

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Biomarkerek klinikai haszna ischaemiás eredetű akut
kórképekben – úton a személyre szabott medicina felé**

Dr. Molnár Tihamér Szabolcs



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet**

Pécs, 2020

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
1.1. BIOMARKEREK JELLEMZŐI.....	1
1.2. VASZKULÁRIS BETEGSÉGEK – PARADIGMA VÁLTÁS.....	1
2. RIZIKÓ CSOPORTOK FELTÁRÁSA	3
2.1. AGYI KÉPALKOTÓ VIZSGÁLATOK.....	3
2.2. DIPYRIDAMOL TESZT A NEUROLÓGIÁBAN?.....	4
2.3. DIPYRIDAMOL TESZT ÉS MR PERFÚZIÓS KÉPALKOTÁS	7
2.4. CÉLKITŰZÉS.....	7
2.5. BETEGEK ÉS MÓDSZER.....	7
2.6. STATISZTIKAI ELEMZÉS	8
2.7. EREDMÉNYEK.....	8
2.8. MEGBESZÉLÉS.....	9
3. SZIGNIFIKÁNS CAROTIS STENOSIS ÉS AKUT ISCHAEMIÁS STROKE	13
3.1. AZ L-ARGININ ÚTVONAL METABOLITJAINAK VIZSGÁLATA SZIGNIFIKÁNS CAROTIS STENOSISBAN ÉS AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN	13
3.2. CÉLKITŰZÉS.....	13
3.3. BETEGEK ÉS MÓDSZER.....	14
3.4. STATISZTIKAI ELEMZÉS	14
3.5. EREDMÉNYEK.....	14
3.6. MEGBESZÉLÉS.....	18
4. A LECTIN ÚTVONAL MOLEKULÁINAK VIZSGÁLATA AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN	20
4.1. NEUROIMMUNOLÓGIAI ELŐZMÉNYEK.....	20
4.2. CÉLKITŰZÉSEK.....	21
4.3. BETEGEK ÉS MÓDSZER.....	21
4.4. STATISZTIKAI ELEMZÉS	21
4.5. EREDMÉNYEK.....	22
4.6. MEGBESZÉLÉS.....	25
5. AZ L-ARGININ ÉS A LECTIN ÚTVONAL KÖZÖTTI KAPCSOLAT VIZSGÁLATA AKUT ISCHAEMIÁS STROKE- BAN	26
5.1. CÉLKITŰZÉS.....	27
5.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER.....	27
5.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS	27
5.4. EREDMÉNYEK.....	28
5.5. MEGBESZÉLÉS.....	32

6. CITOKINEK VIZSGÁLATA AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN ÉS SZIGNIFIKÁNS CAROTIS STENOSISBAN	33
6.1. CÉLKITŰZÉS	33
6.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER	33
6.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS	34
6.4. EREDMÉNYEK	35
6.5. MEGBESZÉLÉS	37
7. A THROMBO-INFLAMMATORIKUS MOLEKULÁK ÉS AZ L-ARGININ ÚTVONAL METABOLITJAINAK ÖSSZEFÜGGÉSE AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN	39
7.1. CÉLKITŰZÉS	39
7.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER	39
7.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS	40
7.4. EREDMÉNYEK	40
7.5. MEGBESZÉLÉS	43
8. A TROPONIN-T ÉS A THROMBO-INFLAMMATORIKUS MOLEKULÁK ÖSSZEFÜGGÉSE AKUT ISCHAEMIÁS STROKE KIMENETELÉVEL	45
8.1. CÉLKITŰZÉS	45
8.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER	45
Bevonási kritériumok	45
A kizárási kritériumok	46
Biomarkerek	46
8.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS	46
8.4. EREDMÉNYEK	47
Markerek és NIHSS	48
Markerek és mortalitás	48
Markerek közötti korreláció	48
Független prediktorok	49
8.5. MEGBESZÉLÉS	49
9. AZ ISCHAEMIÁS STROKE VÉRZÉSES TRANSZFORMÁCIÓJÁNAK RIZIKÓTÉNYEZŐI	51
9.1. CÉLKITŰZÉS	51
Tanulmány A	52
Tanulmány B	52
9.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER	52
Tanulmány A	52
Tanulmány B	53
9.3. STATISZTIKAI ANALÍZIS	54
9.4. EREDMÉNYEK	54

Tanulmány A	54
Tanulmány B.....	56
9.5. MEGBESZÉLÉS- <i>Tanulmány A</i>	61
9.6. MEGBESZÉLÉS- <i>Tanulmány B</i>	62
10. PERIOPERATÍV STRESSZ CAROTIS ENDARTERECTOMIA SORÁN ÉS A SHUNT IGÉNY ELŐREJELZÉSE .	63
10.1. CÉLKITŰZÉSEK.....	64
Perioperatív stressz befolyásolása regionál anesztéziában végzett CEA során (<i>Tanulmány A</i>).	64
A kirekesztési intolerancia hátterében álló faktorok feltárása regionál anesztéziában végzett CEA során (<i>Tanulmány B</i>)	65
10.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER.....	65
Tanulmány A	65
Tanulmány B.....	65
Premedikáció és a szedáció protokollja	66
Regionális anesztézia és shunt behelyezés	66
Vérmintavétel és laboratóriumi mérések	66
5 éves utánkövetés-retrospektív rész	67
10.3. STATISZTIKAI ANALÍZIS	67
10.4. EREDMÉNYEK.....	68
Tanulmány A	68
Tanulmány B.....	68
A plazma kortizol dinamikája a szedáció szerinti két csoportban	69
Az alprazolam és a kortizol szintjének összefüggése	70
Kirekesztési idő és shunt	70
Preoperatív összefüggések.....	71
A vizsgált markerek szintjének időbeli változása	72
A preoperatív L-arginin prediktív szerepe.....	72
A magas és alacsony kockázatú alcsoportok összehasonlítása	73
Az anaerob metabolizmus indikátorai	74
5 éves utánkövetés	74
10.5. MEGBESZÉLÉS	75
A propofol szedáció és a premedikáció hatása a preioperatív stresszre	75
5 éves utánkövetés	75
Az L-arginin út és az agyi ischaemia kapcsolata CEA során	76
11. CLOPIDOGREL SZEKUNDER PREVENCIÓBAN RÉSZESÜLŐ STROKE BETEGEK VÉRLEMEZKE FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA.....	79
11.1.CÉLKITŰZÉS.....	80
11.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER.....	80
Vérlemezkek funkcionális és morfológiai vizsgálata egészségeseken (<i>Tanulmány A.</i>)	81

Vérlemezkék funkcionális és morfológiai eltéréseinek vizsgálata clopidogrelt szedők esetében (Tanulmány B.)	81
Vérlemezkék funkció.....	82
Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)	83
Atomeró mikroszkópia (AFM)	83
11.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS.	85
11.4. EREDMÉNYEK- <i>Tanulmány A.</i>	85
Elektronmikroszkópos eredmények.....	87
Atomeró-mikroszkópos eredmények.....	89
11.5. EREDMÉNYEK- <i>Tanulmány B</i>	90
11.6. MEGBESZÉLÉS	98
12. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	102
13. AZ EREDMÉNYEK KLINIKAI HASZNA	104
14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	105
15. KÖZLEMÉNYEK.....	106
15.1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	106
15.2. AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK.....	109
15.3. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK	110
15.4. KÖNYVFEJEZETEK	113
16. IRODALOMJEGYZÉK	114

INVOKÁCIÓ

PhD dolgozatomat angol nyelven írtam meg “Biomarker investigations in acute brain injuries” címmel, melyet 2009-ben védtem meg. A logikus tudományos gondolkodás, a bennem lévő lelkesedés, valamint a felfedezés öröme egy olyan pályára állított, melyet csak utólag értettem meg. Egy olyan terület kutatója lettem, ami mindennapos kihívást jelent egy olyan szakorvos számára, aki egyszerre műveli az aneszteziológiát és intenzív terápiát, és ezt ötvözni igyekszik a neurológiai szakvizsgával megszerzett tapasztalataival és tudásával. A stroke terápiájában megjelenő ‘paradigma váltás’ a 2000-es évek elején rendkívüli kihívást jelentett a kórházi ellátásban dolgozók számára. Előbb a szisztémás vérrög oldó kezelés elterjedése jelentett reményt a sikeres rekanalizációra, sokak számára biztosítva egy kedvezőbb kimenetelt, majd az ún. “idő ablakon túl” érkező, tehát trombolízis terápiára alkalmatlan betegek számára nyújtott reményt a neurointervenció látványos fejlődése. Ezek birtokában úgy érezhettük, hogy egy specifikus terápia elhozta egy konkrét betegség kezelésére a megoldást. A kép azonban nem ilyen egyszerű. Az eredmények csak jól szervezett prehospitális rendszer, stroke centrumok és nagyon drága intervenciók eljárások árán érhetőek el, ráadásul a betegek egy része a gyors és szakszerű ellátás ellenére sem profitál a költséges beavatkozásból. A fogyatékossgal tovább élők pedig komoly szociális terhet jelentenek a család és az egész társadalom számára. Így a sok nyitott kérdés alapján eddigi tudományos munkáimat a primer stroke prevenció, a már bekövetkezett stroke prognosztikai elemzése, és a stroke-ot követő szekunder prevenció logikai láncára építettem fel (**1. ábra**).

Abszolút prioritás a stroke kialakulásának megelőzése. Az akut ellátásban dolgozó intenzív orvosnak erre nem sok befolyása van. Szerencsés módon sikerült egy olyan kutatást elindítanom, mely a prevenciók eszköztár része lehet. Ennek alapja az a saját megfigyelés volt, hogy a járószalagos terhelésre alkalmatlan szívbetegek, gyógyszeres (dipyridamol-teszt) terhelése kapcsán az esetek kb 20%-ban percek alatt múltó neurológiai tüneteket találtam. Feltételezésem az volt, hogy bár a beteg valamilyen szívpanasszal fordult orvosához, de betegsége nem szervspecifikus, hanem szisztémás kórállapot része, mely az agyi erek szintjén is jelen lehet. Ez indított el a

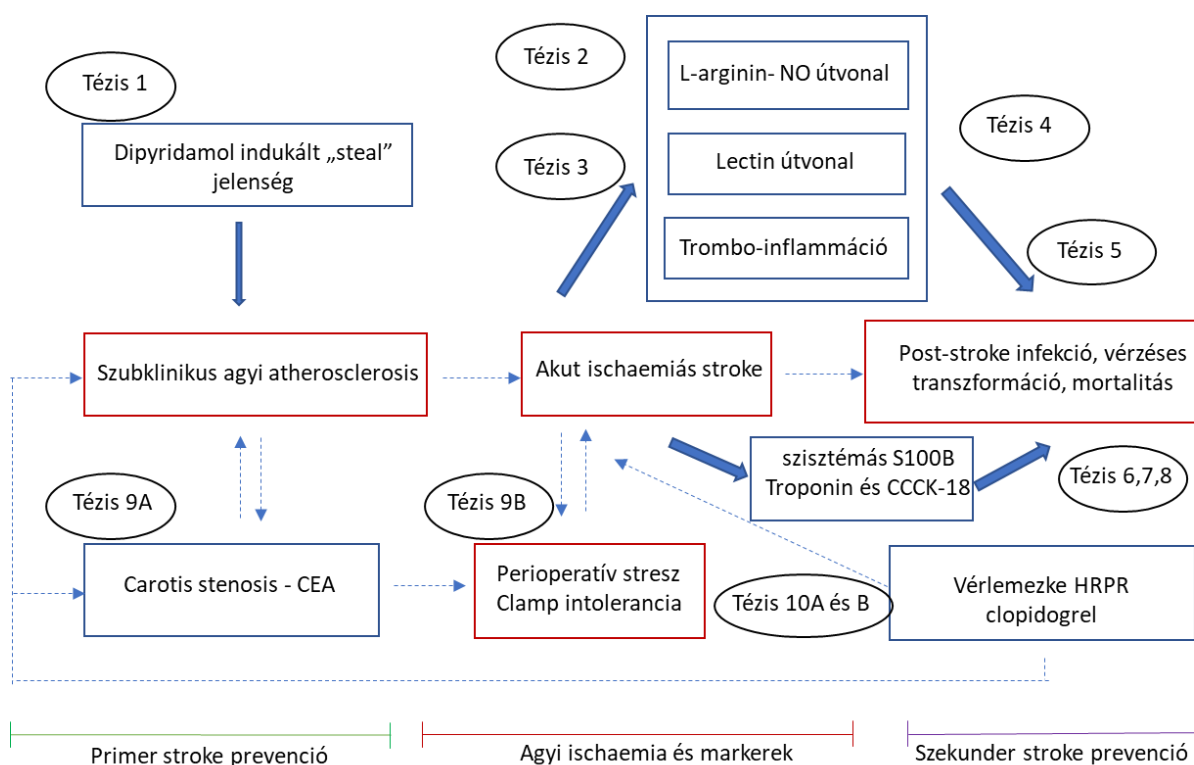
jelenség háttérben álló mechanizmusok tisztázásának irányába azzal a reménnyel, hogy eljussunk a fenyegető stroke előszobájának számító agyi atherosclerosis még szubklinikus stádiumban való detektálásához. Amennyiben hipotézisünk helytálló, akkor megfelelő prevenció terápiai és egyéb befolyásolható rizikó faktorok eliminálásával esélyt adhatunk a stroke megelőzésére (1. ábra, „Dipyridamol indukált steal-jelenség”, Tézis 1).

A második kérdés új biomarkerek vizsgálatára fókuszált már bekövetkezett ischaemiás stroke-ban és a szintén stroke megelőző állapotnak számító szignifikáns carotis stenosisban szenvedő betegekben. Itt olyan új útvonalakat kezdtünk el vizsgálni (L-arginin útvonal, komplement rendszer, thrombo-inflammatorikus kaszkád), melyek azóta sem veszítették el aktualitásukat a nemzetközi irodalomban. Részben a szóhajóható molekulák kinetikájának feltérképezésére, részben a prognózis független prediktorainak keresésére koncentráltunk (1. ábra, „Akut ischaemias stroke”, Tézis 2.).

A harmadik kérdéskör ahhoz a megfigyeléshez kapcsolódik, hogy a kedvezőtlen kimenetel olyan szövődeményekkel áll összefüggésben, mint a post-stroke infekció. Elsők között tártuk fel a post-stroke immundepresszió jelenségét, mely terápiai célpontok azonosítását kínálhatja a jövőben (1. ábra, „Post-stroke infekció, vérzéses transzformáció, miokardiális érintettség és mortalitás”, Tézis 3,4,5,6,7,8A és 8B).

A negyedik problémakör visszatükrözi kettős szakmai érdeklődésemet, és a neurológia/aneszteziológia határterületére koncentrálok. A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központban a carotis endarterectomiák (CEA) locoregionális anesztéziában történnek. Az éber, de a beavatkozás miatt nyilván szorongó beteg perioperatív stresszének csökkentésére irányultak erőfeszítéseink. Olyan éber-szedációs protokollt dolgoztunk ki, melynek kedvező hatásait a szervezetben zajló komplex stresszválasz egyes elemeinek kedvező változásával igyekeztünk alátámasztani, valamint betegek sorsának több éves nyomonkövetésével a mindennapi orvosi gyakorlatban is használható megfigyelésekhez jutottunk. Emellett érsebészeti szempontból sem elhanyagolható, hogy olyan markert azonosítottunk, mely előrejelezte a műtét alatti shunt igényt. Bár munkánk nagyobb esetszámon még validálást igényel, de eddigi eredményeink ígéretesnek tűnnek (1. ábra, „Carotis stenosis- CEA”, Tézis 9A és 9B).

A következőkben a stroke szekunder prevenciójában használt vérlemezke gátlás, illetve a gyógyszer szedése ellenére fennálló ún. 'magas reziduális vérlemezke reaktivitás' került tudományos érdeklődésünk középpontjába (1. ábra, „vérlemezke reziduális reaktivitás”, Tézis 10A és B). A rendelkezésre álló funkcionális vérlemezke vizsgálatokat (impedancia aggregometria, Multiplate), új módszerekkel egészítettük ki. Ezek közé sorolható, a saját fejlesztésű trombocita antiszedimentációs ráta (TAR), mely azt vizsgálja, hogy egyórás gravitációs üleptetés során mi történik a vérlemezkekkel, a Westergren vizsgálat analógiájára. Emellett a labormedicina által nyújtott új vérlemezke paraméterekkel, mint az éretlen trombociták frakciója (IPF stb.), valamint morfológiai (transzmissziós elektronmikroszkópia és atomerő mikroszkópia) vizsgálatokkal egészítettük ki kutatásunkat. Amennyiben ez az innovatív megközelítés eredményes lesz, akkor a személyre szabott medicina gyakorlati alkalmazása felé egy újabb nagy lépést tehetünk, megelőzve a stroke és egyéb vaszkuláris események recidíváját.



1. ábra. A Tézisben szereplő tudományos munkák logikai összefüggése

CEA: carotis endarterectomia; NO: nitrogén monoxid; CCCK-18: caspase cleaved cytoceratin; HRPR: 'high residual platelet reactivity' (kezelés ellenére fennálló reziduális vérlemezke reaktivitás).

Az eltelt évek alatt számos hazai és nemzetközi kollaborációt sikerült kialakítani, de büszkén mondhatom, hogy valamennyi kutatás, mely dolgozatomban említésre kerül hazánkban történt. Minden eredményünk csapatmunka volt, amiért minden résztvevőnek hálás vagyok.

Saját klinikai területem az aneszteziológia és intenzív terápia, rendkívüli módon támaszkodik "high-tech" eszközök alkalmazására. Ráadásul a nem túl távoli jövőben mindez valószínűleg kiegészül a mesterséges intelligencia, illetve "deep learning" alapján működő döntéshozatali algoritmusok használatával. Ennek ellenére személyes meggyőződésem, hogy a betegágy, a monitor és az altatógép mellett álló jól képzett klinikust semmi sem pótolhatja. Ami a kutatást illeti, a másik rendkívül gyorsan fejlődő ágazat a biotechnológia, mely a transzlációs kutatási területekkel még jobban összefonódik majd, és remélhetőleg tényleg elhozza az egyénre szabott terápia, akár diagnosztika, akár gyógyszer előállítás lehetőségét. Mindezek a jövőben az orvosbiológiai szakemberek és mérnökök még szorosabb együttműködését kívánják meg, különben az ugrásszerű fejlődések egyszerűen maguk alá temetnek bennünket.

Összefoglalva, egy olyan orvosgeneráció tagja vagyok, aki pályája kezdetén tanúja volt az "eminencia" alapú - klasszikus klinikai -, majd napjainkban az „evidencia” alapú és remélhetőleg a jövőben az „egyénre szabott”, molekuláris medicina fejlődésének. MTA doktori értekezésemmel a bennünket körülvevő biológiai világ értelmezésének egy apró szeletét szeretném elhelyezni, úgy, hogy abban egyaránt visszatükröződjön tudományos és klinikai érdeklődésem két specifikus területen, a neurológiában és aneszteziológiában a betegek kezelésének előtérbe helyezésével.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACAS: Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study

ACC: arteria carotis communis

ACI: arteria carotis interna

ACS: acute coronary syndromes

ACST: Asymptomatic Carotid Surgery Trial

ACTH: adreno-corticotrop hormon

ADMA: asszimetrikus dimetilarginin

ADP: adenosine diphosphate

AIS: akut ischaemiás stroke

AF: atrial fibrillation

AICS: acute ischemic coronary syndromes

AMI: akut miokardiális infarktus

AUC: are under the curve

BDZ: benzodiazepin

BMI: body mass index

CABG: Coronary artery bypass graft

CAS: carotid artery stenting

CHS: cerebrális hiperperfúziós szindróma

CI: konfidencia intervallum

COPD: chronic obstructive pulmonary disease

CRP: C-reaktív protein

CREST: Carotid revascularization endarterectomy versus stenting trial

CT: computer tomográfia

CTA: CT angiográfia

DSA: digitális szubtrakciós angiográfia

DWI: diffúzió-súlyozott képalkotás

ECST: European Carotid Surgery Trial

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EEG: electroencephalogram

EKG: elektrokardiogram

eNOS: endothelial NOS

ESR: erythrocyte sedimentation rate

FasL: fas ligand

FSC: forward scattered light

GA: általános érzéstelenítés (general anesthesia)

GALA: General anaesthesia versus local anaesthesia (for carotid surgery)

GCS: Glasgow Coma Scale

GOS: Glasgow Outcome Scale

H-IPF: high fluorescent immature platelet fraction

HLA-DR: Human Leukocyte Antigen – DR isotype

HMPAO-SPECT: ^{99m}Techetium-hexamethylpropanolamine oxime-single photon emission computed tomography

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography

hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein

IBM: International Business Machines

ICSS: International Carotid Stenting Study

IFN- γ : interferon- gamma

Ig: immunoglobulin

IL: interleukin

IL-1: interleukin-1

IL-6: interleukin-6

IPF: immature platelet fraction

iNOS: inducible NOS

IQR: interquartile range

IV: intravénás

LAR: leukocyte antisedimentation rate

LCR: large cell platelet ratio

LDL: low density lipoprotein

LOX-1: low-density oxidized lipoprotein receptor-1

LPM: L-arginien pathway metabolites

MMSE: Mini Mental State Examination

MAP-1: MBL/Ficolin associated Protein-1

MASP-3: MBL associated serine protease-3

MBL: mannose binding lectin

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

MIBI: 99mTc-methoxy-isobutyl-isonitrile

MPV: mean platelet volume

MRA: MR angiográfia

n: esetszám

NASCET: North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial

NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale

NK cells: natural killer cells

NKT-like cells: natural killer T-like cells

nNOS: neuronal NOS

NO: nitrogén-monoxid

NOS: NO synthase

NSE: neurone specific enolase

OR: odds ratio

PAR: platelet antisedimentation rate

$P(j-a)CO_2/C(a-j)O_2$: jugulo-arteriális parciális szén-dioxid nyomás különbség / arterio-juguláris vér oxigéntartalom különbség

PCI: perkután koronária intervenció

PCSK9: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

PESA: Progression of Early Subclinical Atherosclerosis Study

POCD: posztoperatív kognitív diszfunkció

PSV: csúcs szisztolés sebesség (peak systolic velocity)

PTE: Pécsi Tudományegyetem

RA: regionális érzéstelenítés (regional anaesthesia)

ROC: receiver operating characteristic

SAPPHIRE: Stenting and Angioplasty with Protection in Patients at High Risk for Endarterectomy

sCD40L: soluble CD40 ligand

SD: standard deviáció

SDMA: szimmetrikus dimetilarginin

sP-selectin: soluble P-selectin

SPE: szilárd fázis extrakció

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

SSC: side scattered light

sVCAM-1: soluble vasculare cell adhesion molecule-1

TBI: traumatic brain injury

TCD: transzkraniális Doppler

TCI: target controlled infusion

TEM: transzmissziós elektronmikroszkópia

TIA: transient ischemic attack

TNJ: tranziens neurológiai jel

tPA: tissue plasminogen activator

WBC: White Blood Cell

WHO: World Health Organization

1. BEVEZETÉS

1.1. BIOMARKEREK JELLEMZŐI

Az akut kórképek kezelése rendkívül idő érzékeny. Mind a gyors diagnosztikában, mind a terápia hatásosságának nyomonkövetésében de a prognózis becslésében is ma már nélkülözhetetlen a biomarkerek használata [1]. Ezek egy része már 'point of care' módon a betegágy mellett is hozzáférhető, jelentősen gyorsítva a klinikai döntéseket. A kutatási céllal használt biomarkerek rendkívül fontosak a különböző kórképek patomechanizmusának megértéséhez, és a jövőben használt rutin markerek kiválasztásának alapjait képezik. A National Institute of Health definíciója szerint: „A biomarker olyan tulajdonság, melyet objektíven lehet mérni, és amely indikátora lehet a fiziológias biológiai folyamatoknak, patológias folyamatoknak, vagy egy terápiára adott farmakológiai válasznak” [2]. Ez alapján nem csak a klasszikus testfolyadékokban mérhető molekulákat, hanem állapot súlyossági pontszámokat, illetve képző eljárással szerzett jeleket/kritériumokat is markereknek tekinthetünk. A kritikus állapotú betegek diagnosztikája és terápiája jelentős fejlődésen ment át az elmúlt időszakban, mely számos költséges és a beteg számára megterhelő invazív beavatkozást igényel. Így a költséghatékonyság szempontjából is elengedhetetlen a biomarker alapú algoritmusok használata, különösen a magas negatív prediktív értékkel rendelkező markereké, melyek lehetővé teszik a felesleges diagnosztikus és terápiás beavatkozások elkerülését [3]. Mivel egy folyamatosan fejlődő biotechnológiai forradalomnak vagyunk tanúi, így a biomarkerekről szóló ismereteink is folyamatosan szélesednek. Egyre érzékenyebb és specifikusabb markerek tűnnek fel a tudományos horizonton, megcsillantva a személyre szabott medicina lehetőségét.

1.2. VASZKULÁRIS BETEGSÉGEK – PARADIGMA VÁLTÁS

Az atherosclerosis patogenezisében számos új útvonal került feltérképezésre és megjelent az autoimmunitás kérdése [4]. Az atherosclerosis a nagy és közepes méretű artériák krónikus gyulladós betegsége, mely az ischaemiás szívbetegséget, a stroke-ot és a perifériás

érrendszeri betegséget foglalja magába. Az atherosclerosis kialakulása megnövekedett LDL koleszterint igényel, melynek szintjét sztatinok és proprotein-konvertáz szubtilizin/kexin 9 (PCSK9) gátlók alkalmazásával lehet szabályozni. Használatukkal mintegy felére lehet csökkenteni a kardiovaszkuláris eseményeket [5]. Kontrollált LDL koleszterin mellett a kardiovaszkuláris események fennmaradó kockázata inkább gyulladásos természetű. A közelmúltban a CANTOS-vizsgálat kimutatta, hogy a canakinumab (egy IL-1 β -t blokkoló antitest) csökkenti a súlyos kardiovaszkuláris eseményeket [6]. Ugyanakkor le is gyengítette a gazdaszervezet védelmét, ami a halálos fertőzések számottevő növekedéséhez vezetett. Az érlemezésedést az LDL-re és más antigénekre adott autoimmun válasz kíséri, amelyek súlyosbíthatják vagy enyhíthetik a betegség lefolyását. Egy új megközelítés az atherosclerosis modulációjára épül, különös tekintettel az autoantigéneket felismerő CD4 T-sejtekre, amelyek alapját képezik az adaptív immunválaszokat célzó új típusú terápia kifejlesztésének [7]. Összességében a kardiovaszkuláris kockázat értékelésében használt hagyományos rizikó faktorok (például cukorbetegség, diszlipidémia, dohányzás, nem, és életkor) nem elég pontosak, hiszen értelmezhetetlen, hogy egyes magas kockázatú betegeknél miért nem tapasztalható kardiovaszkuláris esemény, míg az alacsony kockázatúnak minősített populáció egy százaléka mégis fatális esemény áldozata lesz. Hasonló a probléma az evidencia alapú orvoslással, melynek nagy vívmánya, hogy a tekintély alapú szemléletet szigorú, bizonyítékokon alapuló tudományos gondolkodás váltotta fel, de már ennek a koncepciónak is látható a kritikája, miszerint “ugyanaz a méret nem biztos, hogy mindenki számára jó” [8]. Jelenleg úgy tűnik, hogy a jövőben a személyre szabott medicina alkalmazásától várhatjuk a morbiditási és mortalitási adatok további javulását. Ebben a transzlációs medicina fontos szerepet játszhat a maga eszközeivel (mesterséges intelligencia alapú “big data” analízis stb.) [9]. A célcsoportok azonosítása és a megfelelő kezelés időben történő bevezetése megelőzhetné az akut vaszkuláris esemény bekövetkezését, például, ha a vérlemezke gátló terápiára rezisztens eseteket a mindennapi gyakorlat szintjén szűrni tudnánk. Ha pedig bekövetkezett egy vaszkuláris esemény (pl. ischaemiás stroke), akkor a komplikációkra (pl. vérzéses transzformáció vagy post-stroke infekció) leginkább fogékony betegek szűrése segítene hozzá az időben megkezdett kezeléshez, jelentősen javítva annak kimenetelét. A korábbiakban felvetett problémák mindegyikére kitérek az alábbi kutatásaimban.

Az önálló útvonalakhoz tartozó és különböző patofiziológiai eseményeket tükröző, több biomarker közötti kölcsönhatások és kompozit biomarkerek vizsgálata egy új és izgalmas terület [10]. Ez a koncepció igaz lehet az L-arginin- nitrogén monoxid (NO) útvonal metabolitjai, az akut vaszkuláris kórképeket kísérő trombo-inflammatorikus kaszkád és a központi idegrendszeri sejsérülés neuroinflammációs molekulái közötti összefüggések feltérképezése során is.

2. RIZIKÓ CSOPORTOK FELTÁRÁSA

2.1. AGYI KÉPALKOTÓ VIZSGÁLATOK

Az orvostudomány közelmúltbeli rohamos fejlődésének köszönhetően az ischaemiás stroke egyre nagyobb sikerrel kezelhető betegséggé vált. Ennek alapkövei a laikus oktatás (tünetek felismerése laikus által), a prehospitalis ellátás és a centrumok kialakítása, ahol a modern képalkotás, a gyógyszeres beavatkozás (thrombolysis) és/vagy neurointervenció a nap 24 órájában folyamatosan elérhető [11-13]. Az idősödő társadalomban megfigyelhető stroke prevalencia emelkedés, valamint a terápia ellenére kialakuló morbiditás miatt – a stroke a tartós fogyatékoság leggyakoribb oka - a prevenció fontosságát nem lehet eléggé hangsúlyozni [14]. Ezen a területen a fejlett neuro-képalkotó technikák használata előnyös lehet [15]. A mágneses rezonancia (MR) technikák és a pozitron emissziós tomográfia (PET) segíthetnek olyan premorbid állapotok feltárásában, amelyek egyébként stroke-hoz vezethetnek, és mind az elsődleges, mind a másodlagos stroke prevencióban hasznosak lehetnek [16]. A definitív stroke kialakulását megelőző carotis stenosis és az átmeneti ischaemiás rohamok (TIA) diagnosztikája, kezelése és a progresszió dinamikájának értelmezése elengedhetetlen. Megállapítást nyert, hogy a carotis stenosis olyan jelentős szűkület esetében kell kezelni, amely neurológiai tüneteket is okoz [17]. Felmerül azonban a kérdés: hogyan kell kezelni azokat a betegeket, akiknél a stenosis és a tünetek közötti kapcsolat nem szignifikáns, vagy a tünetek nem tisztázottak. Ilyen esetekben a carotis PET és/vagy zsírtartalmú T1 MRI képei segíthetnek a plakk embolikus jellegének igazolásában [18]. Ismert, hogy a vulnerábilis nyaki plakkok embolizációt okozhatnak. A plakkban zajló

gyulladásos folyamatokat a PET, míg a plakk bevézrésését az MRI képes detektálni [18]. Habár e két vizsgálat a plakkok vulnerabilitásának különböző stádiumait mutatja, mindkettő segíthet olyan érrendszeri léziók észlelésében, amelyek az ischaemiás események kialakulásának valódi kockázatát hordozzák. A diffúzióval súlyozott MR képalkotás (DWI) kimutatta, hogy egyes TIA-k valódi ischaemiás agyi léziók lehetnek, átmeneti tünetekkel [19]. A DWI korai alkalmazása tehát hozzájárulhat ezeknek a betegeknek az időben megkezdett kezeléséhez. Az újabb képalkotó technikák elterjedése javítja a stroke-hoz vezető állapotok korai felismerését, mely a betegség kimenetelére és a stroke-al kapcsolatos egészségügyi költségekre is hatással van. A következő fejezetben e témával kapcsolatos kutatásaimat tárgyalom.

2.2. DIPYRIDAMOL TESZT A NEUROLÓGIÁBAN?

Ebben az alfejezetben szeretném összefoglalni a primér stroke prevencióval kapcsolatos korábbi kutatási eredményeinket, melyek elvezettek a jelenleg is zajló innovatív alkalmazásokhoz. Először a kardiológiai diagnosztikában alkalmazott dipyridamole stressz teszt (DP teszt) során észlelt átmeneti (percek alatt múló) neurológiai tüneteket kezdtük el vizsgálni. A DP-teszt rutin eljárás volt a 90-es években az ischaemiás szívbetegség felismerésében, a műtét előtti kardiális rizikó becslésében, továbbá a koronária intervenció indikációjának felállításában [20-22]. A protokoll szerint 0,56 mg/kg dipyridamolt juttatunk be 4 perc alatt intravénásan a keringésbe, és monitorozzuk a vitális paramétereiket. A radiofarmakon (99mTc-methoxy-isobutyl-isonitrile, MIBI) beadását követően, cardio-SPECT vizsgálat történik [20]. Elsőként publikáltuk a jelenséget, hogy a betegek egy negyedében a DP beadását követően percek alatt regrediáló tranziens neurológiai jelek alakulhatnak ki [23]. Definitív stroke sohasem maradt vissza. Tekintettel a DP értágító hatására, feltételeztük, hogy „steal” jellegű hatás érvényesül az agyi vazoregulációban. Ezt követően egy prospektív vizsgálatban a DP terheléses MIBI vizsgálatra kerülő koronária betegektől DP stressz előtt és után 15 illetve 60 perccel vénás vért vettünk S100B és neuron specifikus enoláz (NSE) meghatározás céljából [24]. A betegeket a DP által indukált tranziens neurológiai jelek alapján pozitív és negatív alcsoportokra osztottuk. A DP pozitív betegek szérumban a DP teszt elvégzése után egy órával diszkrét, de szignifikáns S100B emelkedést ($p < 0.01$) találtunk mind a DP teszt előtti (baseline), mind a kontroll alanyokban

mért értékekhez képest (**1. táblázat**) [24,25]. Az NSE esetében ezt nem tapasztaltuk. Ennek a tanulmánynak folytatásaként egy második, retrospektív analízist végeztünk, melyben a DP indukálta S100B emelkedés és a betegek 7 éves után követése alatt észlelt agyi vaszkuláris események (TIA illetve stroke) közötti kapcsolatot elemeztük kérdőíves módszerrel [24]. Dokumentált ischaemiás agyi esemény a betegek 48% -ánál fordult elő (TIA: 15/37, stroke: 3/37) hét év alatt. ROC analízis alapján a DP által indukált S100B emelkedés 60 perccel a DP stress után, $S100B \geq 0,11$ ng/ml cut-off érték mellett 7 év távlatában előre jelezte az összes cerebrovaszkuláris ischaemiás eseményt 70,6% érzékenységgel és 83,3% specifitással (AUC: 0,781, $p < 0,01$). A cerebrovaszkuláris események százalékos aránya 7 év alatt szignifikánsan magasabb volt, ha a DP-indukált S100B 7 évvel korábban mért koncentrációja meghaladta ezt a küszöbértéket ($p < 0,01$) (**2. táblázat**). Ezen túlmenően, a többváltozós elemzésben az életkorra, a nemre és a komorbiditásokra korrigálva, a küszöbérték fölötti S100B független módon jelzte előre az ischaemiás cerebrovaszkuláris események kockázatát (OR: 70,1, 95% CI: 1,5-3372; $p = 0,03$) (**2. táblázat**) [24].

1. táblázat. A dipyridamole teszt alapján tranziens neurológiai jel (TNJ) pozitív vs. negatív vs. egészségesekben mért S100B és neuron specifikus enoláz (NSE) értékek

Prospektív vizsgálat				
	ISZB TNJ pozitív n=14	ISZB TNJ negatív n=35	Normál kontrol n=34	p
Kor (min-max)	55 (51-60)	55 (52-58)	57 (53-61)	NS
Nem (F/N)	3/11	21/14	11/23	<0.05
Dohányzás	2 (14%)	7 (20%)	0	NS
Hypertonia	12 (86%)	25 (71%)	0	NS
Hyperlipidemia	6 (43%)	14 (40%)	0	NS
Diabetes	1 (7%)	8 (22%)	0	NS
S100B T0	0.06(0.03-0.08)	0.04(0-0.08)	0.03(0.01-0.05)	NS
S100B T15	0.07(0.03-0.14)	0.04(0.01-0.08)	NA	NS
S100B T60	0.15(0.04-0.25)	0.03(0-0.10)	NA	<0.01
NSE T0	10.4(7.5-22.4)	11.5(5.9-28.2)	10.1(9.0-11.9)	NS
NSE T15	9.0(7.1-30.4)	8.5(5.5-14.3)	NA	NS
NSE T60	9.2(8.1-12.1)	7.5(5.5-12.0)	NA	NS

Az adatokat, mint median és interkvartilis tartomány adtuk meg, kivéve életkor, amit átlag (minimum-maximum) ábrázoltunk. A diszkrét változókat, mint abszolút szám (százalék) mutatjuk. Chi-négyzet próba, Mann-Withney U teszt. Rövidítések: ISZB, ischaemiás koronária betegség; TNJ, tranziens neurológiai jelek; NSE, neuron specifikus enoláz; T0: DP teszt előtt; T15: 15 perccel DP teszt után; T60: 60 perccel DP teszt után. NA, nem alkalmazható; NS, nem szignifikáns.

2. táblázat. A dipyridamole teszt után 60 perccel mért szisztémás S100B diszkriminatív értéke a 7 éves után követés alatt észlelt TIA/stroke becslésében

	S100B<0,11ng/ml T60	S100B≥0,11ng/ml T60	p
Follow-up adatok	26	16	NA
TIA/ stroke 7 év alatt, %	23%	75%	<0.01

Rövidítések: T60: 60 perccel DP teszt után.; TIA: tranziens ischaemiás attack; NA, nem alkalmazható.

2.3. DIPYRIDAMOL TESZT ÉS MR PERFÚZIÓS KÉPALKOTÁS

Ezek után a DP-indukált átmeneti neurológiai tünettán képalkotó vizsgálattal való megközelítését helyeztük fókuszba. A DP teszt pozitív betegek ^{99m}Techetium-hexamethylpropanolamine oxime (HMPAO) agyi single photon emission computed tomography (HMPAO-SPECT) vizsgálatának eredményeit korábban már közöltük [23]. A terheléses és a nyugalmi agyi SPECT képek elemzése alapján fogalmaztuk meg azt a hipotézisünket, hogy a DP teszt a neurológiában a szubklinikus (manifeszt tünetek nélküli) agyi keringészavarok diagnosztikájában értékes eljárás lehet. Az MR képalkotás fejlődésével a cerebrovascularis rezerv (CVR) vizsgálata, illetve TIA-n átesett betegek agyi keringészavarának korai felismerése lehetőséget ad a fenyegető stroke megelőzésére, a prevenció elkezdésével. Ezért olyan vizsgálati protokollt terveztünk, melyben (i) a DP tesztet perfúziós MR képalkotással egészítettük ki; (ii) és a betegek szisztémás keringésében mértük az NO donor L-arginin koncentrációját. Ez utóbbtól az L-arginin útvonal és az adenzin mediálta vazodilatáció és endotél funkció szerepének tisztázását vártuk agyi erekben, mivel azt korábban szívizomzatban már leírták [26].

2.4. CÉLKITŰZÉS

(i) DP stressz hatásban elvégzett perfúziós MR vizsgálattal feltárni a betegek tranzien neurológiai kórjelei háttérében álló vaszkuláris eltéréseket az agyi vértartalom (cerebral blood volume, CBV), az átlagos kontrasztanyag áthaladási idő (mean transit time, MTT) illetve a kontraszt csúcsig eltelt idő (time to peak, TTP) alapján; (ii) tisztázni a jelenség dinamikáját: az észlelt eltérések megszűnnek-e a nyugalmi MR vizsgálat során?; (iii) van-e különbség a tranzien neurológiai jeleket mutató és nem mutató betegek L-arginin szérumszintjében?

2.5. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Összesen 9 beteget vontunk be obszervációs előtanulmányunkba, akik sem neurológiai betegségben, sem a nagy artériák proximális stenosisában nem szenvedtek. Korábban mindegyiküknél ischaemiás koszorúér betegség gyanújával DP stresszrel kombinált myocardialis perfúziós szcintigráfia (MPS) történt. Röviddel az intravénás DP beadása után 4 betegnél enyhe és átmeneti bal féltekei neurológiai tüneteket észleltünk, mely 15 percen

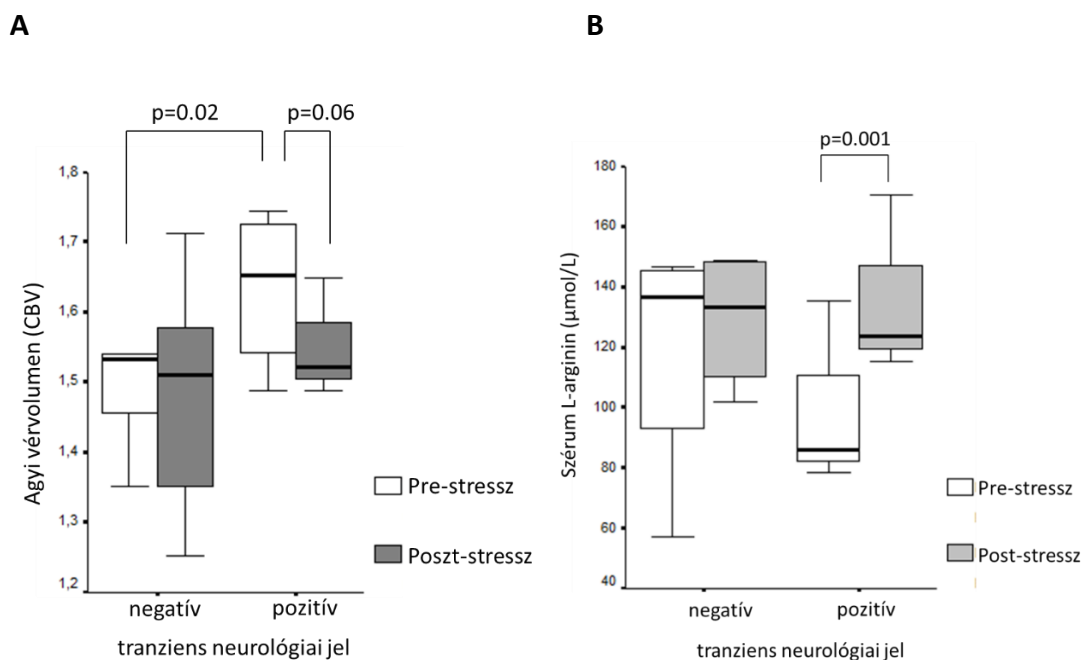
belül eltűnt. Egyiküknél sem maradt vissza tartós deficit. A másik 5 betegnek nem voltak DP indukált neurológiai tünetei. Az L-arginin szérumszint meghatározása céljából pre- és post-stressz vérvétel történt. Az L-arginin szint mérése HPLC-vel (High Pressure Liquid Chromatography) történt a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Intézetében. Tájékoztatás és írásbeli beleegyezést követően mind a 9 beteget újabb intravénás DP-tesztre jegyeztük elő egy későbbi időpontra. Ekkor a korábbival megegyező protokoll szerint végzett DP tesztet perfúziós agyi MR vizsgálattal kombináltuk. A DP-teszt alatt a hemodinamikai paramétereket mint például pulzusszám (HR), szisztolés- (SBP) és diasztolés vérnyomás (DBP), artériás középnyomás (MAP), pulzusnyomás (PP) és perifériás oxigén szaturáció (SpO₂), légzésszám szintén rögzítettük.

2.6. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS program alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). A poszt-DP vs nyugalmi perfúziós és diffúziós paraméterek, valamint a jobb és bal félteke identikus régiói közötti értékek összehasonlítását kétmintás *t*-próbával végeztük. Az L-arginin szérumszint koncentrációk összehasonlítása Mann-Whitney teszttel történt. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

2.7. EREDMÉNYEK

A két csoport makro-hemodinamikai és oxigenizációs változóiban nem találtunk különbséget. A nyugalmi (pre-stressz) MR vizsgálattal a TNJ pozitív betegekben szignifikánsan magasabb vérvolumen (cerebral blood volume, CBV) volt észlelhető a bal féltekei senso-motoros areának megfelelően, a TNJ negatív betegek identikus területében mért vérvolumenhez képest (**2. ábra A**). Ez a különbség a DP hatásban egy hónap múlva elvégzett post-stressz MR felvételeken eltűnt. Az MTT és TTP értékekben nem találtunk különbséget a TNJ pozitív és negatív betegek összehasonlítása során. A TNJ pozitív betegekben az L-arginin szint szignifikánsan emelkedését mértük a DP-teszt után a kiindulási értékhez képest (átlag: $136,4 \pm 29,7$ $\mu\text{mol/l}$ vs. $99,9 \pm 30,9$ $\mu\text{mol/l}$, $p = 0,001$) (**2. ábra B**). Viszont a TNJ pozitív vs negatív betegek között sem a pre-stressz (habár tendenciában különbözött), sem a poszt-stressz L-arginin szint nem mutatott szignifikáns különbséget.



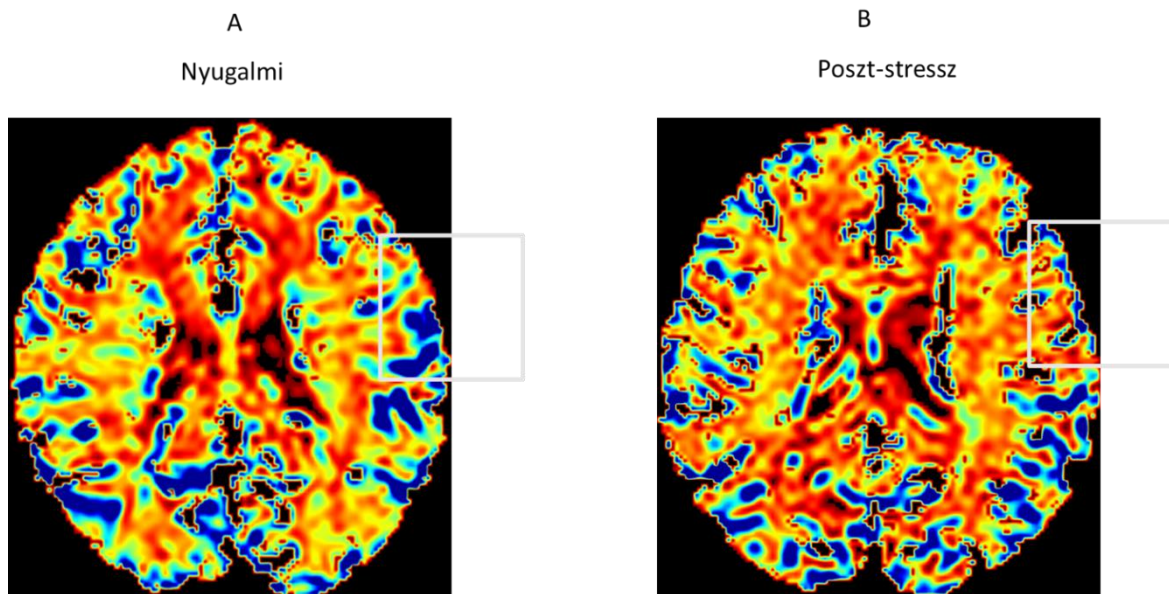
2. ábra. A dipyridamol adás előtt (pre-stressz) és után (post-stressz) mért agyi vérvolumen (CBV) a szenzo-motoros áréában (**A**) és a szérumban L-arginin koncentráció a dipyridamole (DP) teszt pozitív (+) és negatív (-) csoportban (**B**).

DP teszt negatív (kontrol) és pozitív= átmeneteli neurológiai jelek hiánya, illetve jelenléte

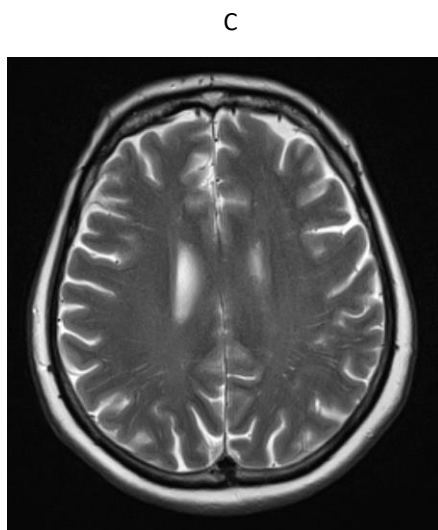
2.8. MEGBESZÉLÉS

Adataink arra utalnak, hogy a mikrocirkulációs zavarral élő TNJ pozitív betegeknél a rezisztencia erek átmérőjének növekedése (magasabb regionális CBV) képes a szükséges, magasabb áramlást biztosítani a kritikus agyi területeken [27]. A DP terhelés során a CBV normalizálódik vagy a maradék területeken is létrejön a vazodilatáció (**3. ábra**). A hatásmechanizmus nem tisztázott. Az endotélfunkció helyreállításáért a DP-indukálta adenosin koncentráció emelkedés, míg a miogén válaszáért a lokális S100B felszabadulás szerepe merül fel [28]. Mindkettő az erek átmérőjének növekedését váltja ki vazodilatáció, illetve vazorelaxáció útján [29]. Az S100B protein *ex vivo* élettani hatásait korábban izolált érpreparátum modellen vizsgáltuk [30]. Patkány basilaris artérián (BA) az S100B dózis függő módon szignifikánsan növelte a BA átmérőjét (diaméter: 280 ± 7 -ről 317 ± 8 μm -re nőtt, 10^{-6} M koncentrációnál, $n=5$, $p<0.05$), valamint szignifikáns BA relaxációt is okozott ($0 \pm 0,02$ -ről $-0,7 \pm 0,03$ Nm-re, $n=5$, $p<0.05$) [30]. Ismételt S100B adagolás hasonló nagyságrendű változást hozott létre. Az acetil-kolin indukálta vazomotoros válasz nem változott S100B hozzáadása után (diaméter: 92 ± 15 μm vs. 108 ± 9 μm , $n=5$) [30]. Ezek alapján azt

feltételezzük, hogy a Ca^{2+} kötő S100B az endotél funkciótól függetlenül vált ki dilatációt és relaxációt az izolált basilaris artérián. Mérési adataink alapján felmerül, hogy a sérült agyterületek vérátáramlásnak (CBF) fokozása révén az S100B neuroprotektív szerepet játszik bizonyos központi idegrendszeri sejt-sérüléssel járó kórállapotokban [31]. A pontos hatásmechanizmus (például a simaizom sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tartalmának szerepe) feltárása azonban még további vizsgálatokat igényel.

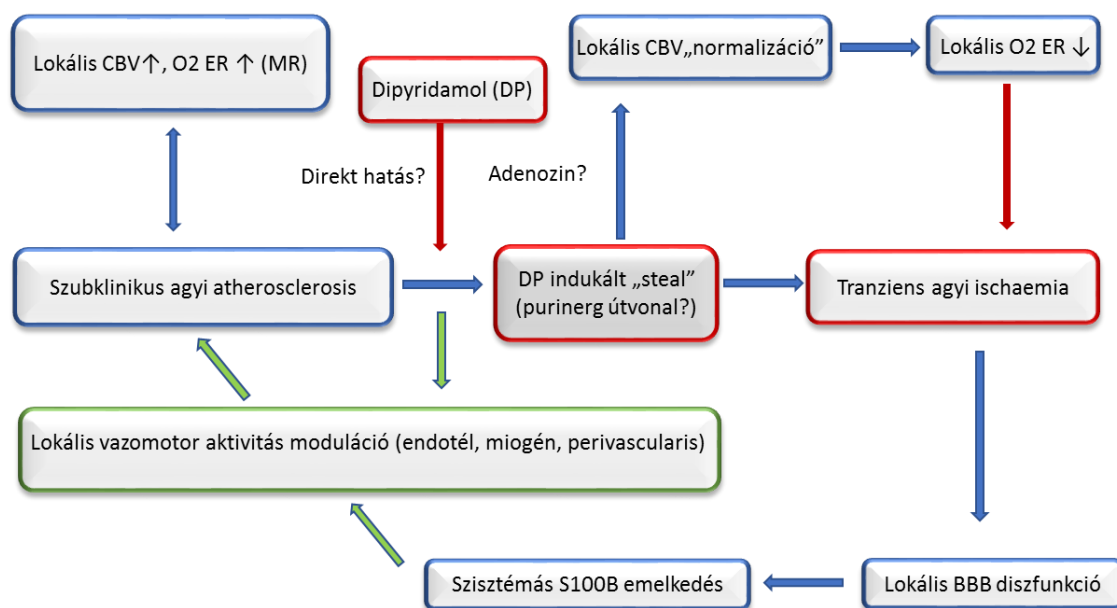


A transziens bal féltekei tüneteket mutató beteg nyugalmi többlet perfúziója látható a szenzo-motoros kéregben az A képen (kék szín= magasabb CBV), míg a B képen DP hatásban globális CBV növekedés észlelhető, lokális relatív csökkenéssel a tünetképző területen (világos keret). Normál T2 szekvencia a C képen.



3. ábra. Egy dipyridamol (DP) stressz pozitív beteg nyugalmi (A) és DP hatásban elvégzett perfúziós MR képe (B), valamint T2 kép az érintett síkban (C).

Az intravénás DP a kritikus területen *ab ovo* fokozott CBV-t csökkenti, paralell szisztémás L-arginin emelkedés kíséretében [27]. Ez egyrészt direkt vazorelaxációs hatást jelez az agyi erekben, másrészt egy közvetett vazodilatációs hatást, mely feltehetően az L-argininből történő NO felszabadulás révén javítja a vazomotor funkciót [32]. Ezzel egyezik egy másik kutatócsoportunk megfigyelése, mely az L-arginin-útvonal és a fehérállományi léziókkal vagy anélkül szövődött migrén közötti kapcsolatot vizsgálta tünetmentes betegekben [33]. Vaszkuláris érintettség esetén, a DP stressz előtti heterogén CBV-vel rendelkező területeken, az ilyen kettős hatások átmeneti neurológiai tüneteket okozhatnak valószínűleg "steal" jelenség következtében [27]. Az intravénás DP stressz segíthet a koszorúér betegek stroke kockázatának becslésében. A dipyridamole teszt alatt észlelt klinikai megfigyelés és az agyi mikrocirkuláció közötti összefüggést saját és mások kísérletes adatai alapján az alábbi sematikus ábrán foglaltam össze (**4. ábra**).



4. ábra. A dipyridamole (DP), az agyi vérvolumen (CBV), az oxigén extrakció (O2ER) és a vér-agy gát (BBB) illetve az S100B közötti összefüggések hipotetikus kapcsolata

A kék nyilak a patofiziológiai, a piros nyilak a stresszor tényezőket, míg a zöld nyilak a "repair" folyamatokat szimbolizálják.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Cseplo P, Vamos Z, Hamar J, Molnar T, Koller A. Ca²⁺-binding protein-S100B elicits dose-dependent dilation/relaxation of rat cerebral arteries. *Ideggyogy Sz.* **2013**;66:3-4 pp.130-1.

Molnar T, Szabo Z, Schmidt E, Barta E, Zambo K, Illes Z. "Cerebrovascular stressing": drug-induced S100B elevation and transient neurological signs predict ischemic cerebrovascular events. *Clin Chem Lab Med.* **2013**;51:e69-72.

Molnar T, Horvath A, Szabo Z, Vamos Z, Dóczy T, Illes Z. Detection of silent cerebral microcirculatory abnormalities in patients with manifest ischemic coronary disease: a perfusion brain MRI study combined with dipyridamole stress. *Scand Cardiovasc J.* **2020**;DOI:10.1080/14017431.2020.1821911

3. SZIGNIFIKÁNS CAROTIS STENOSIS ÉS AKUT ISCHAEMIÁS STROKE

3.1. AZ L-ARGININ ÚTVONAL METABOLITJAINAK VIZSGÁLATA SZIGNIFIKÁNS CAROTIS STENOSISBAN ÉS AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN

A hipoxiás és ischaemiás inzultusok fokozzák a fehérjékben lévő L-arginin metilációját [34]. Ennek eredményeképpen nagy mennyiségű metilált arginin származék (ADMA, SDMA) keletkezik a protein metiltranszferáz (PRMT) enzim hatására [35,36]. Az ADMA lebontását a dimetil-diamino-hidroláz (DDAH) végzi, míg az SDMA kizárólag a vesén keresztül választódik ki [35]. Az ADMA bizonyos koncentrációt meghaladva a szisztémás keringésben, gátolja a nitrogén-monoxid (NO) termelődését, ezért a különböző vaszkuláris betegségek kialakulásában etiológiai tényezőként említik [37-39]. Feltételezik, hogy az L-arginin, mint a legfontosabb NO donor, antagonizálja az ADMA hatását [39]. Az SDMA a végállapotú vesebetegekben a mortalitás fontos markere [40].

A nitrogén-monoxid (NO) az erek átmérőjének szabályozásában játszik fontos szerepet [41]. Az L-arginin és dimetilált származékai, az ADMA és az SDMA plazma koncentrációja összefüggésbe hozható az akut ischaemiás stroke utáni hosszú távú kimenetellel [42-45]. Az ischaemiás stroke utáni szubakut ADMA és SDMA emelkedés a 90 napos funkcionális kimenetel kedvezőtlen prediktorának bizonyult [43]. Emellett a plazmában mérhető SDMA az ischaemiás stroke-ot követő 30 napos kedvezőtlen kiemenetelt is előrejelzi. A vaszkuláris betegekben észlelt endotél diszfunkció összefüggésbe hozható a szisztémás keringésben mért emelkedett ADMA szinttel [46]. Az ADMA a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) gátlása révén az értónus szabályozásában kulcs szerepet játszó NO termelődését csökkenti [47].

3.2. CÉLKITŰZÉS

Célul tűztük ki az akut ischaemiás stroke első 72 órájában: (i) az L-arginin útvonal molekuláinak kinetikai elemzését; valamint korrelációjuk vizsgálatát (ii) az infarktus nagyságát jelző S100B; (iii) és az atherosclerosis marker C-reaktív protein (CRP) szintekkel. Kontrol csoportként olyan betegeket gyűjtöttünk, akik előrehaladott atherosclerosisban, szignifikáns carotis stenosis-ban szenvedtek.

3.3. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Tanulmányunkban prospektív módon vizsgáltunk 55 akut ischaemiás stroke-ban (AIS) szenvedő beteget. Sorozatos vérmintavételt végeztünk az L-arginine, ADMA, SDMA, S100B és magas szenzitivitású C-reaktív protein (hsCRP) meghatározása céljából a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül, majd 24 és 72 óra múlva. A szérum L-arginin, ADMA és SDMA mérése a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Intézettel való kollaborációban történt high-performance liquid chromatographia (HPLC) módszerrel [48]. Adatainkat 44 aszimptomás szignifikáns carotis stenosis-ban (AsCS) szenvedő beteg, illetve 45 egészséges kontrol alany adataival hasonlítottuk össze (**3. táblázat**). A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Skála (NIHSS) pontszáma alapján jellemeztük.

3.4. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS program alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). A két csoport adatainak összehasonlítására diszkrét változó esetén chi-négyzet próbát, normál eloszlás folyamatos változó esetén két mintás *t*-próbát, egyébként nem parametrikus Mann-Whitney tesztet használtunk. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

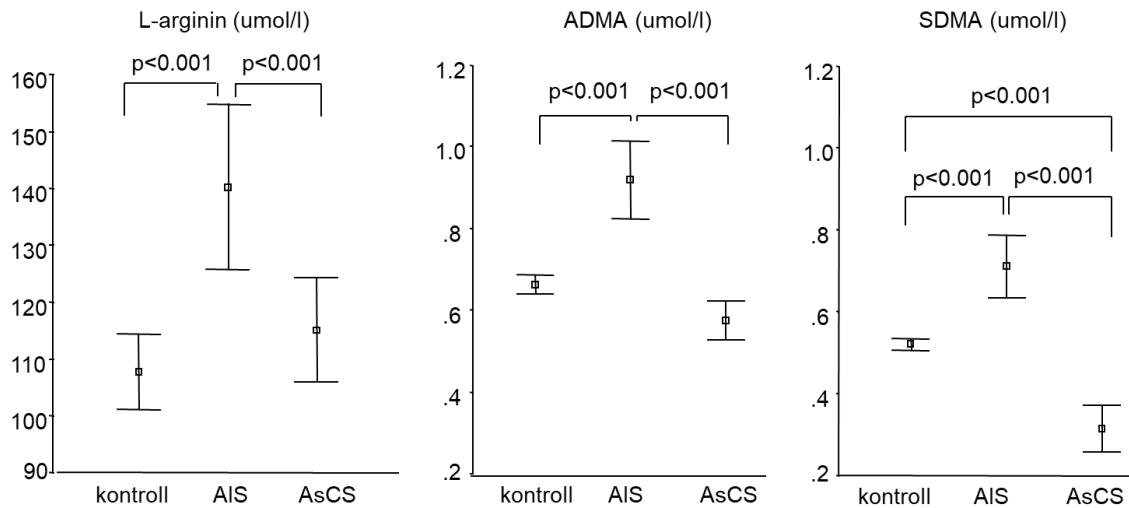
3.5. EREDMÉNYEK

Az akut ischaemiás stroke-ban és aszimptomás szignifikáns carotis stenosisban szenvedő betegek demográfiai és klinikai adatait a **3. táblázatban** foglaltuk össze. A stroke betegek szérumában már a hiperakut szakban emelkedett L-arginin, ADMA és SDMA értékeket mértünk, mely mind a carotis stenosisban szenvedő betegekhez, mind az egészségesekhez viszonyítva szignifikáns volt (**5. ábra**). Az L-arginin útvonal markereinek, valamint az L-arginin/ADMA és L-arginin/SDMA hányadosoknak a kinetikáját a post-stroke 6., 24. és 72. órában az **6. ábrán** mutatjuk be. A szignifikáns különbségeket * (L-arginin/ADMA 24 vs 6 órás) illetve # (L-arginin/SDMA 72 vs 6 órás) jelöltük.

3. táblázat. A beteg csoportok demográfiai és klinikai adatai

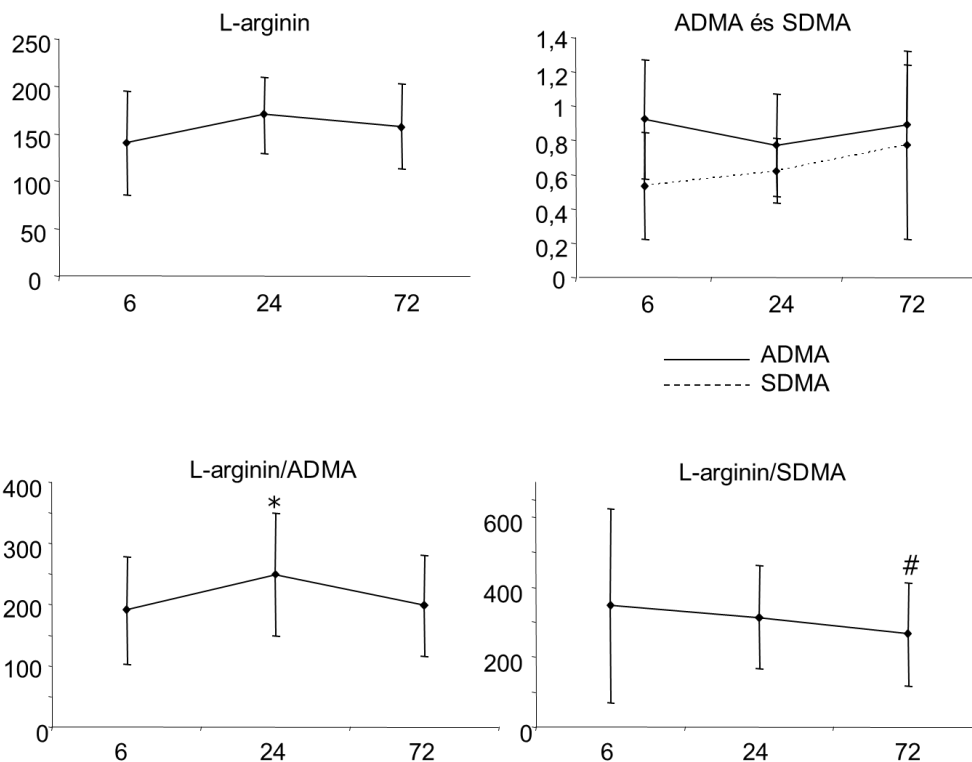
	AIS	AsCS	<i>p</i>
	N= 55	N=44	
Életkor, évek	70±10	66±10	NS
Férfi	28 (51)	29(66)	NS
ISZB	8 (14)	7 (16)	NS
COPD	7 (13)	5(11)	NS
Dohányzás	12 (22)	13 (29)	NS
Hypertonia	40 (72)	39 (88)	NS
Diabetes mellitus	7 (13)	8 (18)	NS
Creatinin (µmol/l)	75.5±14.5	74.5±13.8	NS
Statin terápia	25 (45)	38 (86)	<0.01
Clopidogrel	5 (9)	29 (66)	<0.01
Aspirin	32 (58)	24 (55)	NS
NIHSS felvételtkor	11.5±5.4	NA	NA
NIHSS elbocsátáskor	8.4±6.4	NA	NA
Post-stroke infekció	16 (29)	NA	NA
Halálozás	13 (24)	NA	NA

Az adatokat, mint átlag±SD vagy abszolút szám (százalék) ábráztuk. Rövidítések: AIS, Akut ischaemiás stroke; AsCS, aszimptomás szignifikáns carotis stenosis; BMI, body mass index; ISZB, ischaemiás szívbetegség; COPD, chronic obstructive pulmonary disease, NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale; NA, nem alkalmazható; NS, nem szignifikáns.



5. ábra. Szérum L-arginin, ADMA és SDMA értékek egészséges kontrolban, akut ischaemiás stroke-ban (AIS) és aszimptomás szignifikáns carotis stenosisban (AsCS)

Az adatokat, mint átlag és 95% konfidencia tartomány ábráztuk.



6. ábra. Szérum L-arginin, ADMA és SDMA, valamint az L-arginin/ADMA és L-arginin/SDMA hányadosok kinetkiája akut ischaemiás stroke első 72 órájában

Az adatokat, mint átlag és 95% konfidencia tartomány ábráztuk. (L-arginin/ADMA 24 vs 6 órás; # L-arginin/SDMA 72 vs 6 órás szignifikáns különbséget jelöl)*

Az agyi infarktus nagyságával arányos S100B protein és a post-stroke 72 óránál mért SDMA között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk. Hasonlóan pozitív korrelációt találtunk a baseline és a post-stroke 72 óra közötti S100B és ADMA koncentrációváltozás között. Mindkét metilarginin származék koncentrációváltozása pozitívan korrelált a hsCRP koncentrációváltozásával (**4. táblázat**). A post-stroke 72 óránál mért csökkent L-arginin (OR:1,03; 95% CI: 1,0-1,05, $p<0,05$) és emelkedett hsCRP (OR:1,1; 95% CI: 1,0-1,11; $p<0,05$) a post-stroke infekció független prediktorának bizonyult. A hiperakut szakban (6 órán belül) emelkedett S100B (OR:14,3; 95% CI: 1,4-147,4; $p<0,05$) és a post-stroke 72 óránál mért hsCRP (OR:1,04; 95% CI: 1,0-1,1; $p<0,05$) pedig a halálozás független prediktorai voltak.

4. táblázat A markerek közötti korrelációk az ischaemiás stroke első 72 órájában

	L-arginin	ADMA	SDMA
<6 óra			
hsCRP <6 óra	$r = -0,317$; $p < 0,05$	NS	NS
S100B <6 óra	NS	NS	NS
72 óra			
hsCRP 72 óra	NS	NS	$r = 0,478$; $p < 0,01$
S100B 72 óra	NS	NS	$r = 0,375$; $p < 0,05$
változás 72 óra alatt (Δ)			
Δ hsCRP 72 óra	NS	$r = 0,362$; $p < 0,05$	$r = 0,363$; $p < 0,05$
Δ S100B 72 óra	NS	$r = 0,326$; $p < 0,05$	NS

ADMA=asszimmetrikus dimetilarginin; SDMA=sszimmetrikus dimetilarginin; hsCRP= magas-szenzitivitású C reaktív protein; NS= nem szignifikáns. Spearman korreláció.

3.6. MEGBESZÉLÉS

Az L-arginin útvonal vizsgálatát végeztük el akut ischaemiás stroke és szignifikáns carotis stenosis-ban szenvedő betegeken: (1) vizsgáltuk az AIS nagyon korai szakaszából származó longitudinális változásokat; (2) vizsgáltuk korrelációjukat más biomarkerekkel is, mint az infarktus nagyságát jelző S100B és az akut fázis fehérje hsCRP; (3) valamint analizáltuk az L-arginin útvonal molekuláinak előrejelző szerepét a mortalitásban, a post-stroke fertőzések előrejelzésében és az NIHSS pontszám változásában.

Az AIS-ban szenvedő betegek emelkedett bazális L-arginin szintje valószínűleg adaptív mechanizmus. Ismert, hogy L-arginin adásával antagonizálni lehet az NO képződés gátlását [49,50]. Az L-arginin az NO prekuzora molekulája. Az eNOS által termelt NO döntő szerepet játszik az érrendszer szabályozásában, ami vazodilatációt eredményez. Ezért feltételezzük, hogy az L-arginin korai emelkedése fontos szabályozási mechanizmus lehet az AIS hiperakut fázisában; az extracelluláris arginin elérhetősége kedvező hatással lehet az agyi perfúzióra azáltal, hogy növeli a NO-t. Az ischaemia kezdete után 12-48 órával végzett excitotoxikus és ischaemiás sérülések ugyanakkor aktiválják a neuronális és indukálható NOS-t (nNOS, iNOS); az NO koncentrációjának ilyen késleltetett lokális növekedése már neurotoxikus és hozzájárul a másodlagos károsodásokhoz [51]. Összefoglalva, az ischaemiás folyamat stádiumától és a termelődés helyétől függően, az NO lehet védő vagy károsító hatású. Az NO agyi ischaemiában megfigyelhető kettős szerepe alapján felvetődik a szelektív terápiás megközelítés szükségessége: (i) a neuronális és az indukálható NOS gátlása; (ii) és az endoteliális NOS serkentése. Az endogén NOS-gátló ADMA megnövekedett koncentrációja már 6 órával a stroke után összekapcsolható az endotélsejtek diszfunkciójával és az atherosclerosis patogenezisével; feltehetően ez a fokozott fehérje metilálódás és az oxidatív stressz következménye. Azoknál a betegeknél, akiknél magasabb ADMA koncentráció mérhető a plazmában, gyakrabban látunk tünetmentes ischaemiás léziókat az agyi MRI képeken [52]. Emelkedett ADMA szintet figyeltek meg ismétlődő stroke-ban szenvedő betegeknél is [53]. Noha az SDMA-t hosszú ideje egyszerű inert mellékterméknek tekintették, az AIS után 72 órával történt változásai előre jelezték a post-stroke fertőzéseket ebben a kohortban. Az SDMA szerepét vizsgálták olyan krónikus gyulladós folyamatokban, mint a rheumatoid arthritis és a krónikus vesebetegség [54,55]. Az SDMA

a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) aktiválódását eredményezte, fokozta az interleukin-6 (IL-6), a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF- α) és a reaktív oxigén gyökök (ROS) termelését in vitro endoteliális sejtekben és monocitákban. Ezen felül az SDMA koncentrációja korrelált a kedvezőtlen klinikai kimenetellel az ischaemiás stroke utáni első 30 napban [56]. Egy nagy, multicentrikus, populáció-alapú kohorszban az SDMA, a kardiovaszkuláris mortalitás független előrejelzőjének bizonyult [57]. Az SDMA-t a kórházi halálozás előrejelzőjeként is vizsgáltuk kohorszunkban. A post-stroke 72. órában a $p=0,06$ egy határozott tendenciát jelez; tehát nagyobb mintaméret vagy hosszabb nyomon követés esetén szignifikáns összefüggést is eredményezhet. Tanulmányunk alapján megállapítható, hogy: (i) az L-arginin útvonal metabolitjai (ADMA, SDMA) már az akut ischaemiás stroke korai fázisában emelkedettek, ráadásul ez kifejezettebb, mint szignifikáns carotis stenosisban, ami az atherosclerosisnál súlyosabb endotél diszfunkciót tükröz; (ii) feltételezzük, hogy stroke betegekben az L-arginin korai, emelkedett szérumban koncentrációja, egy adaptív válasz lehet az eleve fennálló érfali bántalomra. Erre utalhat, a post-stroke 24 óránál mért szignifikánsan magasabb L-arginin/ADMA hányados is; (iii) az L-arginin és az ADMA ellentétes mozgása az L-arginin protektív szerepét sugallja; (iv) adatainkból úgy tűnik, hogy az L-arginin koncentráció mérése a post-stroke infekció előrejelzésére is alkalmas, mely lehetővé teszi az adekvát antimikrobás kezelés időben való megkezdését.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY

Molnar T, Pusch G, Papp V, Feher G, Szapary L, Biri B, Nagy L, Keki S, Illes Z. The L-arginine pathway in acute ischemic stroke and severe carotid stenosis: temporal profiles and association with biomarkers and outcome. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2014;23:2206-14.

4. A LEKTIN ÚTVONAL MOLEKULÁINAK VIZSGÁLATA AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN

4.1. NEUROIMMUNOLÓGIAI ELŐZMÉNYEK

Az ischaemiás stroke elsősorban, de nem kizárólagosan, az idős populáció betegsége. Mivel az immunrendszer működésének a hatékonysága az életkor előrehaladtával hanyatlik, a stroke immunológiai aspektusainak vizsgálata az utóbbi években reflektorfénybe került [58,59]. Egy folyamatosan fennálló „szisztémás gyulladós állapot” (atherosclerosis) mellett, csökkent sejt regenerációval és szöveti reparációval is számolni kell az idősokban [60,61]. A stroke és az immunrendszer kapcsolatának vizsgálata alapvetően három irányú: (i) Állatkísérletes és humán klinikai bizonyítékok támasztják alá, hogy a szisztémás gyulladás/infekció fennállása önmagában is rizikófaktora a vaszkuláris betegségek (coronária és cerebrovaszkuláris kórképek) kialakulásának [60,61]. A stroke kialakulásában szerepet játszó társbetegségek, mint az atherosclerosis, hypertónia, elhízás, hyperlipidaemia, vagy cukorbetegség mind kapcsolatba hozhatók a szisztémás gyulladás tartós jelenlétével [60,61]. (ii) Számos evidencia szól a már bekövetkezett stroke esetén az immunrendszer működésének (mind az ősi, mind az adaptív) diszregulációjáról [62]. (iii) Stroke esetén paralel zajlik egy lokális és egy szisztémás immunválasz [63]. Klinikai vizsgálatainkban ez utóbbira koncentráltunk.

Jelenleg is intenzív kutatás tárgyai olyan immunológiai, illetve gyulladós markerek, melyek segítségével egyrészt a stroke kialakulásának rizikóját becsülni tudjuk, másrészt segítenek feltárni a stroke miatt megváltozott immunválasz (stroke indukálta immundepresszió) kulcs szereplőit [64,65], továbbá prognosztikai értékkel bírnak a kórlefordulás és a kimenetel szempontjából [66]. A közelmúltban megjelent adatok hívták fel a figyelmet a komplement rendszer lectin útvonalának szerepére az ischaemiás stroke kialakulásában [67,68]. A lectin útvonal aktiválódása a mannose-binding lectin (MBL), ficolin-2 vagy ficolin-3 különböző ligandokhoz való kapcsolódása révén indul el [68,69]. Míg az MBL jelentőségéről számos adat áll rendelkezésre [70], addig a ficolinok szerepe kevésbé ismert [71].

4.2. CÉLKITŰZÉSEK

Feltételeztük, hogy az akut ischaemiás stroke-ot kísérő komplement aktiváció növeli az agyi infarktus nagyságát és befolyásolja a klinikai kimenetelt.

4.3. BETEGEK ÉS MÓDSZER

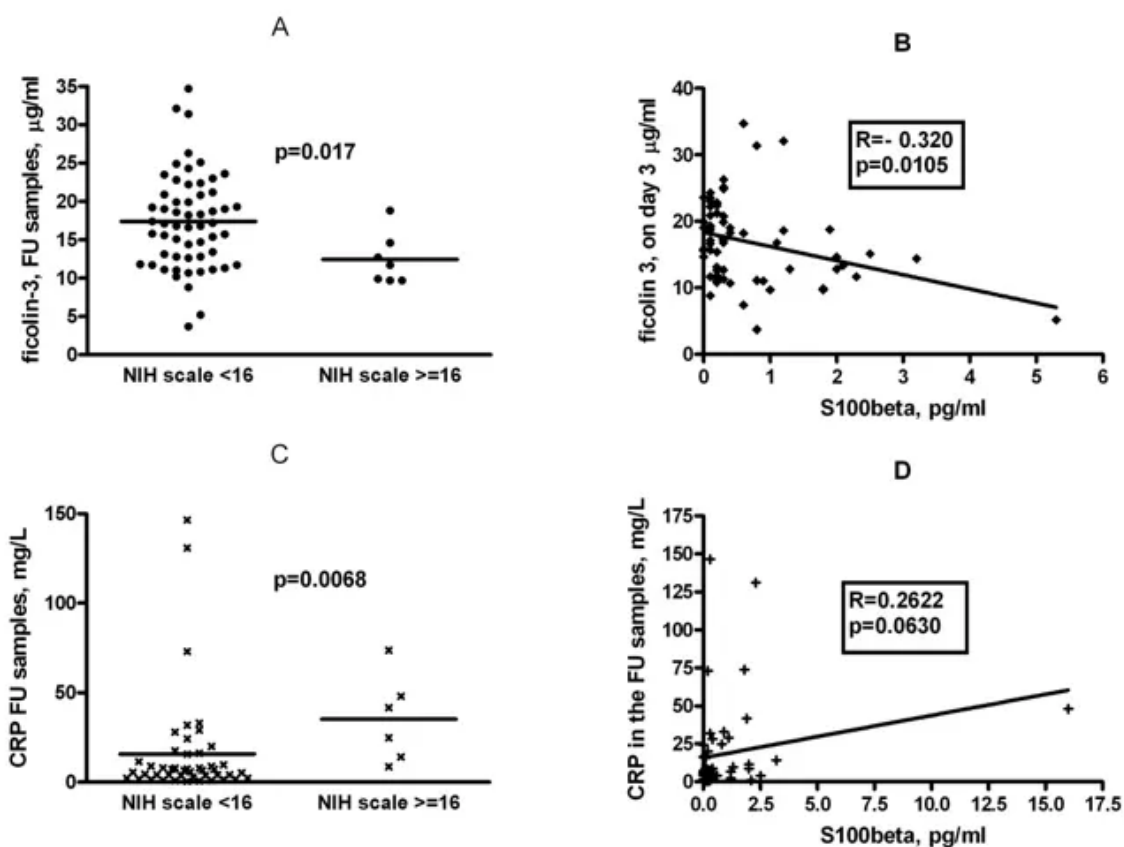
Összesen 65 akut ischaemiás stroke-ban (AIS) szenvedő beteg (kor: $69,8 \pm 9,8$; férfi: 20) szérumát vizsgáltuk. Mérési eredményeinket 100 egészséges kontrolhoz (kor: $35,5 \pm 9$; férfi: 47) és 135 szignifikáns carotis stenosisban szenvedő betegéhez (kor: $69,8 \pm 9,9$; férfi: 88) hasonlítottuk. A tünetek kezdetétől számított 12 órán belül és azt követően 3 napon keresztül sorozatos vénás mintavétel történt. A ficolin-2 és ficolin-3 szérum koncentráció meghatározása ELISA módszerrel történt (Laboratory of Molecular Medicine, Department of Clinical Immunology, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark). Emellett az S100B szérum szinteket (BioVendor, Modrice, Czech Republic) és a C-reaktív protein (CRP) koncentrációt is mértük particle-enhanced immunturbidimetric assay (Roche Cobas Integra 400, Basel, Switzerland) módszerrel. A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Skála (NIHSS) pontszáma, míg a kimenetelt a módosított Rankin Skála (mRS) alapján jellemeztük. Kedvezőtlen kimenetelnek az mRS:3-6, míg kedvezőnek az mRS: 0-2 értékeket tekintettük.

4.4. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS program alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). Mann-Whitney U tesztet használtunk a nem normál eloszlást mutató paraméterek összehasonlításához. A korrelációs analízist Spearman korrelációs együttható (r) kiszámításával végeztük. Bináris logisztikus regressziót használtunk a független prediktorok feltárására, és ROC elemzést végeztünk a küszöbérték kiszámításához. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

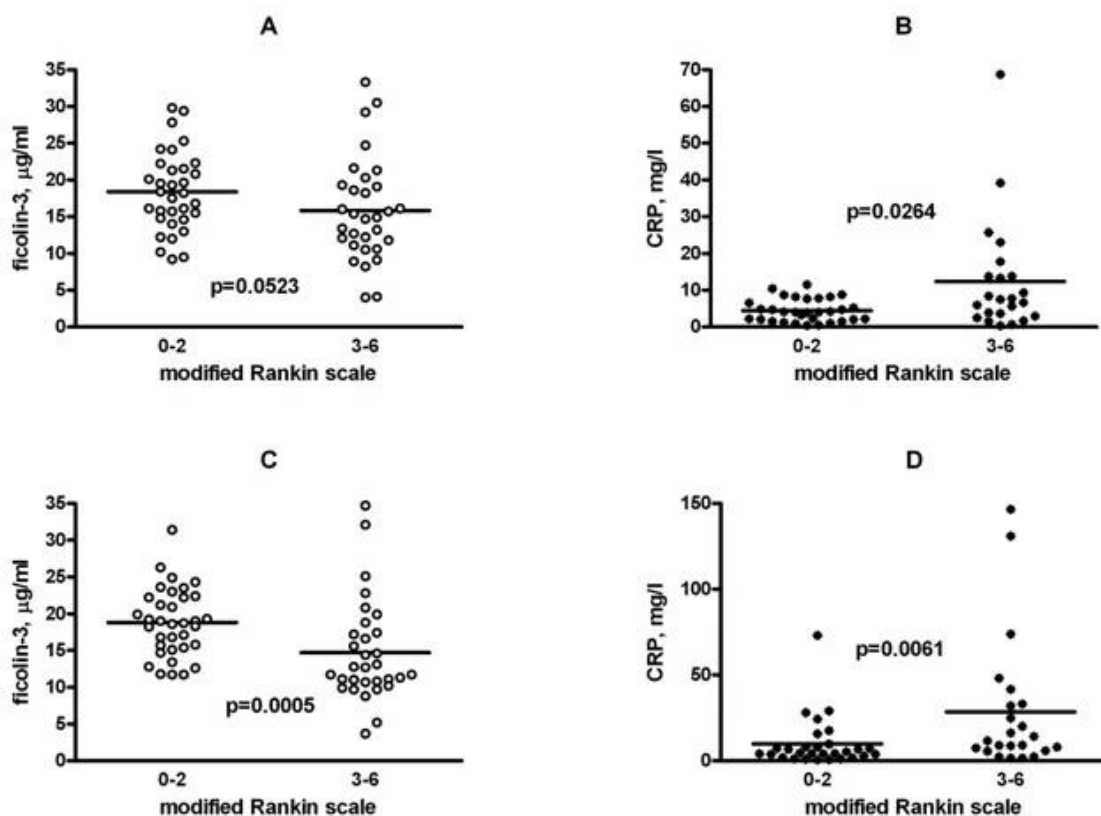
4.5. EREDMÉNYEK

A ficolin-2 és a ficolin-3 valamennyi mérési időpontban szignifikánsan alacsonyabb volt az AIS betegek szérumban az egészségesekhez viszonyítva ($p < 0.001$). Ezzel szemben a kontrol betegekben mindkét marker koncentrációja magasabb volt, mint egészségesekben, jelezve, hogy az alacsony ficolin-2 és ficolin-3 szérumban koncentráció a stroke akut fázisában az ischaemiás eseményhez köthető. A stroke súlyosságát jellemző felvételi NIHSS skála pontszáma és a ficolin-3 szintek között erős negatív korrelációt találtunk, mely a szubakut periódusban is megmaradt (**7. ábra**). Hasonlóan negatív korrelációt találtunk az infarctus területtel arányosan felszabaduló szérumban S100B protein és a ficolin-3 szintje között a sorozatos mérések során (**7. ábra**). Érdekes módon a ficolin-2 esetén a fenti korrelációkat nem észleltük.



7. ábra. A ficolin-3 (A) és a hsCRP (C) a stroke súlyossága (NIHSS) szerinti csoportokban, illetve korrelációjuk (B és D) az infarctus nagyságával (FU= 72 óras 'follow-up' minta) NIH: National Institute of Health Stroke; CRP: C-reaktív protein. Az adatokat, mint medián és individuális értékek (A és C) ábrázoltuk (R =Rho, Spearman korreláció).

A ficolin-3 és CRP szinteket összehasonlítottuk a dichotomizált betegség kimeneteli csoportok között (**8. ábra**). Amikor a betegeket az mRS alapján kedvezőtlen (3–6) és kedvező kimenetel (0–2) szerint csoportosítottuk, akkor a ficolin-3 szint alacsonyabb volt az előző csoportban. A különbség csak a 72 órás mintákban volt szignifikáns (**8. ábra, C panel**), míg a felvételnél vett minták vizsgálatakor csak trendet észleltünk (**8. ábra, A panel**). A 9 post-stroke infektós beteg kizárása után, a CRP szintje mind a felvételnél, mind a 72 órás mintákban szignifikánsan magasabb volt a kedvezőtlen kimenetelű betegcsoportban (**8. ábra, B és D**).



8. ábra. A kórházi felvételnél mért (A és B) és 72 órás (C és D) ficolin-3 és a hsCRP a módosított Rankin Skála (mRS) alapján mért stroke kimeneteli csoportokban

CRP: C-reaktív protein. A módosított Rankin Skála: 3-6 a kedvezőtlen kimenetelt jelzi. Az adatokat, mint medián és individuális értékek ábráztuk.

Mivel korábbról ismert, hogy mind a magasabb NIHSS pontszám, mind az emelkedett S100B a kedvezőtlen kimenetel prediktora, ezért érthető, hogy azon betegeknek, akikben alacsonyabb ficolin-3 (OR: 0,7 p=0,003) és magasabb hsCRP (OR: 1,4 p=0,006) szérumszinteket mértünk szignifikánsan rosszabb volt az mRS szerint definiált klinikai kimenetele (**5. táblázat**). A magas hsCRP koncentráció, a ficolin-3 szinttől függetlenül is a kedvezőtlen kimenetel prediktora.

5. táblázat. Ficolin-3 és hsCRP, mint a kiemenetel (mRS: 3-6 vs 0-2) független prediktorai

	OR (95% CI)	
	Felvételi minták	72 órás minták
ficolin-3, µg/ml	0,989 (0,776-1,020) (p = 0,093)	0,736 (0,603-0,899) (p = 0,003)
hsCRP, mg/L	1,226 (1,040-1,446) (p = 0,015)	1,375 (1,095-1,727) (p = 0,006)
NEM (nő/férfi)	0,951 (0,238-3,794) (p = 0,943)	0,969 (0,207-4,535) p = 0,968)
Életkor, évek	1,005 (0,925-1,092) (p = 0,904)	0,981 (0,902-1,066) (p = 0,652)

Rövidítések: OR= esély hányados; CI= konfidencia intervallum; CRP= C-reaktív protein.

4.6. MEGBESZÉLÉS

Eredményeink alapján megállapítható: (i) adataink is támogatják, hogy a komplement aktiváció hozzájárul a stroke-ot követő ischémias/reperfúziós károsodáshoz; (ii) a korábban leírt MBL-dependens aktiváció mellett, a lectin-útvonal ficolin-3-dependens aktivációja is részt vesz a patológiás folyamatok alakításában; (iii) a 72 órával későbbi mintákban mért alacsony ficolin-3 és magas CRP szintek egymástól függetlenül is a kedvezőtlen kimenetel prediktorainak bizonyultak, sugallva, a patogenezisben résztvevő két különböző gyulladási útvonal lehetőségét. Eredményeink újabb terápiás targetek azonosításának reményét nyújtják.

Összefoglalás: a komplement rendszer aktiválódása a ficolin mediált lectin útvonalon keresztül részt vesz az ischaemiás stroke patogenezisében és valószínűleg súlyosbít más, komplementtől független gyulladási folyamatokat.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Füst G, Munthe-Fog L, Illes Z, Széplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Széplaki Z, Prohászka Z, Skjoedt MO, Garred P. Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. **2011**;29;8:185.

Molnar T, Csuka D, Pusch G, Nagy L, Garred P, Illes Z. Associations between serum L-arginine and ficolins in the early phase of acute ischemic stroke- a pilot study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. **2020**;29(8):104951.

5. AZ L-ARGININ ÉS A LECTIN ÚTVONAL KÖZÖTTI KAPCSOLAT VIZSGÁLATA AKUT ISCHAEMIÁS STROKE- BAN

A neuroinflammáció kulcsfontosságú szerepet játszik a stroke okozta agyszövet károsodás progressiójában [59]. A stroke utáni gyulladást és az immundepressziót a szisztémás immunsejtek, endotélsejtek, mikroglia és neuronok közvetítik [59]. Mind a fertőzés, mind a gyulladás *per se* is befolyásolhatja az ischaemiás stroke kimenetelét [66,72,73]. A komplement rendszer agyi sérülést követő aktiválódása kulcsfontosságú elem az ischaemiás kaszkádban, amely a másodlagos agyi sérülés miatt hozzájárul a kedvezőtlen kimenetelhez [65,68,70]. A lektin útvonal molekuláinak időbeli kinetikáját korábban kutatócsoportunk is vizsgálta akut ischaemiás stroke-ban (AIS) szenvedő betegek szérumában [65,68]. Megfigyeltük, hogy: (i) a stroke hiperakut szakaszában a ficolin-3 koncentrációja feltehetően a konzumpció miatt csökken; (ii) koncentrációja változatlan a szubakut fázis alatt; (iii) a ficolin-3 és az asztrocita-eredetű S100B között fordított a korreláció a 72 órás mintákban arra utal, hogy az agyi infarktus nagyobb mérete fokozott ficolin-3 felhasználódással jár, feltehetően az apoptotikus és nekrotikus sejtekhez történő kötődés révén [65]. Ezen túlmenően az alacsony ficolin-3 szint az AIS kedvezőtlen prognózisával is összefüggést mutat [65].

A komplementrendszer mellett az L-arginin útvonal molekulái is hozzájárulnak az ischaemiás stroke patogeneziséhez és kimeneteléhez [51-53,56,57,74]. Az ischaemiás stroke hiperakut fázisában az L-arginin-útvonal molekuláinak kifejezettebb emelkedését figyeltük meg, mint a tünetmentes szignifikáns carotis stenosisban szenvedő betegek szérumában [74], mely előrehaladott endotél diszfunkcióra utal. Az NO donor L-arginin szintje már a betegek felvételekor (a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül) emelkedett volt. A kritikus post-stroke 24.-ik órában az L-arginin/aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) arány átmeneti emelkedését is megfigyeltük és felvetettük, hogy az L-arginin védő szerepet tölthet be. Emellett azt találtuk, hogy az L-arginin útvonal változásai előrejelzik a stroke utáni fertőzéseket [74]. Az L-arginin útvonal és a komplement rendszer közötti kapcsolatot akut stroke-ban eddig még nem vizsgálták.

5.1. CÉLKITÚZÉS

Korábbi tanulmányaink eredményei alapján arra kerestük a választ, hogy a komplement rendszer akut ischaemiás stroke-ot kísérő, ficolin mediálta lectin útvonal diszfunkciója és az L-arginin útvonal aktiválódása között van-e összefüggés?

5.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumával kooperációban végeztük el. Tanulmányunkban prospektív módon vizsgáltunk 44 akut ischaemiás stroke-ban szenvedő beteget. Sorozatos vérmintavételt végeztünk az L-arginine, ADMA, SDMA, ficolin-2, ficolin-3, mannóz-kötő lectin (MBL), MBL/ficolin-asszociált protein 1 (MAP-1), MBL/ficolin-asszociált szerin proteáz (MASP-3) és high-sensitivity C-reaktív protein (hsCRP) meghatározása céljából (a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül, majd 24 és 72 óra múlva). A szérum L-arginin, ADMA és SDMA mérése a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Intézettel való kollaborációban történt, high-performance liquid chromatographia (HPLC) módszerrel [48], míg a lectin útvonal molekuláit ELISA alapú módszerrel Dániában mérték (Laboratory of Molecular Medicine, Department of Clinical Immunology, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark) [75,76]. A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) pontszáma alapján jellemeztük. Klinikai végpontoknak a 30 napos mortalitást, illetve a post-stroke infekciót használtuk.

5.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS program alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). Mann-Whitney U tesztet használtunk a nem normál eloszlást mutató paraméterek összehasonlításához. A korrelációs analízist Spearman korrelációs együttható (r) kiszámításával végeztük. Bináris logisztikus regressziót használtunk a független prediktorok feltárására, és ROC elemzést végeztünk a küszöbérték kiszámításához. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

5.4. EREDMÉNYEK

Összesen 44 AIS-ban szenvedő beteget (átlag életkor: 67, SD: 10 év, férfi: 21) vontunk be a vizsgálatba. A demográfia és a klinikai paramétereket a **6. táblázatban** tüntettük fel. A betegeket az infekciós szövődmények alapján két alcsoportba osztottuk: post-stroke fertőzés kialakult (n = 7) és post-stroke fertőzés nélkül (n = 37). A NIHSS alapján a stroke súlyossága a post-stroke 24. órában szignifikánsan magasabb volt a post-stroke fertőző csoportban, összehasonlítva az ilyen szövődményekkel nem rendelkezőkkel ($19,7 \pm 5,0$ vs $6,5 \pm 6,0$; $p=0,001$).

6. táblázat. Demográfiai és klinikai adatok

	összes beteg n=44	infekcióval n=7	infekció nélkül n=37	<i>P</i>
Életkor (év)	67±10	66±6	72±9	NS
Férfi	21	3	18	NS
BMI	27.5±5.8	31.1±8.5	26.8±5.3	NS
Dohányzás, %	7 (16)	1 (14)	6 (16)	NS
Hypertonia, %	36 (81)	5 (71)	31 (84)	NS
Diabetes mellitus, %	8 (18)	1 (14)	7 (19)	NS
Dyslipidemia, %	18 (41)	3 (43)	15 (41)	NS
NIHSS felvételnél	10.4±5.3	14.4±6.9	9.5±4.6	NS
NIHSS 24 órás	10.5±8.4	19.7±5.0	6.5±6.0	0.001
Halálozás, %	5 (11)	5 (71)	0	<0.001
TAG terápia, %	25 (57)	5 (71)	20 (54)	NS
Statin terápia, %	18 (41)	3 (43)	15 (41)	NS

Rövidítések: BMI=body mass index; NIHSS=National Institute of Health Stroke Scale; TAG= trombicita ggregáció gátlás; NS= nem szignifikáns. Az adatok, mint átlag±SD vagy abszolút szám (%). Chi-négyzet teszt és Mann-Whitney teszt.

Post-stroke fertőzést 7 betegnél sikerült azonosítani átlagosan az 5. post-stroke napon. Közülük öt beteg súlyos fertőzés (pneumonia) miatt halt meg. A hiperakut szakban (tünetek kezdetétől számított 6 órán belül) szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a szérumban mért L-arginin és a ficolin-3, MAP-1, MBL koncentrációk között (**7. táblázat**).

7. táblázat. A szérum L-arginin, S100B és a lektin útvonal molekulái közötti korreláció a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül

	L-arginin	<i>p</i>	S100B	<i>p</i>
Ficolin-2	0,276	0,219	-0,216	0,182
Ficolin-3	0,398	0,030	-0,307	0,050
MAP-1	0,519	0,004	0,160	0,324
MASP-3	0,262	0,170	0,094	0,563
MBL	0,419	0,020	-0,082	0,613
hsCRP	-0,190	0,364	0,194	0,265

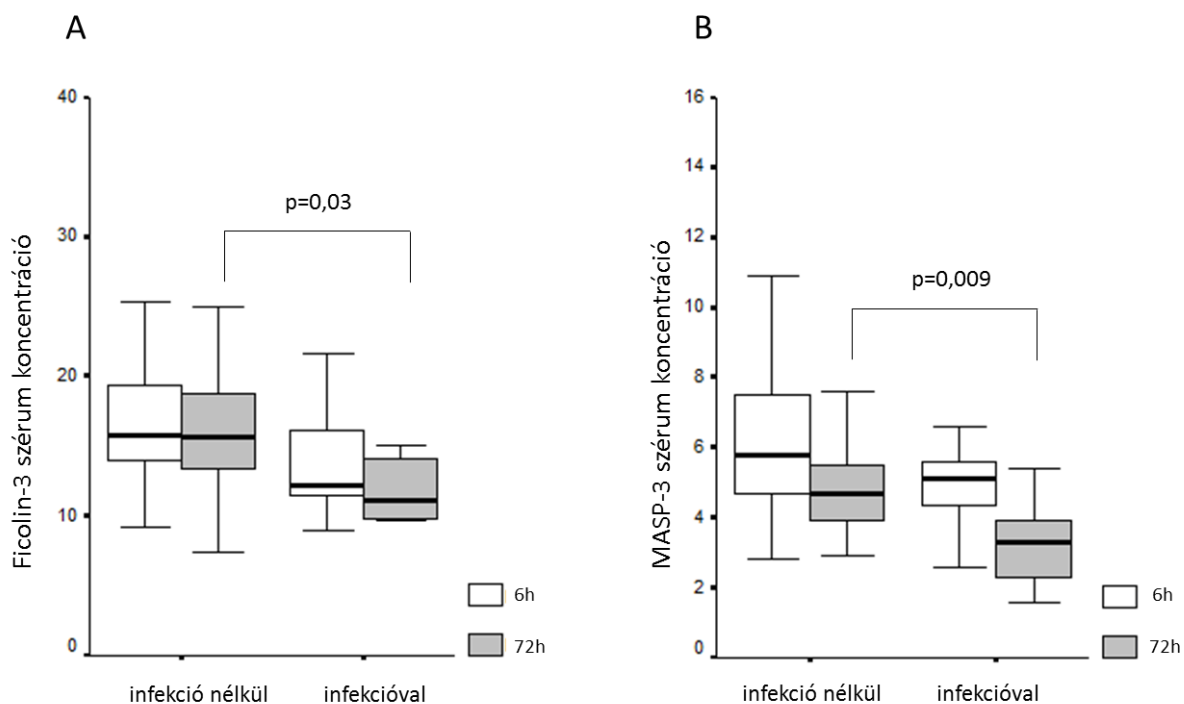
Rövidítések: MBL=mannose-binding lectin; MAP-1= MBL/Ficolin asszociált Protein-1; MASP-3= MBL asszociált szerin proteáz-3; hsCRP= magas-szenzitivitású C reaktív protein; Spearman korreláció.

Ezek az összefüggések azonban a post-stroke 72 óránál már eltűntek. Megjelent viszont egy szignifikáns negatív korreláció az MBL és az ADMA között, valamint egy pozitív korreláció az L-arginin és hsCRP között 72 óránál (**8. táblázat**). A károsodott agyszövetből felszabaduló S100B protein csak a 72 órás mintákban korrelált a lektin útvonal markereivel (ficolin-3 és MBL). Mindkét korreláció negatív volt. Emellett, az S100B a hsCRP-vel egy szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a 72 órás mintákban (**8. táblázat**).

8. táblázat. A szérumban L-arginin, ADMA, S100B és a lektin útvonal molekulái közötti korreláció a post-stroke 72 órás mintákban

	L-arginine	ρ	ADMA	ρ	S100B	ρ
Ficolin-2	0,058	0,774	0,155	0,439	-0,301	0,063
Ficolin-3	-0,104	0,605	-0,192	0,337	-0,397	0,012
MAP-1	0,167	0,404	0,211	0,290	-0,093	0,575
MASP-3	-0,173	0,389	-0,081	0,689	-0,294	0,069
MBL	0,059	0,771	-0,397	0,040	-0,434	0,006
hsCRP	0,485	0,016	0,089	0,994	0,428	0,018

Rövidítések: ADMA=asszimmetrikus dimetilarginin; MBL=mannose-binding lectin; MAP-1= MBL/Ficolin asszociált Protein-1; MASP-3= MBL asszociált szerin proteáz-3; hsCRP= magas-szenzitivitású C reaktív protein; Spearman korreláció.



9. ábra. A ficolin-3 (A) és MASP-3 (B) szérumszintek a 6 órán belüli és 72 órás mintákban az infekciós és anélküli csoportokban

MASP-3, MBL/ficolin-asszociált szerin proteáz

A betegeket a post-stroke infekció, mint szövődmény, alapján dichotomizáltuk, majd a lektin útvonal molekuláit a két alcsoport között összehasonlítottuk. A 72 órás mintákban, mind a ficolin-3 ($p=0,03$), mind a MASP-3 ($p=0,009$) szignifikánsan alacsonyabb azokban a betegekben, akikben jellemző módon a 4-5. napon pneumonia vagy húgyúti infekció jelent meg (**8. ábra, A és B panel**).

Többváltozós regressziós modellt alkalmazva, a csökkent 72 órás ficolin-3 76%-os szenzitivitással és 72%-os specificitással a post-stroke infekció független prediktorának bizonyult (OR: 0,73; 95% CI:0,53-1,00; cut-off<13,3 $\mu\text{g/ml}$, Area: 0,753; $p=0,03$). Ugyanebben a modellben a MASP-3 nem bizonyult független prediktornak. A 30 napos mortalitás független prediktora (OR: 1,05; 95% CI: 1,002-1,100; $p=0,04$) csak a 72 órás hsCRP volt (cut-off \geq 39,6 mg/l, Area: 0,830, $p=0,02$) 80%-os szenzitivitással és 82%-os specificitással.

5.5. MEGBESZÉLÉS

A post-stroke fertőzések kialakulásának kitett személyekben, a ficolin-3 és a MASP-3 koncentráció csökkenése figyelhető meg a stroke után 72 órával. A közelmúltban arról számoltak be, hogy a MASP-2 kulcsszerepet játszik a szövetkárosodásban és a kedvezőtlen kimenetelben ischaemiás agysérülés egérmódeljében [77]. Korábbi kutatásainkban az alacsony ficolin-3 és az emelkedett hsCRP koncentráció a rosszabb kimenetel független prediktora volt [65]. Megállapításunk, miszerint a stroke utáni 72. órában mért ficolin-3 az infekció független prediktora, összhangban áll azokkal a megfigyelésekkel, amelyek szerint a ficolin-3 a legnagyobb komplement-aktiváló képességgel rendelkező molekula a lektin útvonal iniciátorai között akut ischaemiás stroke-ban [78]. Az a tény, hogy a 30 napos mortalitás független előrejelzője csak a hsCRP volt, de a ficolin-3 nem, arra utal, hogy ezek két különböző gyulladási útvonalat reprezentálnak, amelyek eltérően járulnak hozzá a stroke kimeneteléhez. Eredményeink azt sugallják, hogy a stroke korai fázisában a kiterjedtebb agyszövet pusztulást súlyosabb neuroinflammációs válasz kíséri [68,79], ami fokozott komplement felhasználódással jár [65], mely emeli a post-stroke infekciós szövődmények számát is. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a szisztémás immundepresszió és a komplement aktiváció kettős hatású; negatív (infekcióra való hajlam) és pozitív következményekkel (autoimmunitás prevenció) egyaránt jár [80]. Az L-arginin szérumszintje és az egyes komplement faktorok közötti összefüggés, az argininnek az immunválaszban játszott protektív szerepére utalhat [32,81,82], azonban a pontos hatásmechanizmus még feltárássra vár.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY

Molnar T, Csuka D, Pusch G, Nagy L, Garred P, Illes Z. Associations between serum L-arginine and ficolins in the early phase of acute ischemic stroke- a pilot study. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2020**;29(8):104951.

Füst G, Munthe-Fog L, Illes Z, Széplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Széplaki Z, Prohászka Z, Skjoedt MO, Garred P. Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2011;29;8:185.

6. CITOKINEK VIZSGÁLATA AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN ÉS SZIGNIFIKÁNS CAROTIS STENOSISBAN

Számos állatkísérletes és klinikai adat bizonyítja az ősi és az adaptív immunrendszer szerepét az agyi ischaemiát kísérő lokálisan kialakuló gyulladásos válasz [83,84] és a szisztémásan megjelenő immundepresszió létrejöttében [85,86]. Egyre több adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy az endotél diszfunkció [87], a koagulációs kaskád [88] és a gyulladásos válasz [83,84] egymást erősítve determinálják a másodlagos agysérülés [89], következésképpen a funkció kiesés nagyságát, illetve a klinikai kimenetelt akut ischaemiás stroke-ban [90].

6.1. CÉLKITŰZÉS

Célunk a trombo-inflammatorikus markerek időbeli profiljának (több biomarker kombinációjával), és azok prediktív szerepének prospektív vizsgálata volt. A stroke-ban szenvedő betegekben mért koncentrációkat két csoporthoz hasonlítottuk: (i) súlyos atherosclerosis; (ii) és egy neurodegeneratív betegcsoporthoz, akik Parkinson-kórban szenvedtek. Megvizsgáltuk a mért biomarkerek egyidejű kapcsolatát a klinikai végpontokkal (halálozás, post-stroke infekció) egy többszörös regresszió felhasználásával, és megvizsgáltuk a regressziós modellek predikciós képességét.

6.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Sorozatos vérvételt végeztünk (a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül, majd 24 és 72 óra múlva) 76 akut ischaemiás stroke-ban szenvedő betegben a thrombo-inflammatorikus molekulák, mint a P-selectin, a szöveti Plasminogén Aktivátor (tPA), a monocita kemoattraktáns protein (MCP-1), a szolubilis CD40 ligand (sCD40L), valamint az interleukin-6 és -8 (IL-6 és IL-8), továbbá az S100B és a magas szenzitivitású C-reaktív protein (hsCRP) meghatározása céljából. Eredményeinket, 44 carotis duplex scan segítségével diagnosztizált szignifikáns carotis szűkületben, illetve 66 Parkinson kórban szenvedő

betegben mért adatokkal hasonlítottuk össze. Ezek a betegek vaszkuláris szempontból neurológiailag tünetmentesek voltak. Vérzéses stroke, valamint akut fertőzésre utaló jelek (láz 4 héten belül, valamint magas $10\text{mm/h} < \text{We}$, $10\text{ mg/dl} < \text{CRP}$, leukocitózis) esetén a betegeket kizártuk. A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) alapján határoztuk meg. A szövetkárosodás nagyságára a szisztémás keringésben mérhető S100B koncentráció alapján következtettünk. Végpontoknak a 28 napos Barthel Indexet, a mortalitást és a post-stroke infekció kialakulását választottuk. Az akut ischaemiás stroke típusát a TOAST kritériumok alapján osztályoztuk: 22 betegnél volt nagy ér elzáródás (átlag életkor: $68,76 \pm 10,03$; felvételi NIHSS: $12,656 \pm 5,88$), 26 lacunaris infarktus (életkor: $66,46 \pm 10,25$; NIHSS: $6,896 \pm 3,71$), és 28 esetben kardio-emboliás stroke volt (életkor: $77,36 \pm 9,48$ év; NIHSS: $14,076 \pm 4,89$). Egyik betegnél sem volt meghatározhatatlan etiológiájú stroke. A post-stroke infekció definiálása egy evidencia alapú ajánlás szerint történt (röviden, fizikális és labor eredmények: láz, leukocita szám, vörösvértest süllyedés, CRP, procalcitonin, vizelet, mellkas Rtg, mikrobiológiai leoltások).

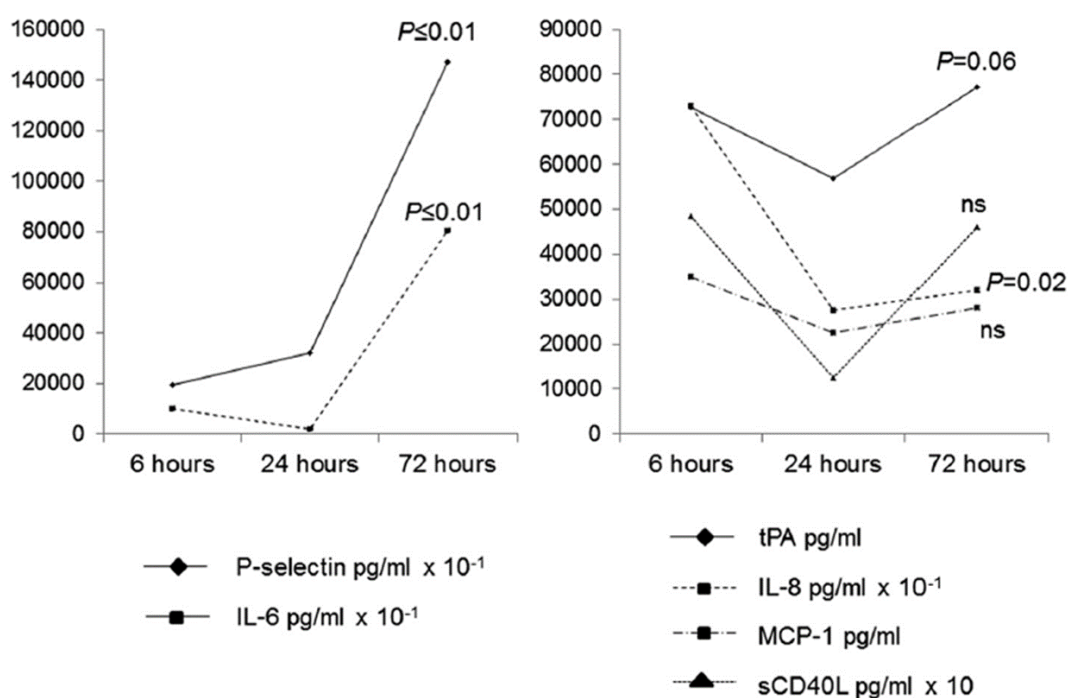
6.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS

A csoportok közötti összehasonlításra Mann-Whitney tesztet, míg a folyamatos változók közötti kapcsolat elemzéséhez Spearman korrelációt végeztünk. A regresszióanalízishez (R version 3.0.1) 3 klinikai végpontot használtunk (mortalitás, post-stroke infekció és a 7. napon észlelt NIHSS pontszám). A bináris kimenetek (halál és post-stroke fertőzések) esetén a Firth logisztikus regressziót az R csomag logistf 1.21 verziójával végeztük. A szokásos logisztikus regresszió módosított változata eltávolította az elsőrendű torzítást a hatásbecslésekből, különösen azokban az esetekben, amikor több változóból egy vagy azok kombinációja tökéletesen megjósolta az eredményt, és végtelen paraméterbecslésekhez vezetett volna, ha szokásos logisztikus regresszióval végeztünk elemzést. Az NIHSS pontszám 7. napra történő meghatározásához szokásos lineáris regressziós modellt alkalmaztunk. A biomarkerek, a demográfiai adatok és a társbetegségek figyelembevételével többszörös regressziós analízist végeztünk, melynek során a post-stroke infekció, a halálozás, illetve a funkcionális kimenetelt előrejelző faktorokat kerestünk. Megvizsgáltuk a modellek végpontokat előrejelző képességét (ugyanazon adatbázison belül), a Pearson korrelációs együttható és a görbe alatti terület (AUC, a bináris eredményekhez) felhasználásával.

6.4. EREDMÉNYEK

Hiperakut fázis: a P-selectin, MCP-1, CD40L, IL-6, tPA, S100B és hsCRP szérumszintjei a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül szignifikánsan magasabbak voltak az AIS csoportban, mint a két kontroll csoportban. A carotis stenosisban szenvedő betegekben a P-selectin kivételével magasabb marker értékeket találtunk a Parkinson-beteg csoporthoz képest.

Biomarker kinetika: A releváns biomarker változásokat (6, 24 és 72 órában) a **10. ábrán** tüntettük fel. Az IL-6, P-szelektin, hsCRP és S100B emelkedést mutatott 6 óránál, további emelkedéssel 72 óránál. Ezzel szemben az IL-8 csak 6 óránál magasabb, majd ezt követően csökken. Míg a tPA, CD40L és MCP-1 esetén folyamatos emelkedés észlelhető az első 72 órában. Az összes biomarker koncentrációja mindhárom időpontban magasabb volt a Parkinson-kóros kontroll csoporthoz képest.



10. ábra. A biomarkerek változása a post-stroke első 72 órában

A P-selectin, a szöveti Plasminogén Aktivátor (tPA), a monocita kemoattraktáns protein (MCP-1), a szolubilis CD40 ligand (sCD40L), valamint az interleukin-6 és -8 (IL-6 és IL-8) kinetikája a stroke első 72 órájában.

Korrelációk: A TOAST kritériumok alapján létrehozott alcsoportokban megvizsgáltuk az életkort, a felvételtkor NIHSS pontszámot, a 28 napos Barthel-indexet és a biomarkerek koncentrációját a stroke kezdete után 6 és 72 órával. A felvételtkor NIHSS alapján, a kisér elzáródásos stroke kevésbé súlyos volt (NIHSS: $6,889 \pm 3,71$) összehasonlítva a nagyér elzáródásos (NIHSS: $12,656 \pm 5,887$; $p=0,03$) és a kardioembolikus stroke-kal ($14,076 \pm 4,89$; $p < 0,001$). Mind a fertőzés, mind a halálozás gyakoribb volt a kardioemboliás stroke-ban, a lakunáris és nagyérelzáródásos betegekhez képest (fertőzési arány: 35% vs 10% és 14,3%; halálozás: 32%, szemben a lacunar stroke 5% -ával és a nagy artériák elzáródásában megfigyelt 23,8%-al). A P-selectin koncentrációja 72 óra elteltével szignifikánsan magasabb volt a nagyérelzáródásos stroke-ban szenvedő betegeknél ($29999,7 \pm 653381,8$), mint a lacunar stroke-ban szenvedőknél ($3312,56 \pm 61192,367$; $p=0,03$). Az IL-6 koncentrációja mind 6 órán belül, mind a 72 óra után magasabb volt a nagyérelzáródásos stroke esetén ($5722,7 \pm 19823$ és 28702 ± 10809), mint lakunáris stroke-ban (13.14 ± 49.2 és $145.1 \pm 439,8$; $p=0,04$). A hsCRP szintje nem különbözött a felvételtkor, de szignifikánsan magasabb lett a 72. órában a nagyérelzáródásos stroke-ban ($p=0,04$) és kardioemboliát elszenvedett betegekben ($p < 0,001$), összehasonlítva a lacunar infarktusos betegekkel.

Korreláció a szövet pusztulással: Az S100B koncentráció pozitívan korrelált a hsCRP szintekkel a 72 órás mintákban ($p < 0,001$). A szérumban mérhető IL-6 abszolút szintek és az IL-6 változása az első 72 órában szintén pozitív korrelációt mutatott az agyszövet sérülésének nagyságát jelző S100B koncentrációval. A 72. órában az IL-6 és P-selectin szintek szignifikánsan magasabbak voltak a nagyér elzáródásos betegekben, mint lacunaris stroke-ban.

Infekció és mortalitás: A 6 órán belül magasabb IL-6, MCP-1 és S100B értékeket mértünk azokban a stroke betegekben, akiknek később post-stroke infekciójuk alakult ki. A magas IL-6, S100B és hsCRP koncentrációk korreláltak a mortalitással. *Független prediktorok:* A stroke első 72 órájában a P-selectin egységnyi emelkedése és a post-stroke infekciók incidenciája között szoros kapcsolatot találtunk (OR: 22,7). Minden 100 egységnyi baseline IL-6 emelkedés 9%-el növelte a halálozás esélyét, míg a 72 óránál észlelt hasonló arányú emelkedése 4%-el növelte a post-stroke infekció valószínűségét. Hasonlóan, az egységnyi baseline hsCRP 7% -al növelte a halálos kimenetelt.

6.5. MEGBESZÉLÉS

Összesen nyolc biomarkert vizsgáltunk prospektív módon akut ischaemiás stroke-ban. Mind a különböző időpontokban mért abszolút koncentrációk, mind a koncentráció változások kapcsolatát elemeztük a post-stroke fertőzésekkel, a mortalitással és a funkcionális kimenetellel. Két kontrol csoportot választottunk: (1) tünetmentes, szignifikáns carotis stenosisban szenvedő betegeket annak eldöntésére, hogy a trombo-inflammatorikus molekulák megnövekedett szintje magával az akut ischaemiás eseménnyel, vagy a fennálló kísérő atherosclerosisissal áll-e összefüggésben, és egy (2) Parkinson kóros, tehát neuroinflammációval kísért [91], krónikus neurodegeneratív betegségben szenvedő kontrol csoportot. Ezt követően több változós regressziós módszert alkalmazva, a biomarkerek, a demográfiai tényezők és a komorbiditási adatok bevonásával független változókat kerestünk a kimeneteli végpontokra.

Akut ischaemiás stroke-ban a szisztémás keringésben mért tPA, P-selectin, MCP-1, IL-8, IL-6 és sCD40L a stroke után 6 órán belül és 72 órával később is emelkedett maradt a Parkinson kóros csoporthoz képest, mely elhúzódó thrombo-inflammatorikus aktivitást jelez [92-94]. Mivel a 6 órán belül mért markerek szintje az atheroszklerózis súlyosságát is tükrözheti [95], ezért a stroke betegek adatait tünetmentes carotis stenosisban szenvedő betegekhez hasonlítottuk és vizsgáltuk a kinetikát is [96]. Az IL-8 kivételével az összes biomarker koncentrációja magasabb volt a 6 órán belüli stroke mintákban, mint a carotis stenosisban szenvedő betegekben, ami arra utal, hogy a megnövekedett szintek nem pusztán az atherosclerosisához köthetőek [95]. További lényeges megfigyelés, hogy a tPA, MCP-1, IL-8, IL-6 és sCD40L koncentrációja ugyan magasabb volt carotis stenosisban szenvedő betegekben, mint a Parkinson csoportban, jelezve, hogy a súlyos atherosclerosisához valóban társul egy emelkedett szisztémás koncentráció, viszont az akut stroke további növekedést eredményez. Logisztikus regressziós modell felhasználásával számos tényező szerepe merült fel a végpontok előrejelzésében: az akut fázisban a hsCRP és a P-selectin változása, valamint az IL-6 korai és késői emelkedése, korai NIHSS és elhízás. Különösen a P-selectin koncentráció 6 és 72 óra közötti egységnyi változása (pg/ml) 22,7-es esély hányadossal növelte a stroke utáni fertőzések előfordulását; továbbá minden 100 egységnyi (pg/ml) IL-6 emelkedés a kiindulási értéknél 9‰ -kel, a 72 óra múlva pedig 4‰ -

kel növelte a halálozás esélyét; hasonlóan a kiindulási hsCRP-koncentráció minden további egységnyi (mg/L) növekedése 7‰ -kel emelte a mortalitás valószínűségét.

Megvizsgáltuk a biomarker koncentrációkat a TOAST kritériumok szerinti különböző betegcsoportokban: 72 órával a stroke kezdete után mért P-selectin és IL-6 szintek magasabbak voltak a nagy artériás elzáródás és kardioembolikus stroke-ban, mint a lacunaris stroke-ban szenvedőknél. Korábbi közleményben mások is magasabb IL-6 plazmaszinteket találtak kardioembolikus stroke-ban szenvedő betegekben [97]. Saját adataink és a korábbi vizsgálatok is azt mutatják, hogy a nagy artériás elzáródásban szenvedő betegekben a hsCRP szintje korrelál az infarktus méretével és a szöveti károsodás kiterjedésével, mely lacunaris stroke-ban nem figyelhető meg [73,85,93].

Összefoglalva, a korábbi tanulmányokból ismert hsCRP mellett, két thromboinflammatorikus marker domináns szerepe merült fel az akut ischaemiás stroke kedvezőtlen kimenetelének előrejelzésére: a P-selectin és az IL-6 korai változása a szisztémás keringésben.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY

Pusch G, Debrabant B, Molnar T, Feher G, Papp V, Banati M, Kovacs N, Szapary L, Illes Z. Early Dynamics of P-selectin and Interleukin 6 Predicts Outcomes in Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2015**;24:1938-47.

Bustamante A, Vilar-Bergua A, Guettier S, Sánchez-Poblet J, García-Berrocso T, Giralt D, Fluri F, Topakian R, Worthmann H, Hug A, Molnar T, Waje-Andreassen U, Katan M, Smith CJ, Montaner J. C-reactive protein in the detection of post-stroke infections: systematic review and individual participant data analysis. *J Neurochem.* **2017**;141:305-314.

7. A THROMBO-INFLAMMATORIKUS MOLEKULÁK ÉS AZ L-ARGININ ÚTVONAL METABOLITJAINAK ÖSSZEFÜGGÉSE AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN

Korábban másokkal együtt igazolni tudtuk, hogy mind a thrombo-inflammatorikus rendszer bizonyos molekulái [85,86,98,99], mind az L-arginin útvonal metabolitjai kapcsolatban vannak az akut ischaemiás stroke kimenetelével [43,74]. Korábban egyetlen cikkben vizsgálták a dimetilarginin származékok és a gyulladáshoz vezető mediátorok közötti korrelációt ischaemiás stroke-ban [44]. Viszont a két rendszer kapcsolatát és együttes prediktív értéküket ischaemiás stroke kimenetelében eddig még nem vizsgálták.

7.1. CÉLKITŰZÉS

Mivel korábbi tanulmányaink alapján az L-arginin protektív szerepét sejtettük, feltételeztük, hogy a prekursor molekula L-arginin és a metabolitjai (ADMA és SDMA) eltérően korrelálnak a citokinekkal.

7.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Tanulmányunkban sorozatos vérmintavételt végeztünk (a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül, majd 72 óra múlva) 55 akut ischaemiás stroke-ban szenvedő betegben a thrombo-inflammatorikus molekulák, mint a P-selectin, a szöveti Plasminogén Aktivátor (tPA), a monocita kemoattraktáns protein (MCP-1), a szolubilis CD40 ligand (sCD40L), valamint az interleukin-6 és -8 (IL-6 és IL-8), továbbá az L-arginin, aszimmetrikus dimethylarginin (ADMA) és szimmetrikus dimethylarginin (SDMA) meghatározása céljából. A thrombo-inflammatorikus molekulák szérumban szintjének meghatározása immunoassay módszerrel történt (BMS711F, Bender GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, Vienna, Austria). A szérumban L-arginin, ADMA és SDMA mérése a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Intézetével való kollaborációban történt high-performance liquid chromatographia (HPLC) módszerrel.

7.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). Mann-Whitney U tesztet használtunk a nem normál eloszlást mutató paraméterek összehasonlításához. A korrelációs analízist Spearman korrelációs együttható (r) kiszámításával végeztük. A bináris logisztikus regressziót használtuk a független prediktorok feltárására, és a ROC elemzést végeztünk a küszöbérték kiszámításához. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

7.4. EREDMÉNYEK

A szérum L-arginine koncentrációja és az IL-6, IL-8, tPA között negatív, míg az ADMA és MCP-1, továbbá az SDMA és MCP-1, P-selectin között pozitív korrelációt találtunk a stroke hiperakut fázisában (**9. táblázat**). Ezen korrelációk többsége (kivétel SDMA és MCP-1 közötti) a tünetek kezdetétől számított 72 óra múlva eltűnt (**9. táblázat**). Az MCP-1 baseline korrelációja az ADMA és SDMA szintekkel és az NIHSS pontszám romlása, valamint a post-stroke infekció kialakulása között erős kapcsolatot találtunk (**10. táblázat**). Hasonló asszociációt figyeltünk meg a korai időpontban, az sCD40L és SDMA közötti korreláció és az NIHSS pontszám között. Míg a P-selectin és az L-arginine közötti negatív korreláció a hyperakut szakban szintén az NIHSS pontszám változásával volt arányos. Azon betegek szérumában, akiknek később post-stroke infekciója lett, erős negatív korrelációt találtunk a korai IL-6 és az L-arginin szintek között (**10. táblázat**).

9. táblázat. A trombo-inflammatorikus markerek és az L-arginin útvonal markerei közötti korrelációk akut ischaemiás stroke-ban

	sCD40L	MCP-1	P-selectin	IL-6	IL-8	tPA
6 órán belüli minták						
L-arginin	NS	NS	NS	-0,444 p=0,001	-0,378 p=0,004	-0,282 p=0,04
ADMA	NS	0,640 p<0,001	NS	NS	NS	NS
SDMA	NS	0,602 p<0,001	0,269 p<0,05	NS	NS	NS
72 órás minták						
L-arginin	-0,306 p<0,05	NS	NS	NS	NS	NS
ADMA	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SDMA	0,412 p=0,006	0,380 p=0,01	NS	NS	NS	NS
6 és 72 óra közötti koncentráció változás (Δ)						
Δ L-arginin	NS	-0,300 p=0,05	-0,338 p=0,027	NS	NS	NS
Δ ADMA	NS	NS	0,358 p=0,019	NS	-0,304 p=0,048	NS
Δ SDMA	NS	NS	NS	NS	NS	NS

sCD40L= szolubilis CD40 Ligand; MCP-1= monocita kemoattraktáns protein-1; IL-6= interleukin-6; IL-8= interleukin-8; tPA= szöveti plazminogen aktivátor; ADMA= asszimmetrikus dimetilarginin; SDMA= szimmetrikus dimetilarginin; NS= nem szignifikáns. Spearman korreláció.

10. táblázat. Az L-arginin útvonal és a trombo-inflammatorikus markerek kimenetellel való kapcsolata

		romló NIHSS 24 óra alatt	Post-stroke infekció	Mortalitás
		n=10	n=16	n=13
6 órán belüli minták				
P-selectin	L-arginin	p=0,008 (-0,778)	NS	NS
MCP-1	ADMA	p=0,04 (0,648)	p=0.01 (0.709)	NS
	SDMA	p=0,005 (0,806)	p=0.04 (0.618)	NS
	L-arg/ADMA	p<0,001 (-0,952)	NS	NS
	L-arg/SDMA	p<0,001 (-0,915)	NS	NS
sCD40L	SDMA	p=0,06 (0,612)	NS	NS
	L-arg/ADMA	p=0,01 (-0,758)	NS	NS
	L-arg/SDMA	p=0,02 (-0,709)	NS	NS
IL-6	L-arginin	NS	p=0,004 (-0,756)	NS
	L-arg/SDMA	NS	p=0,001 (-0,832)	p=0,006 (-0.862)
IL-8	L-arg/ADMA	p=0,02 (-0,701)	NS	NS
72 órás minták				
sCD40L	SDMA	NS	p=0,04 (-0,636)	p=0,02 (-0,886)
	L-arg/SDMA	NS	p=0,04 (0,661)	NS
IL-8	SDMA	NS	NS	p=0,05 (0,812)
	L-arg/SDMA	NS	p=0,04 (-0,650)	p=0,05 (-0,812)

sCD40L= szolubilis CD40 Ligand; MCP-1= monocita kemoattraktáns protein-1; IL-6= interleukin-6; IL-8= interleukin-8; tPA= szöveti plazminogen aktivátor; ADMA= asszimmetrikus dimetilarginin; SDMA= szimmetrikus dimetilarginin; NS= nem szignifikáns. Spearman korreláció.

Több változós regressziós analízist használva, a 72 órás mintákban mért L-arginin és SDMA független asszociációt mutatott a post-stroke infekció megjelenésével (OR: 1.05; 95% CI: 1,005-1,089; $p=0,02$, illetve OR: 4.69; 95% CI: 1,034-21,31; $p=0,04$). A halálozás előrejelzésében ez már nem volt megfigyelhető.

7.5. MEGBESZÉLÉS

Két különböző időbeli összefüggést találtunk az L-arginin útvonal és a tromboinflammatorikus molekulák között: (i) 6 órán belül az IL-6 és az IL-8 koncentrációja negatív korrelációt mutatott az L-arginin, az L-arginin/ADMA és az L-arginin/SDMA aránnyal; (ii) ugyancsak negatív korrelációt figyeltünk meg a tPA szérum szintje és az L-arginin koncentrációja között 6 órán belül; (iii) ezzel szemben az L-arginin útvonal molekuláinak korrelációja az MCP-1-vel 72 órán keresztül fennmaradt, ahogy azt mások is megfigyelték [44], míg az sCD40L-vel csak a post-stroke 72. órában volt megfigyelhető. Hasonló tendencia volt megfigyelhető, amikor ezeket az összefüggéseket a három kimeneteli csoportban vizsgáltuk (tünetek súlyosbodása az első 24 órában, post-stroke infekció és halálozás). Az MCP-1, P-selectin és IL-6 kimenetelre gyakorolt hatását az L-arginin-útvonal molekulái eltérően befolyásolták. Az MCP-1 koncentráció pozitívan korrelált az ADMA és az SDMA szintekkel a post-stroke fertőzésben szenvedő betegek körében. Ezzel szemben a P-selectin és az IL-6 negatív korrelációja az L-arginin szinttel hozzájárult a tünetek súlyosbodásához, illetve a stroke utáni fertőzések kialakulásához. Eredményeink azt sugallják, hogy az ADMA és az SDMA valóban hozzájárulhatnak a proinflammatorikus válaszokhoz, ahogy azt mások cardiovascularis betegségeken felvetették [100]. Az ADMA növeli a TNF- α és IL-8 downstream gyulladási mediátorok képződését és aktiválja az NF- $\kappa\beta$ útvonalat [101]. Az SDMA szérum szintjét szignifikánsan emelkedettnek találták szepszisben szenvedő betegekben. [102] A szepszis akut fázisában az SDMA növekedése és a gyulladási/infekciós markerek között szoros pozitív korrelációt találtak [102]. Feltételezzük, hogy az ADMA és SDMA megnövekedett szintje elősegítheti a neurológiai állapot romlását [100], míg az L-arginin védő szerepe ellensúlyozhatja a P-szelektin és az IL-6 hatását [32,81,82]. Az L-arginin magas koncentrációja a stroke hiperakut fázisában az NO termelődését modulálva megakadályozhatja a további trombusok kialakulását: az

aktiválódott vérlemezkék *in vitro* NO-t szabadítanak fel, amely gátolja a vérlemezke további aktiválását és összecsapódását [103]. Ez a vérlemezke-eredetű P-selectin csökkent termelését is eredményezheti, ami magyarázhatja a megfigyelt negatív korrelációt. Ezt a feltételezést támaszthatja alá az ADMA és a P-selectin szintje közötti változás 72 órán keresztül észlelt pozitív korrelációja, szemben az L-arginin és a P-szelektin 72 órás változása közötti negatív korrelációval. Emellett, az L-arginin útvonal befolyásolja a T-sejt populáció működését is: elégtelen L-arginin termelődés T-sejt diszfunkciót eredményez az I. típusú citrullinemia esetén [104]. Az sCD40L volt az egyetlen olyan molekula, amely kétirányú korrelációt mutatott az L-arginin útvonallal, a végpontoktól függően: (i) pozitív korrelációt megfigyeltünk meg a romló NIHSS pontszámú betegek körében az SDMA szintekkel 6 órán belül; (ii) míg 72 óra elteltével negatív korrelációkat találtunk a stroke utáni fertőzés és a mortalitás tekintetében. A korai versus késői sCD40L és az SDMA eltérő asszociációja a különböző kimenetekhez magyarázható az sCD40L különböző szerepével és celluláris forrásaival. Az sCD40L antitest termelést indukálhat és befolyásolja a dendritikus sejtek apoptózisát [105]. A rákos és HIV-fertőzött betegek immundepressziója az sCD40L Treg-sejtekre gyakorolt hatásával függhet össze [106]. Újabbán inkább az aktivált vérlemezkék szerepe merült fel, mint sCD40L sejtes forrása rákban [106]. Felvetődik, hogy a korai fázisban a trombocita eredetű sCD40L és az immunstimuláló hatások dominálnak, míg később fontosabbak lehetnek a Treg vagy a T-sejtekből származó sCD40L-en keresztül immunszuppresszív hatások [105, 106].

Összefoglalva, az L-arginin, az ADMA és az SDMA eltérő módon korrelálnak a thrombo-inflammatorikus molekulákkal az ischaemiás stroke hiperakut fázisában. A stroke kimenetel pontosabb előrejelzésében a két rendszer szereplői additív értékkel bírnak. Az L-arginin „hasznos” szerepe a jövőben terápiás lehetőségeket kínálhat.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Molnar T, Pusch G, Nagy L, Keki S, Berki T, Illes Z. Correlation of the L-Arginine Pathway with Thrombo-Inflammation May Contribute to the Outcome of Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2016**;25(8):2055-60.

8. A TROPONIN-T ÉS A THROMBO-INFLAMMATORIKUS MOLEKULÁK ÖSSZEFÜGGÉSE AKUT ISCHAEMIÁS STROKE KIMENETELÉVEL

Az emelkedett szérum troponin koncentráció a zajló szívizom nekrozis jele akut koronária szindrómában [107], de szívelégtelenségben [108], myocarditisben [109], Takotsubo kardiomiopátiában [110] és bizonyos ritmuszavarokban [111] is leírták. *Scheitz és mtsai* azonban az akut ischaemiás stroke kedvezőtlen prognózisával is összefüggésbe hozták [112]. A stroke-ban szenvedő betegek troponin szint emelkedésének okát manifeszt miokardiális károsodás nélkül még nem vizsgálták. Nemrégiben egy nagy esetszámú stroke adatbázisban értékelték a stroke utáni mortalitást és a troponin, illetve az echocardiogram adatok közötti összefüggést [113]. *Wrigley és mtsai* azt találták, hogy a sürgősségi osztályon észlelt troponin emelkedés megnövekedett 1 és 3 éves mortalitással járt, még az egyidejű miokardiális infarktus hiányában is [113].

8.1. CÉLKITŰZÉS

Ennek a tanulmánynak a célja a magas szenzitivitású troponin-T (hs-cTnT), a vér-agy gát károsodás és az agyi infarktus nagyságát jelző S100B, a hsCRP mint atherosclerosis marker, valamint a thrombo-inflammatorikus markerek, például a monocita kemoattraktáns protein (MCP-1), a szöveti plazminogén aktivátor (tPA), a szolubilis CD40 ligand (sCD40L), és a P-selectin közötti összefüggések feltárása volt akut ischaemiás stroke-ban szenvedő betegek vérében.

8.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Az akut ischaemiás stroke kezdete után 6 órán belül összesen 35 beteget vontunk be prospektív vizsgálatunkba. A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) alapján rögzítettük. A Sürgősségi Osztályon való megjelenéskor a betegek kardiológiai anamnézise, 12 elvezetési EKG és a fizikai vizsgálat alapján az akut koronária események és a korábbi stroke-n átesett betegek kizárásra kerültek.

BEVONÁSI KRITÉRIUMOK

Az alábbiak voltak: (i) első elszennvedett ischaemiás stroke; (ii) az AIS kezdete 6 órán belül;

(iii) a neurológiai tünetek 24 órán túl fennálló időtartama; (iv) A CT vagy az MRI által detektált agyi infarktus megfelel a klinikai tüneteknek és jeleknek. A bevont betegek mind konzervatív kezelést kaptak, így a keringésben kizárólagosan az endogén tPA szintjét tudtuk mérni.

A KIZÁRÁSI KRITÉRIUMOK

Az alábbiak voltak: (i) vérzéses stroke; (ii) akut koronária szindróma, szívizom infarktus, stabil angina, (iii) akut fertőzéseket jelző klinikai tünetek és más krónikus fertőző betegségek; (iv) immunrendszeri rendellenességek, máj- vagy veseműködési zavarok, myopathia; (v) mind a felírt, mind a vény nélkül kapható gyulladáscsökkentő gyógyszerek használata a vérvételt megelőző 48 órában.

BIOMARKEREK

Vénás vérmintákat vettünk a hs-cTnT mérésére az első neurológiai tünetek megjelenése után 6 órán belül és 24 órával később és 12 elvezetéses EKG regisztrátum történt az esetleges ST mozgás detektálása céljából. A P-selectint, az MCP-1-t, az sCD40L-t és a tPA-t, a hsCRP-t és az S100B-t a kialakulást követő 6 órán belül és 72 órás mintákban mértük. A vérmintákat 10 percig 3000xg-vel centrifugáltuk. A felülúszókat fagyasztottuk és -80°C -on tároltuk az elemzésig. A hs-cTnT koncentrációkat teljesen automatizált szilárd fázisú elektro-kemilumineszcenciás immunvizsgálattal mértük Cobas e 411 analizátorral (Roche, Svájc). Az S100B szérum szintjét automatizált elektrokemilumineszcens immunoassay-módszerrel (Liaison Sangtec 100 system; DiaSorin, Bromma, Sveden) vizsgáltuk. A hsCRP szérum szintjét automatizált fluoreszcencia immunvizsgálattal vizsgáltuk (BRAHMS Kryptor, Berlin, Germany). A P-selectin, az MCP-1, az sCD40L és a tPA koncentrációját immunvizsgálattal vizsgáltuk (BMS711F, Bender GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, Vienna, Austria).

8.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS program alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). Mann-Whitney U tesztet használtunk a nem normál eloszlást mutató paraméterek összehasonlításához. A korrelációs analízist Spearman korrelációs együttható (r) kiszámításával végeztük. Bináris logisztikus regressziót használtunk a független prediktorok

feltárására, és ROC elemzést végeztünk a küszöbérték kiszámításához. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

8.4. EREDMÉNYEK

A betegek átlagéletkora $66,8 \pm 11,7$ év volt (min-max:40-90). A demográfiai és klinikai adatokat az **11. táblázat** foglalja össze. A cukorbeteg (férfi: 6/16 vs. nő: 2/19; $p=0,04$) és a dohányosok (férfi: 8/16 vs nő: 0/19; $p=0,003$) között szignifikánsan több volt a férfi.

11. táblázat. Demográfiai és klinikai adatok az első 24 óra alatti stroke progresszió alapján

	összes beteg n=35	NIHSS javult n=13	NIHSS romlott n=22	p
Kor, év	67±11	61±10	70±11	0.02
Férfi	16	7	9	NS
BMI	27,3±4,4	26,8±4,6	27,7±3,0	NS
Dohányzás	8	3	5	NS
Hypertonia	29	10	19	NS
Diabetes mellitus	8	4	4	NS
Diszlipidemia	10	4	6	NS
Cardioembolia	12	2	10	NS
Atherothrombosis	21	9	12	NS
Lacunaris	2	1	1	NS
NIHSS felvételnél	12±6	9±6	14±6	0.04
NIHSS 2. nap	12±6	7±5	15±6	0.05
NIHSS elbocsátáskor	9.5±6	3.5±1	11±6	0.04
Halálozás	7	0	7	0.02

NIHSS= National Institute of Health Stroke Skála; BMI= body mass index; NS= nem szignifikáns. Az adatok, mint átlag és szórást ábrázoltuk.

MARKEREK ÉS NIHSS

A stroke után 6 órán belül levett mintákban az MCP-1 koncentráció magasabb volt azokban a betegekben, akik neurológiai tünetei romlottak (magasabb NIHSS) az első 24 órában, összehasonlítva a stabil vagy javuló NIHSS pontszámmal rendelkező betegekkel ($p=0,009$). A hs-cTnT koncentrációja mind a 6, mind a 24 órás mintákban emelkedést mutatott azokban, akiket súlyosabb NIHSS pontszámmal bocsátottak el ($p=0,026$ és $p=0,001$). A 24 órás mintákban mért hs-cTnT $\geq 9,4$ ng/l küszöbérték mellett, 81% érzékenységgel és 74% specifitással előrejelezte a romló neurológiai státuszt (magasabb NIHSS) a kórházi elbocsátáskor (ROC analízis: Area: 0,808; $p = 0,002$).

MARKEREK ÉS MORTALITÁS

A nem túlélők szérumban ($n=7$) a túlélőkhöz képest, szignifikánsan magasabb hs-cTnT koncentrációt mértünk a stroke kezdete után 6 órán belül (medián: 17,4; IQR: 15,6-25,5 vs. 7,8; 5,1-17,2), ami 24 óra elteltével is megmaradt (19,2; 16,3-26,2 vs 7,1; 6,4-20,5; $p=0,03$). A mortalitási csoport tagjai azonban szignifikánsan idősebbek voltak (80 ± 8 vs. 67 ± 11 év; $p < 0,001$), és szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az életkor és a hs-cTnT között mind a 6 órán belüli, mind a 24 órás mintákban ($r=0,492$; $p=0,003$ és $r=0,538$; $p=0,001$). Az S100B koncentrációja az AIS után 6 órán belül szintén szignifikánsan magasabb volt azoknál a betegeknél ($n=7$), akik meghaltak a túlélőkhöz képest (medián: 1,17; IQR: 0,17-2,24 vs 0,13; 0,09-0,29; $p=0,009$). A hsCRP szérumban koncentrációja 72 órával az AIS után szintén magasabb volt a nem túlélőknél (medián: 114,1; IQR: 40,8-204 vs 4,0; 2,7-14,2; $p=0,001$).

MARKEREK KÖZÖTTI KORRELÁCIÓ

Az AIS után 6 órán belül és 24 óránál mért emelkedett hs-cTnT koncentráció pozitív korrelációt mutatott: mind a 72 óránál mért magasabb hsCRP szinttel ($r=0,592$ és $0,596$, mindkét esetben $p=0,001$); mind a 6 órán belül mért tPA szinttel ($r=0,550$ és $0,534$; $p=0,001$ és $p=0,002$); mind a 6 órán belül mért MCP-1 koncentrációval ($r=0,465$ és $0,442$; $p=0,01$ és $p=0,015$). A hs-cTnT és az S100B szintek között azonban nem találtunk összefüggést. A stroke kezdetétől számított 6 órán belül mért MCP-1 szérumban koncentráció viszont pozitívan korrelált az S100B-val, mind 6 órán belül, mind 72 óránál ($r=0,379$ és $0,456$; $p=0,04$ és $0,019$).

FÜGGETLEN PREDIKTOROK

Az életkor, a nem és a biomarkerek bevonásával végzett bináris logisztikus regresszió alapján, csak az AIS után 24 órával mért hs-cTnT volt a kórházi elbocsátáskor észlelt neurológiai romlás (magas NIHSS) független előrejelzője (OR: 1,58; 95% CI: 1,063-2,370; $p=0,024$). Érdekes módon, hasonló független prediktort a halálra, mint kemény végpontra nem találtunk.

8.5. MEGBESZÉLÉS

Prospektív tanulmányunk célja az volt, hogy a troponin T, az S100B, az akut fázisú protein hsCRP, valamint a thrombus-inflammatorikus markerek, mint például a tPA, sCD40L, P-selectin és MCP-1 közötti összefüggéseket feltárjuk olyan életük első ischaemiás stroke-ján átesett betegekben, akiknél az akut koronária esemény biztosan kizárható volt. Habár, mind a troponin-T, mind az MCP-1 koncentrációja a hiperakut stádiumban előre jelezte az NIHSS pontszám 24 órás romlását, de a kórházi elbocsátáskor mért rosszabb kimenetelnek csak a stroke utáni 24 órában mért troponin szint maradt független prediktora. A magas érzékenységgű troponin-I szintjének emelkedését találták AIS-ban szenvedő betegek kb. 20% -ánál egy közelmúltban publikált vizsgálatban, de kezelést igénylő akut koronária szindrómát csak elenyésző számban diagnosztizáltak. A troponin-I emelkedése dinamikus változások nélkül előfordulhat stroke-ban szenvedő betegeknél, nyilvánvaló akut koszorúér szindróma nélkül, a szívet érő nem specifikus okok miatt [114]. Ugyanakkor az még nem tisztázott, hogy a megnövekedett troponin T koszorúér betegséget, vagy egyéb patológiát tükröz például ritmuszavar vagy szívizomfibrózis [115]. Fontos megjegyezni, hogy másokhoz hasonlóan, saját anyagunkban is pozitív korrelációt találtunk az életkor és a hs-cTnT között a társbetegségektől függetlenül [116,117]. A troponin-T-t nemrégiben az atherosclerosis súlyosságának markerként írták le [118]. Mivel a hiperakut stádiumban a troponin-T szintje pozitív korrelált az MCP-1 és a tPA koncentrációval, míg a post-stroke 72. órában a hsCRP-vel (ami szintén atherosclerosis marker), felvetődik, hogy az eleve emelkedett korai MCP-1 az akut esemény előtti atherosclerosis súlyosságának indikátora [119]. Megfigyelték, hogy a magas kiindulási MCP-1 hasznos marker lehet azon AIS-ben szenvedő betegek kiválasztásában, akik a korai acetil-szalicilsav és dipiridamol kombinációs kezeléstől javulhatnak [119]. Az MCP-1 emelkedése feltehetően előre jelzi a neurológiai

deficit korai előrehaladását, de nem a késői kimenetelt, mivel ebben a kohortban nem találtak összefüggést az MCP-1 szintje és a mortalitás között. Az MCP-1 valóban kulcsfontosságú szabályozója a vér-agy gát „megnyitásában” állati modellekben és *in vitro* vizsgálatokban egyaránt [120,121]. A troponin-T és az MCP-1 mellett, az endogén tPA megnövekedett szérumkoncentrációja a hiperakut stádiumban szintén kapcsolatot mutatott az NIHSS pontszám 24 órás romlásával, ami a hemosztatikus változók fontos szerepét jelzi az ischaemiás inzultusok propagációjában. Kimutatták, hogy a fokozott véralvadási aktivitás és a zavart fibrinolízis a jövőbeli érrendszeri események prediktorai, beleértve a stroke-ot is [122]. A stroke után 72. órában mért hsCRP koncentrációját, szignifikánsan nagyobbak találtuk azokban a betegekben, akiknek NIHSS pontszáma mind az első 24 órában, mind a kórházi elbocsátáskor rosszabb volt. Mások azt találták, hogy a CRP koncentrációjának a tünetek megjelenése utáni 12–24 órában történő emelkedése a kedvezőtlen kimenetel előrejelzője 'first-ever' stroke-ban [123]. Fontos szempont, hogy a hsCRP erős pozitív korrelációt mutatott mind a troponin-T-vel, mind az S100B-vel az AIS szubakut stádiumában a mi kohorszunkban, ami arra utal, hogy kapcsolat áll fenn az agyi ischaemia által kiváltott gyulladásos válasz és az infarktus méretének nagysága között [124]. Általánosságban elmondható, hogy az ischaemiás agysérülést követő gyulladás nagysága korrelál a káros következményekkel. Saját megállapításaink további érveket szolgáltatnak, hogy a stroke-ot követően a szérumban mért emelkedett troponin-T, nyilvánvaló kardiális esemény nélkül is, kockázati tényező cerebrovaszkuláris betegcsoportban. A közelmúltban a troponin-T és az MRI vizsgálattal detektált agyi mikroinfarktusok száma közötti kapcsolatot írták le idősebb betegekben [125]. Mások összefüggést találtak a hs-cTnT szintje és a kardiovaszkuláris betegségektől függetlenül fokozódó kognitív hanyatlás között idősekben [126].

Összefoglalva, a stroke hiperakut fázisában mért tPA és MCP-1 korrelál az AIS után 24 órával mért hs-cTnT szintjével. A troponin T miokardiális károsodás nélküli emelkedése, független prediktora a neurológiai tünetek progressziójának.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY

Csecsei P, Pusch G, Ezer E, Berki T, Szapary L, Illes Z, Molnar T. Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2018**;27(4):951-956.

9. AZ ISCHAEMIÁS STROKE VÉRZÉSES TRANSZFORMÁCIÓJÁNAK RIZIKÓTÉNYEZŐI

Ebben az alfejezetben két tanulmányra fogok utalni: **A.** egy prospektív vizsgálatra, mely akut ischaemiás stroke-ban egy apoptózis marker (caspase cleaved cytokeratin-18, CCK-18) kinetikája és a kimenetel közötti kapcsolatot tárgyalja [127]; **B.** a második a multicentrikus STAY ALIVE Akut Stroke Regiszter adatai alapján a tünetes intrakraniális vérzéses transzformáció prediktorainak feltárásával foglalkozik [128].

Mind az intravénás trombolízissel (IVT), mind az endovaszkuláris terápiával (EVT) kezelt akut ischaemiás stroke legrettegettebb komplikációja a tünetes intrakraniális vérzés (szimptomás ICH, sICH) [129,130]. A mechanikus thrombectomiát (MT) kísérő sICH általános kockázata 4,4% körül van [131]. Számos tényező befolyásolja az endovaszkuláris terápia hatékonyságát, beleértve az életkort, a stroke tünetek súlyosságát, a preintervenciós ASPECT pontszámot és a stroke kezdetétől eltelt időt (ébredési stroke) [132]. Ennek ellenére az intrakraniális vérzés prediszponáló tényezőit még nem sikerült teljesen tisztázni.

A legfrissebb kutatások kimutatták, hogy az ischaemiás penumbra övezetben az idegsejt apoptózissal pusztulnak az első néhány post-stroke napon, azonban a stroke kezdete után egy bizonyos ideig helyreállíthatók [133]. Az apoptózissal kapcsolatos kaspáz aktivitás olyan sejtekben van jelen, amelyek elveszítették a plazmamembrán integritását az agyi ischaemia során [134]. Az enzim hasítási termékeinek kimutatását a kaspáz kaskád aktiválódás bizonyítékának tekintik. A cytokeratin-18 (CK-18) protein az intermedier filamentum család tagja, mely jelen van a legtöbb epiteliális és parenchimális sejtben, és az apoptózis során kaspázok hatására hasad [135]. Ezt követően a kapott fragmensek, például a kaspázzal hasított citokeratin-18 (CCK-18) a szisztémás keringésben is megjelennek és mérhetővé válnak [136].

9.1. CÉLKITŰZÉS

TANULMÁNY A

Célunk az akut ischaemiás stroke után különböző időpontokban levett mintákból meghatározott CCCK-18 koncentrációk és a stroke kimenetel közötti kapcsolat feltárása volt. Emellett, a CCCK-18 és a vérzéses transzformáció közötti kapcsolatot is vizsgáltuk.

TANULMÁNY B

Célunk a rekanalizáció (IVT, EVT vagy ezek kombinációja) során szövődményként jelentkező sICH független prediktorainak feltárása multicentrikus stroke centrumok által létrehozott regiszter alapján (GINOP-2.3.2-15-2016-00048).

9.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

TANULMÁNY A

A rosszindulatú betegségben szenvedő, korábbi stroke maradvány tünettel élő (módosított Rankin-skála>1) betegeket, folyamatban lévő onkológiai kezelteket és májbetegeket kizártuk a vizsgálatból. A társbetegségek tekintetében a betegek kórtörténeti adatbázisában rögzítetteket vettük figyelembe (magas vérnyomás, ischaemiás szívbetegség, dohányzás, diabetes mellitus, COPD, alkoholfogyasztás, véralvadásgátló kezelés stb.). A pitvarfibrillációt (AF) 12-elvezetéses EKG alapján (Nihon Kohden Cardiofax GEM ECG-9022K) igazoltuk. A felvételtől labor paraméterek alapján kiszámítottuk a vérlemezke-limfocita arányt (PLR) és a neutrofil-limfocita arányt (NLR). Rögzítettük a Glasgow kimeneteli skálát (GOS). Az ischaemiás infarktust és a vérzéses transzformációt (HT) detektálására Siemens SOMATOM Definition 64 Slice CT szkennert használtunk. A nagy artériák elzáródását CT-angiográfiával (CTA) igazoltuk. A HT különféle típusait, azaz a vérzéses infarktust (HI, 1. és 2. típus) és a parenhimás vérzést (PH, 1. és 2. típus) a CT képeken való megjelenés alapján határozták meg [137]. A HI1 izolált petechialis vérzések az infarktuszövetben, míg a HI2-et összefolyó petechiák jellemzik, de egyik sem jár térfoglaló hatással. A PH1-et egy homogén vérzéses lézió jellemzi, minimális térfoglaló hatással, amely az infarktuszó terület kevesebb, mint 30% -át foglalja el. A PH2 meghatározása szerint az infarktuszó terület több mint 30% -át elfoglaló lézió térfoglaló

hatással bír, valamint a vérzés intraventrikulárisan és az infarktusz területen kívül is megjelenhet [137]. Az Alberta stroke program early CT score (ASPECTS) meghatározása képzett neuroradiológus által történt [138]. A stroke felvételi súlyosságát az National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) alapján jellemeztük. A súlyos stroke-nak az NIHSS \geq 9 pontszámot definiáltuk. Kimeneteli végpontoknak az elbocsátáskori és 6 hónappal a stroke után mért mRS pontszámot tekintettük (kedvezőtlen kimenetel: mRS 4–6; kedvező kimenetel: mRS 0–3) [139].

Mintavétel és plazma CCCK-18: A betegektől a tünetek kezdete után 6 órán belül és 72 órával később vénás vérvétel történt. A mintákat azonnal centrifugáltuk 3500 fordulat/perc sebességgel 15 percig. A plazmát -80° C-on tároltuk az elemzésig. A CCCK-18 plazma koncentrációját CCCK-18 ELISA teszttel (Shanghai YL Biotech Co., Ltd., Kína) határoztuk meg.

TANULMÁNY B

Összesen 355 beteg adatait elemeztük (**11. ábra**). Az IVT csoportban az ajánlás szerinti rt-PA kezelés, annak hatástalansága esetén EVT kezeléssel való kombinációja történt [140]. Az IVT ellenjavallata, illetve CTA-val igazolt nagyér elzáródás (carotis interna, ICA; media, MCA; vertebralis, VA; basilaris artéria, BA) esetén priméren EVT történt. Az EVT indikációi a következők voltak: (i) noninvazív érrendszeri képalkotással igazolt nagyér elzáródás; (ii) premorbid mRS pontszám <3 ; (iii) ASPECT pontszám >6 az első CT vizsgálat során. Az EVT indikációja a 6 órás időablakon túl az ASPECT pontszámon alapult, mivel nem minden primer stroke központban történt CT perfúziós vizsgálat. Minden ASPECT pontszámot tapasztalt neuroradiológus validált. A betegeket a kapott terápiától függően 3 csoportra osztottuk: csak trombolízist kapó betegek (IVT); kombinált terápiában részesültek thrombectomia (IVT + EVT); csak thrombectomia-ban részesülő betegek (EVT). Az elsődleges végpontok a halálozás és a kedvező 30 és 90 napos kimenetek voltak. Kedvező kimenetelnek az mRS 0-2-t tekintettük. Másodlagos végpontnak a 'thrombolysis in cerebral infarction' (TICI) pontszám alapján mért rekanalizáció (részleges vagy teljes) sikerességét tekintettük [141]. A teljes rekanalizációnak az EVT után elért TICI 2C – 3 pontszámot határoztuk meg. [141,142]. A kollaterálisok állapotát neuroradiológus értékelte. Statisztikai elemzés céljából a betegeket a multifázisos CT angiográfia (mCTA) alapján jó és rossz kollaterális keringésű csoportokba soroltuk (gyenge kollaterális: 0–3, jó kollaterális: 4–5) [143]. A rekanalizációs kezelés után 24 órán belül

elvégzett kontrol CT eredményét (ICH hiánya vagy jelenléte) használtuk biztonsági végpontnak. Az ICH diagnosztizálását és osztályozását a Heidelberg vérzéses skála alapján végeztük [130]. A betegeket a klinikai állapot és a kontrol képalkotó eredmények alapján tünetes (sICH) és tünetmentes (aICH) vérzéses alcsoportba soroltuk.

9.3. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adatokat SPSS alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). A normalitás ellenőrzésére Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. A demográfiai és klinikai tényezők elemzéséhez chi-négyzet próbát és Student t tesztet használtuk. A nem normál eloszlást mutató adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány ábrázoltuk, és Mann-Whitney tesztel hasonlítottuk össze. A CCK-18 küszöb értéket (n=54) a 6 hónapos utánkövetés során a kedvezőtlen kimenetel előrejelzésére ROC analízissel számoltuk. Korrelációs elemzést Spearman tesztel végeztünk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

9.4. EREDMÉNYEK

TANULMÁNY A

Betegeink demográfiai és klinikai adatait az ischaemiás stroke vérzéses transzformációja (HT) alapján dichotomizált csoportokban a **12. táblázatban** foglaltuk össze. A HT csoportban szignifikánsan alacsonyabb ASPECT, magasabb felvételtori NIHSS, plazma glükóz szint, INR érték, gyakoribb pitvarfibrilláció és magasabb CCK-18 értékek fordultak elő mintavételi időpontokban. Ebben a csoportban az mRS alapján mért kimenetel is rosszabb volt. A plazma CCK-18 szintje a stroke kezdete után 72 órával előrejelezte a 6 hónapos kedvezőtlen kimenetelt (AUC: 0,851 (95% CI = 0,745-0,955; $p < 0,001$). ROC analízissel azt találtuk, hogy a plazma CCK-18 szintje > 223 ng/l cut-off érték mellett, 84,4% érzékenységgel és 77,3% specificitással előre jelezte a 6 hónapos kedvezőtlen kimenetelt. Azokban a betegeken, akikben magasabb plazma CCK-18 szintet mértünk, gyakoribb volt a kórházi fertőzés és magasabb volt a felvételt követő 24 órában mért hsCRP.

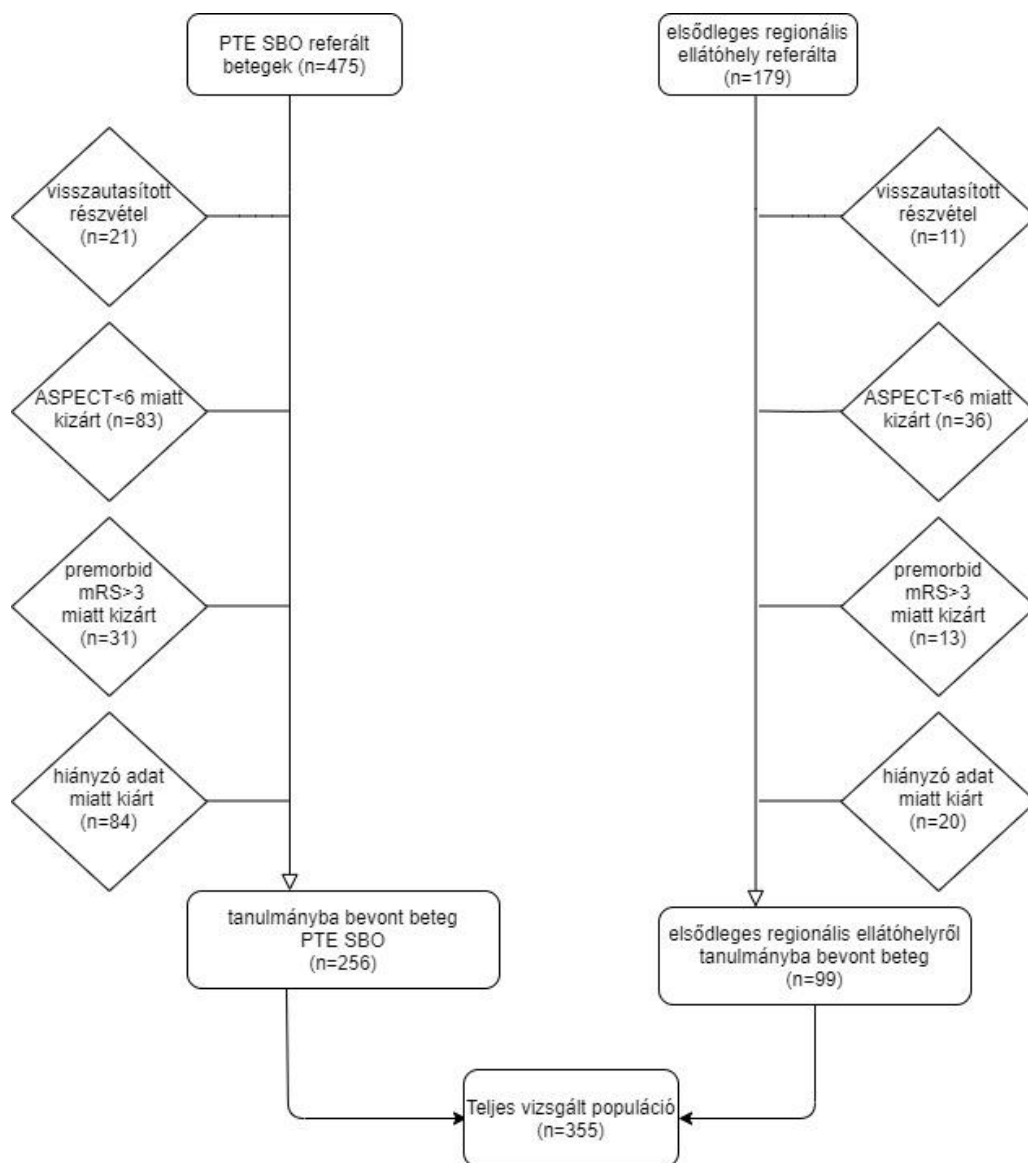
12. táblázat. Demográfiai és klinikai adatok vérzéses transzformációja (HT) alapján

	nincs HT n=45	HT n=9	<i>p</i>
Férfi	29 (64)	3 (33)	0,086
Életkor (év)	66±10	71±8	0,226
GCS	15 (13-15)	11 (4-14)	0,009
ASPECT score	9 (5-10)	4 (2-6)	<0,001
NIHSS felvételtkor	10 (7-15)	16 (13,5-20,5)	<0,001
NLR	3,7 (2,2-6,1)	6,8 (3,4-19,9)	0,027
hsCRP, mg/L	4,6 (2,1-9)	19 (6,9-46,9)	0,008
glükóz	6,8 (6-8)	9,2 (7,5-10,2)	0,014
kreatinin	83 (67-103)	62 (59-101)	0,370
INR	1,04 (1-1,15)	1,19 (1,1-2)	0,007
vérlemezke, G/L	245 (193-307)	159 (138-273)	0,133
thrombolysis	28 (62)	7 (78)	0,382
thrombectomy	10 (22)	2 (22)	1,000
pitvar fibrilláció	12 (27)	7 (78)	0,003
infekció	16 (35)	8 (89)	0,003
CCCK-18 72h, ng/L	234 (179-271)	285 (247-580)	0,025
CCCK-18>223 ng/L	23 (51)	9 (100)	0,006
mortalitás	12 (27)	7 (78)	0,003
rossz kimenetel *	26 (58)	9 (100)	0,015

*Az adatokat, mint esetszám (%), átlag±SD illetve medián (25-75 percentilis) ábrázoltuk. HT: hemorrágiás transzformáció; GCS: Glasgow coma skála; ASPECT: Alberta stroke program early CT score; NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale; NLR: Neutrofil-limfocita arány; CRP: C-reaktív protein; INR: international normalized ratio; CCCK-18, caspase-cleaved cytokeratin; *mRS: 4-6 a kórházi elbocsátáskor.*

TANULMÁNY B

A betegek átlagéletkora 68 ± 11 év, 177 nő (49,9%), és a kiindulási NIHSS medián értéke 9, IQR: 5-15 volt. A leggyakoribb közös érrendszeri kockázati tényező a magas vérnyomás volt (83,1%), a pitvarfibrilláció, a diabetes mellitus és a dohányzás aránya 26,8%, 27% és 38,9% volt. A három kezelési csoportban nem volt különbség az életkorban, de a kombinációs (IVT+EVT) csoportban több volt a nő. Azoknál a betegeknél, akiknek thrombectomiája volt, akár önmagában (EVT), akár intravénás trombolízissel (IVT + EVT) kombinálva, gyakrabban volt pitvar fibrillációja (AF), viszont kevesebb cukorbetegség fordult elő, mint a csak intravénás trombolízis (IVT) csoportban. Ezen túlmenően AF csoportban, függetlenül a kapott kezeléstől, szignifikánsan kevesebb beteg ért el jó funkcionális eredményt a 90. napon (AF csoport: 38,5% vs. nem AF csoport: 69,1%, $p < 0,001$) és magasabb mortalitási arányuk volt a nem AF csoporthoz képest (37,4% vs 11,6% -kal, $p < 0,001$). Több tandem-elzáródást és kevesebb M1-elzáródást figyeltünk meg a nem AF-csoportban, mint az AF-csoportban (tandem: 17,1% vs. 4,1% és M1: 45% vs. 56,8%, $p < 0,001$ mindkettőben), azonban a rekanalizációs arány (TICI 2B \leq) nem mutatott különbséget a két csoport között (95,7% vs 95,8%; $p = 0,831$). A három kezelési csoport demográfiai és klinikai adatait a **13. táblázatban** mutatjuk. A kimeneteli végpontokat az egyes kezelési csoportokban a **14. táblázatban** foglaltuk össze. A beavatkozás után 24 órán belül elvégzett kontrol képalkotó eredménye alapján igazolt ICH közül a tünetes ICH nagyon magas mortalitással járt, és a túlélőknél egyszer sem találtunk kedvező kimenetelt. Ezzel szemben a tünetmentes ICH-ban szenvedő betegek 43% -ánál az mRS alapján kedvező 90-napos kimenetelt észleltünk. A részlegesen sikeres rekanalizáció (TICI \leq 2B), a kezdeti CT vizsgálat során észlelt korai ischaemiás lézió (ASPECT $<$ 6) és a rossz kollaterális keringés gyakrabban vezetett szimptomás ICH megjelenéséhez a kontrol képalkotás során. Többváltozó regressziós analízis alapján a stroke után 24 órával felvett NIHSS pontszám függetlenül prediktora volt a sICH-nak (OR: 1,376; 95% CI: 1,129-1,678, $p < 0,001$). ROC elemzéssel azt találtuk, hogy a 24 órás NIHSS $\geq 15,5$ küszöbérték mellett 100% -os érzékenységgel és 92% -os specifitással előre jelezte a tünetes vérzést (AUC: 0,973; 95% CI: 0,955–0,991, $p < 0,001$). Ezt követően meghatároztuk az mRS alapján számolt 30 és 90 napos kimenetel prediktorait is. A fiatalabb életkor, a kezdeti mCTA által igazolt jó kollaterális keringés és az alacsonyabb 24 órás NIHSS független prediktorai a 90 napos kedvező kimenetelnek (mRS 0-2) (**15. táblázat**).



11. ábra. Beteg bevételi folyamatára

PTE SBO: Pécsi Tudományegyetem, Sürgősségi Betegellátó Osztály; ASPECT: Alberta stroke program early CT score; mRS: módosított Rankin Skála

13. táblázat. Az egyes kezelési csoportok STAY ALIVE stroke regiszterben felvett adatai

	EVT n=131	IVT n=157	IVT+EVT n=67	p
Demográfia				
Kor, év	69±11	68±11	67±13	0,547
≥80 év, (%)	26 (20)	23 (15)	9 (13)	0,383
Női nem, (%)	65 (50)	69 (44)	43 (64)	0,021
BMI	27,3±5,4	27,2±5	28,2±4,8	0,268
Társbetegségek, n (%)				
Hipertónia	112 (85)	130 (83)	52 (78)	0,373
Pitvarfibrilláció	51 (41)	19 (12)	21 (32)	<0,001
Diabetes mellitus	43 (33)	43 (27)	10 (15)	0,027
Dohányzás	58 (44)	55 (35)	25 (37)	0,266
Klinikai adatok n, (%)				
NIHSS felvételnél	12 (8-16)	6 (4-8)	15 (10-18)	<0,001
NIHSS ≤6	25 (19)	93 (59.2)	9 (13.4)	<0,001
NIHSS 24 órás	7 (3-12)	2 (0-5)	6 (2-14)	<0,001
SBP, Hgmm	151±28	158±29	152±31	0,083
Glükóz, mmol/l	7,9±3,6	7,8±3,7	7,7±2,3	0,194
DBP, Hgmm	84±16	86±13	85±14	0,203
ASPECT score<6	11 (9)	1 (14)	8 (13)	0,698
Gyenge kollaterális†	45 (37)	1 (25)	26 (41)	0,742

Elzáródás helye, n (%)				
ICA	6 (5)	5 (3)	6 (9)	<0,001
tandem	19 (14)	0 (0)	9 (14)	<0,001
M1	66 (50)	4 (2)	34 (51)	<0,001
M2	24 (18)	5 (3)	13 (20)	<0,001
M3	2 (1)	1 (1)	1 (1)	<0,408
VA/B	14 (11)	1 (1)	3 (4)	0,325
nem meghatározott	0 (0)	138 (89)	0 (0)	<0,001
Idő, perc				
'door to needle'	NA	72 (112-205)	135 (110-175)	<0,001
'onset to needle'	NA	150 (112-205)	135 (110-175)	0,088
'onset to groin'	310 (218-512)	NA	240 (182-305)	<0,001
beavatkozás ideje	38.5 (25-59)	NA	35 (25-59)	0,666

EVT: endovascularis trombektómia; IVT: intravénás trombolízis; ASPECT: Alberta stroke program early CT score; BMI: body mass index; SBP: szisztolés vérnyomás; DBP: diasztolés vérnyomás; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; ICA: artéria carotis interna; tandem: ICA+MCA; M1: artéria cerebri média M1; M2; M3 ág; VA/B: vertebralis, basilaris artéria; † multifázisos CT angiográfia pontszám≤3; 'door to needle': ajtó-tű idő; 'onset to needle: stroke kezdet-tű idő; 'onset to groin': stroke kezdet-EVT kezdet idő; NA: nem alkalmazható. Az adatokat, mint átlag±SD vagy medián (interkvartilis tartomány) ábráztuk.

14. táblázat. Kimeneteli végpontok az egyes kezelési csoportokban

	EVT n=131	IVT n=157	IVT+EVT n=67	p
Kórházi halálozás (%)	13 (10)	2 (1)	5 (7)	<0,005
30-napos mRS	3 (1-5)	0 (0-3)	3 (1-5)	<0,001
sICH (%)	6 (5)	3 (2)	3 (4)	0,394
30-napos mRS 0-2 (%)	53 (40)	114 (73)	32 (48)	<0,001
90-napos mRS	3 (1-6)	0 (0-2)	2 (0-4)	<0,001
90-napos mRS 0-2(%)	60 (45,8)	119 (75,8)	35 (52,2)	<0,001

EVT: endovascularis trombektómia; IVT: intravénás trombolízis; mRS: módosított Rankin Skála; sICH: tünetes intrakranialis vérzés; mRS 0-2: kedvező kimenetel.

15. táblázat. Többváltozós regressziós analízis a 90 napos kedvező kimenetel (mRS≤2) prediktoraira

	OR	95% CI	p
Kor	1,055	1,01-1,10	0,014
NIHSS felvételtkor	1,045	0,94-1,16	0,401
ASPECT	0,953	0,66-1,37	0,796
Jó kollaterális†	3,546	1,33-9,46	0,011
NIHSS 24 órás	1,255	1,13-1,40	0,001

OR: esély hányados; NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale; ASPECT: Alberta stroke program early CT score; † multifázisos CT angiográfia pontszám≥4.

9.5. MEGBESZÉLÉS- TANULMÁNY A

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az ischaemiás stroke után 72 órával mért magasabb plazma CCK-18 koncentráció: (i) mind az elbocsátáskori, mind a stroke után 6 hónappal mért kedvezőtlen kimenetellel; (ii) a halálozással; (iii) a nagy artériás elzáródással és a magasabb stroke súlyossági pontszámmal; (iv) a vérzéses transzformáció nagyobb esélyével; valamint (v) a kórházi fertőzések magasabb arányával mutatott összefüggést. Hozzánk hasonlóan mások pozitív összefüggést találtak a magas szérumszintű CCK-18 és a malignus media szindrómában szenvedő betegek mortalitása között [144]. Az emelkedett szérumszintű CCK-18 és a kedvezőtlen kimenetel közötti kapcsolatot leírták traumatikus agyi sérülésben [145], akut spontán intracerebrális vérzésben [146] és aneurizma ruptúrához köthető subarachnoidális vérzésben is [147]. Kimutattuk azt is, hogy azokban a betegekben, akikben magasabb kezdeti CCK-18 szintet mértünk, magasabb volt a kórházi felvétel után 24 órával mért CRP szérumszintje, mely a később megjelenő kórházi fertőzéshez vezetett. A CCK-18 szint emelkedése azonban nem központi idegrendszeri sejsérülés specifikus jelenség, mivel más betegségekben is prognosztikus tényezőnek bizonyult [148]. Mások az emelkedett szérumszintű CCK-18 szintet a szepszis súlyosságával, a többszervi elégtelenség kifejlődésével és a mortalitással is összefüggésbe hozták [148]. A szérumszintű CCK-18 kinetikája patofiziológiai jelentőséggel bír sepszisben is, és az apoptózis hozzájárulhat a sepszisben szenvedő betegek többszervi elégtelenségéhez és halálához [149]. Vizsgálatunk korlátai: (i) a bevont betegek alacsony száma; (ii) a képalkotó vizsgálattal való nyomonkövetés hiánya miatt nem tudtuk vizsgálni a korrelációt a penumbra, illetve a hipoperfundált agyterületek nagysága és a markerek között; (iii) habár ez egy prospektív vizsgálat volt, az infarktus volumenének meghatározása nem történt meg minden betegnél, így a 24 órás kontroll képalkotásból csak az ASPECT pontszámot tudtuk felhasználni.

Összefoglalva: korábban egyetlen cikk számolt be arról, hogy a malignus media szindrómában szenvedő stroke betegekben az emelkedett keringő CCK-18 szint magasabb 30-napos mortalitással jár együtt [150]. Saját anyagunkban egy nem szelektált vizsgálati populációban sikerült igazolni, hogy a magasabb szérumszintű CCK-18 szint mind a kórházi elbocsátáskori, mind a 6 hónapos kedvezőtlen kimenetellel összefüggést mutat, továbbá előre jelezheti további komplikációk megjelenését.

9.6. MEGBESZÉLÉS- TANULMÁNY B

Saját anyagunkban azt találtuk, hogy a kiterjedt korai ischaemiás lézió, a részleges rekanalizáció, a gyenge kollaterális keringés és a női nem voltak a rizikófaktorai a tünetes vérzés kialakulásának. *Hao és munkatársai* hozzánk hasonlóan a kollaterális keringés minőségét, a preoperatív ASPECT <6 és az 'onset-to-groin' időablakot hozták összefüggésbe a sICH-val [132]. Másokkal ellentétben [151,152,153], mi nem a felvételtől, hanem a 24 órás NIHSS pontszámot találtuk az sICH független prediktorának a stroke regiszter adatai alapján. Saját kutatócsoportunk ugyanezt találta egy korábbi prospektív vizsgálatban [127]. A beavatkozás után perzisztáló NIHSS \geq 15,5 jelzi a vérzéses transzformáció veszélyét. Egy nemrégiben közzétett metaanalízis a szignifikáns ICH prediktoraiként a női nemet, a kezelési intervallum hosszát, a tirofiban használatot és a felvételtől ASPECTS pontszámot, míg az összes ICH prediktoraként a diabetest, a mély fehérállományi léziókat és az intravénás rt-PA kezelést találta [132]. Ebből látható, hogy eltérő tényezők játszanak szerepet a tünetes és a tünetmentes ICH kialakulásában [132,153]. Tanulmányunk korlátai meg kell említeni: (i) a több mint hat órás tünetekkel érkező betegeknél nem történt perfúziós CT, itt az ASPECT pontszámra támaszkodtunk a betegek kiválasztásakor; (ii) a különböző trombekatómiás eszközök használata torzíthatta az eredményeinket.

Habár a részleges rekanalizáció, az ASPECT<6 és a hiányos kollaterális keringés növeli a tünetes intrakraniális vérzés esélyét, az egyetlen független prediktor a 24 órás NIHSS \geq 15,5 volt, mely arra utal, hogy a döntő patológiai folyamatok az agyi ischaemia első 24 órájában zajlanak [154]. A megfelelő kezelés ellenére súlyosbodó betegek hemosztázisának [155], hemodinamikai [156] és metabolikus [154] paramétereinek körültekintőbb monitorozására nagyobb figyelmet kell fordítani. A vérzéses szövődmények elkerülése céljából a betegre adaptált ideális nyomásviszonyok [157] feltárása további vizsgálatokat kíván.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Molnar T, Borocz K, Berki T, Szapary L, Szolics A, Janszky J, Illes Z, Csecsei P. Subacute Elevation of Plasma Level of Caspase-Cleaved Cytokeratin-18 is Associated with Hemorrhagic Transformation and Functional Outcome in Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2019**;28:719-727

Csecsei P, Tarkanyi G, Bosnyak E, Szapary L, Lenzser G, Szolics A, Buki A, Hegyi P, Abada A, Molnar T. Risk analysis of post-procedural intracranial hemorrhage based on STAY ALIVE Acute Stroke Registry *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2020**; DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104851

10. PERIOPERATÍV STRESSZ CAROTIS ENDARTERECTOMIA SORÁN ÉS A SHUNT IGÉNY ELŐREJELZÉSE

A carotis endarterectomia (CEA) és stent implantáció (CAS), a stroke prevenció fontos eszköztárai [158,159]. Ebben az alfejezetben a CEA-hoz kapcsolódó két fontos klinikai kérdésre szeretnék fókuszálni, két tanulmányra építve: **A.** egy prospektív és egy retrospektív részből álló vizsgálat a perioperatív stressz akut és hosszú távú hatásait elemzi [160]; **B.** a CEA során a kirekesztési intolerancia mechanizmusa és hátterében álló faktorok feltárásával foglalkozik [32].

A carotis endarterectomia (CEA) sebészi és aneszteziológiai szempontból is kihívást jelentő feladat. A CEA elvégezhető általános és regionális érzéstelenítésben is [161]. A regionális érzéstelenítésben végzett CEA egyik leggyakrabban említett hátránya a fokozott perioperatív stressz [162-164]. A műtéti megterhelés fokozza az adrenocorticotrop-hormon (ACTH) felszabadulását, melynek hatására megemelkedik a kortizol koncentrációja a szisztémás keringésben [165]. A műtéti stressz emelkedett myokardiális oxigén felhasználással, a vércukorháztartás zavarával, fertőzőes szövődményekkel és lassabb sebgyógyulással társul [166]. A multicentrikus GALA-tanulmány nem talált jelentős különbséget a stroke, miokardiális infarktus és 30 napon belüli mortalitás végpontok tekintetében a regionális vs általános anesztéziában végzett CEA csoportok között, viszont a regionális érzéstelenítés kedvezőbb posztoperatív neurokognitív kimenetelt eredményezett [167]. A helyi érzéstelenítésben, éberben végzett beavatkozás megfelelő stressz csökkentéssel ideális körülményeket biztosít a CEA-hoz [168].

Az ér tónus szabályozásában a nitrogén-monoxid (NO) az egyik kulcs molekula [50]. Az NO, az L-arginin L-citrullinná történő átalakulása során szabadul fel a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim segítségével [50]. Az NO szintézisét gátolni lehet az L-arginin guanin-szubsztituált analógjaival, mint az aszimmetrikus dimetil-argininnal (ADMA), ami a NOS aktív helyét gátolja [169,170]. Hipoxiás-ischaemiás inzultus hatására ADMA és a szimmetrikus dimetil-arginin (SDMA) képződik az L-arginin csoportokat tartalmazó fehérjék metilációjával [171]. Az SDMA az arginin felvételével vetélkedik és antagonizálja az L-arginin hatását. Nemrégiben L-

argininben gazdag fehérjéket neuroprotektív hatásúnak találtak állatkísérletes modellekben [81]. Ezzel szemben a keringésben lévő ADMA szintet vizsgálták többféle kardiovaszkuláris betegségben, és magasnak találták hypoxiával járó kórképekben [171], ischaemiás stroke-ban [51,74,172], valamint carotis szűkülettel [74,173] összefüggő állapotokban. Az emelkedett ADMA szintet kapcsolatba hozták az endothel diszfunkcióval [174] és atherosclerosis progressziójával [175]. Emellett az ADMA elősegíti a szubklinikus érelmeszesedés kialakulását, az artériás rendszer vulnérabilis pontjain erősebb pro-atherogen hatással [175]. A carotis endarterectomia utáni reocclusióban szenvedő betegekben szintén magasabb szérumszintet találtak [173].

A perifériás vérben mért S100B szint a vér-agy gát diszfunkciójának és az ischaemiás agyi károsodásnak érzékeny markere [175] klinikailag tünetmentes carotis endarterectomia (CEA) során is [176]. Feltételeztük, hogy a carotis interna kirekesztése alatt a véna jugularis internából származó és az artériás vérgáz paraméterek tükrözik a cerebrális hipoperfúzió mértékét [177]. Ennek jellemzésére a jugulo-artériás CO₂ differenciát (P(j-a)CO₂ vagy CO₂ gap) és az arterio-juguláris oxigén extrakció segítségével képzett arány számot (P(j-a)CO₂/C(a-j)O₂) használtuk [178].

10.1. CÉLKITŰZÉSEK

PERIOPERATÍV STRESSZ BEFOLYÁSOLÁSA REGIONÁL ANESZTÉZIÁBAN VÉGZETT CEA SORÁN (TANULMÁNY A).

Hipotézis: Titrálható felületes szedáció mellett a beteggel az egész operáció alatt megmarad a verbális kontaktus, ugyanakkor szorongásai hatékonyan csökkenthetőek. Az éber szedációhoz használt propofol jól kormányozható pleiotrop molekula [179], mely csökkenti a cerebrális metabolikus rátát, antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonsága révén idegrendszert védő hatását bizonyították szöveti kultúrákban és klinikai modellekben is [180-182].

A1. Prospektív rész: A perioperatív stressz csökkentésében a premedikáción túl annak kiegészítése a műtét alatt propofollal végzett éber szedációval milyen előnyöket biztosít?

A2. Retrospektív rész: A perioperatív időszakban észlelt klinikai és laboratóriumi paraméterek milyen hatással vannak a hosszú távú kimenetelre, különös tekintettel az operált ér újbóli elzáródására, az ellenoldali szűkület progressziójára és a mortalitásra?

A KIREKESZTÉSI INTOLERANCIA HÁTTÉRÉBEN ÁLLÓ FAKTOROK FELTÁRÁSA REGIONÁL ANESZTÉZIÁBAN VÉGZETT CEA SORÁN (TANULMÁNY B)

Hipotézis: A kirekesztési intolerancia egyénre szabott predikciója rendkívül lényeges klinikai kérdés, ezért:

B1. Kíváncsiak voltunk, hogy a jugulo-artériás CO₂-gap és a P(j-a)CO₂/C(a-j)O₂ arány tükrözik-e a kritikus agyi hipoperfúziót?

B2. Vizsgálni kívántuk, hogy az L-arginin út metabolitjai összefüggést mutatnak-e az agyi metabolizmussal (laktát), a vér-agy gát integritásával (S100B), illetve a kirekesztés okozta ischaemiával éberén végzett CEA során?

B3. Az intraoperatív „shunt-igényt” előrejelző markert kerestünk.

10.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

TANULMÁNY A

Erőanalízis alapján legalább csoportonként 22 beteg bevonását terveztük. A lehetséges drop-out miatt, végül 25-25 beteget randomizáltunk mindkét csoportba (borítékos randomizációval). A premedikáció+TCI csoportban 3 betegről hibás mintavétel történt, ezért a végső analízisbe 22 beteg adatai kerültek be, melyeket a 25 csak premedikációban részesül beteg adataival hasonlítottunk össze.

TANULMÁNY B

Összesen 55 beteget vontunk be prospektív vizsgálatunkba. Mindkét tanulmányban kizárási kritériumok voltak a végállapotú vesebetegség, illetve a vizsgálatban való részvétel

visszaütasítása. A betegeket neurológiai vizsgálat után jegyezték elő carotis endarterectomiára. A carotis szűkület oldaliságának megfelelő tüetekkel rendelkező, illetve tranziens ischaemiás attack (TIA) vagy minor stroke után lévő betegeket tekintettük tünetesnek (n=32 beteg). A Carotis Consensus Panel kritériumai alapján, Philips HD7XE készülékkel diagnosztizáltuk a szignifikáns carotis stenosis (PSV > 230 cm/s, end-diastolic velocity > 100 cm/s, ACI/ACC ratio > 4). A nemzetközi ajánlásokkal összhangban, a 70-99%-os szűkületeket tekintettük szignifikánsnak [183]. A betegek társbetegségeit, dohányzási szokásait, gyógyszereszedéssel kapcsolatos adatait rögzítettük.

PREMEDIKÁCIÓ ÉS A SZEDÁCIÓ PROTOKOLLJA

Az összes beteg 0,5 mg alprazolam premedikációt (BDZ) kapott 30 perccel a műtét előtt. Borítékos randomizációt követően a szedációs csoportban (BDZ+TCl) a regionál érzéstelenítés elkezdése előtt, TCl pumpa (Injectomat TIVA Agilia, Fresenius-Kabi, Germany)] segítségével propofol szedációt kezdtünk. A kezdeti „effect site” propofol koncentrációt (0,5 ng/ml) a hatás alapján módosítottuk a kívánt Ramsay szedációs skála [184] szerinti 2-3-as szedációs szint eléréséig úgy, hogy a beteggel a verbális kontaktus megmaradt. A kontrol csoport a premedikáción kívül nem kapott más anxiolyticumot.

REGIONÁLIS ANESZTÉZIA ÉS SHUNT BEHELYEZÉS

Minden beteg regionális anesztéziában, éberén végzett carotis endarterectomián esett át [185]. Mély és felületes cervikális blokádot végeztünk, amit szükség esetén további helyi érzéstelenítő adásával egészített ki az érsebész a műtét alatt [185]. A betegekkel verbális kontaktust tartottunk és az operált oldallal ellentétes kéz motoros működését is ellenőriztük. Shunt behelyezés mellett akkor döntöttünk, ha a carotis kirekesztése után tudatállapot, illetve motoros vagy verbális funkcióromlást tapasztaltunk [186].

VÉRMENTAVÉTEL ÉS LABORATÓRIUMI MÉRÉSEK

A műtéti előkészítés részeként artériás kanült helyeztünk be. A v. jugularis internát az operáló érsebész kanülálta a műtét során, a kanül vége a véna koण्याalapi kilépésénél volt [187]. Artériás és jugularis vérmintákat vettünk párhuzamosan vérgáz és laktát vizsgálat (Radiometer Abl 800 flex, Copenhagen, Denmark) céljából négy időpontban: (i) a carotis kirekesztése előtt; (ii) a kirekesztés után 3 perccel; (iii) a kirekesztés felengedése előtt és (iv) után 1-1 perccel.

Artériás vért vettünk a műtét kezdetén (T_1), majd a bulbus juguliból a carotis kirekesztésének felengedése előtt (T_2) és a kirekesztés felengedése után (T_3), ezt követően a posztoperatív szakban csak artériából két órával a műtétet követően (T_4) és a műtét után 24 órával (T_5). A plazma mintákból meghatároztuk az összes vizsgált markert. Az S100B plazma koncentrációjának meghatározása automatizált elektrokemilumineszcens immunoassay módszerrel történt (Liaison Sangtec 100 system; DiaSorin, Bromma, Sweden). A vérminták L-arginin, ADMA és SDMA tartalmát a Debreceni Tudományegyetem Alkalmazott Kémia Intézete végezte. Szilárd fázis extrakciós módszerrel (SPE) határozták meg és derivatizálás után magas teljesítményű folyadék kromatográfiával számszerűsítették [48].

5 ÉVES UTÁNKÖVETÉS-RETROSPEKTÍV RÉSZ

A vizsgálatba bevont betegeket 5 évvel később retrospektív analízisnek vetettük alá az egyetemünkön használt eMedSolution Kórházi Információs Rendszer segítségével. Amelyik betegről nem találtunk érdemi információt, annak hozzátartozóit telefonon kerestük meg. Regisztráltuk az 5 éven belüli érsebészeti eseményeket: (i) amputációt; (ii) az operált érszakasz későbbi restenosisát; (iii) az ellenoldali carotis állapotát (szignifikáns szűkület megjelenése) és (iv) az esetleges mortalitást.

10.3. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adatokat SPSS 20.0 segítségével dolgoztuk fel (IBM, Armonk, NY, USA). A mennyiségi változókat átlag és 95%-os konfidencia intervallum (CI), illetve átlag±standard deviáció (SD) adtuk meg. A normalitás vizsgálatára a Kolmogorov-Smirnov tesztet használtuk. Demográfiai és klinikai tényezők analízisére kategorikus adatok esetén a chi-négyzet próbát, folyamatos adatok esetén a Student-féle t-tesztet alkalmaztunk. A nem normál eloszlást mutató adatokat Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk és mint medián és interkvartilis tartomány adtuk meg. Bináris logisztikus regressziót használtunk a független prediktorok vizsgálatára. Az L-arginin cut-off értékét a shunt behelyezés előrejelzésére ROC analízissel határoztuk meg. Korreláció analízishez Spearman tesztet használtunk. A $p < 0,05$ értéket fogadtuk el szignifikánsnak.

10.4. EREDMÉNYEK

TANULMÁNY A

A tanulmányba randomizált betegeink demográfiai és klinikai adataiban egyik paraméter sem mutatott szignifikáns különbséget a két szedációs csoport összehasonlításakor (**16. táblázat**).

TANULMÁNY B

A tanulmányban résztvevő betegek demográfiai és klinikai adatait a 17. Táblázatban tüntettük fel. Itt sem találtunk szignifikáns különbséget a shunttel vs shunt nélkül operált csoportok összehasonlításakor (**17. táblázat**).

16. táblázat. A szedációs csoportok demográfiai és klinikai adatai (*Tanulmány A*)

	BDZ+TCI n=22	BDZ n=25	összes beteg n=47	<i>p</i> *
tünetes (%)	12 (54)	14 (56)	26 (55)	0,245
folt CEA (%)	13 (59)	16 (64)	29 (62)	0,687
életkor	63,7±8,5	67,7±7,7	65,8±8,3	0,156
férfi (%)	15 (68)	21 (84)	36 (76)	0,206
BMI	27,5 ± 5,9	27,3 ± 2,9	27,4 ± 4,5	0,716
jobb oldali műtét (%)	10 (45)	13 (52)	23 (49)	0,658
operált szűkület (%)	85,9 ± 5,9	83,6 ± 6,2	84,7 ± 6,1	0,203
ellenoldali szűkület (%)	43,0 ± 22,4	42,6 ± 27,0	42,8 ± 24,6	0,974
kirekesztési idő, perc	22,1 ± 6,8	21,8 ± 6,6	21,94 ± 6,6	1,00
shunt (%)	2 (9)	4 (16)	6 (13)	0,117

BDZ= benzodiazepin (alprazolam); TCI= target controlled infusion pump; BMI=body mass index. A *p** érték a két szedációs csoport összehasonlítására vonatkozik.

17. táblázat. A shunt igény alapján képzett csoportok klinikai adatai (*Tanulmány B*)

	shunt n=6	shunt nélküli n=49	összes beteg n=55	<i>p</i> *
életkor	66±8	65±8	66±8	0,668
férfi	6	38	44	0,205
BMI	27,7±3,0	26,8±4,6	27,3±4,4	0,342
preop Hgb, g/L	148±6	141±10	143±10	0,229
postop Hgb, g/L	133±12	129±9	128±10	0,567
operált szűkület (%)	81±7	84±6	84±6	0,589
SBP max, Hgmm	187±27	196±26	191±26	0,771
kirekesztési idő, perc	18±8	22±6	22±7	0,930
kreatinin, μmol/L	90±27	76±17	81±21	0,418

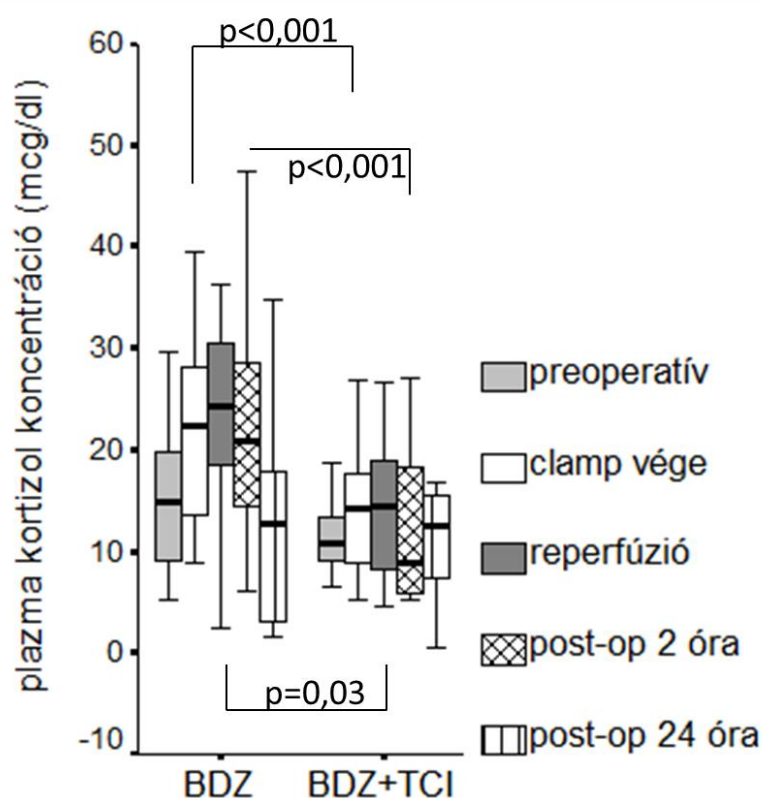
BMI=body mass index; preop= preoperatív; postop= postoperatív; Hgb= hemoglobin; SBP= szisztolés vérnyomás. *p** a shunt igény alapján képzett csoportok összehasonlítására vonatkozik.

A PLAZMA KORTIZOL DINAMIKÁJA A SZEDÁCIÓ SZERINTI KÉT CSOPORTBAN

A kortizol kinetikája a plazmában a **12. ábrán** látható. A TCI és kontroll csoportok között nem volt különbség a műtét előtti (T₁) kortizol értékekben. Ezzel szemben a műtét végén (T₂, T₃) és a műtét után (T₄) szignifikánsan magasabb stresszhormon szinteket mértünk a műtét alatt propofol szedációt nem kapott csoportban (T₂ medián: 24,5; IQR: 23,0 – 28,05 vs. 14,2; 8,64 – 17,7 *p*<0,001; T₃: 26,0; 24,3 – 31,85 vs. 15,1, 8,29 – 18,1 *p*=0,03; T₄: 22,7; 15,6 – 27,7 vs. 8,88; 5,81 – 14,7 *p*<0,001). Tendenciát tekintve a T₄ időpontban a TCI csoportban a kortizol szintje visszatért a kiinduló szintre, míg a kontroll csoportban a magasabb érték perzisztált (**12. ábra**).

AZ ALPRAZOLAM ÉS A KORTIZOL SZINTJÉNEK ÖSSZEFÜGGÉSE

Minden betegnél meghatároztuk az alprazolam plazmaszintjét a műtét előtt (T_1) és a műtét végén (T_3). Megvizsgáltuk az alprazolam- és kortizol közötti összefüggést. Az összes beteget és az egyes csoportokat külön-külön tekintve sem találtunk statisztikai kapcsolatot az alprazolam és a kortizol plazmaszintje között, egyik időpontban sem.



12. ábra. A kortizol szint kinetikája a plazmában a csak premedikáció vs. premedikáció+ intraoperatív propofol szedáció csoportokban

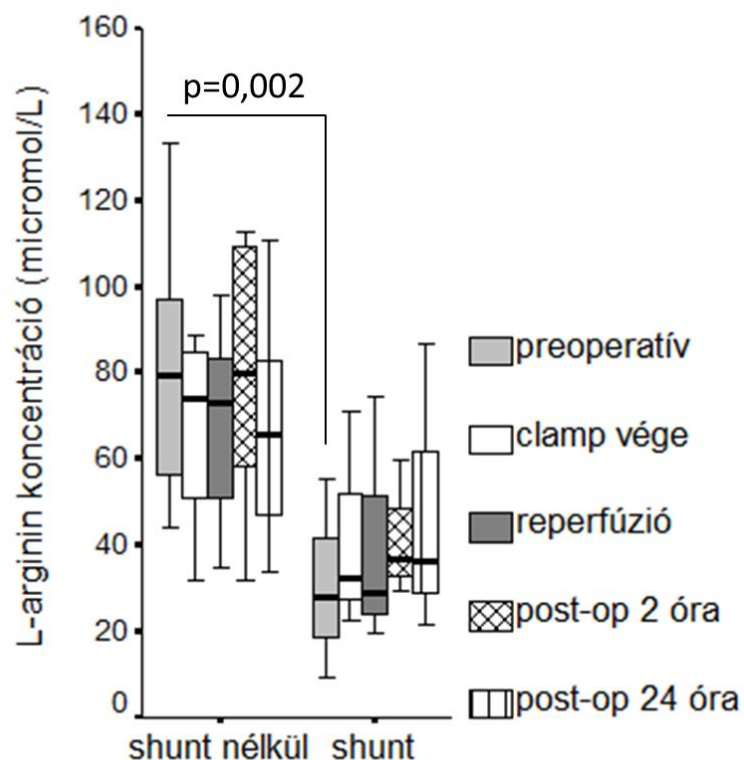
BDZ= benzodiazepin (alprazolam); TCI= target controlled infusion (propofol); clamp=carotis kirekesztés. Az adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány mutatjuk (Mann-Whitney teszt).

KIREKESZTÉSI IDŐ ÉS SHUNT

A kirekesztési idő nem különbözött szignifikánsan a tünetes és tünetmentes csoport között (23 ± 6 perc vs. 22 ± 6 perc). Friss neurológiai kórjel jelentkezett 6 betegnél, melyek a shunt behelyezése után megszűntek. A shunt-idő 20 ± 8 perc volt a shuntölt csoportban. A 6 beteg közül, akiknél shunt behelyezésre volt szükség, 2 a BDZ+TCI csoportban, 4 a BDZ csoportban volt.

PREOPERATÍV ÖSSZEFÜGGÉSEK

A preoperatív artériás vérből mért L-arginin plazma koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt a kirekesztést nem toleráló betegekben, akiknél shuntöt kellett behelyezni (median: 30,3 $\mu\text{mol/L}$; IQR: 24,4-34,4 vs. 57,6; 42.3-74.5; $p=0,002$) (13. ábra). A többi paraméter tekintetében nem volt különbség a két csoport között.



13. ábra. Perioperatív L-arginin plazma szintek a shunt nélkül vs shunttel végzett carotid endarterectomi során

Shunt nélkül= jó kirekesztési tolerancia; shunt= kirekesztési intolerancia, shunt igény; clamp=carotis interna kirekesztés. Az adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány mutatjuk (boksplot diagram, Mann-Whitney teszt).

A VIZSGÁLT MARKEREK SZINTJÉNEK IDŐBELI VÁLTOZÁSA

Megvizsgáltuk a preoperatív artériás L-arginin út metabolitjainak korrelációját az agyi anaerob metabolizmus mutatójával, a $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ aránnyal és a jugularis laktát koncentrációval, amiket a műtét kritikus időpontjaiban (kirekesztés előtt és után, kirekesztés felengedése előtt és után) mértünk. A preoperatív L-arginin koncentráció fordított korrelációt mutatott az artériás preoperatív laktát szinttel ($r = -0,447$, $p = 0,002$). Nem volt korreláció az artériás laktát koncentráció és az ADMA, SDMA szintek között. Inverz korrelációt találtunk a preoperatív L-arginin és a juguláris laktát szintek között, ami megmaradt a kirekesztés és a reperfúzió alatt is ($r = -0,757$, $p = 0,002$ és $r = -0,678$, $p = 0,008$). Ezzel szemben a preoperatív artériás ADMA koncentráció pozitív korrelációt mutatott az agyi anaerob metabolizmus mutatójával, a $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ aránnyal a kirekesztés és a reperfúzió alatt is ($r = 0,701$, $p = 0,005$ és $r = 0,644$, $p = 0,01$). A műtét előtt mért SDMA szint nem korrelált a $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ aránnyal. Az ADMA és SDMA szintek egyik időpontban sem korreláltak a jugularis laktát koncentrációkkal. A juguláris S100B proteint, mint a vér-agy gát sérülésének és az esetleges intraoperatív agyi ischaemia markerét is vizsgáltuk. A preoperatív artériás L-arginin koncentráció, az ADMA-val és SDMA-val ellentétben, fordított korrelációt mutatott a reperfúzió után mért juguláris S100B-val ($r = -0,702$, $p = 0,005$).

Végezetül a $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ és az intraoperatív, illetve pre- és posztoperatív S100B koncentrációk közötti korrelációt vizsgáltuk. A $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ arány a reperfúziót követően szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a műtét után 2 órával mért S100B koncentrációval. A műtét után 24 órával ez az összefüggés már nem volt megfigyelhető.

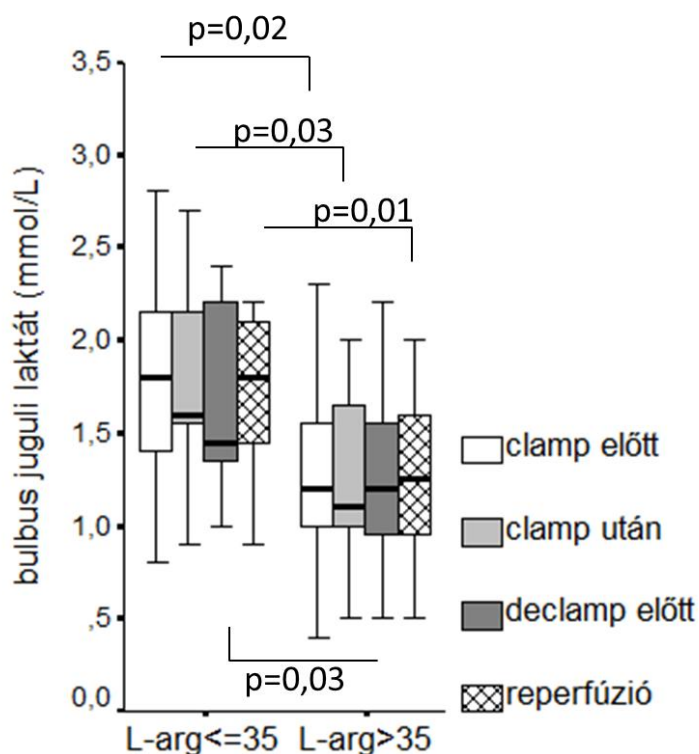
A PREOPERATÍV L-ARGININ PREDIKTÍV SZEREPE

A preoperatív L-arginin és a juguláris laktát közötti fordított korreláció megfigyelése után feltételeztük, hogy a nitrogén-monoxid donor L-argininnak protektív szerepe lehet a cerebrális perfúziós zavar kompenzálásában az a. carotis kirekesztése alatt, ezért ROC analízist végeztünk, hogy meghatározzuk az L-arginin cut-off értékét. Úgy találtuk, hogy a 35 mmol/L-nél kisebb preoperatív L-arginin érték (area: 0,904; szenzitivitás: 95,0%; specificitás: 83,3% [$p = 0,002$]) előre jelezte a shunt behelyezés szükségességét (pozitív prediktív érték: 83%, negatív prediktív érték: 95%). A fenti cut-off értéket használva a betegeinket dichotomizáltuk: magas

rizikójú (preoperatív L-arginine ≤ 35 mmol/L, n=7) és alacsony rizikójú (preoperatív L-arginine > 35 mmol/L, n=42) csoportokra osztva őket. Bináris logisztikus regressziós analízis alapján, az életkor, társbetegségek, az ellenoldali carotis szűkület súlyossága, a biomarkerek kiindulási értékei közül egyedül a preoperatív L-arginine ≤ 35 $\mu\text{mol/L}$ jelezte előre a shunt behelyezés szükségességét (OR: 0,061, 95%, CI 0,004 – 0,866; p = 0,039). Az esély hányados azt mutatja, hogy a cut-off értéknél magasabb műtét előtti L-arginin szint kisebb kockázatot jelent a későbbi shunt behelyezés szempontjából.

A MAGAS ÉS ALACSONY KOCKÁZATÚ ALCSOPORTOK ÖSSZEHAONLÍTÁSA

A preoperatív L-arginin szint alapján képzett alcsoportok összehasonlításakor a magas kockázatú alcsoportban a juguláris laktát koncentráció (mmol/L) szignifikánsan magasabb volt valamennyi időpontban, de a kirekesztés felengedése után volt a legerősebb a szignifikancia (median 1,8; IQR: 1,5-2,2 vs. 1,3; 1,0-1,6; p=0,01) (**14. ábra**).



14. ábra. A preoperatív L-arginin szint alapján képzett alcsoportokban (L-arginine ≤ 35 vs > 35 $\mu\text{mol/L}$) megfigyelt perioperatív jugularis laktát kinetikája

clamp= kirekesztés; declamp= felengedés; reperfúzió= felengedés után. Mann-Whitney teszt, az adatokat mint medián és interkvartilis tartomány ábráztuk borsz-plot diagram formájában.

Hasonló összehasonlításban a magas rizikójú csoportban az S100B koncentráció is szignifikánsan magasabb volt 24 órával a műtét után. (median: 53,9; IQR: 43,9-57,0 vs. 12,4; 1,7-34,0; $p=0,02$). A fentiek ellenére nem találtunk statisztikai különbséget sem az S100B, sem a juguláris laktát szint, sem a vérgázértékekből származtatott paraméterek tekintetében a shuntolt és nem shuntolt csoportok között. Ennek oka részben az alacsony esetszám lehet a shunt alcsoportban.

AZ ANAEROB METABOLIZMUS INDIKÁTORAI

Megvizsgáltuk a nem shuntolt betegekben a carotis interna kirekesztési ideje és az anaerob metabolizmus mutatói, mint az artériás és juguláris laktát és a $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ hányados közötti kapcsolatot. A kirekesztési idő fordított korrelációt ($r = -0,296$; $p = 0,035$) mutatott a kirekesztés felengedése előtt mért $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ hányadossal. Mind a juguláris, mind az artériás laktát koncentráció fordítottan korrelált a $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ hányadossal a kirekesztés előtt ($r = -0,345$; $p = 0,013$ illetve $r = -0,332$; $p = 0,017$). Ez utóbbi inverz koreláció a reperfúzió alatt mért artériás laktát és $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ hányados között is megmaradt ($r = -0,422$; $p = 0,002$).

5 ÉVES UTÁNKÖVETÉS

Retrospektív módon 54 beteg klinikai adatait követtük 5 éven keresztül és dolgoztuk fel. Összesen 7 páciensnek (13%) lett 5 éven belül restenosisa az operált oldalon (átlagéletkor: $61 \pm 11,33$ év, 6 férfi, 1 nő). Az ellenoldali carotis internán 13 (24%) betegben alakult ki szignifikáns stenosis. Ezen kívül 14 (25,9%) betegnél jelentkeztek az alsó végtagi artériás betegség tünetei, közülük 5 (9,3%) betegnél történt femorális vagy cruralis amputáció. Klinikailag jelentős koronária esemény (anginás panaszok, PCI, CABG, AMI) 18 (33,3%) betegnél lépett fel és 13 (24%) beteg halt meg 5 éven belül. Retrospektíven vizsgálva, szignifikáns különbség volt a műtét után 2 órával mért kortizol koncentráció tekintetében az 5 éven belül akut coronaria szindróma tüneteit mutató és a tünetmentes betegek között. Demográfiai, klinikai és laboratóriumi változókat vontunk be bináris logisztikus regressziós analízisbe, hogy a követéses végpontok tekintetében független prediktorokat keressünk. Ez alapján egyedül a posztoperatív plazma kortizol koncentráció (T_4) volt az 5 éven belüli carotis restenosis független prediktora (OR: 1,67, 95% CI: 1,02-2,73, $p=0,04$). Hasonlóképp, a T_4

időpontban mért kortizol koncentráció az 5 éven belül panaszokat okozó akut coronaria szindróma független prediktorának is bizonyult (OR: 1,11, 95% CI: 1,02-1,21, $p=0,01$). ROC analízis alapján a műtét után 2 órával mért plazma kortizol koncentráció specifikus és szenzitív mutatója a későbbi restenosisnak (cut-off érték: kortizol $\geq 19,45$ $\mu\text{g/ml}$, szenzitivitás: 67%, specificitás: 76%, area: 0,708, 95% CI: 0,651-0,958, $p=0,01$). A 13 elhunyt beteg (24%) közül 8 szenvedett alsó végtagi artériás betegségben. Erős szignifikáns összefüggést találtunk az alsó végtagi artériás betegség és az 5 éven belüli mortalitás között ($p=0,01$). Az 5 éven belül meghalt betegek ($n=13$, 9 férfi, 4 nő) tendencia jelleggel idősebbek voltak a műtét idején (életkor: $70\pm 8,7$ vs $64\pm 7,4$ év, $p=0,05$). A műtét idején fennálló magasabb életkor előre jelezte az 5 éven belüli mortalitást (OR: 1,25, 95% CI: 1,01-1,54, $p=0,041$).

10.5. MEGBESZÉLÉS

A PROPOFOL SZEDÁCIÓ ÉS A PREMEDIKÁCIÓ HATÁSA A PREIOPERATÍV STRESSZRE

A plazmában mért kortizol szintek alapján a pemedikáció és propofol szedáció kombinációja kedvezőbb stressz csökkentő effektusát észleltük, melyben valószínűleg a propofol komponensnek van nagyobb szerepe [188]. Viszont másokhoz hasonlóan, nem találtunk statisztikai összefüggést a plazma kortizol és alprazolam koncentrációk között egyik mérési időpontban sem [189].

5 ÉVES UTÁNKÖVETÉS

Az 5 éven belüli halálozás és a perifériás artériás betegség között szoros összefüggést találtunk. A perioperatív időszakban rögzített paraméterek közül, a műtét után 2 órával mért magasabb kortizol szint összefüggést mutatott a carotis restenosis későbbi kialakulásával és a panaszokat okozó ischaemiás szívbetegség megjelenésével. Eredményeink alapján felmerül, hogy a műtéti stressz nagysága és az atherogenesisben szerepet játszó faktorok között összefüggés lehet, mely befolyásolja a kimenetelt [190]. Retrospektív adataink azt sugallják, hogy minden tevékenység, ami segít megelőzni az emelkedett kortizol választ, jótékony hatású lehet hosszú távon is a manifest érbetegségben szenvedők számára [166].

AZ L-ARGININ ÚT ÉS AZ AGYI ISCHAEMIA KAPCSOLATA CEA SORÁN

Legfontosabb megfigyelésünk, hogy a műtét előtt a betegek plazmájában mért L-arginin koncentráció előre jelezte a későbbi shunt behelyezés szükségességét carotis endarterectomia során. A kirekesztési intolerancia preoperatív előrjelzésére a carotis kompresszióra bekövetkező artéria cerebri media áramlási sebesség csökkenés transcranialis dopplerrel (TCD) való monitorozásával történtek próbálkozások [191]. Megfigyelésünket alátámasztja, hogy *Micieli és tsai.* szignifikáns különbséget találtak az L-arginin reaktivásban a súlyos carotis interna stenosisban szenvedő betegek stenotikus oldalán az épp oldalhoz viszonyítva [192]. Megfigyelésüket az endotélium diszfunkciójával magyarázták, mivel a rendellenességek a CEA után három hónappal eltűntek [192]. Ezek az adatok az L-arginin fiziológiás szerepét sejtetik a hemodinamikai kompenzáló mechanizmusokban nyaki verőér betegségben. Ezzel összhangban a beavatkozás előtti L-arginin koncentráció fordított korrelációt mutatott a kirekesztés előtti és a reperfúzió utáni juguláris laktát szinttel a saját anyagunkban. Ezek alapján az NO-donor L-arginin pleiotrop protektív hatását is feltételezzük, mely lehet a javuló perfúzió, de akár direkt metabolikus eredetű is [193,194]. Ezt támogatja, hogy a posztoperatív 24. órában mért S100B alacsonyabb volt azokban, akiknél a preoperatív L-arginin szint magasabb volt (neuroprotektív hatás?) [74].

Perspektivikusan az L-arginin út aktivációja az ischaemiás prekondicionálás eszköze lehet atherosclerotikus betegekben. Ezt támogatja, hogy kísérletes körülmények között előidézett stroke-ban az L-argininnel történt előkezelés meg tudta előzni az agykárosodást [195]. Az ADMA preoperatív koncentrációja pozitívan korrelált az anaerob agyi metabolizmus mutatójával ($P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$) jelezve, hogy a magas ADMA szint cerebrális hipoperfúzióval jár feltehetően vazokonstriktor hatásának megfelelően. Mások adatai szerint az ADMA infúzió növelte az erek merevségét és csökkentette az agyi vérátáramlást egészséges önkéntesekben [196A $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ arány a reperfúzió után pozitívan korrelált az S100B 2 órával a műtét után mért koncentrációjával. Ez arra utalhat, hogy a reperfúzió utáni magasabb juguloarteriális CO_2 és a vér-agy gát sérülése között összefüggés lehet [176]. Tanulmányunk hiányossága, hogy nem történt képzővizsgálat a „silent” ischaemiás léziók kimutatására a látszólag tünetmentes betegeknél CEA után [197]. Meghatároztuk a preoperatív szakban mért plazma L-arginin cut-off értékét, ami előre jelzi a shunt behelyezés szükségességét. Ezt az

értéket használva a betegeket dichotomizáltuk. Magas rizikójúnak tartottuk a carotis kirekesztése utáni kompenzálatlan agyi keringés szempontjából azokat, akik kezdeti L-arginin szintje 35 mmol/L-nél kisebb volt. Lényeges megjegyezni, hogy ez a határérték kifejezetten alacsony az egészséges alanyokéval összehasonlítva [74]. Mások is azt találták, hogy a 10-től 60 $\mu\text{mol/L}$ -ig terjedő L-arginin értékek az ADMA 0,1 mmol/L-es emelkedésével időskorban kiemelt halálozási kockázatot jelent [198]. A magasabb rizikó 60 $\mu\text{mol/L}$ -es L-arginin érték felett eltűnik [198]. Saját anyagunkban az ellenoldali carotis szűkület nem jelezte előre a shunt behelyezés szükségességét. Az L-arginin alapú alcsoport analízisből nyert adatok megmutatták, hogy a küszöbérték alatti L-arginin szinttel élő betegek az anaerob metabolizmusnak jobban ki vannak téve, amire a juguláris laktát emelkedése és az eseménytelen endarterectomiák ellenére észlelt magasabb S100B szint is utal. Mások a kirekesztési intolerancia faktoraiként idősebb életkort, női nemet, az ellenoldali carotis interna elzáródását, illetve az ellenoldali carotis communisban Doppler-vizsgálattal mérhető kisebb átlagos áramlást találták [199]. Ezzel szemben a korábban elvégzett ellenoldali CEA csökkentette a shunt szükségességének valószínűségét [199,200]. Az általunk vizsgált populáció azonban nem hasonlítható össze ezzel a prospektív adatbázissal, mert az esetszámunk kisebb és az átlagos életkor alacsonyabb volt; továbbá több férfit vontunk be a vizsgálatba ellenoldali carotis elzáródás nélkül. Eredményeink azt mutatják, hogy a pre- és intraoperatív L-arginin és ADMA szintek mérése és értékelése klinikailag hasznos lehet a cerebrális ischaemiás események megelőzésében, ahogy azt mások más szerveken találták [201]. Saját anyagunkban a 35 mmol/L-nél alacsonyabb preoperatív L-arginin szint a kirekesztési intolerancia rizikófaktora, mely további validálásra szorul magasabb esetszámon. Emellett érdemes lenne vizsgálni az L-arginin szinteket az általános anesztéziában végzett CEA során is.

Összefoglalva:

- (i) A propofollal végzett betegre szabott éber szedáció csökkenti a perioperatív időszakban kiváltott stressz-választ, ugyanakkor nem rontotta a neuromonitorozás minőségét.
- (ii) Nagyobb műtéti stressz mellett az 5 éven belül fellépő coronaria események (AICS) rizikója nagyobb a vizsgált betegcsoportban.
- (iii) Összefüggést találtunk a műtéti stresszválasz nagysága és az 5 éven belüli restenosis kialakulása között az operált oldalon.

- (iv) Fentiek alapján, a carotis műtéttel járó megterhelés csökkentése a vaszkuláris betegségben szenvedők hosszú távú kimenetelét is kedvezően befolyásolhatja.
- (v) A magas preoperatív ADMA-koncentráció és a kirekesztés, valamint a reperfúzió alatti anaerob agyi metabolizmusra utaló ($P_{j-a}CO_2/C_{a-j}O_2$) hányados közötti pozitív korreláció az ADMA és a csökkent cerebrális perfúzió kapcsolatára utal.
- (vi) Az alacsony preoperatív L-arginin szint képes előre jelezni a carotis kirekesztésekor jelentkező shunt igényt, mely az NO-donor L-arginin protektív szerepét sugallja.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Szabo P, Lantos J, Nagy L, Keki S, Volgyi E, Menyhei G, Illes Z, Molnar T. I-Arginine Pathway Metabolites Predict Need for Intra-operative Shunt During Carotid Endarterectomy. Eur J Vasc Endovasc Surg. **2016**;52(6):721-728.

Szabó P, Mayer M, Horváth-Szalai Z, Tóth K, Márton S, Menyhei G, Sínay L, Molnár T. Awake Sedation With Propofol Attenuates Intraoperative Stress of Carotid Endarterectomy in Regional Anesthesia. Ann Vasc Surg. **2019** Sep 26. pii: S0890-5096(19)30733-2.

Szabó P, Menyhei G, Horváth-Szalai Z, Molnár T. A műtét alatti szedáció hatás a perioperatív stresszre és a hosszútávú kimenetelre regionális anesztéziában végzett carotis endarterectomia során. Érbetegségek, **2019**;26(1):5-9.

11. CLOPIDOGREL SZEKUNDER PREVENCIÓBAN RÉSZESÜLŐ STROKE BETEGEK VÉRLEMEZKE FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

A vérlemezkék kulcsszerepet játszanak az atherothrombotikus folyamatokban és a stroke patogenezisében [202]. A vérlemezke aggregációgátló terápia (TAG), (aszpirin vagy P2Y12-gátlók önállóan vagy kombinációban) rutinszerűen alkalmazott az atherothrombotikus recidívák kivédésében, de a kombinációban való alkalmazás magasabb vérzéses szövődménnyel jár [203]. A TAG monoterápiára adott válasz betegenként eltérő lehet [204]. A kezelés ellenére fennálló reziduális vérlemezke aktivitás szűrése rutinszerűen nem hozzáférhető, így egyeseknél gyakoribbak a recidív atherothrombotikus események [205,206]. Számos kockázati tényezőt azonosítottak a clopidogrel kezelés ellenére fennálló magas reziduális vérlemezke reakcióképesség (high-on-treatment residual platelet reactivity, HTPR) hátterében [207,208]. Mostanáig főleg a recidív koronária események megelőzésében próbáltak vérlemezke funkciók tesztek segítségével stratégiát kialakítani [209]. A kardiovaszkuláris betegségek kimenetele és a vérlemezke turnover között direkt kapcsolatot találtak [210]. Ez utóbbi megbecsülhető a reziduális messenger RNS tartalmuk miatt retikulált, fiatal vérlemezkék arányából [211]. Ezek az éretlen vérlemezkék (IPF) nagyobbak, aktívabbak, és okozati és prognosztikai tényezőt képeznek az atherothrombotikus betegségekben [212]. Kérdéses azonban, hogy a vérlemezke tulajdonságok egyformán hozzájárulnak-e az összes ischaemiás stroke altípushoz [213]. Ezek beazonosítása új egyénre szabott kezelési lehetőségeket kínálhat. A vaszkuláris betegségek diagnosztikájában új vérlemezke-paraméterek kerültek bevezetésre [214,215]: (i) plateletcrit (PCT) – a trombocitafrakció százaléka a teljes vérhez viszonyítva; mean platelet volume; (ii) az átlagos trombocitaterfogot (MPV); (iii) platelet distribution width (PDW) – a trombocitaterfogot eloszlásgörbe szélessége; (iv) platelet larger cell ratio (LCR) > 12 fL térfogatú trombociták százaléka. Az MPV és a PCT az mRS alapján mért kedvezőtlen kimenetellel korreláltak, de több változós modellben csak az MPV bizonyult a rövid távú stroke kimenetel független prediktorának [215]. *Ibrahim és mtsai.* az emelkedett éretlen trombocita frakció (IPF) és a clopidogrel kezelés ellenére fennálló vérlemezke reaktivitás (non-responder státusz) között figyeltek meg kapcsolatot [216].

Bogár és munkatársai a 1990-es évek közepén kezdték vizsgálni a leukociták mozgását a Westergren csőben. Azt tapasztalták, hogy a teljes vér 1-órás ülepedése során a leukociták az aktivációjukkal arányosan felfelé mozognak a csőben [217]. Azt feltételezték, ha mérik a véroszlop felső felében lévő fehérvérsejtek számát, akkor az akut fázis reakcióra utaló kórélettani változást jellemző értékhez jutnak egy egyszerű laboratóriumi módszerrel [217]. Mivel a fehérvérsejtek a vörösvértestek szedimentációjával ellentétes irányban mozogtak, a jelenséget leukocita antiszedimentációs rátának (LAR) nevezték el [217]. Feltételeztük, hogy a vérlemezkék a leukocitákhoz hasonlóan aktivációjukkal arányos flotálódnak a teljes vért tartalmazó oszlopban, melynek klinikai információs értéke lehet.

11.1. CÉLKITŰZÉS

(i) a LAR analógiájára kiszámolt trombocita antiszedimentációs ráta (TAR) meghatározása egészséges kontroll csoportban és stroke prevenció miatt clopidogrelt szedő betegekben; (ii) az IPF, az MPV, az LCR, valamint a magas fluoreszcencia intenzitást mutató éretlen trombocitafrakció (H-IPF) különbözik-e az ülepedés után nyert alsó és felső vérmintában a kontroll csoportban és clopidogrelt szedő betegekben; (iii) a szeparáció során kettéválasztott alsó és felső részben mért vérlemezke aggregáció különbözik-e egymástól, illetve a teljes vérben mért aggregációtól egészséges kontroll csoportban és clopidogrelt szedő betegekben; (iv) a fenti paraméterek mutatnak-e különbséget a clopidogrelt szedő 'reszponder' és 'non-reszponder' alcsoportokban; (v) végül képalkotó vizsgálatokkal azt szerettük volna megtudni, hogy van-e különbség a szeparálódó trombocita szubpopulációk elektronmikroszkópos (TEM) és atomerő mikroszkópos (AFM) morfológiájában.

11.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

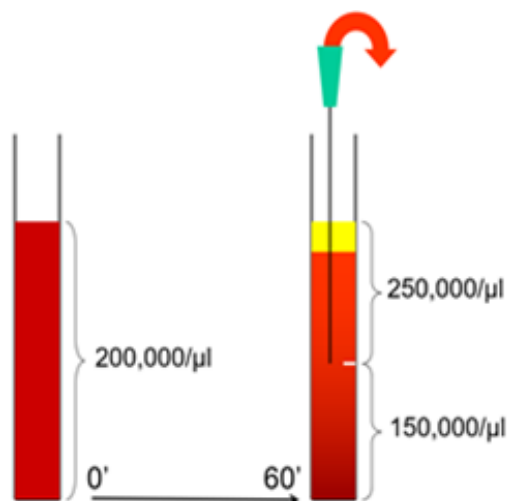
Két leíró, prospektív tanulmányt végeztünk.

VÉRLEMEZKÉK FUNKCIONÁLIS ÉS MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATA EGÉSZSÉGESEKEN (TANULMÁNY A.)

A vérlemezke paraméterek, a TAR és a vérlemezke funkció vizsgálatát 21 egészséges alanytól nyert vénás vérből végeztük el. Az elektronmikroszkópos és az atomerő-mikroszkópos felvételekhez szükséges vérvételre 6-6 egészséges személyt vontunk be.

VÉRLEMEZKÉK FUNKCIONÁLIS ÉS MORFOLÓGIAI ELTÉRÉSEINEK VIZSGÁLATA CLOPIDOGRELT SZEDŐK ESETÉBEN (TANULMÁNY B.)

Korábbi ischaemiás stroke miatt legalább 3 hónapja, napi 75 mg clopidogrel prevencióban részesülő beteg (n=46) és életkorban hasonló egészséges kontrol (n=15) személy került bevonásra. Az akut vaszkuláris esemény, a trombocitopénia (TCT<50 G/L), a veleszületett trombocitafunkciós és véralvadási zavar, az anémia és a méréseinket befolyásoló gyógyszerek szedése (orális antikoaguláns, NSAID, diuretikumok, antiglikémiás szerek) kizárási kritériumot jelentett. A vérlemezke paramétereket (abszolút TCT szám, MPV, IPF, H-IPF, LCR) Sysmex-XN 9000 integrált hematológiai automata rendszeren (Sysmex Co, Japán, 2017) végeztük. *TAR meghatározás:* a mintavétel a könyökhajlati vénából, rövid leszorítás után 21 G-s tűvel, zárt vérvételi rendszerrel történt. Az egyik csőből vérszámológó automatával (Sysmex XN 9000) meghatároztuk a teljes vérképet. A másik EDTA-s csőben lévő vért 1 óra hosszan ülepítettük, majd a csőben lévő véroszlop magasságának felső ½ részét átpipettáztuk egy másik EDTA-s csőbe (trombocita felső, TF) (**15. ábra**). Az eredeti cső alsó felében maradt ½ részből (trombocita alsó, TA) és az átpipettázott felső frakcióból (trombocita felső, TF) vérkép mérésével meghatároztuk a trombociták számát, majd a $TF-TA/TF+TA$ egyenlet szerint kiszámoltuk a TAR értékét és százszal szorozva százalékban adtuk meg.



$$\text{TAR (\%)} = 100 \times \frac{\text{Felső TCT szám} - \text{Alsó TCT szám}}{\text{Felső TCT szám} + \text{Alsó TCT szám}}$$

15. ábra. A vérlemezkék (TCT) szeparálása a teljes vér 1-órás ülepitésével és a trombocita antiszedimentációs ráta (TAR) képlete

VÉRLEMEZKEFUNKCIÓ

A trombocitafunkció méréséhez 2x3 ml vénás vér vettünk hirudint tartalmazó csőbe. Ezt követően az egyik hirudinos csőből elvégeztük a teljes vér trombocitaaggregációs vizsgálatát (Multiplate® Analyzer, Roche, Switzerland) [218]. A Multiplate gyártója által meghatározott $AUC < 53$ tekintettük a hatásos gátlás küszöb értékének adenzin-difoszfát (ADP) teszt esetén [218], míg a clopidogrel kezelés ellenére fennálló fokozott reziduális vérlemezke reaktivitás definíciója a nemzetközi ajánlás szerint történt [219]. A másik cső hirudinos vért ülepitettük 1 óra hosszan, majd a korábban leírt szeparálási technika segítségével két hirudinos (aló és felső) frakcióhoz jutottunk. Ezekben is megmértük a trombocitaaggregációt. A Multiplate Analyzer által nyújtott adatokból, az aggregációs görbe alatti terület (area under the curve, AUC), az aggregációs egység (az impedancia növekedése) és az aggregációs görbe maximális meredeksége (velocity) került archiválásra minden mérés során.

TRANZMISSZIÓS ELEKTRONMIKROSKÓPIA (TEM)

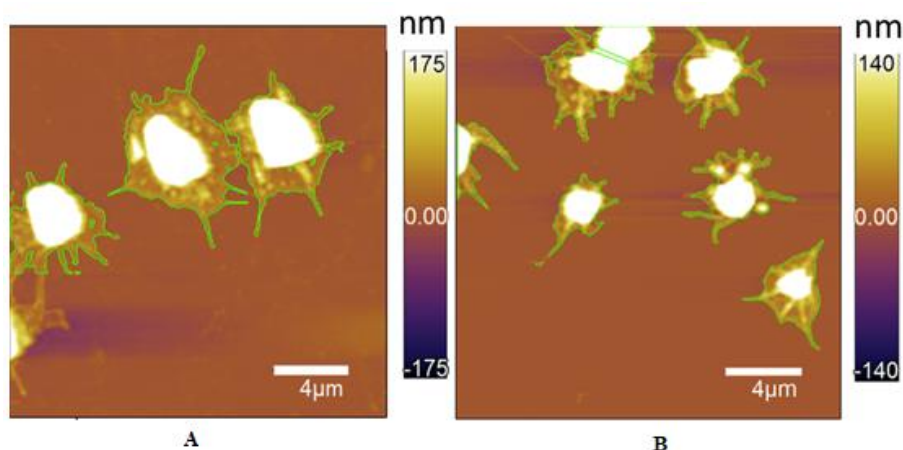
A trombocitadús plazma nyérése céljából 6 egészséges személytől EDTA-s csőbe vénás vért vettünk. Egy órás ülepités után a felső részt átpipettáztuk egy másik EDTA-s csőbe, majd az alsó és a felső részt 5 percig 200 g-n centrifugáltuk. Ezt követően mindkét cső felülúszóját egy új natív csőbe tettük, s ezt 1200 g-n 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítás után a két csőben alul maradó trombocitadús plazmát azonnal elektronmikroszkópos feldolgozásra került. A trombociták fixálása 2,5%-os glutáraldehiddel történt 4 °C-on. Eppendorf csőben történt centrifugálás után az üledék posztfixálása következett 1%-os osmium-tetroxiddal 4 °C-on 60 percig. A fixált szediment 3%-os agarba került, majd 1 mm³ blokk kivágása és 3x10 percig 0,1M-os foszfát pufferben való mosása következett. Az etil-alkoholos dehidráció és mosás után propilén-oxidba helyeztük és beágyaztuk Durcupan gyantába (Sigma, Budapest, Hungary). A félvékony metszeteket toluidine-kékkel megfestettük és fénymikroszkóppal megvizsgáltuk. Az ultravékony rétegeket rácsokra helyeztük és JEOL JEM 1200EX TEM-al vizsgáltuk. A digitális fényképek az iTEM szoftver (Olympus, Japan) segítségével készültek. Elektronmikroszkópos módszerrel az alábbi vizsgálatokat végeztük: (i) TEM kép az alsó - és felső részben lévő trombocitákról; (ii) iTEM program segítségével (interpolált poligon) megmértük a felső - és alsó részben lévő vérlemezkék (50000x nagyítás) területét, kerületét, konvex területét és konvex kerületét; (iii) meghatároztuk az alsó - és felső részben lévő 70-70 közel azonos nagyságú vérlemezkében (50000x nagyítás) látható alfa és dense granulumok számát.

ATOMERŐ MIKROSKÓPIA (AFM)

Hat egészséges egyén alkar vénájából vettünk vért K₂-EDTA-t tartalmazó csőbe. Egyórás, szobahőmérsékleten történő ülepitést követően a vér felső felét azonnal egy másik K-EDTA-t tartalmazó csőbe pipettáztuk és mindkét felet 150 g-n, 8 percig centrifugáltuk szobahőn, 2-es leállási sebességgel. A trombociták aktiválódásának minimalizálása miatt 0,1 mL felső trombocitadús plazma réteget pipettáztunk 10 mL HBS pufferbe (HEPES buffered physiological saline), amely 0,001 M EDTA-t és 0,1 % glukózt is tartalmazott, mindkét fél centrifugálása után. Az óvatos fel-leforgatással a mosott trombocitákat a cső aljára centrifugáltuk (szobahő, 2000 g, 5 perc). A mosópuffer leöntése és a cső faláról való óvatos leitatása után tiszta mosópufferben szuszpendáltuk a trombocitákat, úgy, hogy a trombocitaszám 100 G/L legyen.

A szuszpenziókból frissen hasított csillámpala korongra ($d=12\text{mm}$) $0,025\text{ mL}$ -t cseppentettünk, nedves kamrában 20 percig hagytuk ülepedni, majd $0,025\text{ mL}$ 2% -os glutáraldehid oldatot adtunk hozzá, körkörös döntögetéssel kevertük és 30 percig hagytuk fixálódni. Végül a felszín Milli-Q vízzel mostuk és áramló N_2 gázzal szárítottuk. A csillámpala felszínre ülepedett, fixált és szárított trombocitákat Cypher ES atomerő-mikroszkóppal (Asylum Research, Santa Barbara, CA), tapogató módban (AC) pásztáztuk, AR16 programmal. A pásztázáshoz szilikon-nitrid rugólapkát használtunk, amelynek a rugóállandója $\sim 42\text{ N/m}$ és a rezonanciafrekvenciája $\sim 300\text{ kHz}$ (OTESPA-R3, Bruker, Billerica, MA). A szabad amplitúdót 1V -ra, a pásztázási amplitúdót $0,5\text{--}0,7\text{ V}$ -ra, az erősítést $7\text{--}10$ -szeresre állítottuk.

A pásztázás során alkotott képet az AFM AR16 programjával analizáltuk (Igor Pro 6.34 A, Wavemetrics, Lake Oswego, OR). A pásztázott terület $20\times 20\ \mu\text{m}$ -es volt, amelyen a programmal élesen körbe határoltuk a trombociták területét (**16. ábra**).



16. ábra. A trombociták kijelölése képanalízisre AFM-mel készült magasságképen. Az ábra A része felső, a B része az alsó frakcióból származó trombocitákat mutatja

A trombociták analízise 18 paramétert eredményezett, amelyek közül felszínen rögzített, diszkoid alakú celluláris elemeket feltételezve a következők lehetnek hasznosak: magasság maximum (Z max), a középpontban (Z Center), átlagmagasság (Z Average); terület (Area), térfogat (Volume), kerület (Perimeter), hossz (Length) és szélesség (Width).

11.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS.

Az adatokat SPSS software package (Version 19.0, SPSS Inc, Chicago, USA) segítségével analizáltuk. A diszkrét változókat Chi-négyzet próbával elemeztük. A folyamatos változókat normalitásvizsgálatnak vetettük alá Smirnov-Kolmogorov teszttel. A normal eloszlású értékeket két-mintás Student-t próbával, míg nem normál eloszlást mutató változókat Mann-Whitney-teszttel hasonlítottuk össze. Korreláció analízishez Spearman-korrelációt használtunk (Spearman-korrelációs koefficiens, r). A kategorikus változókat, mint abszolút szám és (százalék), míg a kvantitatív adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány vagy átlag±szórás ábrázoltuk. A p -érték $<0,05$ tekintettük szignifikánsnak.

11.4. EREDMÉNYEK- TANULMÁNY A.

Az egészségesekben a vérlemezke antiszedimentációs ráta (TAR) átlaga $50,8 \pm 18,7$ % volt. A vérlemezke szám, az abszolút értékű éretlen trombocitafrakció (IPF), valamint a százalékos arányban kifejezett H-IPF szignifikánsan magasabb volt a felső frakcióban az alsóhoz viszonyítva ($p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,021$) (**18. táblázat**).

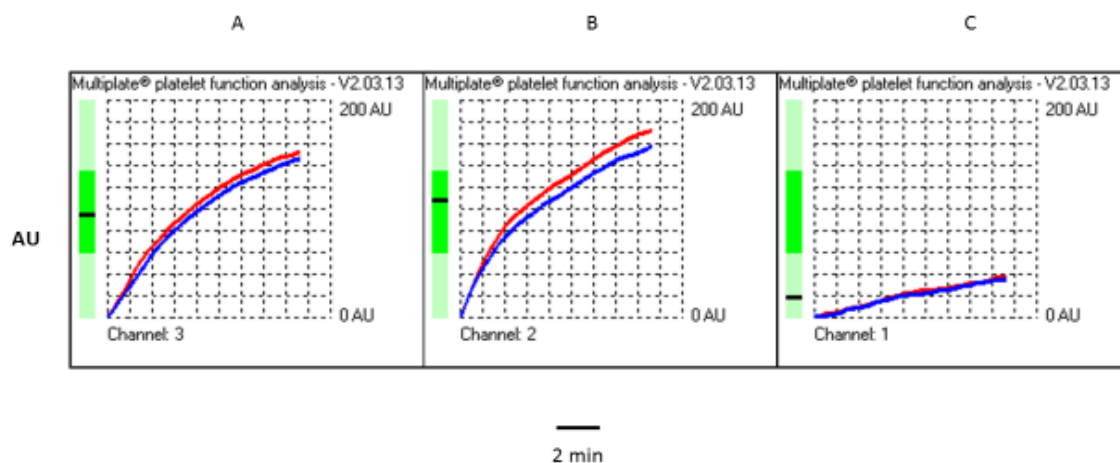
18. táblázat. Egészséges önkéntesekben mért vérlemezke paraméterek

	teljes vér	felső rész	alsó rész	p^*
trombocitaszám (G/l)	239 ± 76	285 ± 132	85 ± 33	0,003
MPV (fl)	$10,4 \pm 1,2$	$10,3 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,6$	0,644
IPF (abs)	$8,8 \pm 4,4$	$7,6 \pm 5,3$	$35 \pm 2,2$	0,003
H-IPF (%)	$1,5 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,9$	0,021
LCR	$27,5 \pm 4,0$	$26,9 \pm 5,1$	$26,9 \pm 4,9$	1,000

MPV= mean platelet volume, IPF= immature platelet fraction, H-IPF= high-fluorescent IPF, LCR= large cell ratio.

Az adatokat, mint átlag±SD ábrázoltuk. p^* a felső vs alsó rész között.

Egy egészséges egyéntől vett vérminta aggregometriai görbéit (A: teljes vér; B: felső; illetve C: alsó vérfrakció AUC görbéje egy órás szedimentáció után) mutatja a **17. ábra**.



17. ábra. A Multiplate analizátor által készített reprezentatív mérési görbék

A vérlemezék *ex vivo* ADP indukálta aggregációjának nagyság az idő függvényében ábrázolva a teljes vérmintában (A), valamint 1-órás ülepítés után a felső frakcióban (B) és az alsó frakcióban (C).

19. táblázat. Egészséges önkéntesekben mért vérlemezke-aggregabilitási adatok

Impedancia-aggregometria				
	teljes vér	felső rész	alsó rész	p^*
AUC	69,9±13,1	103,3±35,8	26,1±9,6	<0,001
aggregáció	130,9±23,7	174,3±53,0	52,2±16,2	<0,001
velocity	15,5±3,8	26,5±10,9	6,5±1,7	<0,001

AUC= area under the curve. Velocity= a görbe meredksége. Az adatokat, mint átlag±SD ábrázoltuk. p^* a felső vs alsó rész között.

Az aggregometriai vizsgálat során szignifikáns különbséget tapasztaltunk a teljes vérben mért (átlag AUC: $69,9 \pm 13,1$) vs. az alsó frakcióban mért (átlag AUC: $26,1 \pm 9,6$) vs. a felső frakcióban mért görbe alatti terület (átlag AUC: $103,3 \pm 35,8$) értékek között a vér egyórás szedimentációját követően (valamennyi, $p < 0,001$) (**19. táblázat**).

A görbe meredekségét jelző „velocity” értékek szignifikáns különbséget mutattak mind a teljes vér vs felső, illetve alsó, mind pedig a felső vs alsó vér frakciók összehasonlításakor (valamennyi, $p < 0,001$) (**19. táblázat**). Kiemelendő, hogy a felső frakcióban mért AUC értékek az egészséges kontrolok 38%-ban ($n=8$) túllépték a normál tartomány felső határát (AUC: 53-122), mely arra enged következtetni, hogy a felfelé vándorló trombociták *ex vivo* hiperaggegabilitást mutatnak ADP jelenlétében. Annak ellenére, hogy az egészséges kontrol csoport nem részesült antitrombotikus kezelésben, az AUC értékek az alsó frakcióban az effektív antithrombotikus kezelés során várt tartományban voltak (AUC: 0-53), „mintha clopidogrel hatásban lennének”, azt sugallva, hogy a szedimentálódott trombociták *ex vivo* nem aktiválhatók ADP hozzáadásával.

Logikus módon a TAR szignifikáns negatív korrelációt mutatott az AUC, az aggregáció, valamint a görbe meredekségét jelző „velocity” értékekkel az alsó frakcióban ($r = -0,661$, $p < 0,05$, $r = -0,700$, $p = 0,01$, $r = -0,636$, $p < 0,05$). Habár negatív korrelációt figyeltünk meg a résztvevők kora, valamint az alsó frakció AUC, aggregáció és a velocity adataival ($r = -0,553$, $p < 0,05$, $r = -0,553$, $p < 0,05$, $r = -0,535$, $p < 0,05$ respectively), ennek ellenére nem találtunk korrelációt az életkor és a vérlemezke-antiszedimentációs ráta (TAR) között.

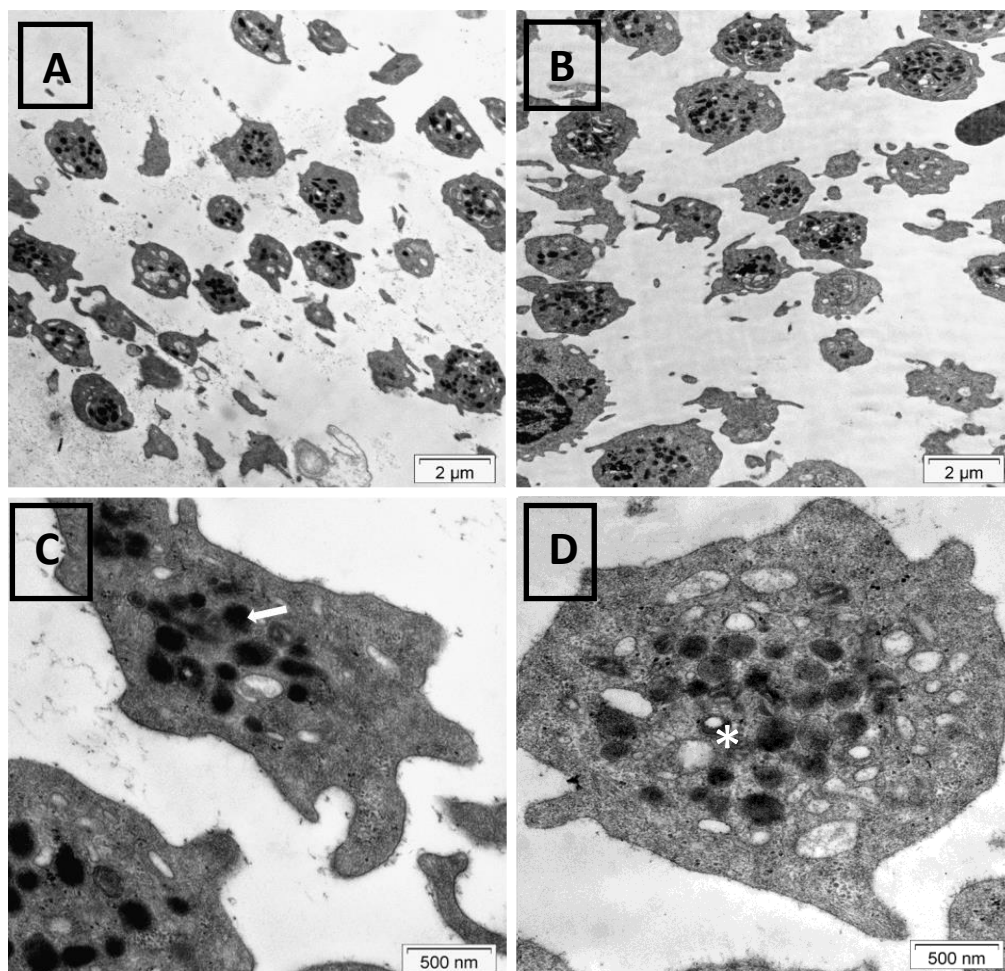
ELEKTRONMIKROSKÓPOS EREDMÉNYEK

Kis nagyítás során különbséget tapasztaltunk a felső és alsó vérfrakciók vérlemezkéinek morfológiai megjelenésében és számukban. A trombociták területe és kerülete szignifikánsan nagyobb volt a felső frakcióból származó trombociták esetében az alsó frakcióban mért értékekkel összehasonlítva ($p < 0,001$). Méréseinket a korábban részletezett ITEM program segítségével végeztük (**20. táblázat**) Nagyobb nagyítás során határoztuk meg a trombocitákban lévő alfa és denz granulumok számát. A felső frakcióban elhelyezkedő trombocitákban 1,6-szor több alfa granulumot találtunk az alsókhöz képest (**18. ábra**).

20. táblázat. Transzmissziós elektronmikroszkóppal nyert adatok egészségesekben

	alsó rész	felső rész	<i>p</i>
vérlemezke-terület (nm ²)	2,26x10 ⁶ ± 6,3x10 ⁵	3,69 x10 ⁶ ± 9,3 x10 ⁵	<0,001
vérlemezke-kerület (nm)	7,21x10 ³ ± 1,55x10 ³	9,17x10 ³ ± 1,42x10 ³	<0,001

Az adatokat, mint átlag±SD ábráztuk.



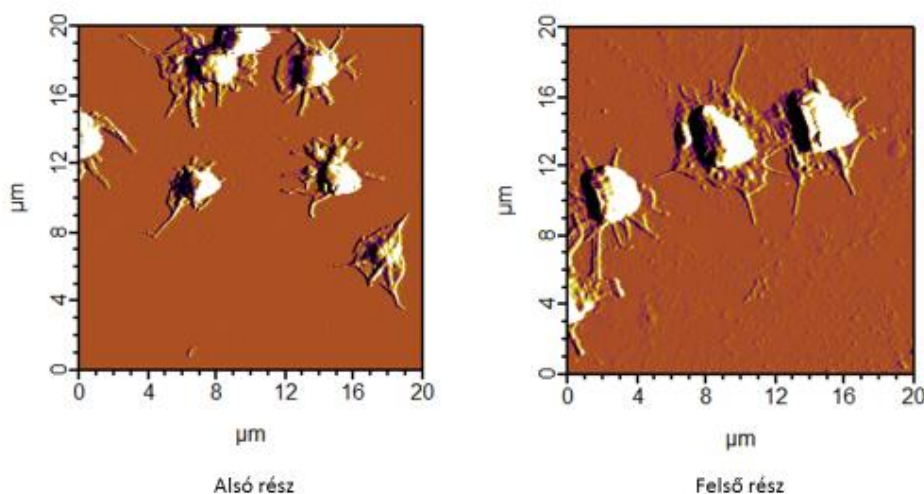
18. ábra. Az alsó (A, C) és felső frakció (B, D) trombocitáinak elektronmikroszkópos képe

A kis nagyítású képek az alsó (A) és felső (B) frakcióban lévő vérlemezkek számát és méretét mutatja. A C és D jelzés alatt nagy nagyításban megjelenített vérlemezke látható. A nyíl a C jelzésű felvételen egy α -granulumra mutat, míg a D-ben lévő csillag egy denz granulumot jelöl. A skálaértékek A és B tartományban 2 μ m, C és D 500 nm.

ATOMERŐ-MIKROSZKÓPOS EREDMÉNYEK

Az egészséges egyének véreből nyert, alsó és felső frakcióból származó trombociták morfológiáját AFM-el is vizsgáltuk, mivel itt az előkészítés a trombocitákat sokkal kevésbé befolyásolja, mint az EM-vizsgálatokhoz szükséges előkészítés. Rutin szerint az alap hematológiai paramétereket K_2 -EDTA-s vérből határoztuk meg, ezért a morfológiai vizsgálatokhoz is ilyen vért használtunk.

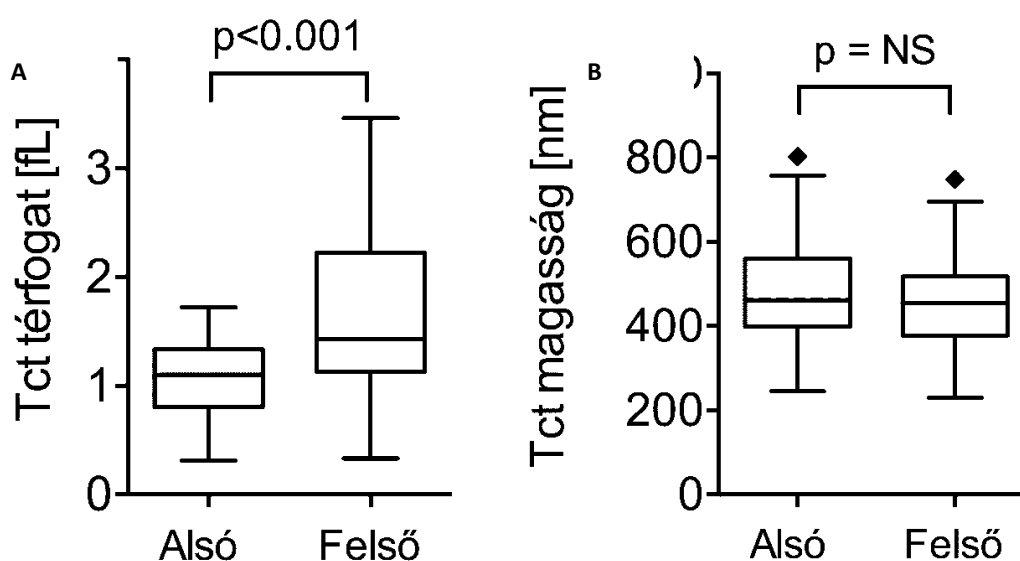
Az AFM-mel a felszínhez kötődő trombocitákat vizsgáljuk, azonban EDTA-s vérből csak mosott trombociták rögzültek a mica felszínre, 20 perces ülepítés és 30 perc glutáraldehides fixálás után. Azonban ezek is elmozdultak a pásztázás során, így dehidrált trombocitákkal dolgoztunk továbbiakban. A magasság, az amplitúdó, a fázis és a Z szenzor képek egyaránt azt mutatták, hogy mindkét fázis trombocitái rögzülés közben gömb alakot vehettek fel, kiterültek a felszínen, majd különböző mértékben összehúzódtak (**19. ábra**).



19. ábra. Trombociták AFM-képe az ülepítés után szeparált alsó és felső vérfrakcióból

Az összehúzódás mértékére jellemzően látszik a kiterült membrán és annak összehúzódásakor a felszínen kapaszkodó állabak. A képen jól látszik, hogy az alsó fázis trombocitái kiterjedésükben és összehúzódtott formájukban is kisebbek. Az AFM programja a felszínen rögzített trombociták magasságáról és kiterjedéséről szolgáltat képanálízisre alkalmas adatokat. A fixált és szárított trombocitáink magasságképen kijelöltük az egyedi

trombocitákat és a programmal elvégeztettük azok analizését. Az alsó és felső frakcióban lévő trombociták térfogatának és a középpontban mért magasságának összehasonlítását mutatja az **20. ábra**. A felső frakció trombocitáinak térfogata [fL] nagyobb volt, mint az alsóé (átlag±SE: $1,6\pm 0,45$ vs $1,0\pm 0,60$; $p < 0,001$) (**20. ábra A**), míg a középmagasságuk [nm] nem különbözött szignifikánsan (átlag±SE: 456 ± 20 vs $484\pm 0,20$) (**20. ábra B**).



20. ábra. Az alsó és felső frakció trombocita AFM paramétereinek box és whiskers Tukey-szerinti grafikus ábrázolása

Az adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány ábráztuk. Tct= trombocita; NS= nem szignifikáns.

11.5. EREDMÉNYEK-TANULMÁNY B

A 2. vizsgálatunkba összesen 46, stroke szekunder prevenció miatt gyógyszeres antitrombotikus kezelésben részesülő beteg adatait (átlagéletkor: 66 ± 8 , férfi: 31) hasonlítottuk össze 15 egészséges egyén adataival (átlagéletkor: 40 ± 13 év, férfi: 6). A csoportok demográfiai jellemzőit és laborértékeit táblázatban foglaltuk össze (**21. táblázat**). A kontrol csoport szignifikánsan fiatalabb volt ($p < 0,001$). A nemek arányában is eltérés látható, de ez éppen nem érte el a szignifikáns különbséget. Az eritrocita-szedimentációs ráta (ESR) szignifikánsan magasabb volt a betegpopulációban ($p < 0,001$), viszont a CRP tekintetében nem

volt szignifikáns különbség a két csoport között. A többi paraméter tekintetében nem találtunk különbséget a két csoport között.

21. táblázat. A kontrol és a clopidogrel kezelt egyének demográfiai és laboratóriumi adatai

	Kontrol (n=15)	Clopidogrel kezelt (n=46)	<i>p</i>
Életkor	40±13	66±8	<0,001
Nem (férfi/nő)	6/14	31/15	0,06
BMI	25±3	27±4	0,12
Dohányzás (%)	2 (18)	9 (19)	0,58
CRP (mg/l)	1,70 (0,8-3,1)	1,75 (0,7-3,5)	0,24
ESR (mm/óra)	2 (1-4)	10 (6-18)	<0,001
Hematocrit (%)	42,8±0,9	43,6±0,7	0,42
Leukocita (G/l)	6,3±1.2	8,3±1.7	0,25
Vérlemezke (G/l)	282±75	239 ± 65	0,09
MPV (fl)	10,2±1.6	10,7±0.9	0,53

BMI= body mass index, CRP= C-reaktív protein, ESR= eritrocita szedimentációs ráta, MPV= mean platelet volume. Az adatokat, mint átlag±SD illetve abszolút érték (%), kivéve CRP és ESR, melyeket medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk.

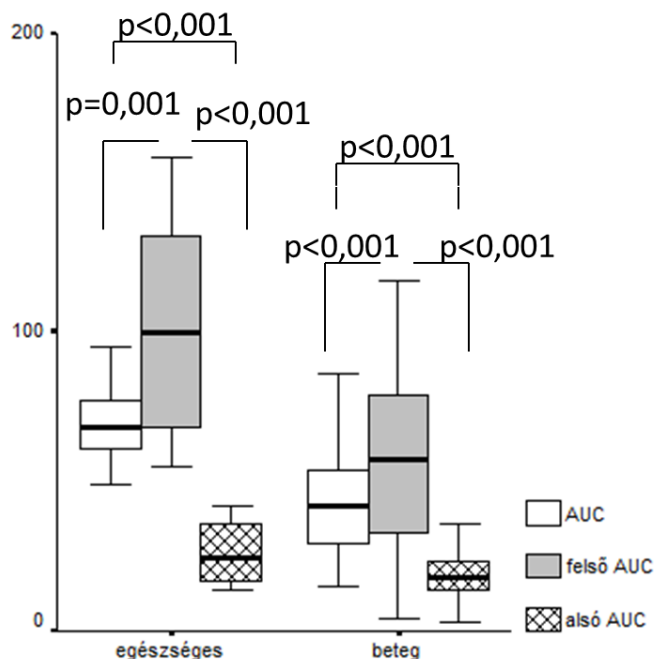
A trombocita antiszedimentációs ráta (TAR) nem mutatott szignifikáns különbséget a kontrol csoport, valamint a beteg populáció értékei között, azonban a betegekben magasabb TAR-tendencia volt megfigyelhető (**22. táblázat**). Mindkét csoportban meghatározásra került az MPV. Ezt összehasonlítottuk a teljes vérben, valamint az alsó és felső frakció vonatkozásában is. Az MPV értékben nem találtunk szignifikáns különbséget sem a beteg populáció és az egészségesek között (**21. táblázat**), sem pedig a teljes vér vs. felső frakció, teljes vér vs. alsó frakció, felső vs. alsó frakció vonatkozásban.

22. táblázat. Vérlemezke paraméterek és trombocita antiszedimentációs ráta egészségesekben és clopidogrel szedőkben

	Kontrol (n=15)	Clopidogrel kezelt (n=46)	<i>p</i>
Felső tct szám (G/L)	316 (218-478)	345 (301-428)	0,68
Alsó tct szám (G/l)	88 (51-124)	71 (54-86)	0,43
TAR (%)	58,5 (45,0-67,5)	67,7 (61,7-72,9)	0,15
MPV (fl) felső	10,7 (10,0-10,8)	10,8 (10,2-11,6)	0,30
MPV (fl) alsó	10,0 (9,8-10,6)	10,5 (9,8-11,2)	0,47
LCR felső (%)	28,9 (24,5-30,6)	33,0 (26,8-38,9)	0,14
LCR alsó (%)	25,5 (22,7-28,7)	30,5 (24,2-36,2)	0,14

Az adatokat, mint medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk. tct=trombocita, TAR=trombocita antiszedimentációs ráta, MPV= mean platelet volume, LCR= large cell ratio.

Az aggregometriai vizsgálat során szignifikáns különbséget tapasztaltunk a betegek alsó és a felső frakcióiban mért AUC értékei között a vér egyórás üleptetését követően (teljes vér vs. alsó frakció: median: 41,5; IQR: 29-54 vs 18,0; IQR: 14-23; teljes vér vs. felső frakció: 41,5; 29-54 vs 57,5; 33-79; alsó vs. felső; mindegyik $p < 0,001$). Fontos megfigyelés, hogy az AUC-értékek a felső frakcióban a clopidogrelt szedő betegek 59%-ában ($n=27$) meghaladták a terápiás tartomány (AUC: 0-53) felső határát. Kérdés volt, hogy a clopidogrelkezelésre nem reagáló (HRPR) betegek (teljes vér Multiplate mérés alapján 'non-responder', $n=12$) és a felső frakcióban mért 53 feletti AUC értékkel rendelkező betegek átfedést mutatnak-e? A 12 'non-responder' betegből 11-nek a felső frakciójában is 53 feletti AUC-értéket mértünk, így a két csoport közötti közötti koincidencia szignifikáns volt ($p=0,001$). Hasonlóképp, a teljes vérből mért AUC-értékek a kontroll csoportban szignifikáns eltérést mutattak mind a felső, mind pedig az alsó vérfrakcióból meghatározott AUC-értékekhez képest (**21. ábra**).



21. ábra. Vérlemezkefunkció vizsgálata impedancia aggregometriával a teljes vérben, valamint a szeparálás után nyert alsó és felső frakcióban, az egészséges és clopidogrel szedő csoportokban

Box-plot diagram. Fehér doboz a teljes vér, szürke doboz az 1-órás ülepités után szeparált felső, míg a sávos doboz az alsó vérfrakcióban mért aggregációs görbe alatti terület (AUC). A felső vs. alsó frakció AUC értéke mindkét csoportban szignifikáns különbséget mutatott ($p < 0,001$).

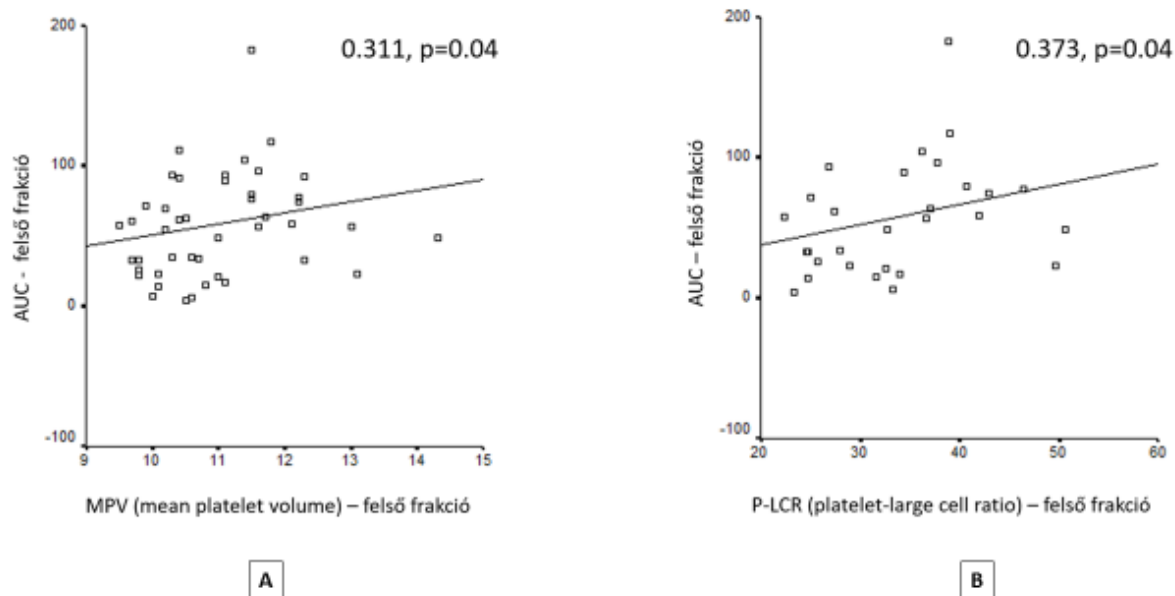
Logikusan a teljes vér AUC-értékek és a felső frakcióban mért AUC-értékek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a gyógyszert nem szedő egészségesekben a clopidogrel szedő betegekkel összehasonlítva ($p < 0,001$) (**23. táblázat**). A felső frakcióban mért AUC-értékek az egészséges populáció 40%-ában ($n=6$) magasabb volt a normál tartomány felső értékénél (AUC: 53-122) (**21. ábra**). Amire viszont nem számítottunk, az alsó frakcióban mért AUC-értékek szignifikáns különbséget nem mutattak az egészséges és a betegcsoport között (egészséges vs. beteg: 23,0, 16,0-35,0 vs 18,0, 14,0-23,0). Ezek az értékek a hatásos antitrombotikus terápiás tartományban voltak (AUC: 0-53), még a clopidogrelt nem szedő egészségesekben is (**21. ábra**). Mind a teljes vérben, mind a felső frakcióban mért aggregáció (aggregation unit, AU) és velocity érték szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,001$) volt a clopidogrelt szedő betegekben, mint az egészségesekben (**23. táblázat**). Az alsó rész aggregációja és a velocity között ilyen összefüggés nem volt kimutatható (**23. táblázat**).

23. táblázat. Impedancia aggregometriai adatok egészségesekben és clopidogrel szedőkben

	Kontrol (n=15)	Clopidogrel kezelt (n=46)	<i>p</i>
AUC	73,5 (59,5-78,5)	41,5 (29,0-54,0)	<0,001
AUC felső	112,5 (73,0-137)	57,5 (33,0-79,0)	0,003
AUC alsó	23,0 (16,0-35,0)	18,0 (14,0-23,0)	0,26
Aggregáció, AU	135 (105-146)	76,3 (59,3-107,3)	<0,001
Aggregáció felső	164 (131-203)	100,1 (48,8-138)	<0,001
Aggregáció alsó	39,8 (34,1-60,4)	37,4 (30,8-45,8)	0,20
Velocity	15,1 (12,2-16,6)	9,4 (7,4-11,4)	<0,001
Velocity felső	27,5 (17,5-33,6)	12,3 (6,5-21,1)	<0,001
Velocity alsó	5,3 (5,0-7,0)	5,1 (4,3-6,5)	0,25

Az adatokat, mint medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk. AUC= area under the curve; AU= aggregation unit; velocity= a görbe meredeksége.

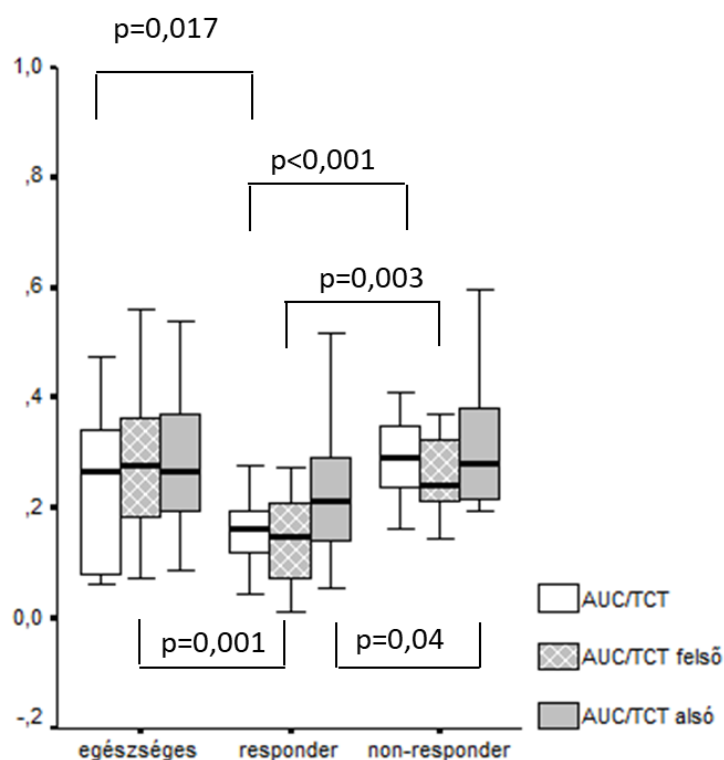
A clopidogrelt szedő betegekben, mind a felső frakcióban mért MPV ($r=0,311$, $p=0,04$) (**22. ábra A**), mind pedig a felső frakcióból meghatározott LCR (%) érték ($r=0,373$, $p=0,04$) pozitívan korrelált a felső frakcióban mért AUC-értékekkel (**22. ábra B**).



22. ábra. Az aggregációs görbe alatti terület (AUC) és az MPV (A) illetve LCR% (B) korrelációja a felső frakcióban

Scatter-plot diagram (Spearman korreláció, rho és p érték)

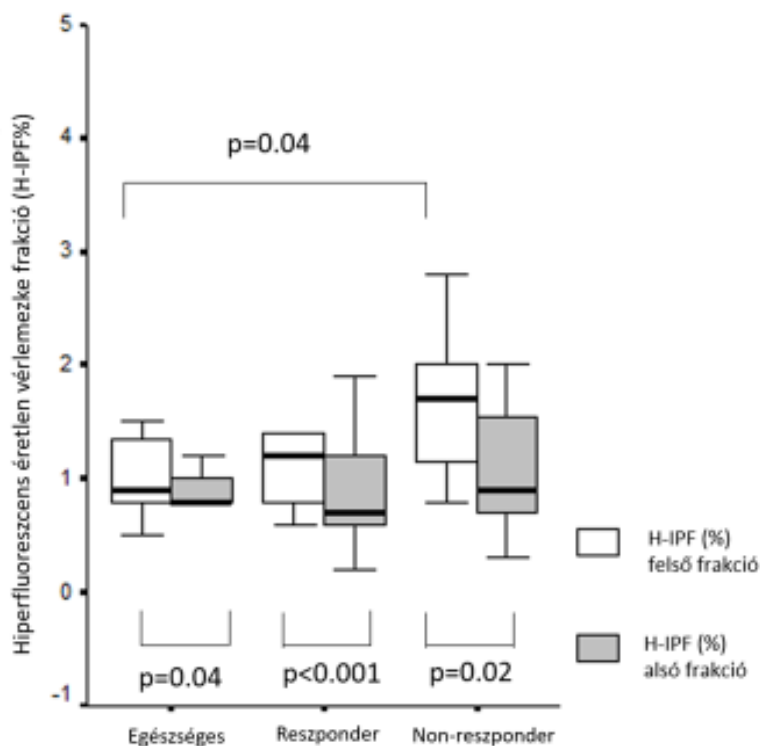
A 75 mg clopidogrelt szedő betegeket a Multiplate[®] analízátor segítségével 'responder' (AUC<53, n=34) és 'non-responder' (53≤AUC, n=12) alcsoportokra osztottuk. Mivel a felső és alsó frakcióban különbség van a vérlemezke szám tekintetében, ezért összehasonlítottuk az egy trombocitára jutó AUC értéket a teljes vérben, valamint a felső és alsó frakcióban az egészséges vs 'responder' vs 'non-responder' betegeknél (23. ábra). A 'non-responder'-ek inkább a normál kontrollhoz hasonlítottak, de a 'responder' vs 'non-responder' különbségek így is megmaradtak (23. ábra). Ezt követően összehasonlítottuk az MPV, IPF, H-IPF (%) és LCR értékeket a teljes vér egyórás szedimentációját követően az egyes vérfrakciókban az egészséges csoport és a clopidogrel szedő 'responder' és 'non-responder' alcsoportokban. A felső frakció H-IPF százalékos aránya a 'non-responder' alcsoportban volt a legmagasabb, de ez csak a kontrol csoporthoz viszonyítva volt szignifikáns (median: 1,7; 1,15-2,0 vs 0,9; 0,8-1,35; p=0,04). A felső és az alsó frakció összehasonlításakor, a H-IPF (%) minden egyes alcsoportban magasabbnak bizonyult a felső frakcióban (egészséges csoport: 0,9; 0,8-1,35 vs 0,8, 0,8-1,0; p=0,04; 'responder': 1,2; 0,8-1,4 vs 0,7; 0,6-1,2; p<0,001; 'non-responder': 1,7; 1,15-2,0 – 0,9; 0,7-1,55; p=0,02) (24 ábra).



23. ábra. Az egy trombocitára jutó AUC érték a teljes vérben (AUC/TCT) vs felső frakcióban (AUC/TCT felső) vs alsó frakcióban (AUC/TCT alsó) egészségesekben és a clopidogrel kezelésre 'responder' és 'non-responder' alcsoportokban

Mann-Whitney teszt, az adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány ábrázoltuk box-plot diagram formájában.

Csak a felső rész AUC bizonyult független rizikófaktornak (OR: 1,07; 95%CI: 1,013-1,128; $p=0,015$), mely 62 feletti cut-off érték esetén, 84%-os szenzitivitással és 71%-os specificitással pontosította a Multiplate által definiált „non-reszponder” status fennállását (Area: 0,863; 95% CI: 0,728-0,998; $p<0,001$). Amennyiben a felső frakcióban mért IPF, H-IPF és LCR értéket is beletettük a modellbe, a szenzitivitás (88%) és specificitás (100%) tovább javult (Area: 0,893; 95%CI: 0,695-1,091; $p=0,001$).



24. ábra. H-IPF (%) az 1-órás szedimentáció után szeparált felső és alsó vérfrakciókban egészségesekben és a clopidogrel kezelésre rezponder és non-reszponder alcsoportokban

Mann-Whitney teszt, az adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány ábráztuk box-plot diagram formájában.

A TAR-értékek nem mutattak szignifikáns különbséget a 'non-responder' vs 'responder' alcsoport összehasonlításakor (71,9; 63,6-74,3 vs. 67,2; 60,3 –71,0; $p=0,20$). A teljes betegcsoportban és a 'responder' alcsoportban, a TAR érték pozitív korrelációt mutatott a teljes vérből meghatározott MPV-értékekkel (Spearman korreláció: $r=0,300$, $p=0,04$; $0,364$, $p=0,04$), azonban hasonló korreláció nem volt kimutatható a 'non-responder' csoportban. Az életkor, a TAR, az ESR és a CRP, valamint a felső frakcióban mért H-IPF, LCR, MPV, AUC értékek bevonásával bináris logisztikus regressziót végeztünk a clopidogrel kezelés ellenére fennálló reziduális vérlemezke aggregáció (HRPR, „non-responder” státusz) független prediktorának feltárása céljából. Ez alapján egyedül a felső rész AUC-értéke tekinthető független rizikófaktornak (OR: 1,06; 95%CI: 1,007-1,120; $p=0,027$). ROC analízis során meghatároztuk a cut-off értéket is: a felső frakcióban mért $AUC>62$ érték, 84%-os szenzitivitással és 71%-os

specificitással megerősítette, illetve pontosította a Multiplate által definiált „non-responder” status fennállását (Area: 0,863; 95% CI: 0,728-0,998; $p < 0,001$).

Ezt követően, a betegeket 30 hónapon keresztül követtük. Ezalatt összesen 11 érrendszeri esemény (stroke/TIA $n=5$, ACS $n=6$) került regisztrálásra az elektronikus beteg ellátási rendszerben (eMedSol). Retrospektíven vizsgálva, a recidív stroke/TIA-t elszenvedő betegekben a felső vérfrakcióban mért AUC szignifikánsan magasabb volt a követés kezdetén, összehasonlítva az eseménytelen betegekkel ($p=0,03$). A retrospektív követéses adatok ismeretében ismét ROC analízist végeztünk a recidív eseményre, mint végpontra vonatkozóan. Azt találtuk, hogy a felső frakcióban mért AUC ≥ 62 képes megjósolni a stroke/TIA eseményt ($p = 0,01$), de nem az összes érrendszeri eseményt. Ezzel szemben egyik érrendszeri esemény (stroke/TIA, ACS) előfordulását sem jósolta meg a Multiplate mérés alapján elfogadott határérték ($53 < \text{AUC}$) szerint definiált HRPR státusz. Ez arra utal, hogy a Multiplate impedancia aggregométer által a teljes vérben mért AUC értéknél pontosabb a saját fejlesztésű, a vér egy órás üleptése után, a felső frakcióban mért AUC ≥ 62 cut-off érték a non-responder betegek szűrésére.

11.6. MEGBESZÉLÉS

A leukocita antiszedimentációs ráta (LAR) analógiájára írtuk le a trombociták mozgását egy órás gravitációs szedimentáció során, clopidogrel kezelés alatt álló post-stroke betegekben, valamint egészséges önkéntesekben. Új fogalomként került bevezetésre a trombocita antiszedimentációs ráta (TAR, angol nyelven platelet antisedimentation rate, PAR rövidítéssel lett publikálva), melynek számítására egy képletet hoztunk létre, mely a vérlemezkék azon hányadát fejezi ki %-ban, melyek a véroszlop középvonalát keresztezik a teljes vér egyórás szedimentációja során [220].

A szeparációt követően az egészséges önkéntesekből származó vérlemezkék a felső frakcióban ADP jelenlétében az egyének 38%-ában fokozott aggregabilitást mutattak. Ez korrelál a korábbi irodalommal, miszerint az éretlen vérlemezkék reaktivitása fokozott az érett alakokhoz képest, mely protrombotikus rizikót képez [221]. Morfológia alapján a felső frakcióban elhelyezkedő vérlemezkék területe, kerülete nagyobb volt és több α -granulomot

tartalmaztak az EM-képeken. Korábbi tanulmányok már felhívták a figyelmet, hogy a nagyobb és hiperdenzitást mutató vérlemezkék fokozottabb aggregabilitást mutatnak, mint a kisebb, kevesebb dense granulumot tartalmazó trombociták [222,223]. Az aszcendáló trombociták összefüggést mutattak a vérlemezkék korával (IPF, H-IPF %), és a trombociták térfogatával, méretével (TEM, AFM). Érdekes azonban az, hogy a TAR-érték nem korrelált az MPV, IPF, H-IPF értékekkel. A szignifikáns negatív korreláció a TAR és az AUC, velocity, aggregáció-értékek között az alsó frakcióban matematikailag nem meglepő a TAR számítás képlete alapján. Ennek klinikai jelentőségét mégis az adja, hogy míg a Multiplate kevés helyen hozzáférhető, addig a TAR egy városi kórház laboratóriumában is könnyedén mérhető és reprodukálható. A TAR az érett/éretlen vérlemezke szubpopulációk arányának indirekt indikátora lehet.

Az egészséges vérlemezkék individuális diverzitására hívja fel a figyelmet az a megfigyelés, hogy a felső frakcióban lévő trombociták *ex vivo* ADP hozzáadását követően hiperaggregabilitást mutattak, míg az ülepedő vérlemezkék teljesen aggregáció gátlásban voltak, minden farmakológiai intervenció nélkül. Feltehetőleg ennek a jelenségnek a hátterében az áll, hogy az ülepedő (öregebb) vérlemezkék már korábban kibocsátották magukból a trombo-inflammatorikus mediátorokat az alfa granulumokból, emiatt elvesztették az ADP-dependens aktivációs képességüket *ex vivo* [224]. Azonban ennek tisztázására további vizsgálatok szükségesek. A felső és alsó vérfrakcióban mérhető endogén ADP koncentráció nem mutatott szignifikáns különbséget (nem ábrázoltuk).

A fixált és dehidrált trombociták AFM képe a trombociták részleges aktivációját mutatta filopódiák és különböző mértékben lamellopódiák megjelenésével. A citoskeletáris rendszer a celluláris elemekkel viszonylag magas, centrális, félgömb alakot képez. Ezzel a vizsgálattal térfogatukban különböznek egymástól a vér alsó és felső frakcióiból izolált trombociták egyórás szedimentáció után. A félgömbszerű rész terjedelme kisebb, amit térfogatméréssel kvantitáltunk, de más morfológiai jellemzőik hasonlóak. Szedimentációval szeparált trombociták AFM-vizsgálatára nem találtunk közleményt. Nem szeparált vérből AFM-mel a trombociták térfogatára vonatkozóan egy közleményt találtunk, melyben hasonló a trombociták térfogata [225].

A *clopidogrel vs egészséges kontrol* tanulmányunkban is megvizsgáltuk a TAR-értéket befolyásoló tényezőket. A clopidogrel szedő betegekben megfigyelt pozitív korreláció a felső

frakció AUC, valamint a felső frakció MPV és az LCR között, a felfelé mozgó, nagyobb méretű vérlemezék trombotikus aktivitására utal, melynek fontos klinikai jelentősége lehet [226,227,228]. Szintén pozitív korrelációt találtunk a szérum CRP koncentráció és a vérlemezkeszám között a felső frakcióban, mely a felfelé mozgó, flotáló vérlemezék gyulladós folyamatokban játszott szerepét jelzi [229]. A CRP és a vérlemezkeaktiváció közötti kapcsolat kutatása perspektivikusnak tűnik. A 'non-responder' alcsoportban megfigyelt pozitív korreláció a CRP és a H-IPF között a felső frakcióban arra utalhat, hogy a szisztémás gyulladós válasz *per se* hatással van a fokozott vérlemezke turnover jelenségére [216,229,230]. Ez támogatja megfigyelésünket, miszerint a legnagyobb H-IPF arány a 'non-responder' csoport felső frakciójában volt megfigyelhető. A szeparációt követően elvégzett trombocitafunkciós vizsgálatban a vérlemezék hiperreaktivitást mutattak a clopidogrelt szedő betegek 59%-ában. Összefoglalva ezeket az eredményeket, úgy véljük, hogy a krónikus gyulladós állapot összefüggésben lehet a megnövekedett vérlemezke turnover-rel, melyre az éretlen vérlemezke frakció méretének növekedése utal [216]. Ezek a hiperreaktív vérlemezék tehetők felelőssé az *ex vivo* fokozott vérlemezke-aktiváció kialakulásáért. Korábban alkalmazott vérlemezke-szeparáción alapuló módszerek szintén különbséget tártak fel a vérlemezék aggregációs tulajdonságaiban, így felvetődik, hogy bizonyos patológiás folyamatokban a nagyobb (éretlenebb) trombociták fontosabbak a kisebb társaiknál [222]. A TAR, így a felfelé szálló vérlemezék aránya, a legnagyobb a clopidogrelt szedő 'non-responder' betegekben volt. A különbség a 'responder' betegekhez képest nem volt szignifikáns, míg az egészséges kontrol csoporthoz viszonyítva igen. A clopidogrelt szedő betegek felső frakciójában észlelt $AUC > 62$, mint vágópont segíthet a reziduális magas trombocitareaktivitással (HRPR) bíró egyének szűrésében, mely a felső frakcióban mért éretlen alakok számának mérésével tovább pontosítható. A 'non-responder' vs 'responder' összehasonlításban az esetszám növelését terveztük, ami folyamatban van. Amennyiben nagyobb esetszámon is igazolni sikerül, hogy a szeparált felső frakcióban mért $AUC > 62$ betegek követése során gyakoribb trombotikus szövődmény észlelhető, az elvezethet a személyre szabott terápia kialakításához (dózisemelés vagy hatóanyagváltás).

A kezelés ellenére fennálló reziduális magas trombocitareaktivitás (HRPR) mechanizmusa egy nagyon összetett folyamat [207,208]. A vérlemezék nem csak a

hemosztázis fenntartásában játszanak szerepet, hanem hozzájárulhatnak az érfalban zajló patológiás folyamatok kialakulásában (ateroszklerózis, trombózis) [231], emellett gyulladási folyamatok szabályozói [221,232], de fontos szerepük van az érvédő folyamatok fenntartásában [233]. Egyik célunk a HRPR mechanizmusának vizsgálata volt. A HRPR szűrésében a TAR és az impedancia aggregometria kombinációjától vártunk előre lépést. Előtanulmányunk ('proof of concept') eredményei alapján további vizsgálatokat tervezünk, részben az esetszám növelése, a betegek követése és a nem vérelemzke eredetű módosító tényezők feltárása révén. További célunk akut ischaemiás stroke-ban vizsgálni a TAR és a származtatott vérelemzke paraméterek kapcsolatát, valamint befolyásukat a klinikai kimenetelre.

Vizsgálatunk során lényeges különbségeket sikerült feltárnunk a trombociták karakterisztikájában (pl. méret, granulomok fajtája, száma, aggregabilitás) az általunk kifejlesztett új szedimentációs technikával. A vizsgálat klinikai jelentőségét az adja, hogy a módszer nagyobb esetszámon való validálása után a kardio- és cerebrovaszkuláris, betegségekben szenvedők a Multiplate-nél szélesebb körű és olcsóbb vizsgálatát biztosíthatja. Reményeink szerint, a vérelemzke antiszedimentáció vizsgálatával személyre szabott és új megközelítéssel tárhatjuk fel a clopidogrel-szedő betegek magas reziduális vérelemzke-reaktivitásának hátterében álló tényezőket [206,234].

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Ezer E, Schrick D, Tőkés-Füzesi M, Szapary L, Bogar L, Molnar T. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel. Clin Hemorheol and Microcirc, 2019; DOI: 10.3233/CH-190580

Schrack D, Tőkés-Füzesi M, Hársfalvi J, Kellermayer M, Ábrahám H, Molnár T, Ezer E. Funkcionális és morfológiai különbséget mutató trombociták clopidogrelt szedő betegekben és egészséges önkéntesekben. Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2020; közlésre elfogadva

12. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Az intravénás dipyridamol az ab ovo fokozott regionális CBV-t csökkenti, paralell L-arginin emelkedés kíséretében.
- 2 (i) az L-arginin útvonal metabolitjai az akut ischaemiás stroke korai fázisában emelkedettek, mely kifejezettebb, mint carotis stenosisban, ami az atherosclerosisnál súlyosabb endotél diszfunkciót tükröz; (ii) a post-stroke 24 óránál mért magasabb L-arginin/ADMA hányados alapján az L-arginin emelkedés adaptív válasz lehet; (iii) az L-arginin és az ADMA ellentétes mozgása az L-arginin protektív szerepét sugallja.
3. (i) a lectin-útvonal ficolin-3-dependens aktivációja is részt vesz a stroke-ot kísérő patológiás folyamatokban; (ii) a követéses mintákban mért alacsony ficolin-3 és magas CRP szintek egymástól független gyulladós útvonalak szerepét sugallják.
4. A stroke korai fázisában megfigyelt korreláció a szövet pusztulás, a neuroinflammáció illetve komplemet felhasználódás között, a post-stroke infekció kockázatát jelzi. Az L-arginin és a lectin útvonal közötti összefüggés, az előbbi immunmoduláns szerepére utalhat.
5. A hsCRP mellett a P-selectin és az IL-6 mint thrombo-inflammatorikus markerek korai változása a keringésben domináns szerepet játszik a kedvezőtlen stroke kimenetel előrejelzésében.
6. Az L-arginin, az ADMA és az SDMA eltérő módon korrelálnak a thrombo-inflammatorikus molekulákkal az ischaemiás stroke hiperakut fázisában. A stroke kimenetel előrejelzésében a két rendszer szereplői additív értékkel bírnak.
7. A stroke hiperakut fázisában mért tPA és MCP-1 korrelál a 24 órás troponin szinttel, mely független prediktora a neurológiai tünetek progressziójának miokardiális lézió hiányában is.
8. A szérum CCK-18 szint összefüggést mutat a kedvezőtlen kimenetellel. Stroke Regiszter adatok alapján a részleges rekanalizáció, az ASPECT<6 és a hiányos kollaterális keringés növeli a tünetes vérzés esélyét, de az egyetlen független prediktor a 24 órás NIHSS≥15,5.
9. (i) Propofollal végzett éber szedáció csökkenti a CEA indukálta perioperatív stresszválaszt. (ii) A magas preoperatív ADMA-koncentráció és az anaerob agyi metabolizmus közötti pozitív

korreláció, az ADMA és a csökkent cerebrális perfúzió kapcsolatára utal. (iii) Az alacsony preoperatív L-arginin szint képes előre jelezni a carotis kirekstsési intoleranciát. (iv) CEA-t kísérő stresszválasz nagysága és a hosszútávú szövődmények (5 éven belüli restenosis kialakulása, koronária események száma) között összefüggést figyeltünk meg.

10. (i) Teljes vér egy órás szedimentációjával kettéválasztott vérfrakciók vérlemezkei számos tulajdonságukban különböznek. (ii) A flotáló és szedimentálódó vérlemezkek morfológiai (TEM és AFM) különbségeket mutatnak. (iii) A felső frakcióban lévő trombociták területe, kerülete és térfogata is nagyobb, valamint több α -granulumot tartalmaznak. (iv) A TAR kifejezi az aktivált vérlemezkek arányát, mely összefügg az életkorral és bizonyos patológiás változásokkal. (vi) A felső frakció Multiplate vizsgálata pontosíthatja a HRPR felismerését.

13. AZ EREDMÉNYEK KLINIKAI HASZNA

1. Az intravénás DP stressz segíthet a koszorúsér betegek stroke kockázatának becslésében, mely különösen hasznos lehet a szívsebészeti műtétek előtt.
2. Az L-arginin útvonal metabolitjai (ADMA, SDMA) korrelálnak az érfali bántalom súlyosságával. Az L-arginin prediktora a post-stroke infekció kialakulásának, ezért segíthet a fogékony betegek antibiotikus kezelésének tervezésében.
3. A komplement rendszer aktiválódása a ficolin mediálta lectin útvonalon keresztül részt vesz az ischaemiás stroke patogenezisében ezért potenciális terápiás targetnek tekinthető.
4. Az L-arginin és a lectin útvonal molekulái közötti összefüggés, az L-arginin immunmoduláns szerepét jelezheti, ezért az L-arginin pótlása, mint potenciális terápiás eszköz merül fel.
5. A P-selectin és az IL-6 kinetikájának követése prognosztikus értékű ischaemiás stroke-ban.
6. Mivel nincs meg az „agy troponinja”, ezért központi idegrendszeri sejsérülés esetén multiplex marker kombinációkra kell támaszkodnunk, ennek az L-arginin is része lehet.
7. A troponin-T alkalmas lehet a korai neurológiai romlás előrejelzésére manifeszt koronária esemény nélkül is.
8. A CCK-18 az ischaemiás stroke kimenetelének prediktora. Romló NIHSS24 órás esetén a beteg fokozott monitorozása szükséges a vérzéses szövődmény kivédésére.
9. A preoperatív ADMA a csökkent cerebrális perfúzió, míg az L-arginin a kirekesztési intolerancia markere carotis endarterektómiában (CEA), ezért preoperatív mérésük segíthet a műtét tervezésében. A betegre adaptált propofollal végzett éber szedáció csökkenti a CEA indukálta stresszválaszt.
10. A TAR fizikai alapja egy ‘size-exclusion’ kromatográfiás jelenség, ahol a vörösvértestek képezik az „oszlopot”, mely szedimentálódik, így a kiszorított részecskék a méretükkel arányos módon csak felfelé mozdulhatnak (antiszedimentáció). A TAR klinikai jelentősége, hogy feltárta, milyen nagy grádiens van a trombociták méretében és granularitásában, mely rávilágít további funkcionális összefüggésekre.

14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik elindítottak a kutatói pályán. Abban a szerencsés helyzetben voltam, hogy még orvostanhallgatóként Nagy Ferenc bevezetett a klinikai neurofiziológia rejtelmeibe. Ezért lettem neurológus szakorvos a Czopf József professzor vezette klinikán. Majd Dóczi Tamás professzor Pécsre érkezésével tanúja lehettem az idegsebészeti intenzív ellátás látványos fejlődésének. Ekkor érett meg bennem az elhatározás, hogy aneszteziológus leszek, és az a megtiszteltetés ért, hogy egy komoly nemzetközi kapcsolatokkal rendelkező intézetbe kerülhettem, ahol Tekeres Miklós professzor egyengette utamat, és adott az egész életre szóló iránymutatást. Ugyanezt a jóindulatot kaptam meg Bogár Lajos professzor részéről is, aki messzemenően támogatott multidiszciplináris érdeklődésem kibontakozásában. Nagyon szerencsésnek érzem magamat, hogy Illés Zsolt professzor témavezetése alatt klinikai területen írhattam PhD Tézisemet. Illés professzor segítségével kapcsolódhattam be nemzetközi kollaborációkba, tanulhattam meg a tudományos publikáció alapjait, de amire a legbüszkébb vagyok, hogy Zsolt az egyik legjobb barátom lett. Önzetlen segítségük formálta jellememet és egyben példát adott, hogy a fiatal kollégák talentumainak kibontakoztatásában én is aktív szerepet vállaljak.

Végül, de nem utolsó sorban, kimondhatatlan hálával tartozom orvos feleségemnek és gyermekeimnek Máténak, Abigélnek és Lídiának.

15. KÖZLEMÉNYEK

15.1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Molnar T, Szabo Z, Schmidt E, Barta E, Zambo K, Illes Z. "Cerebrovascular stressing": drug-induced S100B elevation and transient neurological signs predict ischemic cerebrovascular events.
Clin Chem Lab Med. **2013**;51:e69-72.
Q1, IF:2,955
2. Molnar T, Horvath A, Szabo Z, Vamos Z, Dóczy T, Illes Z. Detection of silent cerebral microcirculatory abnormalities in patients with manifest ischemic coronary disease: a perfusion brain MRI study combined with dipyridamole stress.
Scand Cardiovasc J. **2020**; DOI:10.1080/14017431.2020.1821911
Q2, IF: 1,084
3. Molnar T, Pusch G, Papp V, Feher G, Szapary L, Biri B, Nagy L, Keki S, Illes Z. The L-arginine pathway in acute ischemic stroke and severe carotid stenosis: temporal profiles and association with biomarkers and outcome.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2014**;23:2206-14.
Q2, IF:1,669
4. Füst G, Munthe-Fog L, Illes Z, Széplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Széplaki Z, Prohászka Z, Skjoedt MO, Garred P. Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke.
J Neuroinflammation. **2011**;29;8:185.
Q1, IF: 3,827
5. Molnar T, Csuka D, Pusch G, Nagy L, Garred P, Illes Z. Associations between serum L-arginine and ficolins in the early phase of acute ischemic stroke – a pilot study.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2020**;DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104951
Q2, IF:1,787
6. Pusch G, Debrabant B, Molnar T, Feher G, Papp V, Banati M, Kovacs N, Szapary L, Illes Z. Early Dynamics of P-selectin and Interleukin 6 Predicts Outcomes in Ischemic Stroke.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2015**;24:1938-47.
Q2, IF: 1,598

7. Molnar T, Pusch G, Nagy L, Keki S, Berki T, Illes Z. Correlation of the L-Arginine Pathway with Thrombo-Inflammation May Contribute to the Outcome of Acute Ischemic Stroke.
J Stroke Cerebrovasc Dis. 2016 Jun 1. pii: S1052-3057(16)30089-1.
Q2, IF:1,517
8. Bustamante A, Vilar-Bergua A, Guettier S, Sánchez-Poblet J, García-Berrocso T, Giralt D, Fluri F, Topakian R, Worthmann H, Hug A, Molnar T, Waje-Andreassen U, Katan M, Smith CJ, Montaner J. C-reactive protein in the detection of post-stroke infections: systematic review and individual participant data analysis.
J Neurochem. **2017**;141:305-314.
Q1, IF: 4,083
9. Csecsei P, Pusch G, Ezer E, Berki T, Szapary L, Illes Z, Molnar T. Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2018**;27:951-956.
Q2, IF: 1,646
10. Csecsei P, Nagy L, Keki S, Szapary L, Illes Z, Farkas N, Molnar T. L-Arginine Pathway Metabolites Predict 6 Months Outcome after Acute Ischemic Stroke.
Int J Neurorehabilitation **2018**,5:315. DOI: 10.4172/2376-0281.1000315
11. Csecsei P, Várnai R, Nagy L, Kéki S, Molnár T, Illés Z, Farkas N, Szapáry L. L-arginine pathway metabolites can discriminate paroxysmal from permanent atrial fibrillation in acute ischemic stroke.
Ideggyógyászati szemle **2019**;72(3-4):79-88.
Q4, IF:0,252
12. Molnar T, Borocz K, Berki T, Szapary L, Szolics A, Janszky J, Illes Z, Csecsei P. Subacute Elevation of Plasma Level of Caspase-Cleaved Cytokeratin-18 is Associated with Hemorrhagic Transformation and Functional Outcome in Ischemic Stroke.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2019**;28:719-727.
Q2, IF:1,787

13. Csecsei P, Tarkanyi G, Bosnyak E, Szapary L, Lenzser G, Szolics A, Buki A, Hegyi P, Abada A, Molnar T. Risk analysis of post-procedural intracranial hemorrhage based on STAY ALIVE Acute Stroke Registry

J Stroke Cerebrovasc Dis. **2020**; DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104851

Q2, IF:1,787
14. Szabo P, Lantos J, Nagy L, Keki S, Volgyi E, Menyhei G, Illes Z, Molnar T. l-Arginine Pathway Metabolites Predict Need for Intra-operative Shunt During Carotid Endarterectomy.

Eur J Vasc Endovasc Surg. **2016**;52:721-728.

Q1, IF:4,061
15. Szabó P, Mayer M, Horváth-Szalai Z, Tóth K, Márton S, Menyhei G, Sínay L, Molnár T. Awake Sedation With Propofol Attenuates Intraoperative Stress of Carotid Endarterectomy in Regional Anesthesia.

Ann Vasc Surg. **2020**;63:311-318.

Q2, IF:1,125
16. Szabó P, Menyhei G, Horváth-Szalai Z, Molnár T. A rnútét alatti szedáció hatás a perioperatív stresszre és a hosszútávú kimenetelre regionális anesztéziában végzett carotis endarterectomia során.

Érbetegségek, **2019**;26:5-9.
17. Ezer E, Schrick D, Tőkés-Füzesi M, Szapary L, Bogar L, Molnar T. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel.

Clin Hemorheol and Microcirc, **2019**; DOI: 10.3233/CH-190580

Q2, IF: 1,741
18. Schrick D, Tőkés-Füzesi M, Hársfalvi J, Kellermayer M, Ábrahám H, Molnár T., Ezer E. Funkcionális és morfológiai különbséget mutató trombociták clopidogrelt szedő betegekben és egészséges önkéntesekben.

Aneszteziológia és Intenzív Terápia **2020**; közlésre elfogadva

15.2. AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Molnar T, Zambo K, Scmidt E, Tekeres M. Dipyridamole teszt az agyi keringészavarok korai felismerésében?
Orv Hetil, **2000**;141:2717-2722.
2. Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Pusch G, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. Deficient leukocyte antisedimentation is related to post-stroke infections and outcome.
J Clin Pathol, **2008**;61:1209-1213.
Q1, Impakt factor: 2,342
3. Molnár T. S100 fehérje meghatározás és szerepe az intenzív osztályon.
Focus Medicinae, **2008**;2:25-31.
4. Molnar T, Jakab L, Palinkas L, Molnar FT, Bogar L, Illes Z. Increased levels of baseline biomarkers reflecting platelet and endothelial activation predict early cognitive dysfunction after lung surgery
Eur J Anaesthesiol, **2009**;26:708-10.
Q1, IF:1,435
5. Peterfalvi A, Molnar T, Pusch G, Szereday L, Illes Z. Impaired function of innate T lymphocytes and NK cells in the acute phase of ischemic stroke.
Cerebrovasc Dis, **2009**;28:490-8.
Q1, IF:3,535
6. Molnar T, Papp V, Banati M, Szereday L, Pusch G, Szapary L, Bogar L, Illes Z. Relationship between C-reactive protein and early activation of leukocytes indicated by leukocyte antisedimentation rate (LAR) in patients with acute cerebrovascular events
Clin Hemorheol and Microcirc, **2010**;44:183-92.
Q2, IF:2,838
7. Papp V, Molnár T, Illés Z. Az immunválasz és a neuroimmun moduláció szerepe az akut ischaemiás stroke és a post-stroke infekció patogenezisében.
Ideggyogy Sz. **2010**;30;63(7-8):232-46.
Q4, IF:0,236

8. Erdélyi-Bótor S, Komáromy H, Kamson DO, Kovács N, Perlaki G, Orsi G, Molnár T, Illes Z, Nagy L, Kéki S, Deli G, Bosnyák E, Trauninger A, Pfund Z. Serum L-arginine and dimethylarginine levels in migraine patients with brain white matter lesions.
Cephalalgia. **2017**;37:571-580.
Q1, IF:3,886
9. Tarkanyi G, Csecsei P, Szegedi I, Feher E, Annus A, Molnar T, Szapary L. Detailed severity assessment of Cincinnati Prehospital Stroke Scale to detect large vessel occlusion in acute ischemic stroke.
BMC Emerg Med. **2020**;20(1):64. doi: 10.1186/s12873-020-00360-9.
Q1, IF:1,480
10. Nagy B, Engblom E, Matas M, Maróti P, Kőszegi T, Menyhei G, János Lantos J, Szabó P, Molnár T. Increased serum level of high sensitivity troponin T even prior to surgery can predict adverse events during carotid endarterectomy.
Vascular, 2020 (accepted)
Q2, IF: 1,315

15.3. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. The In TIME-II Investigators: Intravenous NPA for the treatment of infarcting myocardium early. InTIME-II, a double-blind comparison of single-bolus lanoteplase vs accelerated alteplase for the treatment of patients with acute myocardial infarction. Eur Heart J, **2000**;21:2005-2013
Q1, IF:3,840, sokszerzős
2. Molnár T, Kőszegi T, Szakmány T, Bogár L. A szérumban S100 β és procalcitonin szintjének prognosztikai jelentősége újraélesztett betegeknél. [Prognostic role of serum S100 β and procalcitonin in patients after cardio-pulmonary resuscitation]
Újraélesztés, **2004**;1:51-56
3. Molnar T, Bogar L, Koszegi T, Szakmany T. NT- proBNP: a szeptikus komplikáció korai markere újraélesztett betegeknél.
Aneszteziológia és Intenzív Terápia, **2009**;39:164-70.

4. Banati M, Csecsei P, Koszegi E, Nielsen HH, Suto G, Bors L, Trauninger A, Csepany T, Rozsa C, Jakab G, Molnar T, Berthele A, Kalluri SR, Berki T, Illes Z.

Antibody response against gastrointestinal antigens in demyelinating diseases of the central nervous system.

Eur J Neurol. **2013**;20:1492-5.

Q1, IF:3,852

5. Suto B, Szitter I, Bagoly T, Pinter E, Szolcsányi J, Loibl C, Nemeth T, Tanczos K, Molnar T, Leiner T, Varnai B, Bardonicsek Z, Helyes Z. Plasma somatostatin-like immunoreactivity increases in the plasma of septic patients and rats with systemic inflammatory reaction: experimental evidence for its sensory origin and protective role.

Peptides. **2014**;54:49-57.

Q2, IF:2,618

6. Ruzsics I, Nagy L, Keki S, Sarosi V, Illes B, Illes Z, Horvath I, Bogar L, Molnar T. L-arginine pathway in COPD patients with acute exacerbation: a new potential biomarker.

COPD. **2016**;13:139-45

Q1, IF:2,576

7. Kovacs KT, Kalluri SR, Boza-Serrano A, Deierborg T, Csepany T, Simo M, Rokusz L, Miseta A, Alcaraz N, Czirjak L, Berki T, Molnar T, Hemmer B, Illes Z. Change in autoantibody and cytokine responses during the evolution of neuromyelitis optica in patients with systemic lupus erythematosus: A preliminary study.

Mult Scler. **2016**;22:1192-201.

Q1, IF:4,671

8. Elkjaer ML, Molnar T, Illes Z. Teriflunomide for multiple sclerosis in real-world setting.

Acta Neurol Scand. **2017**;136:447-453.

Q1, IF:3,126

9. Ruzsics I, Biri B, Nagy L, Kéki S, Sárosi V, Horváth I, Bogár L, Molnár T.

Metilált arginin származékok szerepe a stabil és az exacerbált COPD betegeknél – követéses vizsgálat

Medicina Thoracalis. **2017**;70:71-80.

10. Bocskai T, Loibl C, Vamos Z, Woth G, Molnar T, Bogar L, Lujber L.
Cost-effectiveness of anesthesia maintained with sevoflurane or propofol with and without additional monitoring: a prospective, randomized controlled trial.
BMC Anesthesiol. **2018**;18:100. doi: 10.1186/s12871-018-0563-z.
Q2, IF:1,619
11. Tóké-s-Füzesi M, Ruzsics I, Rideg O, Kustán P, Kovács GL, Molnár T.
Role of microparticles derived from monocytes, endothelial cells and platelets in the exacerbation of COPD.
Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. **2018**;13:3749-3757.
Q1, IF:3,274
12. Martin NA, Nawrocki A, Molnar V, Elkjaer ML, Thygesen EK, Palkovits M, Acs P, Sejbaek T, Nielsen HH, Hegedus Z, Sellebjerg F, Molnar T, Barbosa EGV, Alcaraz N, Gallyas F Jr, Svenningsen AF, Baumbach J, Lassmann H, Larsen MR, Illes Z. Orthologous proteins of experimental de- and remyelination are differentially regulated in the CSF proteome of multiple sclerosis subtypes.
PLoS One. **2018**;13:e0202530.
Q1, IF:2,776
13. Csiszár B, Németh Á, Márton Z, Riba J, Csécsei P, Molnár T, Deres L, Halmosi R, Tóth K, Kenyeres P. A citokeratin-18 sejthalálmarker vizsgálata sikeres cardiopulmonalis resuscitáció átesett betegpopulációban. Orv Hetil. **2020**;161:26-32
Q3, IF:0,564
14. Loibl C, Rozanovic M, Bogár L, Pankaczi A, Kovács P, Miseta A, Molnár T*, Csontos C. Lack of early platelet and leukocyte activation can indicate complications after major burn injury.
Clin Hemorheol and Microcirc, **2020**; DOI: 10.3233/CH-190779.
Q2, IF: 1,741, * megosztott utolsó szerzőség
15. Kovács P, Mayer M, Tóké-s-Füzesi M, Schrick D, Ezer E, Molnár T. Porckorongsérv műtét alatt alkalmazott diklofenák tartalmú infúziós készítmények összehasonlítása: gyógyszerkínétika és műtéti stressz – előtanulmány.
Aneszteziológia és IntenzívTerápia **2020**; közlésre elfogadva

16. Szabo Z; Bartha E; Nagy L; Molnar T. Increased symmetric dimethylarginine, but not asymmetric dimethylarginine, concentrations are associated with transient myocardial ischemia and predict outcome.

J Int Med Res **2020**;48:1-9.

Q3, IF:1,287

15.4. KÖNYVFEJEZETEK

1. Molnár Tihamér: Központi idegrendszeri betegségek. In: Bogár Lajos (szerk.): Aneszteziológia és intenzív terápia, Medicina Könyvkiadó, Budapest, **2009**, pp: 271-275.
2. Molnár Tihamér: Neuromuscularis betegségek anesztéziai vonatkozásai. In: Bogár Lajos (szerk.): Aneszteziológia és intenzív terápia, Medicina Könyvkiadó, Budapest, **2009**, pp: 275-278.
3. Molnár Tihamér. Intenzív ellátást igénylő neuroinfekciók. In: Neuroanesztézia és neurointenzív ellátás. (Szerkesztette: Fülesdi B- Tassonyi E- Molnár Cs), Budapest, Medicina **2013**, pp: 261-267.
4. Molnár, Tihamér. Neuromuscularis betegségek anesztéziai vonatkozásai. In: Bogár, Lajos (szerk.) Aneszteziológia és intenzív terápia, Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt., **2014**; pp. 296-299.
5. Molnár, Tihamér. Központi idegrendszeri betegségek. In: Bogár, Lajos (szerk.) Aneszteziológia és intenzív terápia, Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt., **2014**; pp. 292-296.
6. Molnár, Tihamér: Súlyos koponya-, és agysérült felnőtt anesztéziája. In: Vámos Zoltán (szerk.) Baleseti agysérültek ellátása. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt., (2021) pp. (elfogadott kézirat)

16. IRODALOMJEGYZÉK

1. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS. Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics*. 2000;56:337-44.
2. Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:89.
3. Vlachopoulos C, Xaplanteris P, Aboyans V, et al. The role of vascular biomarkers for primary and secondary prevention. A position paper from the European Society of Cardiology Working Group on peripheral circulation: Endorsed by the Association for Research into Arterial Structure and Physiology (ARTERY) Society. *Atherosclerosis*. 2015;241:507-32.
4. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis. *Circ Res*. 2018;123:1118-1120.
5. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359:2195–2207.
6. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al.; CANTOS Trial Group. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377:1119–1131.
7. Kimura T, Tse K, Sette A, Ley K. Vaccination to modulate atherosclerosis. *Autoimmunity*. 2015;48:152–160.
8. Horwitz RI, Hayes-Conroy A, Caricchio R, Singer BH. From Evidence Based Medicine to Medicine Based Evidence. *Am J Med*. 2017;130:1246-1250.
9. Beckmann JS, Lew D. Reconciling evidence-based medicine and precision medicine in the era of big data: challenges and opportunities. *Genome Med*. 2016;8:134.

10. Lyngbakken MN, Myhre PL, Røsjø H, Omland T. Novel biomarkers of cardiovascular disease: Applications in clinical practice. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2019;56:33-60.
11. Pandian JD, Gall SL, Kate MP, et al. Prevention of stroke: a global perspective. *Lancet.* 2018;392(10154):1269-1278.
12. Wang Z, Ding Y, Fu P. Prehospital stroke care, a narrative review. *Brain Circ.* 2018;4:160-164.
13. Hill M, Glenn BA, Reese BJ, Morrow B. Recommendations for Endovascular Care of Stroke Patients. *Interv Neurol.* 2018;7:65-90.
14. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global Burden of Stroke. *Circ Res.* 2017;120:439-448.
15. Hetts S, Khangura R. Imaging of Acute Stroke: Current State. *Radiol Clin North Am.* 2019;57:1083-1091.
16. Smith EE, Saposnik G, Biessels GJ, et al; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Functional Genomics and Translational Biology; and Council on Hypertension. Prevention of Stroke in Patients With Silent Cerebrovascular Disease: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2017;48:e44-e71.
17. Meschia JF, Klaas JP, Brown RD Jr, Brott TG. Evaluation and Management of Atherosclerotic Carotid Stenosis. *Mayo Clin Proc.* 2017 Jul;92(7):1144-1157., Aday AW, Beckman JA. Medical Management of Asymptomatic Carotid Artery Stenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2017;59:585-590.
18. Brinjikji W, Huston J 3rd, Rabinstein AA, et al. Contemporary carotid imaging: from degree of stenosis to plaque vulnerability. *J Neurosurg.* 2016;124:27-42.
19. Inatomi Y, Kimura K, Yonehara T, et al. DWI abnormalities and clinical characteristics

in TIA patients. *Neurology*. 2004;62:376-80.

20. Stratmann HG, Tamesis BR, Younis LT, et al. Prognostic value of dipyridamole technetium-99m sestamibi myocardial tomography in patients with stable chest pain who are unable to exercise. *Am J Cardiol*. 1994;73:647-52.

21. Zafrir N, Bassevitch R, Shimoni A, et al. Effect of dipyridamole on myocardial perfusion and function using technetium-99m MIBI. *Int J Cardiol*. 1995;49:25-31.

22. Stratmann HG, Younis LT, Wittry MD, et al. Dipyridamole technetium 99m sestamibi myocardial tomography for preoperative cardiac risk stratification before major or minor nonvascular surgery. *Am Heart J*. 1996;132:536-41.

23. Molnar T, Zambo K, Schmidt E, Tekeres M. Dipyridamole teszt az agyi keringészavarok korai felismerésében? *Orv Hetil*, 2000;141:2717-2722.

24. Molnar T, Szabo Z, Schmidt E, et al. "Cerebrovascular stressing": drug-induced S100B elevation and transient neurological signs predict ischemic cerebrovascular events. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:e69-72.

25. Bynoe MS, Viret C, Yan A, et al. Adenosine receptor signaling: a key to opening the blood-brain door. *Fluids Barriers CNS*. 2015;12:20. doi: 10.1186/s12987-015-0017-7.

26. Bøttcher M, Botker HE, Sonne H, et al. Endothelium-dependent and -independent perfusion reserve and the effect of L-arginine on myocardial perfusion in patients with syndrome X. *Circulation*. 1999;99:1795-801.

27. Molnar T, Horvath A, Szabo Z, et al. Detection of silent cerebral microcirculatory abnormalities in patients with manifest ischemic coronary disease: a perfusion brain MRI study combined with dipyridamole stress. *Scand Cardiovasc J*. 2020; DOI:10.1080/14017431.2020.1821911.

28. Pedrinelli R. Dipyridamole Potentiates the Endothelium-Dependent and -Independent Vasomotion in Isolated Human Small Arteries. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 1996;1:203-210.

29. Chilian WM, Layne SM, Klausner EC, et al. Redistribution of coronary microvascular resistance produced by dipyridamole. *Am J Physiol.* 1989;256(2 Pt 2):H383-90.
30. Cseplo P, Vamos Z, Hamar J, et al. Ca²⁺-binding protein-S100B elicits dose-dependent dilation/relaxation of rat cerebral arteries. *Ideggyogy Sz.* 2013;66:3-4 pp.130-1.
31. Willoughby KA, Kleindienst A, Müller C, et al. S100B protein is released by in vitro trauma and reduces delayed neuronal injury. *J Neurochem.* 2004;91:1284-91.
32. Szabo P, Lantos J, Nagy L, et al. L-Arginine Pathway Metabolites Predict Need for Intra-operative Shunt During Carotid Endarterectomy. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016;52:721-728.
33. Erdélyi-Bótor S, Komáromy H, Kamson DO, et al. Serum L-arginine and dimethylarginine levels in migraine patients with brain white matter lesions. *Cephalalgia.* 2017;37:571-580.
34. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002–12.
35. Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: Regulation and action. *Pharmacol. Res.* 2009;60:448–460.
36. Tain YL, Hsu CN. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). *Toxins (Basel).* 2017;9:92.
37. Wilson AM, Shin DS, Weatherby C, et al. Asymmetric dimethylarginine correlates with measures of disease severity, major adverse cardiovascular events and all-cause mortality in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Med.* 2010;15:267-74.
38. Surdacki A. L-arginine analogs - inactive markers or active agents in atherogenesis? *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6:302e11.

39. Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro L.J. The L-arginine paradox: Importance of the Larginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol. Ther.* 2007;114:295–306.
40. Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, et al. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *Am Soc Nephrol.* 2006;17:1128-34.
41. Lavallée M, Takamura M, Parent R, Thorin E. Crosstalk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone. *Heart Fail Rev.* 2001;6:265-76.
42. Schulze F, Carter AM, Schwedhelm E, et al. Symmetric dimethylarginine predicts all-cause mortality following ischemic stroke. *Atherosclerosis.* 2010;208:518-523.
43. Worthmann H, Chen S, Martens-Lobenhoffer J, et al. High plasma dimethylarginine levels are associated with adverse clinical outcome after stroke. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18:753- 761.
44. Chen S, Martens-Lobenhoffer J, Weissenborn K, et al. Association of dimethylarginines and mediators of inflammation after acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2012;9:251.
45. Willeit P, Freitag DF, Laukkanen JA, et al. Asymmetric dimethylarginine and cardiovascular risk: systematic review and metaanalysis of 22 prospective studies. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e001833.
46. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998;98:1842–7.
47. Toth J, Racz A, Kaminski PM, et al. Asymmetrical dimethylarginine inhibits shear stress-induced nitric oxide release and dilation and elicits superoxide-mediated increase in arteriolar tone. *Hypertension.* 2007;49:563-8.
48. Nonaka S, Tsunoda M, Imai K, et al. High-performance liquid chromatographic assay

of NG-monomethyl-L-arginine, NG,NG-dimethyl-L-arginine, NG,NG'-dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. *J Chromatograph A* 2005;1066:41–45.

49. Amezcua JL, Palmer RM, de Souza BM, Moncada S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol*. 1989;97:1119-1124.

50. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13:97-104.

51. Chen S, Li N, Deb-Chatterji M, et al. Asymmetric dimethylarginine as marker and mediator in ischemic stroke. *Int J Mol Sci*. 2012;13:15983-16004.

52. Pikula A, Boger RH, Beiser AS, et al. Association of plasma ADMA levels with MRI markers of vascular brain injury: Framingham offspring study *Stroke*. 2009;40:2959-2964.

53. Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke Atherosclerosis. 2001;158:425-430.

54. Schepers E, Barreto DV, Liabeuf S, et al. Symmetric dimethylarginine as a proinflammatory agent in chronic kidney disease *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:2374-2383.

55. Kwasny-Krochin B, Gluszko P, Undas A. Plasma asymmetric dimethylarginine in active rheumatoid arthritis: links with oxidative stress and inflammation *Pol Arch Med Wewn*. 2012;122:270-276.

56. Lüneburg N, von Holten RA, Töpper RF, et al. Symmetric dimethylarginine is a marker of detrimental outcome in the acute phase after ischaemic stroke: role of renal function. *Clin Sci (Lond)*. 2012;122:105-111.

57. Gore MO, Lüneburg N, Schwedhelm E, et al. Symmetrical dimethylarginine predicts

mortality in the general population: observations from the Dallas heart study

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33:2682-2688.

58. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. Nat Med. 2011;17:796-808.

59. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, et al. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. J Neuroinflammation. 2019;16:142.

60. Zhu Y, Xian X, Wang Z, et al. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. Biomolecules. 2018;8:80. doi: 10.3390/biom8030080.

61. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. Circ Res. 2019;124:315-327.

62. Liu DD, Chu SF, Chen C, et al. Research progress in stroke-induced immunodepression syndrome (SIDS) and stroke-associated pneumonia (SAP). Neurochem Int. 2018;114:42-54.

63. Felger JC, Abe T, Kaunzner UW, et al. Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin. Brain Behav Immun. 2010;24:724-37.

64. Mocco J, Sughrue ME, Ducruet AF, et al. The complement system: a potential target for stroke therapy. Adv Exp Med Biol 2006;586:189-201.

65. Füst G, Munthe-Fog L, Illes Z, et al. Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. J Neuroinflammation. 2011;29;8:185.

66. Vasthare US, Barone FC, Sarau HM, et al: Complement depletion improves neurological function in cerebral ischemia. Brain Res Bull 1998;45:413-419.

67. Yanamadala V, Friedlander RM: Complement in neuroprotection and neurodegeneration. *Trends Mol Med* 2010;16:69-76.

68. Szeplaki G, Szegedi R, Hirschberg K, et al: Strong complement activation after acute ischemic stroke is associated with unfavorable outcomes. *Atherosclerosis* 2009;204:315-320.

69. Cervera A, Planas AM, Justicia C, et al: Genetically-defined deficiency of mannose-binding lectin is associated with protection after experimental stroke in mice and outcome in human stroke. *PLoS One* 2010;5:e8433.

70. Osthoff M, Katan M, Fluri F, et al: Mannose-binding lectin deficiency is associated with smaller infarction size and favorable outcome in ischemic stroke patients. *PLoS One* 2011;6:e21338.

71. Mocco J, Wilson DA, Komotar RJ, et al: Alterations in plasma complement levels after human ischemic stroke. *Neurosurgery* 2006;59:28-33.

72. Papp V, Molnár T, Illés Z. Az immunválasz és a neuroimmun moduláció szerepe az akut ischaemiás stroke és a post-stroke infekció patogenezisében. *Ideggyogy Sz.* 2010, 30;63(7-8):232-46.

73. Bustamante A, Vilar-Bergua A, Guettier S, et al. C-reactive protein in the detection of post-stroke infections: systematic review and individual participant data analysis. *J Neurochem.* 2017;141:305-314.

74. Molnar T, Pusch G, Papp V, et al. The L-arginine pathway in acute ischemic stroke and severe carotid stenosis: temporal profiles and association with biomarkers and outcome.

J Stroke Cerebrovasc Dis. 2014;23:2206-14.

75. Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Hansen BE, et al: The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the Ficolin-2 serum levels. *Scand J Immunol* 2007; 65:383-392.

76. Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Ma YJ, et al: Characterization of a polymorphism in the coding sequence of FCN3 resulting in a Ficolin-3 (Hakata antigen) deficiency state. *Mol Immunol* 2008;45:2660-2666.
77. Orsini F, Chrysanthou E, Dudler T, et al. Mannan binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) critically contributes to post-ischemic brain injury independent of MASP-1. *J Neuroinflammation*. 2016;13:213. doi: 10.1186/s12974-016-0684-6.
78. Hummelshoj T, Fog LM, Madsen HO, et al. Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen) *Mol Immunol*. 2008;45:1623–1632.
79. Beer C, Blacker D, Bynevelt M, et al. Systemic markers of inflammation are independently associated with S100B concentration: results of an observational study in subjects with acute ischaemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2010;7:71. doi: 10.1186/1742-2094-7-71.
80. Javidi E, Magnus T. Autoimmunity After Ischemic Stroke and Brain Injury. *Front. Immunol.*, 02 April 2019 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00686>
81. Meloni BP, Brookes LM, Clark VW, et al. Poly-arginine and arginine-rich peptides are neuroprotective in stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35:993-1004.
82. Maldonado PD, Cháñez-Cárdenas ME, Fernández-López A. Mechanisms of Cell Damage in Neurological Diseases and Putative Neuroprotective Strategies. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:9784319. doi: 10.1155/2018/9784319. eCollection 2018.
83. Magnus T, Wiendl H, Kleinschnitz C. Immune mechanisms of stroke. *Curr Opin Neurol*. 2012;25:334-40.
84. Kim JY, Kawabori M, Yenari MA. Innate Inflammatory Responses in Stroke: Mechanisms and Potential Therapeutic Targets *Curr Med Chem*. 2014;21:2076-97.

85. Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, et al. Deficient leukocyte antisedimentation is related to post-stroke infections and outcome. *J Clin Pathol*, 2008;61:1209-1213.

86. Peterfalvi A, Molnar T, Pusch G, et al. Impaired function of innate T lymphocytes and NK cells in the acute phase of ischemic stroke.

Cerebrovasc Dis, 2009;28:490-8.

87. Qu Z, Chaikof EL. Interface between hemostasis and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:634-42.

88. Habets KL, Huizinga TW, Toes RE. Platelets and autoimmunity. *Eur J Clin Invest*. 2013;43:746-57.

89. Shi K, Tian DC, Li ZG, et al. Global brain inflammation in stroke. *Lancet Neurol*. 2019;18:1058-1066.

90. Westendorp WF, Nederkoorn PJ, Vermeij JD, et al. Post-stroke infection: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol*. 2011;11:110. doi: 10.1186/1471-2377-11-110.

91. Deleidi M, Gasser T. The role of inflammation in sporadic and familial Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:4259-4273.

92. Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, et al. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 2003;34:1412-1418.

93. Ormstad H, Aass HC, Lund-Sørensen N, et al. Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke lateralization, type, and infarct volume. *J Neurol* 2011;258:677-685.

94. Hasan N, McColgan P, Bentley P, et al. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol* 2012;74:230-240.

95. Thakore AH, Guo CY, Larson MG, et al. Association of multiple inflammatory markers with carotid intimal medial thickness and stenosis (from the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 2007;99:1598-1602.
96. Novo S, Basili S, Tantillo R, et al. Soluble CD40L and cardiovascular risk in asymptomatic low-grade carotid stenosis. *Stroke* 2005;36:673-675.
97. Licata G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, et al. Immuno-inflammatory activation in acute cardioembolic strokes in comparison with other subtypes of ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 2009;101:929-937.
98. Pusch G, Debrabant B, Molnar T, et al. Early Dynamics of P-selectin and Interleukin 6 Predicts Outcomes in Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015 Jun 4. pii: S1052-3057(15)00250-5.
99. Stoll G, Nieswandt B. Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke - implications for treatment. *Nat Rev Neurol*. 2019;15:473-481.
100. Rochette L, Lorin J, Zeller M, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther*. 2013;140:239-57.
101. Chen MF, Xie XM, Yang TL, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reactions by angiotensin II. *J Vasc Res* 2007;44:391-402.
102. Hoffmann G, Czechowski M, Schloesser M, et al. Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. *Crit Care Med* 2002;30:2091-2095.
103. Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, et al. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:350-356.
104. Tarasenko TN, Gomez-Rodriguez J, McGuire PJ. Impaired T cell function in argininosuccinate synthetase deficiency. *J Leukoc Biol* 2015;97:273-278.

105. Huang J, Jochems C, Talaie T, et al. Elevated serum soluble CD40 ligand in cancer patients may play an immunosuppressive role. *Blood* 2012;120:3030-3038.

106. Jenabian MA, Patel M, Kema I, et al. Soluble CD40-ligand (sCD40L, sCD154) plays an immunosuppressive role via regulatory T cell expansion in HIV infection. *Clin Exp Immunol* 2014;178:102-111.

107. Alpert JS, Thygesen K, Antman EM, Bassand JP. Myocardial infarction redefined - A consensus document of The Joint ESC/ACC Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000;21:1502–1513.

108. Liquori ME, Christenson RH, Collinson PO, Defilippi CR. Cardiac biomarkers in heart failure. *Clin Biochem* 2014;47:327–337.

109. Agewall S, Giannitsis E, Jernberg T, Katus H. Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease. *Eur Heart J*. 2011;32:404-11.

110. Banki NM, Kopelnik A, Dae MW, et al. Acute neurocardiogenic injury after subarachnoid hemorrhage. *Circulation* 2005;112:3314–3319.

111. Eggers KM, Lindahl B. Application of cardiac troponin in cardiovascular diseases other than acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2017;63:223–235.

112. Scheitz JF, Endres M, Mochmann HC, et al. Frequency, determinants and outcome of elevated troponin in acute ischemic stroke patients. *Int J Cardiol* 2012;157:239-42.

113. Wrigley P, Khoury J, Eckerle B, et al. Prevalence of positive troponin and echocardiogram findings and association with mortality in acute ischemic stroke. *Stroke* 2017;48:1226–1232.

114. Anders B, Alonso A, Artemis D, et al. What does elevated high-sensitive troponin I in stroke patients mean: concomitant acute myocardial infarction or a marker for high risk patients? *Cerebrovasc Dis* 2013;36:211-7.

115. Murer M, Cuculi F, Toggweiler S, et al. Elevated high-sensitivity troponin does not indicate the presence of coronary artery disease in patients presenting with supraventricular tachycardia. *Cardiol J* 2017;doi: 10.5603/CJ.a2017.0058.

116. Webb IG, Yam ST, Cooke R, et al. Elevated baseline cardiac troponin levels in the elderly - another variable to consider? *Heart Lung Circ* 2015;24:142-8.

117. Mair J. Cardiac troponin I and troponin T: are enzymes still relevant as cardiac markers? *Clin Chim Acta* 1997;257:99-115.

118. Divard G, Abbas R, Chenevier-Gobeaux C, et al. High-sensitivity cardiac troponin T is a biomarker for atherosclerosis in systemic lupus erythematosus patients: a cross sectional controlled study. *Arthritis Res Ther* 2017;19:132.

119. Worthmann H, Dengler R, Schumacher H, et al. Monocyte chemotactic protein-1 as a potential biomarker for early anti-thrombotic therapy after ischemic stroke. *Int J Mol Sci* 2012;13:8670-8.

120. Strecker JK, Minnerup J, Schütte-Nütgen K, et al. Monocyte chemoattractant protein-1-deficiency results in altered blood-brain barrier breakdown after experimental stroke. *Stroke* 2013;44:2536-44.

121. Stamatovic SM, Shakui P, Keep RF, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:593-606.

122. Smith FB, Lee AJ, Fowkes FG, et al. Hemostatic factors as predictors of ischemic heart disease and stroke in the Edinburgh Artery Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3321-3325.

123. Winbeck K, Poppert H, Etgen T, et al. Prognostic relevance of early serial C-reactive protein measurements after first ischemic stroke. *Stroke* 2002;33:2459-2464.

124. Beer C, Blacker D, Hankey GJ, et al. Association of clinical and aetiologic subtype of acute ischaemic stroke with inflammation, oxidative stress and vascular function: a cross-sectional observational study. *Med Sci Monit* 2011;17:CR467-73.

125. Hilal S, Chai YL, van Veluw S, et al. Association Between Subclinical Cardiac Biomarkers and Clinically Manifest Cardiac Diseases With Cortical Cerebral Microinfarcts. *JAMA Neurol* 2017;74:403-410.

126. Wijsman LW, de Craen AJ, Trompet S, et al. High-sensitivity cardiac troponin T is associated with cognitive decline in older adults at high cardiovascular risk. *Eur J Prev Cardiol* 2016;23:1383-92.

127. Molnar T, Borocz K, Berki T, et al. Subacute Elevation of Plasma Level of Caspase-Cleaved Cytokeratin-18 is Associated with Hemorrhagic Transformation and Functional Outcome in Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2019;28:719-727.

128. Csecsei P, Tarkanyi G, Bosnyak E, et al. Risk analysis of post-procedural intracranial hemorrhage based on STAY ALIVE Acute Stroke Registry *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2020; DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104851

129. Liu M, Pan Y, Zhou L, Wang Y. Predictors of post-thrombolysis symptomatic intracranial hemorrhage in Chinese patients with acute ischemic stroke. *PLoS ONE* 2017; 12(9): e0184646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184646>.

130. von Kummer R, Broderick JP, Campbell BCV, et al. The heidelberg bleeding classification. *Stroke* 2015;46:2981-2986.

131. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet* 2016;387:1723-1731.

132. Hao Z, Yang C, Xiang L, et al. Risk factors for intracranial hemorrhage after mechanical thrombectomy: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Neurother* 2019;19:927-935.

133. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40:e331-9.

134. Unal-Cevik I, Kiliç M, Can A, et al. Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. *Stroke*. 2004;35:2189-94.

135. Caulín C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell Biol.* 1997;138:1379–1394.

136. Bantel H, Lügering A, Heidemann J, et al. Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology* 2004;40:1078–1087.

137. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). *Lancet* 1998;352:1245–51.

138. Konstas AA, Minaeian A, Ross IB. Mechanical thrombectomy in wake-up strokes: a case series using alberta stroke program early CT score (ASPECTS) for patient selection. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2017;26:1609-1614.

139. Abilleira S, Cardona P, Ribo M, et al. Outcomes of a con- temporary cohort of 536 consecutive patients with acute ischemic stroke treated with endovascular therapy. *Stroke* 2014;45:1046-1052.

140. Bhatia R, Hill MD, Shobha N, et al. Low rates of acute recanalization with intravenous recombinant tissue plasminogen activator in ischemic stroke: real-world experience and a call for action. *Stroke* 2010;41:2254-2258.

141. Goyal M, Fargen KM, Turk AS, et al. 2C or not 2C: defining an improved revascularization grading scale and the need for standardization of angiography outcomes in stroke trials. *J Neurointerv Surg* 2014;6:83-86.

142. Kaesmacher J, Maegerlein C, Zibold F, et al. Improving mTICI2b reperfusion to mTICI2c/3 reperfusion: a retrospective observational study assessing technical feasibility, safety and clinical efficacy. *Eur Radiol* 2018;28:274-282.

143. Menon BK, d'Esterre CD, Qazi EM, et al. Multiphase CT angiography: a new tool for the imaging triage of patients with acute ischemic stroke. *Radiology* 2015;275:510-520.

144. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, et al. High serum levels of caspase-cleaved cytokeratin-18 are associated with malignant middle cerebral artery infarction patient mortality. *BMC Neurol*. 2018;18:32.

145. Lorente L, Martín MM, González-Rivero AF, et al. Serum levels of caspase-cleaved cytokeratin-18 in patients with severe traumatic brain injury are associated with mortality: a pilot study. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121739.

146. Gu SJ, Lu M, Xuan HF, et al. Predictive value of serum caspase-cleaved cytokeratin-18 concentrations after acute intracerebral hemorrhage. *Clin Chim Acta*. 2016;452:124-8.

147. Yuan ZG, Wang JL, Jin GL, et al. Serum caspase-cleaved cytokeratin-18 levels and outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurol Sci*. 2015;359(1-2):298-304.

148. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, et al. Higher serum caspase-cleaved cytokeratin-18 levels during the first week of sepsis diagnosis in non-survivor patients. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:1621-1629.

149. Lorente L, Martín MM, González-Rivero AF, et al. Serum levels of caspase-cleaved cytokeratin-18 and mortality are associated in severe septic patients: pilot study. *PLoS One*. 2014;9(10):e109618.

150. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, et al. High serum levels of caspase-cleaved cytokeratin-18 are associated with malignant middle cerebral artery infarction patient mortality. *BMC Neurol*. 2018;18:32.

151. Sugiura Y, Yamagami H, Sakai N, et al. Predictors of Symptomatic Intracranial Hemorrhage after Endovascular Therapy in Acute Ischemic Stroke with Large Vessel Occlusion. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017;26:766-771.

152. Kaesmacher J, Kaesmacher M, Maegerlein C, et al. Hemorrhagic Transformations after Thrombectomy: Risk Factors and Clinical Relevance. *Cerebrovasc Dis.* 2017;43:294-304.

153. Jiang S, Fei A, Peng Y, et al. Predictors of Outcome and Hemorrhage in Patients Undergoing Endovascular Therapy with Solitaire Stent for Acute Ischemic Stroke. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144452.

154. Montalvo M, Mistry E, Chang AD, et al. Predicting symptomatic intracranial haemorrhage after mechanical thrombectomy: the TAG score. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90:1370-1374.

155. Nogueira RG, Smith WS; MERCI and Multi MERCI Writing Committee. Safety and efficacy of endovascular thrombectomy in patients with abnormal hemostasis: pooled analysis of the MERCI and multi MERCI trials. *Stroke.* 2009;40:516-22.

156. Mistry EA, Mistry AM, Nakawah MO, et al. Systolic Blood Pressure Within 24 Hours After Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke Correlates With Outcome. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(5):e006167. doi: 10.1161/JAHA.117.006167.

157. Anadani M, Orabi MY, Alawieh A, et al. Blood Pressure and Outcome After Mechanical Thrombectomy With Successful Revascularization. *Stroke.* 2019;50(9):2448-2454.

158. Flaherty ML, Kissela B, Khoury JC, et al. Carotid artery stenosis as a cause of stroke. *Neuroepidemiology.* 2013;40:36–41.

159. Dharmakidari S, Bhattacharya P, Chaturvedi S. Carotid Artery Stenosis: Medical Therapy, Surgery, and Stenting. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2017;17:77.

160. Szabó P, Mayer M, Horváth-Szalai Z, et al. Awake Sedation With Propofol Attenuates Intraoperative Stress of Carotid Endarterectomy in Regional Anesthesia. *Ann Vasc Surg. Ann Vasc Surg.* 2020;63:311-318.

161. Unic-Stojanovic D, Babic S, Neskovic V. General versus regional anesthesia for carotid endarterectomy. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013;27:1379-1383.

162. Sideso E, Walton J, Handa A. General or local anesthesia for carotid endarterectomy - The "Real-World" Experience. *Angiology* 2011;62:609-613.

163. Gabriel RA, Lemay A, Beutler SS et al. Practice variations in anesthesia for carotid endarterectomies and associated outcomes. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2016;30:23-29.

164. Pandit JJ, Satya-Krishna R, Gratton P: Superficial or deep cervical plexus block for carotid endarterectomy: A systematic review of complications. *Br J Anaesth* 2007; 99:159-169.

165. Marrocco-Trischitta MM, Tiezzi A, Svampa MG et al: Perioperative stress response to carotid endarterectomy: The impact of anesthetic modality. *J Vasc Surg* 2004;39:1295-1304.

166. Iwasaki M, Edmondson M, Sakamoto A et al. Anesthesia, surgical stress, and "long-term" outcomes. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 2015;53:99-104.

167. Lewis SC, Warlow CP, Bodenham AR et al. GALA Trial Collaborative Group. General anaesthesia versus local anaesthesia for carotid surgery (GALA): A multicenter, randomized, controlled trial. *Lancet* 2008;372:2132-2142.

168. Bekker AY, Basile J, Gold M, et al. Dexmedetomidine for awake carotid endarterectomy: efficacy, hemodynamic profile, and side effects. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2004;16:126-35.

169. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1023-1030.

170. Surdacki A. L-arginine analogs - inactive markers or active agents in atherogenesis? *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6:302-311.

171. Ruzsics I, Nagy L, Keki S, et al. L-arginine pathway in COPD patients with acute exacerbation: a new potential biomarker. *COPD*. 2016;13:139-45.

172. Nishiyama Y, Ueda M, Katsura K et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a possible risk marker for ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2010;290:12-15.

173. Zinellu A, Sotgia S, Porcu P et al. Carotid restenosis is associated with plasma ADMA concentrations in carotid endarterectomy patients. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:897-901.

174. Stühlinger MC, Stanger O. Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Curr Drug Metab* 2005;6:3-14.

175. Maas R, Xanthakis V, Polak JF et al. Association of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA with carotid artery intimal media thickness in the Framingham Heart Study offspring cohort. *Stroke* 2009;40:2715-2719.

176. Arfvidsson B, Nilsson TK, Norgren L. S100B concentrations increase perioperatively in jugular vein blood despite limited metabolic and inflammatory response to clinically uneventful carotid endarterectomy. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53:111-117.

177. Zanier ER, Rossi S, Conte V et al. The ratio between arterio-venous PCO₂ difference and arterio-jugular oxygen difference as estimator of critical cerebral hypoperfusion. *Minerva Anestesiol* 2006;72:543-549.

178. Mekontso-Dessap A, Castelain V, Anguel N et al. Combination of venoarterial PCO₂ difference with arteriovenous O₂ content difference to detect anaerobic metabolism in patients. *Intensive Care Med* 2002;28:272–277.

179. Barringer C, Williams JM, McCrerrick A, Earnshaw JJ. Regional anaesthesia and propofol sedation for carotid endarterectomy. *ANZ J Surg*. 2005;75:546-9.

180. Zheng X, Huang H, Liu J, et al. Propofol Attenuates Inflammatory Response in LPS-Activated Microglia by Regulating the miR-155/SOCS1 Pathway. *Inflammation*. 2018;41:11-19.

181. Jovic M, Unic-Stojanovic D, Isenovic E, et al. Anesthetics and cerebral protection in patients undergoing carotid endarterectomy. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2015;29:178-84.

182. McCulloch TJ, Thompson CL, Turner MJ. A randomized crossover comparison of the effects of propofol and sevoflurane on cerebral hemodynamics during carotid endarterectomy. *Anesthesiology*. 2007;106:56-64.

183. Arous EJ, Simons JP, Flahive JM, et al. Vascular Quality Initiative. National variation in preoperative imaging, carotid duplex ultrasound criteria, and threshold for surgery for asymptomatic carotid artery stenosis. *J Vasc Surg*. 2015;62:937-44.

184. Bolzani ND, Junqueira Dde O, Ferrari PA, et al. Anesthesia for awake craniotomy: case report. *Braz J Anesthesiol*. 2013;63:500-3.

185. Koköfer A, Nawratil J, Opperer M. Regional anesthesia for carotid surgery : An overview of anatomy, techniques and their clinical relevance. *Anaesthesist*. 2017;66:283-290.

186. Piffaretti G, Tarallo A, Franchin M, et al. Outcome Analysis of Carotid Cross-Clamp Intolerance during Carotid Endarterectomy under Locoregional Anesthesia. *Ann Vasc Surg*. 2017;43:249-257.

187. Andrews PJ, Dearden NM, Miller JD. Jugular bulb cannulation: description of a cannulation technique and validation of a new continuous monitor. *Br J Anaesth.* 1991;67:553-8.

188. Yu W, Gao D, Jin W, et al. Propofol Prevents Oxidative Stress by Decreasing the Ischemic Accumulation of Succinate in Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Neurochem Res.* 2018;43:420-429.

189. Rodríguez-Huertas F, Carrasco MS, García-Baquero A, et al. Changes in Plasma Cortisol and ACTH Caused by Diazepam, Bromazepam, Triazolam, and Alprazolam in Oral Premedication. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 1992;39:145-8.

190. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Chalidis B, Hall GM. Surgical stress response. *Injury.* 2006;37 Suppl 5:S3-9.

191. Anzola GP, Limoni P, Cavrini G. Predictors of carotid clamping intolerance during endarterectomy that would be wise to apply to stenting procedures. *Cerebrovasc Dis* 2008;26:494e501.

192. Micieli G, Bosone D, Zappoli F, et al. Vasomotor response to CO₂ and L-Arginine in patients with severe internal carotid artery stenosis; pre- and post-surgical evaluation with transcranial Doppler. *J Neurol Sci* 1999;163:153e8.

193. Grosse GM, Schwedhelm E, Worthmann H, Choe CU. Arginine Derivatives in Cerebrovascular Diseases: Mechanisms and Clinical Implications. *Int J Mol Sci.* 2020;21:1798. doi: 10.3390/ijms21051798.

194. Gabriel A, Porrino ML, Stephenson LL, Zamboni WA. Effect of L-arginine on leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 2004;113:1698-702.

195. Abdel Baky NA, Zaidi ZF, Fatani AJ, et al. Nitric oxide pros and cons: the role of L-arginine, a nitric oxide precursor, and idebenone, a coenzyme-Q analogue in ameliorating cerebral hypoxia in rat. *Brain Res Bull* 2010;83:49e56.

196. Kielstein JT, Donnerstag F, Gasper S, et al. ADMA increases arterial stiffness and decreases cerebral blood flow in humans. *Stroke* 2006;37:2024-9.

197. Wolf O, Heider P, Heinz M, et al. Frequency, clinical significance and course of cerebral ischemic events after carotid endarterectomy evaluated by serial diffusion weighted imaging. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27:167e71.

198. Pizzarelli F, Maas R, Dattolo P, et al. Asymmetric dimethylarginine predicts survival in the elderly. *Age (Dordr)* 2013;35:2465e75.

199. Bourke VC, Bourke BM, Beiles CB. Operative factors associated with the development of new brain lesions during awake carotid endarterectomy. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2016;51:167e 73.

200. Gibello L, Varetto G, Spalla F, et al. Impact of the Supra-Aortic Trunks and Circle of Willis Patency on the Neurological Compensation during Carotid Endarterectomy. *Ann Vasc Surg*. 2019;60:229-235.

201. Colagrande L, Formica F, Porta F, et al. L-arginine effects on myocardial stress in cardiac surgery: preliminary results. *Ital Heart J*. 2005;6:904-10.

202. Olie RH, vander Meijden PEJ, Ten Cate H. The coagulation system in atherothrombosis: Implications for new therapeutic strategies. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018;2:188-98.

203. Johnston SC, Easton JD, Farrant M, et al; Clinical Research Collaboration, Neurological Emergencies Treatment Trials Network, and the POINT Investigators. Clopidogrel and Aspirin in Acute Ischemic Stroke and High-Risk TIA. *N Engl J Med*. 2018;379:215-225.

204. Fiolaki A, Katsanos AH, Kyritsis AP, et al. High on treatment platelet reactivity to aspirin and clopidogrel in ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2017;376:112-116.

205. Oza R, Rundell K, Garcellano M. Recurrent Ischemic Stroke: Strategies for Prevention. *Am Fam Physician*. 2017;96:436-440.

206. Rosafio F, Lelli N, Mimmi S, et al. Platelet Function Testing in Patients with Acute Ischemic Stroke: An Observational Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26:1864-1873.

207. Thomas MR, Storey RF. Clinical significance of residual platelet reactivity in patients treated with platelet P2Y12 inhibitors. *Vascul Pharmacol*. 2016;84:25-7.

208. Zhao X, Wu H, Xu H, et al. Association Between Residual Platelet Reactivity on Clopidogrel Treatment and Severity of Coronary Atherosclerosis: Intrinsic Hypercoagulability as a Mediator. *Adv Ther*. 2019;36:2296-2309.

209. Vries MJ, Bouman HJ, Olie RH, et al. Determinants of agreement between proposed therapeutic windows of platelet function tests in vulnerable patients. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2017;3:11-17.

210. Tscharre M, Farhan S, Bruno V, et al. Impact of platelet turnover on long-term adverse cardiovascular outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur J Clin Invest*. 2019;49:e13157. doi: 10.1111/eci.13157. Epub 2019 Aug 19.

211. Smith NM, Pathansali R, Bath PM. Altered megakaryocyte-platelet-haemostatic axis in patients with acute stroke. *Platelets*. 2002;13:113-20.

212. Lordkipanidzé M. Platelet turnover in atherothrombotic disease. *Curr Pharm Des*. 2012;18:5328-43.

213. Sporns PB, Hanning U, Schwindt W, et al. Ischemic Stroke: What Does the Histological Composition Tell Us About the Origin of the Thrombus? *Stroke*. 2017;48:2206-2210.

214. Pogorzelska K, Krętowska A, Krawczuk-Rybak M, Sawicka-Żukowska M. Characteristics of platelet indices and their prognostic significance in selected medical condition - a systematic review. *Adv Med Sci.* 2020;65:310-315.
215. Mohamed AB, Elnady HM, Alhewaig HK, et al. The mean platelet volume and plateletcrit as predictors of short-term outcome of acute ischemic stroke. *Egypt J Neurol Psychiatr Neurosurg.* 2019;55(1):4. doi: 10.1186/s41983-018-0035-x. Epub 2019 Jan 8.
216. Ibrahim H, Nadipalli S, DeLao T, et al. Immature platelet fraction (IPF) determined with an automated method predicts clopidogrel hyporesponsiveness. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;33:137-42.
217. Bogar L, Molnar Z, Kenyeres P, Tarsoly P. Sedimentation characteristics of leucocytes can predict bacteraemia in critical care patients. *J Clin Pathol.* 2006;59:523-5.
218. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133-48.
219. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:919–33.
220. Ezer E, Schrick D, Tóké-Füzesi M, et al. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel. *Clin Hemorheol and Microcirc,* 2019; DOI: 10.3233/CH-190580.
221. Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, et al. Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions-new clues for immunopathology? *Crit Care.* 2013;17:236.
222. Thompson CB, Eaton KA, Princiotta SM, et al. Size dependent platelet subpopulations: Relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function. *Br J Haematol.* 1982;50:509-19.

223. Polanowska-Grabowska R, Raha S, Gear ARL. Adhesion efficiency, platelet density and size. *Br J Haematol*. 1992;82:715-720.

224. Joshi S, Banerjee M, Zhang J, et al. Alterations in platelet secretion differentially affect thrombosis and hemostasis. *Blood Adv*. 2018;2:2187-2198.

225. Woolley R, Prendergast U, Jose B, et al. A rapid, topographical platelet activation assay. *Analyst*. 2013;138:4512-8.

226. Peng F, Zheng W, Fengli Li F. et al. Elevated mean platelet volume is associated with poor outcome after mechanical thrombectomy. *J Neurointerv Surg* 2018;10:25–28.

227. Staszewski J, Pogoda A, Data K. et al. The mean platelet volume on admission predicts unfavorable stroke outcomes in patients treated with IV thrombolysis. *Clinical Interventions in Aging* 2019;14:493–503.

228. Noris P, Melazzini F, Balduini C.L. New roles for mean platelet volume measurement in the clinical practice? *Platelets* 2016;27:607-612.

229. Loibl C, Rozanovic M, Bogár L, et al. Lack of early platelet and leukocyte activation can indicate complications after major burn injury. *Clin Hemorheol and Microcirc*, 2020; DOI: 10.3233/CH-190779.

230. Fabbri A, Marcucci R, Gori AM, et al. A time course study of high on treatment platelet reactivity in acute coronary syndrome male patients on dual antiplatelet therapy. *Thromb Res*. 2015;136:613-9.

231. Sharma G, Berger JS. Platelet activity and cardiovascular risk in apparently healthy individuals: a review of the data. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2011;32:201–208.

232. Li JL, Zarbock A, Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. *J Exp Med* 2017;214:2193-2204.

233. Menter DG, Kopetz S, Hawk E, et al. Platelet "first 'responder's" in wound response, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36:199-213.

234. Lüscher TF, Steffel J. Individualized antithrombotic therapy. *Hamostaseologie.* 2016;36:26-32.