 577: 249–252.
- 43) Barone FC vd (1993). Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. *Brain Res* 1993; 623: 77–82.
- 44) Bharosay A vd (2012). Correlation of brain biomarker neuron specific enolase (NSE) with degree of disability and neurological worsening in cerebrovascular stroke. *Indian J. Clin. Biochem*. 2012; 27:186–190
- 45) Glushakova OY vd (2017). Biomarkers for acute diagnosis and management of stroke in neurointensive care units. 2017. doi:10.4103/2394-8108.178546
- 46) Jickling G.C vd (2011). Blood Biomarkers of Ischemic Stroke. *Neurotherapeutics*. 2011;8: 349– 360.

- 47) Kim J.Y vd (2018). The 70-kDa heat shock protein (Hsp70) as a therapeutic target for stroke. *Expert Opinion of Therapeutic Targets*. 2018; 22(3): 191-199
- 48) Matsumori Y vd (2005). Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005; 25(7): 899–910.
- 49) Sharp FR vd (2000). Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20 (7):1011–1032.
- 50) Oh S vd (2003). Prediction of early clinical severity and extent of neuronal damage in anterior-circulation infarction using the initial serum neuron-specific enolase level. *Arch Neurol*. 2003; 60 (1): 37-41.
- 51) Ahmad O vd (2012). Correlation of level of neuronal and glial markers with radiological measures of infarct volume in ischaemic stroke. A systematic review. *Cerebrovasc Dis*. 2012; 33: 47-54.
- 52) Missler U vd (1997). S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1997; 28 (10): 1956-60.
- 53) Zaheer S vd (2013). Correlation between serum neuron specific enolase and functional neurological outcome in patients of acute ischemic stroke. *Ann Indian Acad Neurol*. 2013; 16 (4); 504-8.
- 54) Pang X vd (2019). Identifications of serum biomarkers for ischemic penumbra by ITRAQ-based quantitative proteomic analysis. *Proteomics Clinical Applications*. 2019; 1900009. DOI: 10.1002/prca.201900009
- 55) Li S vd (2019). miRNA-223-3p and let-7b-3p as potential blood biomarkers associated with the ischemic penumbra in rats. *Acta Neurobiol Exp*. 2019; 79: 205-216.
- 56) Lorenzano S vd (2019). Early molecular oxidative stress biomarkers of ischemic penumbra in acute stroke. *Neurology*. 2019; 93 (13): 1-11. doi:10.1212/WNL.00000000000008158
- 57) Demyanenko S vd (2017). Profiling of signaling protein in penumbra after focal photothrombotic infarct in the rat brain cortex. *Mol Neurobiol*. 2017; 54(9): 6839-6856.
- 58) Dayon L vd 2011). Brain extracellular fluid protein changes in acute stroke patients. *J Proteom Res*. 2011; 10(3): 1043-1051.
- 59) Bustamente A vd (2017). Blood biomarkers for the early diagnosis of stroke. *Stroke*. 2017; 48: 2419–2425
- 60) Stevens H vd (1999). Neurone-specific enolase and N-acetyl-aspartate as potential peripheral markers of ischaemic stroke. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29: 6–11.

- 61) Monbailliu T vd (2017). Blood protein biomarkers as diagnostic tool for ischemic stroke: a systematic review. *Biomarkers in Medicine*. 2017; 11(6): 503-512.
- 62) Büttner T vd (1997). S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke*. 1997; 28(10): 1961-5.
- 63) Gonzalez-Garcia S vd (2012). Serum neuron-specific enolase and S100 calcium binding protein B biomarker levels do not improve diagnosis of acute stroke. *J R Coll Physicians Edinb*. 2012; 42: 199-204.
- 64) Unden J vd (2009). Explorative investigation of biomarkers of brain damage and coagulation system activation in clinical stroke differentiation. *J Neurol*. 2009; 256(1): 72-7
- 65) Shao A vd (2019). The role and therapeutic potential of heat shock proteins in haemorrhagic stroke. *J Cell Mol Med*. 2019; 23 (9): 5846-5858
- 66) Liu C vd (2013). Effect of oral administration of pheretima aspergillum (Earthworm) in rats cerebral infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2013; 10(1): 66-82.
- 67) Leigh R. vd (2018). Imaging the physiological evolution of the ischemic penumbra in acute ischemic stroke. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2018; 38 (9): 1500- 1516
- 68) Wunderlich M.T vd (2004).Release of neurobiochemical markers of brain damage is related to the neurovascular on admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2004; 227 (1): 49-53.
- 69) Jauch E.C vd (2006). Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke* 2006; 37 (10) : 2508-13.
- 70) Luo L vd (2019). L-glutamine protects mouse brain from ischemic injury via up-regulating heat shock protein 70. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2019; 25(9): 1030-1041.
- 71) Xiao L vd (2014). Correlation between cerebral microbleeds and S100/RAGE in acute lacunar stroke patients. *J Neurol Sci*. 2014; 340 (1-2): 208-12
- 72) Wintermark M (2007). Comparison of CT perfusion and angiography and MRI in selecting stroke patients for acute treatment. *Neurology*. 2007; 68 (9): 694-7.