

**MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**HEMOSZTÁZIS VIZSGÁLATOK**

**CEREBROVASZKULÁRIS KÓRKÉPEKBEN:**

**ÚJ BIOKÉMIAI ÉS KLINIKAI VONATKOZÁSOK**

**DR. BAGOLY ZSUZSA**



**DEBRECENI EGYETEM**

**ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**

**LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET**

**KLINIKAI LABORATÓRIUMI KUTATÓ TANSZÉK**

Debrecen, 2023

# 1 BEVEZETÉS

## 1.1 A hemosztázis rendszer

A hemosztázis az érrendszeri sérülésekre adott fiziológias védekező mechanizmus. A hemosztázis három pillére: az érfal integritása, a koagulációs rendszer és a vérlemezkék megfelelő száma és működése biztosítja azt, hogy az ér sérülésének helyén a vérzés minimálisra csökkenjen, és a trombocitákból és fibrinből álló hemosztatikus dugó létrejöheszen.

A koaguláció kaszkádra vagy vízesésre emlékeztető aktiválódási rendszerét 1964-ben MacFarlane és munkatársai, valamint Davie és Ratnoff írták le először. Az általuk felvázolt kaszkádszerű aktiválódási folyamatot két szakaszra tagolták: az intrinsic és az extrinsic útra, mely a közös útvonalban folytatódott. Napjainkban a vízesésre emlékeztető kaszkádszerű elméletét felváltotta a hemosztázis sejt alapú modellje, melyet Hoffman és Monroe 2001-ben definiált.

### 1.1.1 A koaguláció iniciációs, amplifikációs és propagációs fázisa

Az iniciációs fázis a szöveti faktort expresszáló sejtekre (endothel, szubendotheliális struktúrák) lokalizálódik. Ebben a szakaszban az aktivált VII-es faktor (FVIIa) - szöveti faktor komplex kis mennyiségben aktiválja a IX-es és X-es faktorokat. Ezt követően az aktivált X-es faktor (FXa) az aktivált V-ös faktorról (FVa) együtt kis mennyiségben protrombináz komplexet képez a szöveti faktort hordozó sejtek felszínén, mely a protrombint trombinná konvertálja. A sérülés helyén a trombociták kollagénhez és egyéb extracelluláris mátrix komponensekhez tapadnak ki. Az adhéziós folyamat tovább aktiválja a vérlemezkéket, és elősegíti a granulomok szekrécióját. Amennyiben az FXa disszociál a szöveti faktort hordozó sejtekről, a folyadékfázisban gyorsan gátlódik az aktivitása a szöveti faktor útvonal inhibitor (TFPI) vagy az antitrombin révén. Az inhibitorok jelenléte tehát hatékonyan lokalizálja az FXa aktivitást azon a felszínen, ahol képződött. Az iniciációs szakaszban ennek megfelelően csak kevés aktivált koagulációs fehérje képződik.

Az amplifikációs fázis során a vérlemezkék és a kofaktorok aktiválódása történik meg a szöveti faktort hordozó sejteken képződő kis mennyiségű trombin által. A koaguláció kezdetén a von Willebrand faktor (VWF) szubendotheliális mátrix fehérjékhez kötődik, a kikötött VWF pedig a keringő trombociták glikoprotein Ib $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ) receptorához kötődve iniciálja a trombocita adhézió folyamatát, mely során aktiválódnak a trombociták. A koaguláció során keletkező trombin a trombociták GPIIb/IX/V komplexe és proteáz aktivált receptorai (PAR) révén aktiválja a trombocitákat. A  $\gamma$ -karboxi-glutaminsavban (Gla) gazdag domént tartalmazó alvadási faktorok (pl. FII, FVII, FIX, FX) elsősorban a foszfatidil-szerin-klaszterekhez kötődnek, a foszfatidil-szerin jelenlétében a koagulációs reakciók több ezerszeresére gyorsulnak. Az iniciációs fázisban képződő trombin egy másik funkciója az V-ös és VIII-as kofaktorok és a XI-es faktor aktiválása, immár nagy mennyiségben a trombociták felszínén. Az aktivált trombociták a tromboxán A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) és az adenzin-5'-difoszfát (ADP) szekréciója révén további trombociták aktivációját és aggregációját is előidézik. A trombocita aggregáció központi receptora a fibrinogén receptor, mely a GPIIb ( $\alpha_{IIb}$  integrin) és a GPIIIa ( $\beta_3$  integrin) által alkotott heterotetramer (GPIIb/IIIa). Míg a TXA<sub>2</sub> erőteljes vazokonstriktor és potens vérlemezke aktivátor, az ADP önmagában csak gyenge, reverzibilis trombocita aggregációt képes létrehozni, de mivel a trombociták denz granulumaiból felszabadulva nagy mennyiségben van jelen a sérülés helyén, ezért a kialakuló trombus stabilizálásában fontos szerepet játszik. Eddig 8 különböző ADP receptort írtak le, a trombociták felszínén viszont mindössze kettő található meg: a P2Y<sub>1</sub> és a P2Y<sub>12</sub> receptor. Mindkét receptor által közvetített

mechanizmus fontos szerepet játszik a trombocita aktiváció és aggregáció folyamatában. A P2Y1 receptor Gq fehérjéhez kötött útvonalon keresztül intracelluláris kalcium mobilizációt hoz létre, amely a trombociták alakváltozását és az aggregáció iniciációját hozza létre. A P2Y12 receptor hatása gátló Gi fehérjén keresztül érvényesül: csökkenti a ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) szintet, mely hozzájárul a denz granulumok szekréciójához és a granulumok ADP tartalma révén fontos pozitív visszacsatolásként az aggregáció stabilizálásához vezet a GPIIb/IIIa receptor komplexek trombocita felszínre kerülése és aktivációja révén. A két receptor közül tehát a P2Y12 receptor felelős a tartós, irreverzibilis trombocita aggregáció kialakításáért. Mind a TXA2 képződését gátló aszpirin, mind az ADP hatását gátló specifikus P2Y12 ADP receptor inhibitorok képesek gátolni a trombociták aggregációját, ezért ideális farmakológiai célpontnak bizonyultak az artériás trombusok elleni védelemben. Az amplifikációs fázis végére már jelentős mértékű trombin generáció jön létre. A propagációs fázis az aktivált vérlemezkék felszínén történik, kialakulásában számos koagulációs fehérje játszik szerepet. Ebben a fázisban a prokoaguláns komplexek aktivitása robbanásszerű trombinképződést eredményez, mely fibrinogénből fibrint hoz létre a fibrinopeptidek kihalásának révén. A képződő trombin hatására a XIII-as faktor (FXIII) is aktiválódik a véralvadás utolsó lépésében. Az aktivált FXIII (FXIIIa) a fibrin láncokat keresztköti, továbbá a fibrinolízis egyik legfőbb inhibitorát, az  $\alpha$ 2-plazmin inhibitorát ( $\alpha$ 2-PI, antiplazmin) a kialakult alvadékhoz köti, így stabilizálva az alvadékot.

### 1.1.2 A koaguláció regulációja

A koaguláció regulációjáért több fehérje összetett hatása felelős, melyek gátló hatásukat a koaguláció különböző szakaszaiban fejtik ki. A koaguláció regulációjáért felelős az inaktivátor rendszerként ismert (aktivált) protein C, protein S, a trombocitákban, endothelsejeken és szolubilis formában előforduló TFPI, valamint az antitrombin, mely utóbbi a FIXa és trombin gátlásával (kisebb mértékben a FIXa gátlása révén) a koaguláció egyik legfontosabb inhibitora. A trombin-antitrombin 1:1 arányú komplexe (TAT-komplex) az *in vivo* trombin generáció érzékeny markere. Megjegyzendő, hogy a teljes képződő trombin mennyiség kevesebb, mint 5%-a elegendő a fibrinogén fibrinné történő átalakításához, vagyis az alvadék létrejöttéhez. A rutin hemosztázis diagnosztikában használt alvadási szűrőtesztek, mint a protrombin idő (PI), az aktivált parciális tromboplastin idő (APTI) vagy trombin idő (TI) esetében a mérés végpontja az alvadék képződés kezdete, melyet kevesebb, mint a teljes képződő trombin mennyiség 5%-a befolyásol. A trombin generációs teszt a hagyományos hemosztázis szűrőtesztekkel ellentétben nemcsak a koaguláció kezdeti, iniciációs fázisát, hanem az amplifikációs és a propagációs fázisokat is méri, és a teszt magában foglalja az alvadás természetes inhibitorának (antitrombin), ill. inaktivátorainak (protein C, ill. kofaktorként a protein S) hatásait is. A koaguláció regulációjáért felel továbbá az endothelsejeken jelen lévő transzmembrán trombomodulin, ill. a transzmembrán glikoprotein EPCR (endothelsejt protein C receptor). Az inaktivátor rendszer a prokoaguláns rendszerrel együtt trombin hatására aktiválódik. Trombomodulin (TM) hiányában a folyamat csupán a trombin generációig jut el, viszont TM jelenlétében a folyamat tovább halad, a trombin-trombomodulin komplex hatására a plazmában keringő protein C aktív enzimmé (APC) alakul. Az APC kofaktora, a protein S jelenlétében fejt ki inaktivátor hatását a FVa és a FVIIIa proteolitikus inaktivációja révén.

Az V-ös faktor Leiden mutációja (FV<sub>Leiden</sub>) egy relatíve gyakori mutáció az európai populációban, mely heterozigóták esetén 5-8-szoros, homozigóták esetén 50-80-szoros rizikót jelent vénás tromboembóliás események kialakulására nézve. A mutáció a FV nehéz láncának az 506-os pozíciójában bekövetkező arginin/glutamin cserét (p.Arg506Gln) eredményezi, melynek következtében az APC elsődleges hasítási helye elvész. FV<sub>Leiden</sub> mutáció esetén a

FVa prokoaguláns aktivitásának down-regulációja csökkent, így a trombin generáció APC okozta csökkenése elmarad. A FV<sub>Leiden</sub> trombin generáción túlmutató közvetett hatásai kevésbé ismertek.

### **1.1.3 Az alvadék szerkezetét, stabilitását befolyásoló sejtes elemek. A neutrofil extracelluláris csapdák**

A neutrofil extracelluláris csapdák (NET) fogalmát 2004-ben Brinkmann és kutatócsoportja írta le először, mint gyulladásos stimulus hatására az aktivált neutrofilekből felszabaduló, főként DNS-ből, hisztonból és granulás fehérjékből álló extracelluláris hálózatot. A NET-ek az azurofil (primer) granulomok egyes fehérjéit is tartalmazzák, úgymint a neutrofil elasztázt, katepszin G-t és a mieloperoxidázt, valamint egyes specifikus (szekunder) és a terciér granulomokból származó fehérjéket is, pl. a laktoferrint és a zselatinázt. Brinkmann munkacsoportjának korai megfigyelései szerint a NET-ek kialakulása az emberi szervezetbe bekerült Gram-pozitív és a Gram-negatív baktériumok elleni immunválasz része, vagyis a NET képződés a korai neutrofil sejthalál egy újonnan leírt formája.

A NET-ek azon túl, hogy védelmet nyújtanak különböző kórokozókval szemben, egyes kórképek patomechanizmusához is hozzájárulhatnak. Legújabb adatok szerint a kontrolálatlan NET képződés pretrombotikus állapotot eredményez. A NET-ek több ponton befolyásolják a hemosztázis egyensúlyát: hozzákapcsolódnak a vérlemezkékhez, elősegítve azok aktiválódását és aggregációját. A NET-ek elősegítik a trombin képződését azáltal, hogy megfelelő vázat biztosítanak a vörösvértestek, véralvadási faktorok, prokoaguláns molekulák (pl. a VWF, fibrinogén, FXII, szöveti faktor) kötődésének, továbbá gátolják a TFPI-t. Legújabb adatok szerint a NET-ek DNS-hiszton komplexből álló gerince stabilizálja a fibrint, és az így kialakult alvadék vékonyabb fibrinrostokból álló, sűrűbb hálózat lesz, mely fokozottan ellenáll a fibrinolízisnek. Akut ischaemiás stroke-ot (AIS) szenvedett betegek katéteres eljárással eltávolított trombusaiban először 2017-ben mutatták ki a NET-ek jelenlétét, melyet több hasonló tanulmány követett. Újabb vizsgálatok kimutatták a keringő NET-ek mennyiségének összefüggését az AIS súlyosságával, a betegek kedvezőtlen rekanalizációs válaszával ill. kimenetelével. Legújabb közlemények a NET-eket az AIS trombolízis terápia sikertelenségének egyik fő okaként tartják számon, és számos kezdeményezés indult olyan gyógyszerek kifejlesztésére, melyek a NET-ek degradációja vagy a NETózis gátlása révén a jövőben a stroke kimenetelének javítását szolgálják.

### **1.1.4 A fibrinolízis összefoglalása**

A fibrinalvadék lokalizált, megfelelő időben történő lebontásáért a fibrinolitikus rendszer felelős, melynek központi proteáza a plazmin. A plazmin plazminogén aktivátorok hatására keletkezik plazminogénből, mely egyláncú glikoprotein, szintézisének legfőbb helye a máj. A fibrinolízis első lépéseként a plazminogén a fibrin felszínén található lizincsoportokhoz kötődik és aktiválódik. A keletkező szerin proteáz plazmin a fibrinalvadéket részlegesen degradálódott fibrinné hasítja, különböző, egyre kisebb méretű fibrin degradációs termékeket hozva létre. A D-dimer két, a  $\gamma$ -láncuknál kovalens kötéssel kapcsolódó fibrin monomer D-régiójából áll.

A plazminogén aktivátorai közé tartozik a szöveti típusú plazminogén aktivátor (t-PA) és az urokináz típusú plazminogén aktivátor (u-PA). A fibrin nemcsak szubsztrátja, hanem regulátora is a fibrinolízisnek: mind a plazminogént, mind a t-PA-t köti a felszínéhez, ezáltal lokalizálja, és fokozza a plazmin képződését. A plazminogén és a t-PA specifikus lizin kötőhelyei a fibrinogén-fibrin átalakulás után keletkeznek konformációváltozás hatására.

A t-PA egy szerin proteáz típusú glikoprotein, kisebb erek endothelsejtjei szintetizálják és expresszálják aktivációs ingerek hatására. A t-PA révén kialakuló plazminogén aktiváció leginkább az érpályán belüli fibrin degradációt segíti: megakadályozza az intravaszkuláris fibrin szükségtelen felhalmozódását és lehetővé teszi a már kialakult alvadékok eltávolítását.

A t-PA rekombináns formáját a trombus feloldására (trombolízis) világszerte az 1990-es évek óta alkalmazzák az AIS terápiájában, mely valódi áttörést jelentett a stroke kezelésében. Magas plazminkoncentrációk (pl. trombolízis) esetén nemcsak fibrinhasítás, hanem fibrinogénhasítás is történik, fibrinogén degradációs termékeket eredményezve. A fibrinolízis hatékonyságát számos tényező befolyásolja, többek között a fibrin szerkezete. A vékony fibrinszálakból álló, ezért kompaktabb fibrin alvadék lassabban degradálódik, mint a vastagabb fibrinszálakból álló, lazább alvadék.

### 1.1.5 A fibrinolízis inhibitorai

A fibrinolitikus rendszer proteázainak működése számos endogén inhibitor által biztosított szigorú szabályozás alatt áll. A plazminogén aktivátorokat és magát a plazmint a keringésben mindig túlsúlyban lévő szerin proteáz inhibitorok, másnéven szerpinek semlegesítik. A plazminogén aktivátorok legfőbb fiziológiás inhibitora a t-PA-t és u-PA-t egyaránt hatékonyan gátló plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1). Az elsőként placentából kinyert PAI-2 gyengébb inhibitor tulajdonságokkal rendelkezik, elsősorban az u-PA gátlásában vesz részt hatékonyan.

Az aktivált plazmin legfőbb természetes inhibitora az  $\alpha_2$ -PI. Az  $\alpha_2$ -PI gyorsan és irreverzibilisen kötődik a szabad plazminhoz 1:1 arányú stabil, inaktív plazmin- $\alpha_2$ -PI komplexeket (PAP-komplexet) képezve. A fibrinhez kötött plazmin védett az  $\alpha_2$ -PI gátló hatásával szemben, biztosítva a fibrin proteolitikus lebontását. A fibrinolízis nem szerpín-függő szabályozása többek között a trombin aktivált fibrinolízis inhibitor (TAFI) révén valósul meg. A proenzimet a trombin, a trombin-trombomodulin komplex vagy a plazmin alakítja át funkcionálisan aktív formává. A TAFI aktív formája (TAFIa) egy karboxipeptidáz, amely eltávolítja a fibrin C-terminális lizin- és arginin-oldalláncait, ezáltal csökkenti a rendelkezésre álló plazminogén kötőhelyek számát, lelassítva a plazmin képződését és ezáltal stabilizálva az alvadékokat.

#### 1.1.5.1 A XIII-as faktor és főbb polimorfizmusai

A FXIII a koagulációs kaskád utolsó alvadási faktora, egyben a fibrinolízis egyik legfőbb inhibitora. Fiziológiás funkciója a fibrin keresztkötésekkel történő stabilizálása és ellenállóvá tétele a fibrinolízis gyors hatásával szemben. A plazmában található FXIII heterotetramert (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) két potenciálisan aktív A alegység (FXIII-A) és két hordozó/gátló B alegység (FXIII-B) alkotja.

Az FXIIIa antifibrinolitikus hatása 3 fő mechanizmus révén valósul meg. Egyrészt az FXIIIa kovalens keresztkötések révén beépíti az  $\alpha_2$ -PI-t és más plazmakomponenseket a képződő fibrin alvadékba. A második mechanizmus a fibrin  $\alpha$ - és  $\gamma$ -láncainak keresztkötése, mely mechanikusan stabilizálja a fibrin alvadékokat. Harmadrészt, a fibrin  $\alpha$ -láncok C-terminális lizinjeinek keresztkötése következtében csökken a plazminogén és t-PA számára elérhető kötőhelyek száma a fibrinen. Öt gyakori kódoló polimorfizmust azonosítottak az A alegységben (p.Val34Leu, p.Tyr204Phe, p.Pro564Leu, p.Val650Ile, p.Glu651Gln) és kettőt a B alegységben (p.His95Arg és c.1952+144 C>G a K intronban). A FXIII leginkább tanulmányozott polimorfizmusa a FXIII-A p.Val34Leu. A Leu34 variáns esetében a trombin hasítás 2,5-szer gyorsabban megy végbe, így a Leu34 allél jelenléte fokozott FXIII aktivációval jár együtt. A polimorfizmus hatással van a keresztkötött fibrinháló szerkezetére is, melyet a fibrinogén

koncentrációja is befolyásol. A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus és a vénás ill. artériás trombózisok kialakulásának rizikójával az elmúlt két évtizedben számos tanulmány foglalkozott, melyek eredményei gyakran voltak ellentmondásosak. E vizsgálatok metaanalízise arra utal, hogy a Leu34 allél jelenléte kismértékű, de szignifikáns védelmet nyújt a koszorúér-betegség és a vénás tromboembóliák kialakulásával szemben, ugyanakkor védőhatását ischaemiás stroke kialakulására nézve még egyértelműen nem igazolták.

#### *1.1.5.2 Az $\alpha$ 2-plazmin inhibitor és főbb polimorfizmusai*

Az  $\alpha$ 2-PI egyedi szerkezeti elemeket mutató szerpin, mely a keringésbe kerülve mind az aminos terminális, mind pedig a karboxi-terminális részén proteolitikus módosításokon esik át. Ennek következtében négy heterogén, eltérő aktivitású  $\alpha$ 2-PI izoforma jön létre. Az  $\alpha$ 2-PI fibrinhez történő keresztkötését az FXIIIa katalizálja, a keresztkötött inhibitor ellenállóbbá teszi a fibrin a plazmin révén létrejött degradációval szemben. Mivel a Met- $\alpha$ 2-PI keresztkötése lassabban megy végbe, ezért ezen izoforma emelkedett szintje fokozott mértékű fibrinolízissel társul. Az  $\alpha$ 2-PI heterogenitását a felsorolt módosításokon kívül az azt kódoló SERPINF2 gén genetikai variációi is befolyásolják. A p.Arg6Trp egy funkcionális polimorfizmus, ami befolyásolja a Met- $\alpha$ 2-PI átalakulását az Asn- $\alpha$ 2-PI formává, ezáltal befolyásolja az  $\alpha$ 2-PI fibrinbe való beépülésének sebességét. Kimutatták, hogy az N-terminális hasítást végző APCE körülbelül nyolcszor gyorsabban hasítja a Met- $\alpha$ 2-PI Arg6 formát a Met- $\alpha$ 2-PI Trp6 formához képest, és az argininre nézve homozigóta egyénekben kifejezettebb az N-terminális proteolízis mértéke. Az  $\alpha$ 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus patofiziológiai ill. klinikai jelentősége jelenleg még kutatások tárgyát képezi.

#### *1.1.5.3 A plazminogén aktivátor inhibitor-1 és főbb polimorfizmusai*

A PAI-1 a t-PA és u-PA legfontosabb inhibitora, elsőrendű feladata a t-PA gátlása, ezen keresztül hatékonyan gátolja a plazminogén plazmin átalakulást. A PAI-1 keringésben detektálható szintjét számos tényező szabályozza, pl. gyulladásos folyamatok, elhízás, cirkadián ritmus és genetikai tényezők. Az emelkedett PAI-1 szintet több tanulmányban kardio- és cerebrovaszkuláris kórképek rizikótényezőjeként azonosították.

A PAI-1 fehérjét a SERPINE1 gén kódolja. A gén inzerációs/delációs eltérései közül leginkább a 4G/5G polimorfizmus tanulmányozott, mely a promóter régió -675. helyén található. Korábbi tanulmányok összefüggésbe hozták a 4G allél hatását fokozott trombozishajlammal, emelkedett szívinfarktust követő halálózással, ill. szepszist követő halálózással is, de az irodalomban fellelhető eredmények sokszor ellentmondásosak.

### **1.1.6 A fibrinolízis laboratóriumi vizsgálata**

A fibrinolízis vizsgálatára alkalmazhatunk egyedi vagy individuális tesztek (pl. a plazminogén, plazminogén aktivátorok, plazminogén aktivátor inhibitorok, és plazmin inhibitorok szintjének meghatározása, ill. a fibrinolízis aktivációját jelző egyes markerek szintjének meghatározása), valamint globális tesztek. A fibrinolízis globális tesztjeinek vizsgálata történhet teljes vérből, pl. viszkoelasztikus módszerek révén. A fibrinolízis globális tesztjeinek ismertek plazma-alapú tesztjei is, ilyen például a plazma alvadék lízis idő, a fibrin lemez módszer, vagy a szimultán trombin és plazmin generációs teszt. A fibrinolízis globális vizsgálatára jelenleg nincs gold standard módszer, minden tesztnek megvan az előnye és a hátránya. Egyes tesztek érzékenyebbek a hipo- vagy éppen a hiperfibrinolízis kimutatására, így fontos a klinikai/kísérleti szituációnak megfelelően megválasztani az alkalmazott teszt típusát.

## 1.2 A stroke

### 1.2.1 A stroke epidemiológiája, definíciója, típusai

Világszerte a stroke a halálozás második leggyakoribb és a rokkantság leggyakoribb oka. A stroke a WHO definíciója szerint „az agyműködés globális vagy fokális zavarával jellemezhető, gyorsan kialakuló tünetegyüttes, mely több mint 24 órán keresztül fennáll, és amelynek bizonyíthatóan nincs más oka, mint az agy érrendszerében kialakult változás”. A betegek 80%-a esetén a stroke ischaemiás. A stroke esetek fennmaradó 20%-a vérzéses stroke: a vérzéses csoporton belül további két alcsoportot különítünk el: nem traumás állományvérzések (15%) ill. subarachnoideális vérzések (5%). Bár a vérzéses stroke-ok az összes stroke esetek kis hányadát teszik ki, halálozási arányuk jóval magasabb. Az ischaemiás stroke csoporton belül az etiológiát figyelembe véve számos altípust különítünk el. Vizsgálataink során a klasszikus TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) kritérium rendszert használtuk az öt altípus elkülönítésére: nagyér ateroszklerózis, kisérbetegség (lacunaris stroke), kardiogén stroke, egyéb eredetű stroke, ismeretlen eredetű (kriptogén stroke).

### 1.2.2 Rizikótényezők

A stroke alapvetően időskori betegség, az előfordulási gyakorisága az életkor előrehaladtával folyamatosan nő, megduplázódik minden évtized után 55 éves életkor felett. A stroke rizikó nemi különbségeket is mutat. Idősebb korban a relatív kockázat valamivel magasabb a férfiak körében. Ennek ellenére a betegség gyakoribb nőknél, mivel hosszabb a várható élettartamuk, így a prevalencia 80-85 év felett a nők felé tolódik el.

Az ischaemiás stroke-nak számos befolyásolható és nem befolyásolható rizikófaktora van. A befolyásolható rizikófaktorok közül a leggyakoribb a hipertónia, a cukorbetegség, a dyslipidemia, a pitvarfibrilláció, billentyűhibák. Az életmód is hozzájárul az ischaemiás stroke kialakulásához: a fizikai inaktivitás, elhízás és a következményes metabolikus szindróma fontos kockázati tényezők. A dohányzás a stroke kialakulásának egyik jelentős rizikófaktora, a kockázat arányos az elszívott cigaretta mennyiségével.

Az állományvérzés (intracerebrális hemorrhagia: ICH) kialakulásának leggyakoribb okai: a magasvérnyomás (30-60%), az agyi amyloid angiopathia ill. arteritis (10-30%), antikoaguláció ill. véralvadási zavar (1-20%), érabnormalitások, pl. aneurysma, angioma, arterio-venosus malformatio (3-8%), az esetek mintegy 5-20%-ában pedig a kiváltó ok meghatározhatatlan. Kockázati tényezőként tartjuk számon továbbá a diabetes mellitust, dohányzást, az előrehaladott életkort (>50 év), alkoholfogyasztást ill. egyes drogok használatát is. Agyvérzés kialakulhat meglévő cerebrális lézió talaján is, pl. központi idegrendszeri tumor, granuloma, gyulladás, encephalitis, abscessus esetén is.

### 1.2.3 A stroke diagnosztikája

A stroke leggyakrabban előforduló, tipikus tünetei közé tartozik a hirtelen kialakuló féloldali zsibbadás, hemiparesis (ritkábban mono, tri- vagy tetraparesis), az arc féloldali elferdülése, esetenként beszédzavar, látótérzavar, kettőslátás, szédülés. A diagnosztikus eljárások célja, hogy azonosítsa a stroke altípusát, megállapítsa lokalizációját, kizárja az egyéb stroke-ot utánzó betegségeket. A stroke diagnózisa anamnesztikus adatok, klinikai és agyi képalkotó vizsgálati eredményeken alapul, a laboratóriumi diagnosztika jelentősége az akut stroke diagnosztikájában csekély.

A részletes neurológiai vizsgálat során a stroke súlyosságának megállapítására az NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) rendszer használatos. Más pontozóskálákhoz hasonlóan az NIHSS pontozás is korlátozott értékű, ha a betegnek már a stroke előtt is voltak neurológiai tünetei. A fizikális vizsgálat és pontos anamnézis felvételének fontos célja a differenciáldiagnosztika egyéb, stroke-ot utánzó betegségektől ill. állapotoktól, és annak felmérése, hogy ischaemiás stroke esetén alkalmas-e a beteg valamilyen dezobliterációs kezelésre.

Az akut stroke gyanús beteg ellátásának alapvető lépése az agyi képalkotó vizsgálat elvégzése, mely lehet koponya CT vagy koponya MR vizsgálat, natív és kontrasztanyag adásával készült vizsgálat, CT angiográfia (CTA). A képalkotás célja az ischaemiás ill. vérzéses stroke elkülönítése és a kialakult károsodás kiterjedésének felmérése. Az arteria cerebri media (ACM) területi ischaemiás stroke kiterjedésének meghatározására rutinszerűen az Alberta Stroke Program Early CT Score (ASPECTS) használatos.

A diagnosztika fontos része az angiográfias vizsgálatok elvégzése, mellyel ischaemiás stroke esetén igazolható a nagyérelzáródás (LVO) fennállása. Az ereket elzáró alvadék méretének becslésére az anterior keringés területén az úgynevezett „clot burden score” (CBS) használható fel. Az akut dezobliterációs kezelés megkezdése előtt további vizsgálatokra van szükség: vérnyomásmérés, vércukorszint, vérkép, különös tekintettel a trombocitaszámra, ill. hemosztázis szűrőtesztek (ez utóbbi két vizsgálat eredményével a legújabb irányelvek szerint nem kell megvárni a kezelés kezdetét, csak abban az esetben, ha alapos gyanú van alacsony trombocitaszámra, ill. véralvadási zavarra pl. gyógyszerzedés kapcsán).

Az akut fázis lezajlása után a további diagnosztika során komplex kardio- és cerebrovaszkuláris átvizsgálás keretein belül a cél annak felderítése, hogy mi okozta a stroke-ot.

#### **1.2.4 Az akut ischaemiás stroke kezelése**

Az AIS hatékony kezelési módszere az elzáródott ér dezobliterációja vénás vérrögoldó kezelés (intravénás trombolízis) vagy mechanikus vérrögtávolítás (mechanikus trombektómia) segítségével. A vérrögoldó kezelésre a tünetek kialakulásától számított 4,5 órán belül (arteria basilaris oclusio esetén 12 óra) van lehetőség, abban az esetben, ha a beteg megfelel a beválogatási és kizárási feltételeknek. A legújabb, 2021-ben megjelent European Stroke Organisation (ESO) irányelv 9 órán belül javasolja a vénás lízist és 24 órán belül a mechanikus vérrögtávolítást válogatott esetekben, ha kellő nagyságú még életképes agyszövet igazolható speciális vizsgálatok (perfúziós CT ill. MRI) segítségével. Jelenleg az AIS intravénás trombolízisére hazánkban az egyetlen törzskönyvezett szer az alteplase (rt-PA; rekombináns szöveti plazminogén aktivátor). Az intravénás trombolízis hatékonyságát és biztonságosságát számos tanulmány igazolta, azonban nem tekinthetünk a kezelésre csodaszerként, hiszen csupán a betegek 30-40%-ánál lesz kedvező a kimenetel. A rekanalizációs sikertelenség mellett intrakraniális vérzés is kialakulhat mellékhatásként, a vérzési kockázat minimalizálása mellett is. Számos kiindulási klinikai faktor befolyásolhatja az rt-PA terápia kimenetelét, ideértve a férfi nemet, a stroke súlyosságát felvételkor, az infarktus nagyságát, az előrehaladott életkort, a hiperglikémiát, stb. Tekintettel azonban az alacsony prediktív értékükre egyéni kezelési döntésekhez ezek nem használhatóak. Jelenleg nem ismert olyan specifikus laboratóriumi marker, amely segítséget nyújthatna a betegek szelektálásában azáltal, hogy előrevetíthetné a rossz kimenetelt vagy a vérzéses szövődményeket.

Az AIS másik fontos kezelési stratégiája a mechanikus trombektómia, melyre kizárólag nagyérelzáródás esetén van lehetőség. Az eljárást a tünetek kialakulásától számított 6 órán belül kell elvégezni. Válogatott betegcsoportnál kiterjesztett, 24 órás időablakon belüli kezelésre is sor kerülhet, ez azonban speciális képalkotó vizsgálatot igényel (perfúziós CT vagy MR). A



mechanikus trombektómia esetén a kedvező hosszú távú kimenetel aránya az intravénás trombolízishez hasonló, a különböző tanulmányokban kb. 30-40% közöttinek adódott. Az intravénás trombolízisre alkalmas betegeknél a trombolitikus terápia után is alkalmazható a trombektómia, valamint a beavatkozás azoknál a betegeknél is alkalmazható, akik a megnövekedett vérzési kockázat miatt nem részesülhetnek intravénás trombolízisben (pl. 50-100 G/L közötti trombocitaszám). A legújabb ESO irányelvek az LVO-t szenvedett betegek esetén inkább ajánlják az intravénás trombolízist a trombektómia előtt, amennyiben mindkét kezelés szóba jön, hangsúlyozva, hogy bár a trombektómia maga nem lehet az intravénás trombolízis gátja, ugyanakkor a trombolízis ne késleltesse a trombektómiát.

### **1.2.5 Az ischaemiás stroke prognózisa, rehabilitáció, másodlagos prevenció**

Az első ischaemiás stroke-ot követő 30 napos halálozás kb. 16-23% közötti. A neurológiai tünetek jelentős része a betegek többségénél 6 hónapon túl is fennáll: a betegek 40-50%-a hemiparetikus, kognitív deficit is gyakori és a betegek 15-20%-ánál tapasztalható szenzoros tünet, hemianopsia vagy aphasia. A tartósan fennálló tünetek általában rokkantságot okoznak, a betegek nagy része tartós ápolásra, gondozásra szorul, kb. negyedük intézeti elhelyezést igényel. A hosszú távú funkcionális kimenetel vizsgálatára a módosított Rankin Skálát (mRS) használjuk. A stroke ismétlődésének kockázata igen magas, altípustól függően mintegy 7-20% egy éven belül és 16-35% öt éven belül. A szekunder prevenció során a trombocitagátló terápia korai és hosszú távú bevezetésével a korai ismétlődő stroke jelentős hányada megelőzhető minor stroke vagy TIA esetében. Hosszú távú vérnyomáscsökkentéssel, az LDL koleszterinszint csökkentésével, II. típusú diabetes mellitus esetén az inzulinszenzitivitás növelésével csökkenthető az ismétlődő stroke kockázata. Több mint 50%-os arteria carotis stenosis esetén felmerül a reperfüziós kezelés lehetősége (a társult betegségek függvényében), 70-99% között pedig ajánlott TIA vagy stroke esetén (a súlyosság függvényében korán vagy késleltetve). Pitvarfibrilláló betegek esetén az egyéni vérzéses rizikófaktoroktól függően a 0-14. napon megkezdett antikoaguláns terápia szintén csökkenti az ismétlődő stroke kockázatát. A személyre szabott rehabilitáció fontos eleme a stroke utáni gondozásnak, funkcionális javulásnak.

### **1.2.6 Trombocitagátló terápia alkalmazása szekunder stroke prevencióként**

A vérlemezke aktiváció és aggregáció kulcsszerepet játszik az aterotrombotikus események patogenezisében. A kettős trombocitagátló terápia, mely az aszpirin (acetyl-salicilsav) és egy ADP receptor gátló kombinációjából áll, hatásosan alkalmazható szekunder prevencióként az aterotrombózis magas kockázatának kitett betegeknél, így pl. akut koronária szindrómában szenvedő betegek esetén és újabban AIS betegek esetén is. Míg akut koronária szindróma esetén számos randomizált klinikai vizsgálat már több, mint egy évtizede megerősítette a kettős vérlemezke gátló kezelés előnyeit, szemben a monoterápiával, ischaemiás stroke-ot szenvedett betegek esetén a kombinált kezelés lehetősége csak a közelmúltban került be a nemzetközi irányelvekbe, és jelenleg legfeljebb 3 hónapig javasolt a vérzésveszélytől való félelem miatt. A jelenleg érvényben lévő ESO irányelvek szerint az ischaemiás stroke-ot szenvedett betegeknél a kezdeti kettős trombocita aggregáció gátlást követően hosszú távú szekunder prevencióként feltétlenül monoterápia javasolt: elsősorban aszpirin monoterápia vagy az ADP receptor gátlók közül clopidogrel monoterápia alkalmazása lehet opció.

Az aszpirin a ciklo-oxigenáz 1 (COX-1) enzim 529-es helyzetében lévő szerin reziduumjának acetilálása révén hatékonyan gátolja az arachidonsav (AA) hozzáférését a trombocita COX-1 aktív központjához és ezáltal megakadályozza a TXA<sub>2</sub> képződését a vérlemezke teljes

élettartama alatt. Mivel a TXA2 több trombocita aktivációs útvonal amplifikáló szignáljaként működik, az aszpirin hatékonyan gátol többféle trombocita aktivációs útvonalat.

Az ADP receptor gátlók közül világszerte az egyik legelterjedtebb gyógyszer jelenleg még mindig a clopidogrel, az új generációs, per os alkalmazható ADP receptor gátlók (prasugrel, ticagrelor) erőteljes térhódítása mellett. Az ADP receptor gátló gyógyszerek a trombociták felszínén található ADP receptorok közül a P2Y1 ADP receptorra nincsenek hatással, kizárólag a P2Y12 ADP receptor inhibitorai. A clopidogrel egy pro-drug, mely a májban, a citokróm P450 (CYP) rendszer enzimek segítségével, kétlépéses reakcióban alakul át aktív metabolittá. A keringésbe jutott clopidogrel 80-85%-a gyorsan degradálódik a plazmában található észterázok által. A gyógyszer 10-15%-a alakul át aktív metabolittá a májban, amely a reaktív tiol csoportjával képes diszulfid-híd kialakítására a P2Y12 receptor extracelluláris cisztein csoportjával, ezáltal a clopidogrel a P2Y12 receptor irreverzibilis gátlását éri el és hatása a vérlemezke teljes élettartama alatt érvényesül. A clopidogrel metabolizmusában fontos szerepet játszanak a CYP enzimes család egyes tagjai, úgymint a CYP1A1, CYP2B6, CYP3A, CYP2C9 és CYP2C19 enzimek, melyek közül az egyik legfontosabb a CYP2C19. A CYP2C19 enzim egyéni genetikai variánsai kiemelkedő fontosságúak nemcsak a clopidogrel hatástalanság, de a fokozott clopidogrel hatás kialakulásában is.

Az aszpirin és a clopidogrel variábilis vérlemezke gátló hatását (úgynevezett "rezisztenciát") az elmúlt egy-két évtizedben világszerte széles körben vizsgálták. Az eredmények hatására jelentős szemlélet-változás következett be. Az aszpirin esetében ma már ismert, hogy a terápiára nem kellően reagálók gyakoriságát a múltban erősen túlbecsülték olyan laboratóriumi módszerek használatával, amelyek nem specifikusak az aszpirin COX-1 gátlására. Napjainkban már általánosan elfogadott tény, hogy az aszpirin "rezisztencia" leggyakoribb oka valójában a non-compliance, vagyis a gyógyszer nem megfelelő szedése, indokolatlan elhagyása. Csak néhány, ritka esetben lehet megfelelő gyógyszer szedés mellett valódi rezisztenciához vezető tényezőket azonosítani, például nem-szteroid gyulladáscsökkentőkkel való interferenciát.

Az aszpirinnel ellentétben azonban azok a tanulmányok, amelyekben a clopidogrel hatásának mérésére megfelelő tesztek alkalmaztak, igen változó mértékű vérlemezke gátlást írtak le, kontrollált gyógyszer-szedés mellett is. A kezelés során a terápia hatástalanságához vezető „magas kezelés alatti trombocita reaktivitás” ("high on-treatment platelet reactivity") a legtöbb tanulmány esetén 10-50% mértékű volt, legtöbbször 30-40%-os mértékben volt jelen. A jelenség hátterében elméletileg több ok is állhat (felszívódási zavar, gyógyszer-interferenciák, stb.) de a clopidogrel hatástalanságának legfőbb okaként ma már egyértelműen az aktív metabolit képződés variabilitását tesszük felelőssé, mely elsősorban a CYP izoenzimek (elsősorban a CYP2C19) genetikai polimorfizmusai eredményeként jön létre. Az a tény, hogy a clopidogrelre metabolikus okok miatt rezisztens betegek a rekurrens ischaemiás események magas kockázatának vannak kitéve, új generációs, jobb metabolikus profillal rendelkező orális P2Y12 gátlók kifejlesztéséhez vezetett, ezek a prasugrel és a ticagrelor. A prasugrel aktív metabolitja egy lépéses átalakulás révén keletkezik a májban, így hatástalansága a clopidogrelhez képest jóval ritkább (<10%). A ticagrelor nem pro-drug, így gyorsan kialakuló, reverzibilis P2Y12 gátlást tesz lehetővé. Irodalmi adatok alapján ma már tudjuk, hogy a legtöbb clopidogrel rezisztenciát mutató beteg esetén megfelelő mértékű trombocita gátlás alakul ki prasugrel vagy ticagrelor szedése esetén. Az új generációs szerek esetén azonban a hatásosság gyakrabban társulhat a vérzéses rizikó növekedésével, és ezek a gyógyszerek költségesebbek a clopidogrelhez képest.

A vérlemezke funkció tesztelése különféle laboratóriumi módszerekkel a vérlemezke gátló szerek hatását összehasonlító klinikai vizsgálatok közös jellemzője. A mindennapi orvoslás során azonban a betegek testreszabott kezelése a laboratóriumi vizsgálatok eredményei alapján továbbra is bizonytalan vagy nem kellő súlyú evidenciával alátámasztott. Ez alapvetően két okra vezethető vissza: egyrészt aszpirin esetén a "rezisztencia" laboratóriumi tesztelése ma már

ritka esetektől eltekintve okafogyottá vált. Clopidogrel esetén pedig többek között annak a következménye, hogy a clopidogrel tesztelése szempontjából ideális laboratóriumi módszert nem sikerült kiválasztani, standardizálni és validálni az új generációs P2Y12 ADP receptor gátlók térhódítása előtt.

Amennyiben mégis sor kerül a trombotagátoló terápia tesztelésére, fontos, hogy megfelelő laboratóriumi módszert válasszunk, mely specifikus a gyógyszer által gátolt biokémiai útvonalra. Az aszpirin hatás vizsgálata esetén ezért olyan módszert kell választanunk, mely a vérlemezkékben a TXA2-függő gátlást specifikusan jelzi, vagyis specifikus a COX-1 gátlásra. Ezt a gyakorlatban legegyszerűbben a vérlemezkék AA-indukálta aktivációjával érhetjük el. Az aszpirin hatás tesztelésére alkalmas (COX-1 specifikus) módszereket a 1. táblázat foglalja össze. Mivel a TXA2 féléletideje *in vivo* rendkívül rövid, a gyakorlatban általában a stabilabb inaktív metabolitjai révén, a tromboxán B2 (TXB2) vagy 11-dehidro-TXB2 származékok meghatározásával vizsgálják a TXA2 termelődést. Megjegyzendő, hogy a TXA2 a vérlemezkékben több trombocita aktivációs útvonal amplifikáló szignáljaként működik, ezért az aszpirin hatékonyan gátol többféle trombocita aktivációs útvonalat és így hatása egyéb, nem COX-1 specifikus trombocita funkciós vizsgálatok esetén is jelentkezhet. Bár korábban elterjedt volt ezen módszerek használata az aszpirin hatás tesztelésére, a COX-1 hatásra nem specifikus laboratóriumi módszerek használata az aszpirin hatás vizsgálatára ma már nem javasolt.

---

### 1. táblázat. Az aszpirin hatás laboratóriumi vizsgálata

---

#### **COX-1 gátlásra specifikus módszerek (terápia monitorozásra ajánlott):**

*Arachidonsav-indukálta trombocita aggregáció/agglutináció alapú módszerek:*

- Trombocita aggregáció és szekréció vizsgálata (lumiaggregometria)
- Multiplate<sup>®</sup> módszer
- VerifyNow<sup>®</sup> Aspirin módszer

*TXB2 meghatározás*

- Szérumból
- Trombocita dús plazmából, arachidonsav stimulációt követően

#### **COX-1 gátlásra nem specifikus módszerek (terápia monitorozásra nem ajánlott):**

- ADP-, kollagén-, adrenalin-indukálta trombocita aggregáció és szekréció (lumiaggregometria, Multiplate<sup>®</sup>)
- PFA-100<sup>®</sup> záródási idő (kollagén/ADP, kollagén/adrenalin patronok)
- Vizelet 11-dehidro-TXB2 meghatározás

---

ADP: adenosin-5'-difoszfát, COX-1: ciklo-oxigenáz-1, PFA-100: platelet function analyser-100, TXB2: tromboxán B2. Forrás: Bagoly Z, American Association of Clinical Chemistry, Pearls of Laboratory Medicine, 2014 alapján.

Annak ellenére, hogy nincs érvényben lévő szakmai ajánlás, a clopidogrel hatásának tesztelése fontos lehet olyan válogatott betegekben, akik akár szakmai (fokozott vérzéses kockázat, orális antikoaguláns kezelés, agyi történet, stb.), akár finanszírozási okok miatt nem kaphatnak ticagrelort vagy prasugrelt. Ilyenkor kérdéses lehet, hogy melyik laboratóriumi módszert válasszunk a clopidogrel hatás tesztelésére. A clopidogrel hatás laboratóriumi vizsgálata esetén is fontos a gátolt biokémiai útvonalra specifikus módszer használata (2. táblázat). Agonistaként a tesztek többsége ADP-t használ, a P2Y12 receptor hatásra való specificitás pedig legegyszerűbben prosztaglandin E1 (PGE1) használatával érhető el. A PGE1 a P2Y1 receptor

útvonal gátlása révén specifikussá teszi az adott módszert a P2Y<sub>12</sub> receptor gátlás mértékének vizsgálatára, vagyis a clopidogrel hatásra. Az ADP és PGE<sub>1</sub> kombinációját alkalmazó lumiaggregometriás módszert munkacsoportunk írta le először (lásd Eredmények).

---

## **2. táblázat. Az clopidogrel hatás laboratóriumi vizsgálata**

---

### **P2Y<sub>12</sub> receptor gátlásra specifikus módszerek, az agonista ADP, PGE<sub>1</sub> jelenlétében (terápia monitorozásra ajánlott):**

*Trombocita aggregációs, agglutinációs tesztek:*

- Trombocita aggregáció vizsgálata (lumiaggregometria, ADP+PGE<sub>1</sub>)
- Multiplate<sup>®</sup> módszer (ADP+PGE<sub>1</sub>)
- VerifyNow<sup>®</sup> P2Y<sub>12</sub> módszer
- PFA-100 P2Y

*Egyéb:*

- VASP foszforilációs teszt (áramlási citometria vagy ELISA)

### **P2Y<sub>12</sub> receptor gátlásra nem specifikus módszerek:**

- ADP-indukálta trombocita aggregáció és szekréció (lumiaggregometria, Multiplate<sup>®</sup>)
- Trombocita felszíni GPIIb/IIIa receptor aktiváció mértékének vizsgálata, P-szelektin expresszió vizsgálata áramlási citometriával
- Tromboelasztometria

---

ADP: adenzin-5'-difoszfát, GPIIb/IIIa: glikoprotein IIb/IIIa, PFA-100: platelet function analyser-100, PGE<sub>1</sub>: prosztoglandin E<sub>1</sub>, VASP: vazodilatátor stimulált foszoprotein. Forrás: Bagoly Z, American Association of Clinical Chemistry, Pearls of Laboratory Medicine, 2014 alapján.

Különösen érdekes kérdés a terápia monitorozása olyan beteg esetén, aki kettős trombocitagátló kezelésben részesül (aszpirin és clopidogrel). Az aszpirin és a clopidogrel ugyan látszólag különböző trombocita funkciókat gátol, azonban a blokkolt intracelluláris utak átfedése azt sugallja, hogy az aszpirin befolyásolhat néhány, a clopidogrel hatásának kimutatására szolgáló laboratóriumi módszert és fordítva. Meglepő módon kevés információ áll rendelkezésünkre a jelenleg használt laboratóriumi módszerek specifikitásáról egy adott vérlemezkegátló gyógyszerrel kapcsolatban ill. más vérlemezkegátlók által ezen tesztekre gyakorolt hatás mértékéről, munkacsoportunk ezt a lehetőséget vizsgálta (lásd Eredmények).

## **1.3 A pitvarfibrilláció**

### **1.3.1 A pitvarfibrilláció epidemiológiája, rizikófaktorai, patofiziológiája**

A pitvarfibrilláció az ischaemiás stroke egyik legismertebb rizikófaktor. A pitvarfibrilláció a leggyakoribb tartós arrhythmia, gyakorisága az életkor előrehaladtával nő. Pitvarfibrilláció esetén a normál sinus ritmust a pitvarok kaotikus depolarizációja (kb. 400-800/perc) váltja fel, mely ellehetetleníti a szív elektromos és mechanikai működését egyaránt. A pitvarfibrilláció kialakulhat organikus szívbetegség nélkül primer vagy idiopátiás módon, esetleg genetikus hajlam révén, továbbá szekunder módon. A szekunder forma kialakulhat kardiális okok pl. vicium, koszorúér betegség vagy bal szívfél elégtelenség, de akár cardiomyopathia vagy myocarditis/pericarditis, ill. extrakardiális okok miatt. A pitvarfibrilláció osztályozása a ritmuszavar időbeli viselkedésén és klinikai lefolyásán alapul, típusai: paroxysmalis, persistens,

tartós persistens ill. permanens pitvarfibrilláció. A pitvarfibrilláció két legfőbb szövődménye: az akut szívelégtelenség, melynek oka a perctérfogat kritikus csökkenése, ill. az artériás, leginkább nagyvérkőri embolizáció, melynek oka a pitvari trombusképződés. Az ischaemiás stroke események ötöde szív eredetű okokra vezethető vissza, melynek hátterében az esetek többségében maga a pitvarfibrilláció áll.

### **1.3.2 A hiperkoagulabilitás patofiziológiája pitvarfibrillációban**

A pitvarfibrillációban végbemenő változások teljesítik a Virchow-triász elemeit, de fontos megjegyezni, hogy a fokozott tromboemboliás rizikó pontos patomechanizmusának megismerése még további kutatásokat igényel. A Virchow-triász mai megközelítésben a következő elemekből tevődik össze: 1/ endothel diszfunkció/károsodás (pitvarfibrilláció esetén endokardiális diszfunkció és kapcsolódó strukturális változások), 2/ sztázis, 3/ protrombotikus hemosztázis egyensúly: hiperkoagulabilitás, hipofibrinolízis és trombocita aktiváció.

A pitvarfibrilláció és hemosztázis kapcsolatának vizsgálatakor a legtöbb tanulmány elsősorban a koagulációs oldalt vizsgálta, főként perifériás vérmintákból. A vizsgálatok többsége endothelsejt károsodást jelző markereken és gyulladásos markereken kívül protrombotikus markereket, valamint a trombocita aktiválódás keringő markereit vizsgálta. A pitvarfibrilláció és fibrinolitikus rendszer kapcsolatát csak kevés tanulmány vizsgálta, melyek eredménye legtöbbször ellentmondásos. A perifériás vérminták vizsgálata helyett az intrakardiális vérminták vizsgálata azért érdemelhetne nagyobb figyelmet, mert a protrombotikus változások esetleg csak lokálisan, intrakardiálisan jelentkezhetnek, anélkül, hogy a hemosztázis egyensúlyában bekövetkező eltérés a perifériás keringésben is manifesztálódna. Az eddig publikált, bal pitvari mintákat vizsgáló tanulmányok azonban csupán a hemosztázis rendszer válogatott tagjait vizsgálták, a fibrinolitikus rendszer pedig még kevésbé tanulmányozott ebben a vonatkozásban, munkacsoportunk vizsgálta részleteiben először (lásd Eredmények). A bal fülcséből származó vérminta hemosztázis és fibrinolízis paramétereinek vizsgálata szintén ritkaságnak számít a szakirodalomban, annak ellenére, hogy korábbi kutatások szerint a bal fülcsé a leginkább trombogén intrakardiális terület pitvarfibrillációban.

### **1.3.3 A pitvarfibrilláció diagnózisa és kezelése**

A diagnózist általában 12 elvezetéses EKG alapján állapítják meg, de paroxysmalis esetekben nem mindig detektálható a ritmuszavar, ezért 24 órás Holter-monitorozás, vagy még tartósabb ritmus monitorozás lehet célravezető. A pitvarfibrilláció diagnózisát követően széles körű kardiológiai, ill. belgyógyászati kivizsgálás javasolt a korábban tárgyalt rizikótényezők és társbetegségek felmérése érdekében. A pitvarfibrilláció kezelésének három alappillére van: 1/ a stroke prevenció, ami a szívüregi trombus kialakulásának megelőzését jelenti, 2/ a frekvenciakontroll, ami a kamrafrekvencia optimalizálását jelenti és 3/ a ritmuskontroll, ami a normál sinus ritmus helyreállítását és fenntartását célozza.

#### *1.3.3.1 Stroke prevenció: antikoagulálás*

Az antikoagulálás célja a stroke prevenciója, mely a pitvarfibrilláció terápiájának központi kérdése. A stroke rizikójának felmérésére különböző klinikai pontrendszereket alkalmazhatunk, melyek a terápiás döntéshozatalt segítik. Korábban leginkább a CHADS<sub>2</sub> klinikai pontrendszert alkalmazták a stroke rizikójának becslésére, az újabb ajánlások szerint erre a CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc pontrendszer a legalkalmasabb, mely a rizikótényezőket súlyozott mértékben veszi figyelembe. Alacsony stroke-rizikó esetén (férfiaknál 0 pont, nőknél 1 pont) nem szükséges antitrombotikus terápiát alkalmazni. Ennél magasabb pontértékek esetén antikoagulálás javasolt, mely lehet K-vitamin antagonistá (VKA) ill. direkt orális antikoaguláns

(DOAC): faktor Xa inhibitor vagy direkt trombin inhibitor. VKA alkalmazásával a stroke rizikója 64%-kal, az ösztörtalitás pedig 26%-kal csökkenthető. Ezzel szemben a trombotitágtáló terápia alkalmazása a stroke kockázatát mindössze 22%-kal csökkenti, az ösztörtalitást pedig nem csökkenti szignifikáns mértékben. Egyes ajánlások szerint, a pitvarfibrillációban alkalmazott klinikai rizikóbecslő skálák kiegészítése biomarkerekkel (pl. endothel károsodást jelző vagy protrombotikus állapotot jelző biomarkerekkel) tovább növelhetné azok prognosztikus értékét, azonban ilyen kezdeményezés egyelőre még nem implementálódott a klinikai gyakorlatba.

#### *1.3.3.2 A pulmonális véna izoláció*

A pitvarfibrilláció transzkatóéteres kezelésének sarokköve a tüdővéna, ill. az azokba bekúszó pitvari izomrostok és a bal pitvar elektromos izolációja. A katóéterablációs technikákat folyamatosan fejlesztik. A beavatkozás során a véna femoralison keresztüli behatolást követően katóétert vezetnek a jobb pitvarba, ahol a pitvari septum punkcióját követően jutnak a bal pitvar üregébe, felkeresve a tüdővéna szájadékat. Elsőként a radiofrekvenciás elvű katóéter terjedt el, mely fokális laesiókat, myocardialis nekrozisokat hoz létre (point-by-point technika). A beavatkozás technikai részét nagyban könnyítette, ezáltal a beavatkozás időtartamát jelentősen rövidítette a fázisos radiofrekvenciás multielektrod katóéter használata a pulmonális véna ablációjára (PVAC). A cryoballon (fagyasztásos ballon) technikával szintén jelentősen könnyebben lehet a pulmonális véna szájadékat izolálni a point-by-point technikához képest. A cryoballon abláció kapcsán ritkábban jelentkezik súlyos komplikáció (pl. tamponád, véna pulmonalis stenosis, tromboembólia) a radiofrekvenciás ablációhoz képest. A katóéterabláció sikeressége a pitvarfibrilláció típusától, társbetegségek jelenlététől és az operáló orvos tapasztaltságától is függ.

#### *1.3.3.3 A periprocedurális antikoagulálás*

A pitvarfibrilláció transzkatóéteres kezelése egy komplex beavatkozás, amelyet olyan betegeknek hajtanak végre, akiknél a tromboembóliás szövődmények, köztük a stroke eleve magasabb kockázatú, mint a nem pitvarfibrilláló betegeknek. Ezért nem meglepő, hogy a cerebrovaszkuláris szövődmények a pitvarfibrilláció abláció kezdete óta a legrettegettebb szövődmények közé tartoznak. Irodalmi adatok alapján a tromboembóliás (cerebrovaszkuláris) szövődmények aránya a transzkatóéteres beavatkozást követően jellemzően 1% körüli vagy az alatti. Hátterében legvalószínűbb okként a bal pitvari endokardiális szövetsérülés következtében kialakult hiperkoagulabilitás áll. A katóéterablációs beavatkozások periprocedurális antikoaguláns terápiaját illető szakmai irányelvek az elmúlt években módosultak. A legújabb ajánlások nem javasolják az orális antikoagulánsok felfüggesztését, hanem a periprocedurális tromboembóliás rizikó miatt a katóéteres abláció előtt (VKA/DOAC), alatt (heparin) és után (VKA/DOAC) trombozisz profilaxis folytatását javasolják. Ezen legújabb irányelvek szerint a beavatkozás után minimum 2-3 hónapig ajánlott orális antikoagulálásban részesíteni a beteget. Ez után a stroke rizikója alapján ítéendő meg a terápia folytatásának szükségessége. A periprocedurális antikoagulálással kapcsolatos szemléletváltás lassan formálódott az elmúlt évtizedben, melynek hátterében több ok áll, köztük a biztonságra való törekvés. A beavatkozás során alkalmazott heparin, a transseptális szúrás és a vékony falú pitvarban történő katóéter manipulációk, ill. az ablációs energia leadása együttesen akár életveszélyes vérzéses szövődmény veszélyét rejtheti, mely teoretikusan bármilyen preoperatív antikoaguláns folyamatos adása ellen szól. Ezen aggodalmak ellenére randomizált klinikai vizsgálatok a perioperatív időszakban terápia dózisban folyamatosan adott VKA típusú antikoagulánsok biztonságosságát és fölényét igazolták a stroke rizikó csökkenésére nézve. A közelmúltban végzett számos különböző esetszámú és tervezésű kutatás, ill. metaanalízisek eredménye alapján a direkt orális FXa, ill. direkt trombin gátlók folyamatos („uninterrupted”)

antikoagulációs stratégia szerinti alkalmazása legalább azonos mértékű vagy nagyobb biztonságot nyújtottak a megszakítás nélküli VKA stratégiához képest, hasonló hatásosság mellett, de az irodalomban néhány ellentmondásos vizsgálat is fellelhető.

Feltételezhetjük, hogy a katéterablációs beavatkozás során bekövetkező endothel károsodás, lokális hemosztázis aktiváció mértékét intrakardiálisan vett vérminta pontosabban tükrözheti, mint a perifériás vénás vérmintából nyert mérési adatok. Vélhetően a mintavétel nehézségeiből adódóan azonban a különböző preprocedurális antikoagulációs stratégiák közvetlen hatásait az ablációs beavatkozás alatt intrakardiális mintákból korábban nem vizsgálták, munkacsoportunk vizsgálta először (lásd Eredmények).

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során három témakörben vizsgáltuk az ischaemiás cerebrovaszkuláris történések kezelésére, ill. megelőzésére alkalmazott hemosztázis terápiák (intravénás trombolízis, trombocitagátló terápia, antikoaguláns terápia) hatékonyságát komplex hemosztázis diagnosztikai módszerek, biokémiai vizsgálatok, ill. obszervációs klinikai vizsgálatok révén.

### Részleteiben:

#### **I/ Hemosztázis vizsgálatok AIS betegekben az intravénás trombolízis kimenetelének vizsgálatára. Experimentális vizsgálatok a fibrinolízis regulációjának jobb megértése érdekében.**

1. Intravénás trombolízisben részesülő, AIS betegekben célul tűztük ki megvizsgálni, hogy hogyan változik egyes hemosztázis markerek, fibrinolitikus faktorok szintje a trombolízis során, és a különböző időpontokban mért laboratóriumi eredmények összefüggésbe hozhatók-e a terápia hatástalanságával? A legfontosabb fibrinolízis regulátorok (FXIII,  $\alpha$ 2-PI, ill. PAI-1) gyakori polimorfizmusai befolyásolják-e a trombolízis kimenetelét és a vérzéses szövődmények kialakulását?
2. Az agyi ereket elzáró alvadék mérete vagy az egyes fibrinolitikus fehérjék szintje mutat-e szorosabb összefüggést az intravénás trombolízis kimenetelével?
3. Mivel a lizálandó alvadék mérete a trombolízis egyik fő korlátja, célunk volt megvizsgálni *in vivo* ill. *in vitro* kísérletekben, hogy a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmusa befolyásolja-e a celluláris elemeket is tartalmazó vérrögök tömegét?
4. Milyen hatásai vannak a FVLeiden mutációnak a fibrinolízis regulációjára, az  $\alpha$ 2-PI alvadékba való beépülésének mértékére? Új módszert fejlesztettünk ki az alvadékba beépülő  $\alpha$ 2-PI mennyiségének meghatározására, és teszteltük a módszert intravénás trombolízisben részesülő AIS betegekben, összefüggést keresve a lízis kimenetelével.
5. A globális hemosztázis ill. fibrinolízis tesztek (trombin generáció, alvadék lízis vizsgálat, ill. egy általunk leírt új, módosított alvadék lízis vizsgálat) között van-e olyan, amely előrejelzi a hemorrhagiás transzformáció kialakulását intravénás trombolízisben részesülő AIS betegekben? A módszereket nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek felvételi plazmamintáiban is teszteltük, összefüggést keresve a módszerek eredménye és a hemorrhagiás stroke súlyossága, a hematoma térfogata, a stroke kimenetele között.

#### **II/ Hemosztázis vizsgálatok a vérlemezke gátló terápiák hatástalanságának felismerésére.**

1. Célunk volt olyan laboratóriumi teszt kidolgozása, amely specifikus a clopidogrel P2Y<sub>12</sub> ADP receptort gátló hatására, emellett könnyen kivitelezhető, olcsó és széles körben elvégezhető. Clopidogrel monoterápián lévő, ischaemiás stroke-ot szenvedett betegekben a kidolgozott tesztet összehasonlítottuk a clopidogrel hatástalanságának tesztelésére alkalmas egyéb laboratóriumi tesztekkel.
2. Aszpirin monoterápián és clopidogrel monoterápián lévő betegek vérmintáinak vizsgálatával kívántuk megfigyelni, hogy az aszpirin mely clopidogrel monitorozásra alkalmas laboratóriumi teszt eredményét befolyásolja és fordítva, a clopidogrel mely aszpirin monitorozásra használatos laboratóriumi teszt eredményére van hatással.

#### **III/ Hemosztázis vizsgálatok pitvarfibrilláló betegekben a tromboembóliás szövődmények (stroke rizikó) jobb megértése érdekében.**

1. Pitvarfibrilláló betegek és nem pitvarfibrilláló kontrollok perifériás vérből nyert és intrakardiális (bal pitvari és bal fülcsei) vérmintáinak összehasonlításával célunk volt



olyan hemosztázis és fibrinolízis eltérések azonosítása, amelyek magyarázzák a lokálisan fokozott tromboemboliás rizikót.

2. Célul tűztük ki a pitvarfibrilláció transzkatóteres ablációja során alkalmazott különböző antikoagulációs stratégiák koagulációra és fibrinolízisre kifejtett hatásának vizsgálatát a beavatkozás előtt ill. után vett bal pitvari vérmintákból, az optimális preprocedurális antikoagulációs stratégia hemosztázis biokémiai nyomait keresve.

## 3 BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

### 3.1 Hemosztázis vizsgálatok akut ischaemiás stroke betegekben az intravénás trombolízis kimenetelének vizsgálatára

#### 3.1.1 Betegek bevonása

Három prospektív, obszervációs tanulmányt végeztünk, a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikájával kollaborálva. Az első két tanulmány esetén a stroke kezdetétől számított legfeljebb 4,5 órán belül intravénás trombolízis kezelésben részesült AIS betegek kerültek beválogatásra, függetlenül attól, hogy a stroke milyen érellátási területet érintett. Az első tanulmányba a betegek beválogatása 2011 márciusától 2013 januárig tartott, a második tanulmány esetén a betegek beválogatása folytatódott és 2016 szeptember - 2019 április között további betegek kerültek be a vizsgálatba (a 2016 szeptember - 2019 április között bevont betegek kohorszát külön is vizsgáltuk). A harmadik, eset-kontroll típusú tanulmányba kizárólag anterior keringést érintő, AIS betegek kerültek beválogatásra. Az eset-kontroll tanulmány esetén minden LVO-t szenvedett beteghez (clot burden score, CBS: 0-9) egy életkorban és nemben illesztett LVO nélküli (CBS: 10) beteget párosítottunk. A betegeket 519 konsekutív AIS beteg közül választottuk ki, akiket 59 hónap alatt vettek fel a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikára 2011 és 2020 között.

A betegek kezelése a vizsgálat teljes időtartama alatt egységes volt. A neurológusok valamennyi beteg beválogatásánál az aktuális ESO irányelv bevonási és kizárási kritériumait használták. Minden beteg intravénás trombolízisben részesült standard protokoll alapján a 4,5 órás terápiás időablakon belül rt-PA alkalmazásával. A bevont betegek közül senki sem részesült mechanikus trombektómiában: a beavatkozás vagy nem volt elérhető a vizsgálati időszakban, vagy a beteg nem volt alkalmas a beavatkozásra. Az AIS jelenlétét a klinikai tünetek jelenléte és a képalkotó eljárások eredményei alapján diagnosztizálták CT és CTA segítségével. A felvételtkor és a lízis után 24 órával készített CT-felvételeket három független radiológus egyidejűleg elemezte, és meghatározták az ASPECTS értékeket. Minden betegnél regisztrálták a tünetek jelentkezésének időpontját, az alapvető demográfiai és klinikai jellemzőket. A neurológiai tünetek súlyosságát a klinikusok az NIHSS pontrendszer alapján ítélték meg négy különböző időpontban: a beteg felvételekor, 2 órával, 24 órával és 7 nappal a trombolízis után. A stroke etiológiáját a TOAST kritériumrendszer alapján osztályozták. A lízist követő hemorrhagiás transzformációt tünettel járó (SICH: szimptomatikus intrakraniális hemorrhagia) vagy tünettel nem járó (aSICH: aszimptomatikus intrakraniális hemorrhagia) vérzésként határozták meg az ECASS II (European Cooperative Acute Stroke Study II) kritériumai szerint. Tünettelen járó hemorrhagiás transzformáció alatt azt értettük, ha a neurológiai tünetek  $\geq 4$  ponttal romlottak a NIHSS pontrendszer szerint, és a romló állapot hátterében a hemorrhagiás elváltozások voltak valószínűsíthetőek. A betegek hosszú távú funkcionális kimenetelét 3 hónappal az eseményt követően a mRS használatával állapították meg.

A tanulmány során a következő kimeneteket vizsgáltuk:

1. *Rövid távú kimenetel az eseményt követő 7. napon:* az NIHSS pontszám legalább 4 ponttal való csökkenését vagy 0-ra történő csökkenését értékeltük kedvező kimenetelként (neurológiai javulás), míg az NIHSS pontszám legalább 4 ponttal történő növekedését kedvezőtlen kimenetelnek tekintettük.

2. *Hosszú távú kimenetel az eseményt követő 90. napon:* az mRS 0-2 értékeket definiáltuk kedvező hosszú távú kimenetelként, ill. egyes vizsgálatok esetén a legkedvezőbb kimenetelű mRS 0-1 csoportot külön vizsgáltuk.

3. *Terápiával összefüggő intracerebrális vérzés (ICH):* SICH vagy aSICH az ECASS II kritériumai szerint, a lízist követő napon.

### 3.1.2 Mintagyűjtés és hemosztázis laboratóriumi vizsgálatok

Minden betegtől perifériás vérmintát gyűjtöttünk felvételkor (az rt-PA infúzió megkezdése előtt) és 24 órával a lízis után. A betegek egy részében (n=131, 2011-2013 között) közvetlenül az rt-PA teljes dózisének beadása után is történt mintavétel. A rutin laboratóriumi vizsgálatok (ionok, glükózszint, vese- és májfunkciós vizsgálatok, nagy érzékenyséű C reaktív fehérje meghatározás, vérkép) standard laboratóriumi módszerek segítségével történtek a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében.

A specifikus hemosztázis tesztek elvégzéséhez a 0,109 M nátrium-citrátot ill. nátrium-citrátot, teofillint, adenozint és dipirydamolt (CTAD) tartalmazó csövekbe gyűjtött vérmintákat a mintavételt követően azonnal feldolgoztuk (kétszer centrifugáltuk 1500 g-vel, szobahőmérsékleten 15 percig). A véralvadás szűrővizsgálatai (PI, APTI, TI) és a fibrinogén szint Clauss módszer szerinti meghatározása BCS koagulométerrel történtek a gyári protokoll lépéseit követve. A speciális hemosztázis tényezők és fibrinolitikus markerek meghatározásához a citráttal alvadásgátolt plazma minták alikvotjait egyedi kóddal jelöltük, és -80 °C-on tároltuk a mérések elvégzéséig. A DNS izolálást citráttal alvadásgátolt mintavételi csőbe vett vérminták határreteg sejtjeiből (buffy coat) végeztük.

A VWF antigén szintek meghatározása immunturbidimetriás módszerrel, a FVIII aktivitás meghatározása kromogén módszerrel történt Siemens BCS koagulométeren. A plazma FXIII aktivitás szinteket ammónia felszabaduláson alapuló teszttel, a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigénszinteket szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg. Az  $\alpha$ 2-PI aktivitást kromogén tesztben Siemens BCS koagulométeren határoztuk meg. A totál  $\alpha$ 2-PI antigénszintet in house ELISA módszerrel mértük. Ez a vizsgálat az  $\alpha$ 2-PI minden izoformáját kimutatja, és nem befolyásolja a PAP-komplexek jelenléte. A PAI-1 aktivitás és antigén szinteket szendvics ELISA esszék segítségével végeztük. A PAI-1 mérésekhez felhasznált plazma mintákat CTAD vérlemezké gátlót is tartalmazó csövekbe vett vérmintákból nyertük, annak érdekében, hogy vérminta szállítása, tárolása során a vérlemezkékből utólagosan PAI-1 ne szabadulhasson fel. Az általunk használt PAI-1 aktivitás esszé kizárólag a szabad, aktív PAI-1 meghatározására alkalmas, míg a PAI-1 antigén esszé a szabad, a t-PA-val komplexben lévő és latens PAI-1-et is méri. A plazminogén aktivitás meghatározása kromogén tesztben történt, a D-dimer szinteket immunturbidimetriás módszerrel határoztuk meg, Siemens BCS koagulométeren, a gyártó utasításai alapján. A fibrin monomer kvantitatív meghatározását immunturbidimetriás módszerrel végeztük, az Instrumentation Laboratory ACL TOP 500 koagulométeren. A PAP-komplex és TAT-komplex meghatározásához szendvics típusú ELISA módszert használtunk, a detektálást TECAN Infinite m200 típusú ELISA olvasóval végeztük.

A FXIII-A p.Val34Leu (c.103G>T; rs5985), FXIII-A p.Tyr204Phe (c.614A>T; rs3024477), FXIII-B p.His95Arg (c.344G>A; rs6003) és FXIII-B intron K (IVS11 c.1952+144C>G; rs12134960), és az  $\alpha$ 2-PI Arg6Trp (rs2070863) polimorfizmusait valós idejű PCR-módszerekkel határoztuk meg fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) detektálás és olvadási görbe elemzése segítségével LightCycler<sup>®</sup> 480 készüléken.

### 3.1.3 Globális hemosztázis ill. fibrinolízis tesztek vizsgálata

#### 3.1.3.1 A trombin generációs teszt kivitelezése

A vizsgálat elvégzéséhez a fluoreszcens mérésen alapuló, Thrombinoscope CAT esszét használtuk. Röviden, 80  $\mu\text{L}$  plazmához 20  $\mu\text{L}$  PPP-Reagent<sup>TM</sup> (tartalma: 5 pM rekombináns szöveti faktor és 4  $\mu\text{M}$  foszfolipid) reagenst adtunk és az elegyet 10 percig inkubáltuk, U-aljú, 96 lyukú, fekete polipropilén mikrolemezt használva Minden minta esetén saját kalibrátort (Thrombin Calibrator<sup>TM</sup>) is használtunk a szubsztrát fogyasztásból adódó fluoreszcens jel korrekciója és a plazma-szín variabilitás korrigálása érdekében. A trombin generációt 20  $\mu\text{L}$  Flu-Ca-Kit<sup>TM</sup> reagens (tartalma: fluoreszcens szubsztrát és  $\text{CaCl}_2$  tartalmú Fluo-Buffer<sup>TM</sup>) hozzáadásával indítottuk. Minden minta mérése duplikátumban történt. A mérést a Fluoroskan Ascent FL fluoriméteren végeztük, a Thrombinoscope szoftvert használva, mely meghatározta a trombin generációs paramétereket: *Lag time (perc)*: a teszt kezdetétől a trombin generáció kezdetéig eltelt idő. *Peak thrombin (nM)*: a legnagyobb trombin aktivitás. *Time to peak (perc)*: a maximális trombin generáció eléréséhez szükséges idő. *ETP (nM\*perc)*: endogén trombin potenciál, a görbe alatti terület. *Start tail (perc)*: a trombin generáció lecsengésének időpontja. *Velocity index (nM/perc)*: a felszálló görbe meredeksége.

#### 3.1.3.2 In vitro alvadék lízis (CLA) mérések. A módosított CLA (mCLA) módszer kidolgozása

Az *in vitro* alvadék lízis vizsgálat (CLA) során 96 lyukú mikrotiter lemezen a vizsgált plazma mintákból rekombináns szöveti faktorról és foszfolipiddel alvadékot képeztünk, és ezzel egyidőben rt-PA hozzáadásával lízist indukáltunk, melyet valós időben turbidimetriás módszerrel monitoroztunk. A mérések során két kísérleti beállítást alkalmaztunk, mindkét módszer során valamennyi mintát négy párhuzamos méréssel vizsgáltunk. Az első kísérleti elrendezésben (CLA) a citráttal alvadégtöltött mintákhoz 1000-szeresre hígított rekombináns humán szöveti faktort és foszfolipidet tartalmazó reagenst (Innovin) és 100 ng/mL rt-PA-t adtunk HEPES pufferben (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH:7,4). A második kísérleti elrendezésben a mintaoldathoz 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sejtmentes, szabad tisztított DNS-t (cfDNA, borjú thymus DNS) és 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hiszton (borjú thymus, TIII S) adtunk imitálva a NET-ek jelenlétét (módosított CLA, mCLA). A cfDNA és hiszton optimális koncentrációját az irodalomban leírt előkísérletek alapján állítottuk be, ahol a hiszton (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) és a különböző koncentrációjú cfDNA (50-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) együttes hatását vizsgálták a fibrinolízis kinetikájára, tisztított kísérleti körülmények között. A plazma minták megalvasztását mindkét kísérleti elrendezésben az automata által injektált  $\text{CaCl}_2$ -ot tartalmazó (21 mM) HEPES pufferrel iniciáltuk. A minták abszorbanciáját 340 nm hullámhosszon, 37 °C-on detektáltuk TECAN Infinite m200 mikrolemes olvasó segítségével. Az alvadék lízis görbék analízisét a Shiny App ClotlysisCL online kiértékelő szoftver segítségével végeztük. Mindkét kísérleti módszer során kapott turbidimetriás görbék esetén a következő paramétereket számoltuk ki: maximális abszorbancia, a maximális abszorbancia eléréséhez szükséges idő, különböző időpontokban meghatározott alvadék lízis idők (CLT): 10%CLT, 50%CLT, 90%CLT, és a görbe alatti terület (CLA AUC). Az analitikai pontosságot mindkét kísérleti elrendezés során meghatároztuk a Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI dokumentum, EPO05-A3) irányelvei alapján. A sorozaton belüli és a laboratóriumon belüli pontosság meghatározása során a variációs koefficiens 8,6 és 8,9%-nak adódott, mindkét kísérleti beállítás során.

### **3.1.4 Nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek vizsgálata globális hemosztázis ill. fibrinolízis tesztek révén**

A fent listázott globális hemosztázis ill. fibrinolízis teszteket (trombin generáció, CLA) egy prospektív obszervációs tanulmány keretein belül nem traumás ICH-t elszenvedett betegek plazmamintáin is teszteltük, a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Neurológiai Klinikájával kollaborációban. A betegek beválogatása a tanulmányba 2017 júniusában kezdődött és 2020 szeptemberéig tartott (IRONHEART vizsgálat). A vizsgálat klinikai protokollja publikálásra került. A vizsgálatba bevont betegek 18. életévüket betöltött, CT-vel igazolt nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot szenvedett személyek voltak. A pontos beválogatási és kizárási kritériumokat illetően utalunk az eredeti publikációkra. Az ICH jelenlétének igazolása a klinikai tüneteken alapuló komplex neurológiai vizsgálatok mellett CT-vel történt. A CT vizsgálatokat az eseményt követő 14. és 30. napon megismételték. A CT felvételek elemzését 3 független radiológus végezte, akik a radiográfiai jellemzőket és a becsült vérzésvolumen értékeket is rögzítették. A neurológusok emellett számos klinikai és demográfiai adatot regisztráltak a kórházi felvételkor. A stroke súlyosságának meghatározására az NIHSS skálarendszert alkalmazták, felvételkor és az eseményt követő 7. napon. A mortalitás veszélyének becslésére a klinikusok az ICH score pontrendszert alkalmazták. A betegek hosszú távú funkcionális kimenetelének értékelésére az mRS pontrendszert használták.

Mivel a vizsgálat során alkalmazott globális módszereknek jelenleg nincs hivatalosan elfogadott referencia tartománya, kontrollként egészséges önkéntesek csoportját is vizsgáltuk. Minden beválogatott önkéntes 18. életévét betöltött személy, akinél az artériás magasvérnyomáson kívül más alapbetegség a kórelőzményben nem szerepelt, valamint a családtörténetben vénás, vagy artériás trombotikus esemény nem szerepelt.

A tanulmány során a következő kimeneteleket vizsgáltuk:

1. *Mortalitás*: az eseményt követő 14. és 90. napig.
2. *Hosszú távú funkcionális kimenetel*: az mRS érték alapján 90 nappal az eseményt követően. Kedvező hosszú távú kimenetelként értékeltük az mRS 0-1 értékeket.

## **3.2 Experimentális vizsgálatok a fibrinolízis regulációjának jobb megértése érdekében**

### **3.2.1 A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus hatásának tanulmányozása a celluláris elemeket is tartalmazó vérrögök súlyára**

#### *3.2.1.1 Vizsgálati alanyok*

A kísérleteket Prof. Alisa Wolberg (University of North Carolina at Chapel Hill, USA) munkacsoportjával kollaborációban végeztük. Nyolcvanhat egészséges, ismert FXIII-A p.Val34Leu genotípusú (n=40 FXIII<sup>Val/Val</sup>, n=28 FXIII<sup>Val/Leu</sup> és n=18 FXIII<sup>Leu/Leu</sup>) önkéntest (15 férfi és 71 nő, medián életkor: 26; IQR: 23-39 év) válogattunk be a kísérleteinkbe. A donoroknak nem volt ismert vérzékenységük, máj- vagy vesebetegségük, jelentős belgyógyászati betegségük, kizárási tényező volt a terhesség, a kórelőzményben trombózis ill. bármilyen gyógyszerhasználat a vizsgálatot megelőző két hétben. A véralvadás szűrőtesztjei, a fibrinogén-, a FXIII aktivitás és antigén szintek minden önkéntes esetében referencia tartományban voltak (mérési elveket lásd korábban). A kísérletekhez használt, tisztított FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-t kizárólag FXIII<sup>Val/Val</sup> ill. FXIII<sup>Leu/Leu</sup> donoroktól gyűjtött kevert humán plazmákból preparáltuk intézetünkben Lóránd és munkatársai módszerei alapján.

### 3.2.1.2 *Sejtes elemeket is tartalmazó, „teljes” véralvadékok in vitro vizsgálata*

A teljes vért centrifugáltuk (150 g, 20 perc). Egy FXIII<sup>Val/Val</sup> genotípust hordozó donortól vérlenke dús plazmát (platelet rich plasma, PRP) nyertünk, melyet prosztoglandin-I<sub>2</sub>-vel kezeltük (50 ng/mL), majd újra centrifugáltuk, hogy vérlenkekben szegény plazmát (platelet poor plasma: PPP, 700 g, 10 perc) vagy vérlenkekét (400 g, 20 perc) kapjunk. A vérlenkepelleteket HEPES Tyrode pufferben (15 mM HEPES, 3,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,5 mM dextróz) szuszpendáltuk. A vörösvértesteket 0-negatív donorból izoláltuk; a vörösvértest-frakciót izoláltuk, citrátos glicin-sóoldattal háromszori centrifugálással (400 g, 5 perc) mostuk. A vérlenkek és a vörösvértestek elkészítése és felhasználása mindig a kísérlet napján történt.

Az első kísérletsorozatban úraszuszpendált vérlenkek (10<sup>5</sup>/μL), mosott vörösvértestek (4,5 x10<sup>6</sup>/μL) és a FXIII<sup>Val/Val</sup>, FXIII<sup>Val/Leu</sup>, vagy FXIII<sup>Leu/Leu</sup> donoroktól származó PPP kombinálásával állítottunk elő teljes vért. Az alvadást szilikonizált mikrotiter lemez vályúiban váltottuk ki szöveti faktor és foszfolipid (Innovin) és CaCl<sub>2</sub> (10 mM) hozzáadásával, 37 °C-on. Két óra elteltével a kontrahált vérrögöket eltávolítottuk a vályúkból, és súlyukat lemértük.

A második kísérletsorozatban a vérrögök elkészítéséhez a mosott vérlenkekén (10<sup>5</sup>/μL) és mosott vörösvértesteken (4,5x10<sup>6</sup>/μL) kívül FXIII deficiens plazmát használtunk, és tisztított FXIII<sup>Val/Val</sup> vagy FXIII<sup>Leu/Leu</sup> fehérje (21 μg/mL) hozzáadásával állítottuk elő a teljes vért.

## 3.2.2 **A FV<sub>Leiden</sub> mutáció hatása a fibrinolízis regulációjára, az α<sub>2</sub>-PI alvadékba való beépülésének mértékére**

### 3.2.2.1 *Vizsgálati alanyok, mintavétel*

Tizenöt egészséges, ismert FV genotípusú (5 vad típusú, 5 FV<sub>Leiden</sub> heterozigóta, 5 FV<sub>Leiden</sub> homozigóta) önkéntest (3 férfit és 12 nő, életkoruk: 17-67 év) válogattunk be a kísérleteinkbe. Kizárási kritériumot jelentett a személyes anamnézisben szereplő trombózis, vagy vérzékenységgel járó kórkép. Egyik résztvevő sem használt antikoagulánst. A véralvadás szűrőtesztjei, a fibrinogén-, a FXIII aktivitás és antigén szintek minden önkéntes esetében referencia tartományban voltak (módszereket lásd korábban). Tekintettel arra, hogy a FXIII aktiváció sebességét a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus is befolyásolja, ezért a vizsgálatokhoz valamennyi esetben FXIII-A p.Val34Val genotípusú egyéneket választottunk. A FV<sub>Leiden</sub> mutáció és a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus genotipizálása korábban közölt, standard PCR módszerrel történt. Valamennyi kísérletet megismételtünk izolált vad típusú FV-tel ill. FV<sub>Leiden</sub>-nel kiegészített FV hiányplazmában, a FV izolálást korábban közölt módszer alapján végeztük. Egyénenként 18 mL vért vettünk a könyökhajlati vénából 2 mL 0,105 M-os trinátrium-citrát tartalmú csőbe. A véralvadás intrinsic útjának aktivációját 50 μg/mL kukorica tripszin inhibitorral gátoltuk, melyet közvetlenül a vérvétel után adtuk hozzá a teljes vérmennyiséghez. A citráttal alvadást gátolt vérmintákból trombocita-depletált plazmát (PDP) nyertünk és használtunk fel kísérleteinkhez.

### 3.2.2.2 *A FXIII aktivációjának és a következményes fibrin keresztötések dinamikájának a vizsgálata különböző FV<sub>Leiden</sub> genotípusú plazmákban*

Mivel plazmában a FXIII aktivációja a fibrin felszínén megy végbe, ezért kísérleteinkben a FXIII aktivációját az alvasztás során nyert fibrinalvadékokban vizsgáltuk. A fibrinalvadékokat a szöveti faktor útvonal aktivációja révén nyertük. Az aktivációt elvégeztük rekombináns humán trombomodulin (rhTM) jelenlétében és hiányában egyaránt. Az rhTM koncentráció kiválasztásánál az volt a célunk, hogy a trombingeneráció gátlása megközelítőleg 50%-os legyen a FV vad típusú plazmákban. A kísérleteinkhez kiválasztott rhTM koncentrációt (1,5 nM) előzetes kísérletek során teszteltük FV vad típusú plazmákon, melyekben az rhTM

jelenléte átlagosan 45,4%-al (40-61%) csökkentette a trombingenerációt. A fibrinalvadékok képzése során 150  $\mu$ L PPP-hez 40  $\mu$ L aktivátor koktélt és 10  $\mu$ L puffert adtunk, s az elegyet 37 °C-on különböző ideig inkubáltuk, majd a reakciót azonos térfogatú gátló koktéllal állítottuk le. Az aktivátor koktél a Technothrombin TGA RC Low volt, melyet 7,5 nM rhTM-et tartalmazó, vagy nem tartalmazó 62,5 mM  $\text{CaCl}_2$ -ban oldottunk fel. A feloldott Technothrombin TGA RC Low  $\sim$ 5 pM rekombináns humán szöveti faktort, Tris-HEPES-NaCl pufferben oldott alacsony koncentrációjú foszfolipidet tartalmazott. A koaguláció során keletkezett trombin és FXIIIa aktivitásának blokkolására, ill. a fibrinolízis megakadályozására használt gátló koktél összetétele a következő volt: 20 mM benzamidin, 0,1 mM D- fenilalanil-L-prolil-L-arginin chloromethyl keton (PPACK), 2 mM jóacetamid, 50 mM  $\epsilon$ -aminokapronsav, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM HEPES puffer (pH 7,5). Az aktivátor koktél által indukált reakciót különböző időintervallumok után leállítottuk. Amennyiben az adott időintervallum alatt alvadék képződött, azt centrifugálással szeparáltuk, majd háromszor alaposan átmostuk fiziológiás sóoldattal és SDS-PAGE minta-pufferben feloldottuk.

### 3.2.2.3 SDS-PAGE és Western blotting

Az alvadékokban képződött fibrin keresztkötéseket ( $\alpha$ -polimerek,  $\gamma$ -dimerek) SDS-PAGE technikával 10%-os gélben vizsgáltuk; az elektroforézist követően a gélen levő fibrint Coomassie-kék (R250) festékkel tettük láthatóvá. A képződött fibrin  $\gamma$ -dimerek ill.  $\alpha$ -lánc oligomerek-polimerek relatív mennyiségét GS-800 kalibrált denzitométeren határoztuk meg. Az  $\alpha$ 2-PI és fibrin közti keresztkötések keletkezését SDS-PAGE (7,5%-os gél) és Western blotting technikával követtük. Elsődleges antitestként kecske anti-humán  $\alpha$ 2-PI antitestet, másodlagos antitestként nyúlban termelt biotinált kecske-ellenes IgG-t használtunk. Az  $\alpha$ 2-PI-fibrin  $\alpha$ -lánc közti heterodimerek relatív mennyiségének a meghatározása kvantitatív denzitometriával történt. Az egyes plazmamintákban kialakult heterodimerek relatív mennyiségét a maximálisan képződött  $\alpha$ 2-PI-fibrin  $\alpha$ -lánc közti heterodimerek %-ában fejeztük ki. Az összehasonlítás érdekében  $T_{1/2}$  értékeket (az 50%-os heterodimerizációhoz szükséges időintervallumokat) számoltunk.

### 3.2.2.4 In vitro alvadék lízis vizsgálatok

Az alvadékok t-PA által indukált lízisét turbidimetriás módszerrel vizsgáltuk (lásd korábban). A t-PA végkoncentrációja ez esetben 5 nM volt. A lízis vizsgálatokat elvégeztük rhTM jelenlétében is hiányában is. Egyes kísérletekben a TAFIa-t 25  $\mu$ g/mL burgonyából izolált karboxipeptidáz inhibitorral gátoltuk. Amennyiben az FXIIIa aktivitást kívántuk gátolni az lízis vizsgálatok során, 2 mM jóacetamidot adtunk a rendszerünkhöz. Az eredmények kvantitatív értékeléséhez az 50%-os lízishez szükséges időt számoltuk ki.

## 3.2.3 Új módszer kifejlesztése az alvadékba beépülő $\alpha$ 2-PI mennyiségének meghatározására

### 3.2.3.1 A trombin koncentráció és az alvasztási idő hatása az $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való beépülésére

Annak érdekében, hogy a  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való beépülésének mértékét meg tudjuk határozni, új módszert dolgoztunk ki. Az előkísérletek során tíz egészséges személy plazmájához trombint (0,5; 1; 2; 5 U/mL) és 20 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot adtunk, majd különböző ideig tartó (10; 20; 30; 45; 60; 180 perc), 37 °C-on történő inkubálást követően a keletkezett szérumokat az alvadékoktól centrifugálással elválasztottuk (1600 g, 5 perc). A totál  $\alpha$ 2-PI antigén szinteket a kiindulási plazma mintákból és az alvasztás után keletkezett szérumokból az intézetünkben kifejlesztett szendvics ELISA technikával határoztuk meg, amely az  $\alpha$ 2-PI

minden formáját felismeri, de nem ismeri fel a PAP-komplexet. Az ELISA technikával kapott antigén koncentrációk alapján az alvadékba beépült  $\alpha 2$ -PI mennyiségét az alábbi képlet alapján számítottuk:

$$\alpha 2\text{-PI beépülés (\%)} = (\text{plazma } \alpha 2\text{-PI (mg/L)} - \text{szérum } \alpha 2\text{-PI (mg/L)}) / \text{plazma } \alpha 2\text{-PI (mg/L)} \times 100$$

A FXIII koncentráció hatását az  $\alpha 2$ -PI fibrin alvadékba való beépülésének mértékére FXIII deficiens plazma minta alkalmazásával vizsgáltuk, amely normál  $\alpha 2$ -PI szinttel rendelkezett. A FXIII deficiens plazmát kiegészítettük plazmából tisztított FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> preparátummal különböző koncentrációban (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mg/L). A FXIII-t egészséges személyek kevert plazmájából tisztítottuk Loránd és munkatársai közleménye alapján. A FXIII-mal kiegészített plazmákhoz 2 U/mL trombint és 20 mM CaCl<sub>2</sub>-ot adtunk és 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk, majd a keletkezett szérumot az alvadéktól centrifugálással elválasztottuk (1600 g, 5 perc). A totál  $\alpha 2$ -PI antigén szinteket a plazma és a szérum mintákból a fent leírtak alapján határoztuk meg. Az alvadékot 3 mg/mL jódcetamidot tartalmazó PBS (pH: 7,2) pufferrel alaposan mostuk CRC oszlopokban (compact reaction columns). A mosott alvadékot 8 M ureát és 5% merkaptotetanolt tartalmazó redukáló Laemmler mintapufferben szobahőmérsékleten, rázatás mellett 20 óra alatt feloldottuk. A feloldott alvadékokat 7,5%-os SDS-PAGE gélben megfuttattuk. Western blotting technikát alkalmaztunk, tormaperoxidázzal (HRPO) jelzett poliklonális totál  $\alpha 2$ -PI ellenes antitest használatával, érzékenyített kemilumineszcenciás detektálással, melyet Azure c300 készülékben végeztünk. Az  $\alpha 2$ -PI fibrinbe való beépülésének tanulmányozását 57 AIS-ot elszenvedő beteg trombolízis előtti plazmamintáján teszteltük, akik valamennyien a tünetek megjelenésétől számítva 4,5 órán belül rt-PA trombolízis terápiában részesültek (lásd korábban). A betegek plazmamintáját ill. a korban illesztett 26 egészséges kontroll plazmáját 2 U/mL trombinnal és 20 mM CaCl<sub>2</sub>-dal megalvasztottuk 37 °C-os vízfürdőben, 30 percig. A szérumot és az alvadékot centrifugálással elválasztottuk (1600 g, 5 perc). Az eredeti plazmából és a keletkezett szérumból szendvics ELISA technikával meghatároztuk a totál  $\alpha 2$ -PI antigén szinteket. Az alvadékba beépült totál  $\alpha 2$ -PI mennyiségét a plazma és a szérum szintekből kalkuláltuk. A betegek kimenetelét a korábban leírtaknak megfelelően értékeltük és összehasonlítottuk az  $\alpha 2$ -PI fibrinbe való beépülésének mértékével.

### **3.3 Hemosztázis vizsgálatok a vérlemezkegátló terápiák hatástalanságának felismerésére**

#### **3.3.1 Új, P2Y<sub>12</sub> ADP receptor specifikus trombocita aggregációs módszer kidolgozása és a módszer összehasonlítása a clopidogrel terápia monitorozására alkalmas egyéb laboratóriumi módszerekkel**

##### *3.3.1.1 Beteg- és kontrollpopuláció*

A vizsgálati populációba 114 olyan beteg került, akinek kórtörténetében nem-kardiogén ischaemiás cerebrovaszkuláris betegség szerepelt, és 75 mg/nap fenntartó clopidogrel monoterápiában részesült. A kontrollcsoport 140, nem szerint illesztett egészséges egyénből állt, akik nem szedtek vérlemezke funkciót befolyásoló gyógyszereket. A priori kizárási kritériumok: aspirin/nem szteroid gyulladáscsökkentő kezelés, krónikus májbetegség, hemoglobinszint <80 g/L, vérlemezkeszám >500×10<sup>9</sup>/L vagy <150×10<sup>9</sup>/L, akut fertőző betegség, ismert hemorrhagiás diathesis, egy hónapon belül műtét vagy ischaemiás esemény, elismert non-compliance (gyógyszer-kihagyás). Clopidogrel non-responderek esetében a betegek kikérdezését követően, két hetes újabb gyógyszereszedési periódus után



megismételtük az eredményeket. Bizonyított gyógyszer-kihagyás miatt három beteg kizárásra került a vizsgálatból. A vizsgálatban résztvevőktől éhgyomri könyökvéna vérvétel történt.

### *3.3.1.2 A clopidogrel hatás vizsgálatára alkalmas laboratóriumi tesztek. Az ADP-indukálta trombocita aggregáció és szekréció*

Az ADP-indukálta trombocita aggregációt és szekréciót Chrono-Log modell 700 lumiaggregométerrel végeztük. A citráttal antikoagulált teljes vér centrifugálásával PRP-t nyertünk (150 g, szobahő, 15 perc). Miután óvatosan eltávolítottuk a PRP felső kétharmadát, a csöveket 1500 g-vel további 20 percig centrifugáltuk, hogy PPP-t kapjunk. Az aggregációs vizsgálatokhoz a trombocitaszámot a szükséges mennyiségű PPP hozzáadásával úgy állítottuk be, hogy a trombocitaszám  $250 \times 10^9/L$  legyen. Az ADP-indukálta aggregációt  $5 \mu M$  és  $20 \mu M$  ADP-vel végeztük. Luciferin-luciferáz reagenst használtunk az ATP szekréció mérésére. A kapott görbéken feljegyeztük a maximális aggregáció mértékét (maximális  $\Delta$ transzmisszió%) és az ATP felszabadulás mértékét ( $\mu mol ATP/10^{11}$  vérlemezke).

### *3.3.1.3 A VerifyNow P2Y12 teszt*

A VerifyNow P2Y12 teszt (Accumetrics, San Diego, CA) egy teljes vért használó point-of-care vizsgálat. A mérés egyszer használatos patronokban megy végbe, melyek két speciális agonistát és fibrinogénnel fedett gyöngyöket tartalmaznak. Az ADP hatására, PGE1 jelenlétében aktiválódó trombociták a mérés során fibrinogénnel fedett gyöngyökhöz kötődnek és agglutináció/aggregáció jön létre. A PGE1 jelenléte specifikálja a tesztet a P2Y12 receptor útvonalára, a P2Y1 receptor által közvetített válasz blokkolódik. Az agglutináció/aggregáció hatására a transzmisszió nő, melyet a készülék detektál és egy algoritmus segítségével kalkulálja az eredményt „P2Y12 reaction unit”-ként (PRU), mely arányos a clopidogrel hatékonyságával.

### *3.3.1.4 A vazodilatátor stimulált foszfoprotein (VASP) foszforiláció áramlási citometriai vizsgálata*

A VASP foszforiláció vizsgálatát a gyártó utasításai szerint hajtottuk végre a Biocytex (Marseille, Franciaország) által forgalmazott kereskedelemben kapható reagens-készlet felhasználásával. A teszt alapja, hogy PGE1 és ADP jelenlétében a VASP foszforilációjának mértéke arányos a vérlemezék clopidogrel általi gátlásával. A mintákat FacsCalibur áramlási citométerrel elemeztük. A VASP foszforilációjának mértékét az átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékekből számított vérlemezke reaktivitási index (PRI) formájában fejeztük ki a gyártó utasításai szerint.

### *3.3.1.5 Új módszer kidolgozása: P2Y12 specifikus trombocita aggregáció (ADP[PGE1])*

A hagyományos ADP-indukálta trombocita aggregációt módosítottuk annak érdekében, hogy P2Y12 receptor specifikus vérlemezke aggregációt kapjunk. A PRP-t 3 percig  $37^\circ C$ -on előinkubáltuk  $0,31 \mu M$  PGE1-el az ADP-indukálta aggregáció előtt, a P2Y1 receptor-hatás nemkívánatos hozzájárulásának felfüggesztése érdekében. A PGE1 hatásosságát a P2Y1 receptor útvonal hatásának blokkolására összehasonlítottuk a P2Y1 antagonistá adenzin  $-3'$ ,  $5'$ -difoszfát (A3P5P) hatásával. Előkísérleteink során  $20 \mu M$ ,  $40 \mu M$  és  $60 \mu M$  ADP-t használtunk, optimális aggregációt  $40 \mu M$  és  $60 \mu M$  ADP használata esetén tapasztaltunk, ezért a teszt végleges formájában  $40 \mu M$  ADP-t alkalmaztunk.

### **3.3.2 Aszpirin monoterápián és clopidogrel monoterápián lévő betegek vérmintáinak tesztelése a clopidogrel és aszpirin terápia monitorozására használt módszerekkel**

#### *3.3.2.1 Betegek*

Annak érdekében, hogy megtudjuk, hogy egy adott laboratóriumi módszert, mely az aszpirin vagy a clopidogrel hatásosságának vizsgálatára alkalmas, befolyásol-e más vérlemezkegátló egyidejű használata, egyedi kutatási tervet állítottunk fel. A betegbeválasztás során célunk volt hatásos aszpirin monoterápián és hatásos clopidogrel monoterápián lévő betegek kiválasztása, és a betegek vérmintáinak vizsgálata a nem szedett vérlemezkegátló hatásosságának vizsgálatára alkalmas tesztekkel. Kizárási kritérium minden vizsgálatban szereplő egyén esetén: nem szteroid gyulladáscsökkentő kezelés, krónikus májbetegség, hemoglobín koncentráció  $<80$  g/L, vérlemezkeszám  $>500 \times 10^9/L$  vagy  $<150 \times 10^9/L$ , akut fertőző betegség, ismert hemorrhagiás diathesis, egy hónapon belül műtét vagy ischaemiás esemény. Clopidogrel csoport: 101 beteg került beválogatásra, akik nem kardiogén ischaemiás cerebrovaszkuláris történés miatt legalább 1 hónapja napi 75 mg clopidogrel terápiaiban részesültek. Kizárásra került 48 beteg a vizsgálati csoportból, mert esetükben P2Y<sub>12</sub> receptor specifikus módszerrel nem lehetett clopidogrel hatást igazolni. A P2Y<sub>12</sub> receptor specifikus tesztekkel clopidogrel hatást mutató betegek mintáit az aszpirin hatás követésére használt módszerekkel vizsgáltuk (lásd később). A vizsgálat másik ágán (aszpirin csoport) 55 koszorúérbeteget választottunk be, akik legalább egy hónapja napi 100 mg aszpirin monoterápián voltak. Ötvenkét beteg esetében a COX-1 specifikus tesztekkel aszpirin hatásosságot mutattunk ki, ezen betegek mintáit a clopidogrel hatást vizsgáló hagyományos módszerekkel vizsgáltuk. Három beteg került kizárásra non-compliance miatt. Kontroll csoportként 140 egészséges önkéntest válogattunk be a vizsgálatba, akik semmilyen trombocita funkciót befolyásoló szert nem szedtek. A kontroll mintákat valamennyi, a betegcsoportok esetében alkalmazott módszerrel vizsgáltuk és referencia tartomány meghatározásra használtuk.

#### *3.3.2.2 Clopidogrel hatás vizsgálatára használt módszerek*

A clopidogrel hatás tesztelésére alkalmas módszereket az aszpirin monoterápián lévő betegek (aszpirin csoport) vérmintáin teszteltük. Ezek a módszerek: VASP foszforiláció mérése áramlási citometriával, ADP-indukálta trombocita aggregáció és szekréció, és az újonnan kifejlesztett, P2Y<sub>12</sub> specifikus aggregációs teszt (ADP [PGE<sub>1</sub>] teszt) (lásd korábban).

#### *3.3.2.3 Aszpirin hatás vizsgálatára használt módszerek*

Az aszpirin hatás tesztelésére alkalmas módszereket a clopidogrel monoterápián lévő betegek (clopidogrel csoport) vérmintáin teszteltük. Ezek a módszerek: AA-indukálta trombocita aggregáció és szekréció, AA-indukálta TB<sub>2</sub> képződés PRP-ből és a VerifyNow Aspirin teszt. A trombocita aggregáció és szekréció során 500 µg/mL (1,53 mM) AA agonistát használtunk. Az eredményeket a maximális aggregáció és ATP szekréció mértékével fejeztük ki a fent leírtaknak megfelelően. Az AA-indukálta TXB<sub>2</sub> képződés mértékét PRP-ből határoztuk meg. Az AA-stimulus hatására képződött TXB<sub>2</sub>-t szolid fázisú extrakcióval távolítottuk el, az extrahált TXB<sub>2</sub> mennyiségét az Assay Designs kompetitív ELISA módszerével határoztuk meg. Az eredményeket pg TXB<sub>2</sub>/10<sup>6</sup> trombocita mennyiségben fejeztük ki. A VerifyNow Aspirin teszt esetén használt patron AA agonistát tartalmaz. A mérést a gyártó utasításának megfelelően végeztük el, az eredményeket Aspirin Reaction Units (ARU) értékekben fejeztük ki.

### 3.4 Hemosztázis vizsgálatok pitvarfibrilláló betegekben a tromboembóliás szövődmények (stroke rizikó) jobb megértése érdekében

#### 3.4.1 Betegek és kontrollok

A Debreceni Egyetem Kardiológiai Klinikával kollaborációban két obszervációs eset-kontroll tanulmányt végeztünk, olyan betegek beválogatásával, akik bal pitvari elektrofiziológiás procedúrán estek át. Az első vizsgálat esetén célunk volt pitvarfibrilláló betegek és nem-pitvarfibrilláló kontrollok perifériás vérből nyert és intrakardiális (bal pitvari és bal fülcei) vérmintáinak összehasonlításával olyan hemosztázis és fibrinolízis eltérések azonosítása, amelyek magyarázzák a lokálisan fokozott tromboembóliás rizikót. A második vizsgálat esetén a pitvarfibrilláció transzkatóeteres ablációja során alkalmazott különböző antikoagulációs stratégiák koagulációra és fibrinolízisre kifejtett hatását vizsgáltuk a beavatkozás előtt ill. után vett bal pitvari vérmintákból. Mindkét tanulmány esetén a betegcsoportot katéterablációs terápiában részesülő, tünettel járó paroxysmalis és persistens pitvarfibrilláló betegek alkották. Az első vizsgálat esetén a kontroll csoportba kor és nem szerint illesztett egyéb supraventricularis tachycardia miatt bal pitvari radiofrekvenciás katéterabláció terápiában részesülő betegek kerültek. Az első vizsgálati populáció beválogatása és a mintagyűjtés 2013 október és 2015 december között, a második vizsgálati populáció esetén 2013 október és 2018 augusztus között történt. Az első vizsgálatban a pitvarfibrilláló betegeknél fázisos radiofrekvenciás vagy cryoballon katéterrel elvégzett pulmonális véna izoláció történt, a második vizsgálatban kizárólag cryoballon abláció történt. A nem pitvarfibrilláló, egyéb supraventricularis tachycardiában szenvedő kontroll csoportnál a bal pitvari forrás főként bal oldali járulékos atrio-ventricularis útvonal volt.

A betegcsoport beválogatási kritériumai az alábbiak voltak: 18-75 év, dokumentált, tünettel járó paroxysmalis vagy persistens pitvarfibrilláció, legalább egy antiarrhythmias gyógyszer hatástalansága, írásos beleegyező nyilatkozat aláírása. A kontroll csoport beválogatási kritériumai: 18-75 év, dokumentált pitvarfibrillációtól eltérő arrhythmia egyik: bal pitvari tachycardia, paroxysmalis supraventricularis tachycardia (orthodrom vagy antidrom) vagy bal oldali járulékos köteg miatt kialakuló FBI (gyors, széles, irreguláris) tachycardia, tünetmentes egyén 12 elvezetési EKG-ján látható praexcitatio, ha az elektrofiziológiai vizsgálat olyan bal oldali járulékos köteget mutat ki, mely a vezetési tulajdonságai alapján potenciálisan szignifikáns arrhythmia eredményezhet, írásos beleegyező nyilatkozat aláírása. A beteg- és kontroll csoport kizárási kritériumait illetően utalunk az eredeti közleményekre. A vizsgált populáció beválogatása előtt minden esetben felmérésre kerültek a stroke rizikófaktorai és a gyógyszeres terápia. Pitvarfibrilláló betegek esetén felmérésre került a stroke rizikóját becsülő CHADS<sub>2</sub> és CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc pontrendszer.

#### 3.4.2 Elektrofiziológiai beavatkozás és mintagyűjtés

Az első obszervációs vizsgálat esetén minden, a koagulációra vagy a trombocita aktivitásra potenciálisan befolyással bíró gyógyszer megszakításra került minimum három félétidővel korábban vagy a hatásuk teljes csökkenéséhez szükséges időtartammal korábban a beavatkozást megelőzően. A második obszervációs vizsgálatban, amelynek során a különböző perioperatív antikoagulációs eljárások hatását vizsgáltuk, a betegek az alábbi 3 preprocedurális antikoagulációs stratégia valamelyikében részesültek:

- 1/ Az orális antikoaguláns nélküli (*OAC mentes*) csoportban a betegek nem szedtek vérárvadásgátlót.
- 2/ A *VKA* csoport betegei legalább 30 napon keresztül *VKA*-t szedtek, és az abláció reggelén INR értékük terápiás tartományban (2-3) volt.

3/ A *dabigatran* csoport betegei legalább 30 napja 2x150 mg *dabigatran* terápiában részesültek, az utolsó dózist a beavatkozás előtt pontosan 2 órával kapták meg.

A fenti 3 csoportba a betegek aszerint kerültek, hogy az ablációra történő előjegyzéskor melyik antikoagulációs stratégián voltak, a vizsgálat nem volt randomizált. Az antikoaguláció hatásosságát a beavatkozás előtt közvetlenül nyert perifériás vérmintákból ellenőriztük, VKA esetén INR, *dabigatran* esetében direkt trombin inhibitor meghatározással.

A vérminták vétele több mintavételi helyről, minden esetben kanülön (sheath) keresztül történt. Az első vizsgálat során először a vena femoralisból, majd a bal pitvarból, ill. pigtail katéteren keresztül a bal fülcséből történt mintavétel. A mintavételi folyamat röviden a következőképpen zajlott: a jobb oldali vena femoralis-on Seldinger-technikával három szúrást ejtett az operátor, és mellékágakkal rendelkező vezető katétert helyeztek a vénába. A rövid vezető katéter behelyezése után közvetlenül, annak mellékágán keresztül 45 ml vérminta vételére került sor, melynek első 5 ml-ét eldobták, a katéteren belüli hemosztázis-aktiváció elkerülése végett (vena femoralis minta). A vérvétel után egy decapoláris katéter és egy intrakardiális ultrahangos (ICE) katéter került bevezetésre a sinus coronariusba, valamint a jobb pitvarba. A transseptális szúrás az ICE-katéter segítségével ultrahang vezérelten történt standard technikák szerint. A pitvari mintavételre a septumon való áthaladás után, a Mullins-katéter dilatátorának eltávolítása után került sor (45 ml pitvari vér, első 5 ml eldobásra került). A bal pitvari mintavétel után az első vizsgálatban 5F pigtail katéter használatával jutott az operátor a bal fülcsébe (45 ml vérminta, az első 5 ml eldobásával). A bal fülcséi vérvételt követően azonnal 150 IU/testtömeg kg intravénás heparin adása következett, majd standard protokollok szerint elvégezték az ablációs beavatkozást.

A második tanulmányban, melyben különböző preprocedurális antikoagulációs stratégiák hatását vizsgáltuk intrakardiálisan cryoabláció alatt, a bal pitvarból történt mintavétel az abláció előtt (PRE) és közvetlenül után (POST). Az abláció előtti bal pitvari vérmintákat a műanyag hüvelyen (sheath) keresztül közvetlenül a transseptális szúrás és a dilatátor eltávolítása után vették le, az intravénás heparin adása előtt. Az abláció utáni bal pitvari vérminták levétele hasonló módon történt az utolsó applikációt követően az ablációs katéter eltávolítása után. Az operátor 45 ml vérmintát vett minden esetben, amelyekből az első 5 ml vér nem került felhasználásra. A vérmintákat vakuténeres csövekbe gyűjtöttük (0,109 M nátrium-citrátot, ill. CTAD-t tartalmazó csövekbe). Az antikoagulált vérminták plazma mintáit -80 °C-on tároltuk.

### **3.5 Etikai engedélyek**

Valamennyi klinikai tanulmány és az egészséges önkéntesek bevonásával történt vizsgálatok tervezése a Helsinki deklarációs egyezmény figyelembevételével történt. A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottsága, ill. az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága is engedélyezte. A vizsgálatról a betegek vagy hozzátartozóik és az önkéntesek megfelelő tájékoztatásban részesültek és önkéntes, írásos beleegyező nyilatkozatot adtak a tanulmányban való részvételről.

### **3.6 Statisztikai analízis**

Az adatok statisztikai elemzésére a Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 26.0 verzió, Chicago, IL) és a GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Inc., La Jolla, CA) szoftvereket használtunk. A tanulmányok során vizsgált adatok normalitásának meghatározására a Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztunk. Folyamatos változók esetén két csoport közötti különbség meghatározására Student-féle t-próbát, vagy Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk, párosított adatok esetén párosított t-próbát vagy Wilcoxon párosított tesztet használtunk a normalitástól

függően. Több csoport adatainak folyamatos változói esetén ANOVA tesztet Bonferroni post hoc tesztel, vagy Kruskal-Wallis tesztet és a Dunn-féle post hoc tesztet használtunk a normalitás próba eredményeinek megfelelően. A trombolízis egyes hemosztázis faktorokra kifejtett hatását Friedman's kétirányú ANOVA-tesztel, valamint Dunn-Bonferroni post hoc tesztel vizsgáltuk. Néhány esetben az adatok logaritmikus transzformálását követően, az adjusztált átlagok közti különbségek vizsgálatára egymintás ANCOVA-tesztet alkalmaztunk. A folytonos változók közötti összefüggések erősségének vizsgálatához Pearson vagy Spearman féle korrelációs analízist alkalmaztunk. A kategorikus változók közötti különbségek vizsgálata  $\chi^2$  tesztel vagy Fisher-féle egzakt tesztel történt az esetszámoktól függően. A módszerek diagnosztikai hatékonyságának jellemzésére ROC (receiver operating characteristics) analízist végeztünk. A diagnosztikai határértékek meghatározása a Youden-féle J index használatával történt. A tesztekre jellemző szenzitivitás, specificitás, pozitív prediktív értékek (PPV), és a negatív prediktív értékek (NPV) kiszámítása kontingencia táblázatok segítségével  $\chi^2$  teszt vagy Fisher-féle egzakt tesztek alapján történt. A Kaplan-Meier módszert alkalmaztuk a betegek túlélési arányának ábrázolására, a túlélési görbéket a log-rank tesztel hasonlítottuk össze. Backward bináris logisztikus regressziós modelleket használtunk a vizsgált kimenetek független prediktorainak meghatározására. A regressziós modellek azokat a változókat tartalmzták, melyek az egyváltozós statisztikai modellek esetén szignifikáns eltérést mutattak a különböző kimenetelű csoportok között, vagy irodalmi adatok alapján lényeges tényezőnek bizonyultak a vizsgált kimenet szempontjából. A logisztikus regressziós analízis eredményeit esélyhányadosban (OR) és 95%-os konfidencia intervallumban (CI) fejeztük ki. A clopidogrel terápia vizsgálatára alkalmas módszerek esetén referencia tartomány meghatározást végeztünk a CLSI ajánlásai alapján. A diagnosztikai hatékonyságot (diagnostic efficacy: DE) ezen módszerek esetén a VASP foszforilációs teszthez viszonyítva határoztuk meg százalékban. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 Hemosztázis vizsgálatok akut ischaemiás stroke betegekben az intravénás trombolízis kimenetelének vizsgálatára

#### 4.1.1 Prospektív obszervációs tanulmányok: a betegek alapadatai és kimenetele

Az első prospektív, obszervációs tanulmányban (betegek beválogatása: 2011 március - 2013 január) 131 konsekutív, intravénás trombolízisben részesülő AIS betegben vizsgáltuk a VWF, FVIII, FXIII, PAI-1 szinteket a trombolízis előtt, közvetlenül a lízis után ill. 24 órával a lízist követően. A második prospektív, obszervációs tanulmány esetén a betegek beválogatása folytatódott (2016 szeptember - 2019 április) és összesen 421 intravénás trombolízis kezelésben részesülő AIS beteg került beválogatásra, akikben a trombolízis előtt ill. 24 órával a lízist követően vizsgáltuk az  $\alpha$ 2-PI szinteket, továbbá a betegek egy része esetén (n=131) közvetlenül a lízist követően is. Az első kohorsz esetén a betegek átlagéletkora  $69,0 \pm 12,2$  év volt, 58,3%-uk férfi volt. A felvételi NIHSS pontszám mediánja 8 (IQR: 5-14) volt. A TOAST kritériumok szerint a legtöbb beteg esetén a stroke etiológiája nagyér aterotrombózis volt (37,1%). A tünetek megjelenésétől az rt-PA kezelésig eltelt idő átlaga kevesebb, mint 3 óra volt a kohorszban. Kedvező rövid távú és hosszú távú funkcionális kimeneteleket 40,2%, ill. 34,8%-ban figyeltünk meg. A mortalitás a 7. napon, a 14. napon és az esemény utáni 3. hónap végére 3,8%, 13,6% és 22,0% volt. A lízist követően kialakuló intrakraniális vérzés 13 esetben (9,8%) került leírásra, mely 6 esetben (4,5%) SICH, 7 esetben (4,5%) pedig aSICH volt.

A második kohorsz alapadatai és a vizsgált kimenetelek hasonlóan alakultak az első tanulmány esetén látottakhoz. A kohorsz medián életkora 68 (IQR: 60-77) év volt, a betegek 57,2%-a férfi volt. A felvételi NIHSS érték mediánja 7 volt (IQR: 4-11). A tünetek megjelenésétől az rt-PA-kezelésig eltelt idő mediánja 150 (IQR: 115-185) perc volt. A leggyakoribb cerebrovaszkuláris rizikófaktor a magas vérnyomás volt (82,2%). Kedvező rövid és hosszú távú kimenetel a betegek 45,2%-ánál, ill. 48,6%-ánál volt megfigyelhető (a lízis után vérzést szenvedett eseteket külön csoportként kezelve). A trombolízishez köthető intrakraniális vérzéses szövődmény 34 betegnél (8,1%) fordult elő, 14 esetben (a teljes kohorsz 3,3%-a) volt SICH, 20 betegnél (a teljes kohorsz 4,8%-a) pedig aSICH komplikáció alakult ki.

#### 4.1.2 A trombolízis hatása a vizsgált hemosztázis ill. fibrinolitikus faktorok szintjére

A trombolízis előtti mintákban a FVIII aktivitás és VWF antigén szintek medián értéke a referencia tartomány felett volt (FVIII aktivitás medián: 188,0; IQR: 153,0-242,0%, VWF antigén: 201,3; IQR: 169,1-259,6%). Közvetlenül a trombolízis után a FVIII aktivitás nagymértékű, szignifikáns csökkenést mutatott a terápia előtti értékekhez képest (medián: 102,0; IQR: 62,0-155,5%;  $p < 0,001$ ), majd 24 órával később ismét megemelkedett a szintje (medián 166,0; IQR: 130,0-209,0%;  $p = 0,014$ ). Ezzel ellentétben a VWF antigén szintje folyamatos emelkedést mutatott a három egymást követő mintavételi időpontban. Figyelemre méltó, hogy a VWF antigén szintek medián és IQR értékei minden vizsgált időpontban a referencia tartomány felett helyezkedtek el.

A FVIII aktivitás és VWF antigén értékek a trombolízis előtti mintákban jó korrelációt mutattak (Spearman  $r = 0,748$ ,  $p < 0,001$ ), azonban közvetlenül a trombolízis után nem mutattak szignifikáns korrelációt ( $r = 0,093$ ,  $p = 0,299$ ), melynek hátterében feltehetőleg plazmin mediált FVIII degradáció állhat. Közepes mértékű korreláció volt megfigyelhető 24 órával a trombolízist követően ( $r = 0,420$ ,  $p < 0,001$ ).

A trombolízis előtti FXIII aktivitás és antigénszintek a betegek jelentős részében (n=39) szintén

emelkedettek voltak. A FXIII szintek fokozatos csökkenést mutattak a trombolízis során, a legalacsonyabb szinteket 24 órával a trombolízist követően detektáltunk (FXIII aktivitás trombolízis előtt és 24 órával trombolízis után:  $126,1 \pm 36,1\%$  és  $116,6 \pm 35,0\%$ ;  $p=0,034$ ). A FXIII szintek a trombolízis során egy kivételével minden betegnél a referencia tartomány alsó határa felett maradtak. A FXIII aktivitás és antigénszintek erős korrelációt mutattak mindhárom vizsgált időpontban (Pearson  $r=0,915$ ,  $p<0,001$ ;  $r=0,919$ ,  $p<0,001$  és  $r=0,917$ ,  $p<0,001$ ).

A PAI-1 aktivitás trombolízis előtt valamennyi beteg esetén a referencia tartományban volt, de a trombolízis hatására egyöntetűen minden betegben, szignifikáns mértékben, a detektálhatóság alsó határára csökkent (medián:  $0,94$ ; IQR:  $0,73-1,18$  U/mL). A trombolízist követően 24 órával a PAI-1 aktivitás jelentős mértékben megemelkedett, minden beteg esetén meghaladta a referencia tartomány alsó határát. A PAI-1 antigén szintek nem változtak a trombolízis hatására. A PAI-1 aktivitás és antigénszintek közötti legjobb korrelációt 24 órával a trombolízis után detektáltuk (Spearman  $r=0,752$ ,  $p<0,001$ ).

A felvételtkor  $\alpha 2$ -PI aktivitás és az antigénszintek meglepően széles eloszlást mutattak, de a betegek többsége esetén az  $\alpha 2$ -PI szintek a referencia határértékeken belül voltak. Mind az  $\alpha 2$ -PI aktivitás, mind az  $\alpha 2$ -PI antigénszintek szignifikáns csökkenést mutattak közvetlenül a trombolízis után, jelezve, hogy a terápia során a képződött szabad plazmin gyorsan komplexet alkot az  $\alpha 2$ -PI-al. Közvetlenül a trombolízis után az  $\alpha 2$ -PI-aktivitás és az  $\alpha 2$ -PI antigénszint minden betegnél a referencia tartomány alatt volt ( $\alpha 2$ -PI aktivitás medián:  $8$ ; IQR:  $1-29\%$ ;  $\alpha 2$ -PI antigén medián:  $11,3$ ; IQR:  $8,2-17,3$  mg/L). Huszonnégy órával a trombolízis után az  $\alpha 2$ -PI aktivitás és az  $\alpha 2$ -PI antigénszintek jelentősen megemelkedtek, de a betegek jelentős hányadában még mindig az alsó referencia határtérték alatt maradtak ( $\alpha 2$ -PI aktivitás medián:  $76$ ; IQR:  $66-86\%$ ;  $\alpha 2$ -PI antigén medián:  $39,4$ ; IQR:  $34,1-46,1$  mg/L). Az  $\alpha 2$ -PI aktivitás és antigénszintek között a legerősebb korrelációt ( $r=0,770$ ; 95% CI:  $0,723-0,808$ ;  $p<0,001$ ) a trombolízis után 24 órával mért plazma mintákban figyeltük meg. Érdekes módon ebben a kohorszban a felvételtkor mintákból meghatározott  $\alpha 2$ -PI aktivitás és antigénszintek közötti összefüggést találtuk a leggyengébbnek ( $r=0,560$ ; 95% CI:  $0,486-0,627$ ;  $p<0,001$ ), a közvetlenül lízis utáni korreláció mértéke is erősebb volt ( $r=0,705$ ; 95% CI:  $0,600-0,787$ ;  $p<0,001$ ).

#### **4.1.3 A vizsgált hemosztázis tényezők összefüggése a stroke súlyosságával és etiológiájával**

Súlyosabb AIS esetén (NIHSS 6-16 és NIHSS  $>16$ ) a felvételtkor mért VWF antigén szintek szignifikánsan magasabb értéket mutattak az enyhébb esetekhez (NIHSS 0-5) képest. A VWF szintek a súlyosabb stroke csoportok esetén további, szignifikáns emelkedést mutattak a trombolízist követően. A FVIII szintek esetén nem volt megfigyelhető hasonló szignifikáns összefüggés. A VWF és a stroke súlyossága között megfigyelt összefüggés szignifikáns maradt a befolyásoló tényezőkre való adjusztálást követően is (aktív dohányzás, CRP, kor).

A súlyosabb AIS és az emelkedett VWF kapcsolatát az a megfigyelés is alátámasztotta, hogy a 24 órás kontroll CT vizsgálat esetén a kedvezőtlenebb ASPECTS pontokhoz (ASPECTS 7-0) szignifikánsan magasabb VWF antigén szintek társultak minden mintavételi időpontban. FVIII esetén közvetlenül a trombolízis utáni időpontban nem volt szignifikáns összefüggés a 24 órás kontroll CT kedvezőtlen ASPECTS pontértékeivel, azonban a lízis előtti és 24 órával trombolízis utáni FVIII értékek esetén már szignifikáns kapcsolat volt kimutatható. Az összefüggések mindkét paraméter esetén szignifikánsak maradtak a befolyásoló tényezőkre (aktív dohányzás, CRP, kor) való adjusztálás után is. A TOAST kritériumok által meghatározott etiológiai altípusok és a FVIII aktivitás, ill. a VWF antigén szintek között nem találtunk szignifikáns kapcsolatot.

A FXIII szintek nem mutattak összefüggést a stroke súlyosságával. A TOAST kritériumok által meghatározott stroke etiológiai altípusokkal azonban a FXIII szintek mutattak összefüggést, kardioembóliás eredetű stroke esetén a FXIII szintek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak az aterotrombotikus eredetű stroke esetekhez képest.

A PAI-1 aktivitás és antigén szintek a stroke klinikai súlyosságával és a stroke etiológiájával nem mutattak összefüggést. A trombolízis előtti PAI-1 aktivitás és PAI-1 antigénszint azonban szignifikánsan magasabb volt azokban a betegekben, akik CT felvételét 24 órával a lízist követően alacsonyabb ASPECTS pontszámmal (7-0) értékelték, tehát esetükben radiológiailag értékelve súlyosabb eltérés igazolódott.

A felvételi  $\alpha$ 2-PI szintek szignifikáns összefüggést mutattak a stroke súlyosságával. Azok a betegek, akik a felvételi NIHSS értékük alapján súlyosabb stroke-ban szenvedtek, szignifikánsan alacsonyabb  $\alpha$ 2-PI szinttel rendelkeztek. Fordított, lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető a stroke súlyossága és a felvételi  $\alpha$ 2-PI antigénszintek között, hasonló, de gyengébb összefüggést találtunk a lízis után 24 órával vett minták esetén. A trombolízis után közvetlenül meghatározott  $\alpha$ 2-PI szintek nem mutattak szignifikáns összefüggést a stroke súlyosságával. A felvételi  $\alpha$ 2-PI antigénszintek kísér infarktusok esetén voltak a legmagasabbak, míg a legalacsonyabb szintek kardioembóliás eredetű stroke-ok esetén voltak megfigyelhetők ( $\alpha$ 2-PI antigén medián: 61,8; IQR: 56,3-72,8 mg/L vs. 56,6; IQR: 52,3-64,2 mg/L;  $p=0,024$ ).

#### 4.1.4 A vizsgált hemosztázis tényezők összefüggése a stroke kimenetelével

*Rövid távú kimenetel.* Az akut stroke után 7 nappal, az NIHSS pontrendszer változása alapján meghatározott rövid távú kimenetellel a vizsgált paraméterek közül kizárólag a felvételi  $\alpha$ 2-PI szintek mutattak összefüggést. Szignifikánsan alacsonyabb FXIII szintek voltak megfigyelhetők a trombolízist követően azokban a betegekben, akik a terápiát követő 14. napig elhunytak. Logisztikus regressziós modellben a trombolízis után 24 órával mért, alsó kvartilisbe tartozó FXIII aktivitás független rizikófaktornak bizonyult a 14. napi mortalitásra vonatkozóan (OR: 4,95; 95% CI: 1,31-18,68;  $p=0,0018$ , adjusztált faktorok: kor, nem, CRP, dohányzás, felvételi NIHSS).

*Hosszú távú kimenetel.* Az AIS-t követően 90 nappal mért kedvezőtlen funkcionális kimenetel (modelltől függően  $mRS \geq 2$  vagy  $mRS \geq 3$ ) szignifikáns összefüggést mutatott olyan jól ismert rizikófaktorokkal, mint az életkor, magasabb felvételi NIHSS érték, emelkedett CRP, diabetes mellitus. Mindezekon kívül a hosszú távú funkcionális kimenetellel ugyancsak szignifikáns összefüggést mutattak a 24 órás kontroll CT ASPECTS értékei.

A vizsgált hemosztázis paraméterek közül a kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel a közvetlenül trombolízis utáni minta emelkedett VWF antigén szintje, valamint a 24 órával a trombolízis utáni mintákból származó emelkedett FVIII aktivitás és emelkedett VWF antigén szint mutatott szignifikáns kapcsolatot. A trombolízis előtt meghatározott hemosztázis paraméterek közül csak az alacsony felvételi  $\alpha$ 2-PI antigénszintek mutattak összefüggést a hosszú távú kimenetellel (lásd később).

Bináris backward logisztikus modellünk eredményei szerint az első vizsgált kohorszban a közvetlenül a trombolízis után ill. a 24 órával a trombolízis után vizsgált, referencia tartomány fölötti FVIII aktivitás és VWF antigén szignifikánsan és függetlenül jelezte a kedvezőtlen hosszú távú funkcionális kimenetel nagyobb esélyét. A közvetlenül a trombolízis utáni emelkedett FVIII aktivitás független esélyhányadosa OR: 7,10 (IQR: 1,77-28,38;  $p=0,006$ ), az emelkedett VWF független esélyhányadosa OR: 6,31 (IQR: 1,83-21,7;  $p=0,003$ ) volt a kedvezőtlen hosszú távú kimenetelre vonatkozóan (a logisztikus regressziós modellben az életkor, emelkedett CRP, aktív dohányzás, diabetes mellitus, felvételi kor meghatározott  $>5$



NIHSS érték, >168% FVIII aktivitás, >160% VWF antigén szint szerepelt). Az általunk használt statisztikai modell szerint tehát a közvetlenül a trombolízis után vagy a 24 órával a trombolízis után mért emelkedett FVIII aktivitás és emelkedett VWF antigén szint a kedvezőtlen hosszú távú kimenetel független prediktora (megjegyzendő azonban, hogy az OR korlátozottan alkalmas relatív kockázat becslésre).

Az egyéb vizsgált hemosztázis paraméterek közül kizárólag a felvételi  $\alpha$ 2-PI szintek mutattak összefüggést az előre meghatározott kedvezőtlen funkcionális kimenetellel. Azok a betegek, akik elhunytak (mRS 6) vagy kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel rendelkeztek (mRS 2-5), szignifikánsan alacsonyabb  $\alpha$ 2-PI-antigénszinttel rendelkeztek felvételnél azokhoz képest, akik az esemény után 90 nappal a legkedvezőbb kimenetelt mutatták (mRS 0-1 medián: 61,6; IQR: 55,9-70,5 mg/L vs. mRS 2-5 medián: 59,7; IQR: 54,5-69,1 mg/L vs. mRS 6 medián: 56,0; IQR: 48,5-61,0 mg/L;  $p < 0,001$ ). Kaplan-Meier túlélési analízis során úgy találtuk, hogy azok a betegek, akik a kórházi felvételnél a legfelső kvartilisnek megfelelő  $\alpha$ 2-PI antigénszinttel rendelkeztek, szignifikánsan jobb túlélést mutattak, mint azok, akiknél az  $\alpha$ 2-PI antigénszint a legalacsonyabb kvartilisben volt (HR: 4,54; 95% CI: 1,92-10,8;  $p < 0,001$ ).

Backward bináris logisztikus regressziós modellt használva (1. modell: hiperlipidémia, BMI, diabetes mellitus, nem és CRP) kimutattuk, hogy a felvételnél a legalacsonyabb kvartilisben lévő  $\alpha$ 2-PI antigénszint szignifikáns előrejelzője a kedvezőtlen (mRS 2-6) hosszú távú kimenetelnek (OR: 2,10; 95% CI: 1,21-3,66;  $p = 0,008$ ) és halálozásnak (mRS 6) 3 hónappal a trombolízis után (OR: 2,22; 95% CI: 1,15-4,31;  $p = 0,018$ ). Amikor azonban az életkort és az NIHSS-t is bevettük a modellekbe, az  $\alpha$ 2-PI antigénszint hatása már nem bizonyult szignifikánsnak, és csak az életkor és az NIHSS maradt a modellben mindkét kimenetel független prediktoraként.

Bár többszörös logisztikus regressziós analízis szerint a FXIII szintek egyik vizsgált időpontban sem bizonyultak a hosszú távú kimenetel független előrejelzőjének, megjegyzendő, hogy a FXIII szintek a lízis után 24 órával szignifikánsan alacsonyabbak voltak azoknál a betegeknél, akik az eseményt követő 3. hónap végéig elhunytak.

*Intrakraniális hemorrhagia kialakulása.* A trombolízissel kapcsolatba hozható vérzéses szövődeményekkel a vizsgált hemosztázis paraméterek közül csak a trombolízist követően emelkedett VWF antigén szintek és a felvételnél alacsony  $\alpha$ 2-PI értékek mutattak szignifikáns kapcsolatot. Huszonnégy órával a trombolízis után mért emelkedett VWF antigén szintek szignifikáns összefüggést mutattak a SICH kialakulásával (nincs vérzés/aSICH esetén VWF antigén szintek mediánja: 226,8; IQR: 176,5-279,4%, míg SICH esetén a VWF antigén szintek mediánja: 347,5; IQR: 263,3-372,1%;  $p = 0,017$ ).

A második vizsgált kohorszban a lízis után ICH-t szenvedő betegeknél ( $n = 32$ ) a felvételi  $\alpha$ 2-PI antigén szint szignifikánsan alacsonyabb volt azokhoz képest, akiknél nem volt vérzéses szövődemény. Ez az összefüggés nem volt megfigyelhető a betegek lízis utáni mintáiban ill. az  $\alpha$ 2-PI aktivitás esetén egyik mért időpontban sem. A felvételnél medián  $\alpha$ 2-PI antigénszintek közötti különbség, bár szignifikáns, de csekély mértékű volt a lízist követően agyvérzett ill. a szövődéymenyes betegek között (nincs ICH medián: 59,8; IQR: 54,0-68,0 mg/L vs. ICH: 57,0; IQR: 53,4-61,7 mg/L;  $p = 0,036$ ). Nem volt megfigyelhető szignifikáns korreláció a lízis utáni becsült hematoma térfogata és a felvételnél  $\alpha$ 2-PI antigénszintje között ( $r = 0,207$ ; 95% CI: -0,176-0,536;  $p = 0,272$ ). Az  $\alpha$ 2-PI antigén ill. aktivitás szintek nem különböztek a SICH és aSICH alcsoportokban a vizsgált időpontokban. A várakozásoknak megfelelően az NIHSS szignifikánsan magasabb volt az ICH-t szenvedett betegeknél, a vérzéses komplikáció nélküli betegekhez képest (medián: 12; IQR: 7-32 vs. 6,5; IQR: 4-36;  $p < 0,001$ ).

#### 4.1.5 A vizsgált fibrinolízis inhibitorok gyakori polimorfizmusainak összefüggése a trombolízis kimenetelével

Valamennyi vizsgált polimorfizmus (FXIII-A p.Val34Leu, FXIII-A p.Tyr204Phe, FXIII-B p.His95Arg, FXIII-B intron K c.1952+144 C>G,  $\alpha$ PI p. Arg6Trp, PAI-1 4G/5G) allélfrekvenciája a Hardy-Weinberg-egyensúlynak megfelelően alakult a kohorszban, és gyakorlatilag megegyezett az 1000 Genom projektben található, európai alcsoportra vonatkozó allélgyakoriságokkal. A korábbi irodalmi adatokkal összehangban a FXIII-A p.Val34Leu, FXIII-A p.Tyr204Phe és FXIII-B p.His95Arg polimorfizmusok nem befolyásolták a FXIII szinteket. A FXIII-B intron K c.1952+144 G allél hordozói esetén szignifikánsan alacsonyabb FXIII szint volt megfigyelhető a nem hordozókhöz képest (FXIII aktivitás:  $114,5 \pm 30,9\%$  vs.  $130,5 \pm 36,9\%$ ;  $p=0,021$ , ill. FXIII antigén szint:  $19,3 \pm 1,2$  vs.  $23,5 \pm 0,8$  mg/L;  $p=0,004$ ), de az ismert befolyásoló tényezőkre (életkor, CRP, dohányzás) való statisztikai adjusztálás után a különbségek nem voltak szignifikánsak a csoportok között. A vizsgált FXIII polimorfizmusok egyike sem mutatott szignifikáns összefüggést a stroke súlyosságával, a terápia kedvezőtlen rövid- vagy hosszú távú kimenetelével, a terápiával összefüggő szimptomatikus intrakraniális vérzés kialakulásával és mortalitással. A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus esetében megfigyelhető volt ugyan egy tendencia, mely szerint a FXIII-A Leu34 allél hordozása védő hatású lehet a kedvezőtlen rövid távú kimenetellel szemben (OR: 0,33; 95% CI: 0,09-1,10), de az összefüggés ennél az esetszámnál statisztikailag nem volt szignifikáns ( $p=0,072$ ). Az  $\alpha$ 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus egyetlen mért időpontban sem volt hatással az  $\alpha$ 2-PI aktivitásra vagy antigénszintekre, és nem mutatott összefüggést a stroke súlyosságával, etiológiájával vagy kimenetelével.

A PAI-1 4G/5G polimorfizmus ezzel ellentétben a lízis utáni vérzéses transzformáció szignifikáns, független előrejelzőjének bizonyult. Bináris, backward logisztikus regressziós modellt alkalmazva az első vizsgált kohorsz esetén (elemi: életkor, nem, BMI, felvételi NIHSS, hipertónia, hiperlipidémia, PAI-1 4G/5G genotípus) a vérzés esélye a PAI-1 5G/5G homozigóta betegeknél csaknem ötszörös volt (OR: 4,75, 95% CI: 1,18-19,06;  $p=0,028$ ). A PAI-1 5G/5G genotípusú betegeknél a lízis utáni intrakraniális vérzés térfogatának mediánja tendenciájában nagyobb volt a PAI-1 4G hordozókhöz képest, bár feltehetőleg a relatíve kis esetszám miatt a különbség nem volt szignifikáns és az eredmények igazolása érdekében a jövőben további vizsgálatok szükségesek (medián: 16,82; IQR: 1,46-58,16  $\text{cm}^3$  vs. medián: 0,67; IQR: 0,26-13,55  $\text{cm}^3$ ;  $p=0,09$ ).

#### 4.1.6 A trombus méretének (clot burden) szerepe a trombolízis sikerére nézve

##### 4.1.6.1 A betegek alapadatai és kimenetele

A harmadik, eset-kontroll típusú prospektív obszervációs vizsgálatunkba összesen 200, olyan anterior keringés területi AIS-ben szenvedő beteget vontunk be, akiknél intravénás trombolízis történt rt-PA-val: 100 LVO (CBS 0-9) és 100 LVO nélküli (CBS 10) kontroll AIS beteget, életkor- és nem szerint illesztve. A dohányzás lényegesen gyakoribb és az NIHSS szignifikánsan magasabb volt a CBS 0-9 csoportban. Jelentős különbségek voltak mind a radiológiai, mind a klinikai kimenetekben a két csoport között. A CBS 0-9 csoporthoz tartozó betegek esetén szignifikánsan gyakoribb volt a kedvezőtlen kimenetel rövid- és hosszú távon is, ill. alacsonyabb volt az ASPECTS pontszám a 24 órás kontroll CT vizsgálat során. A rutin laboratóriumi paraméterek közül a CRP szignifikánsan magasabb volt a CBS 0-9 csoportban. A plazminogén aktivitás a felvételnél szignifikánsan magasabb volt a CBS 0-9 csoportban, míg más hemosztázis paraméterek nem különböztek érdemben a két csoport között.

A CBS 0-9 csoportban 11 betegnél alakult ki vérzéses transzformáció (11%), míg a CBS 10 csoportban ez a szövődmény 7 betegnél fordult elő (7%). Eredményeink alapján a két CBS csoportban kialakuló intrakraniális vérzés aránya az ECASS II (aSICH vagy SICH) szerint osztályozva nem mutatott szignifikáns különbséget, ami arra utal, hogy a vérrög mérete nem állt szoros összefüggésben a lízis utáni vérzéses szövődményekkel a vizsgált kohorszban.

A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus allélfrekvenciája Hardy-Weinberg egyensúlyban volt a teljes kohorszt vizsgálva (FXIII-A Val34Val: n=112 [56%], FXIII-A Val34Leu: n=78 [39%] és FXIII-A Leu34Leu: n=10 [5%]). A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmusának allélfrekvenciája egyik CBS csoportban sem volt szignifikánsan különböző egy nagy populációs kontrollcsoporthoz viszonyítva. A FXIII-A Leu34 alléje ugyanakkor szignifikánsan gyakoribb volt a CBS 10 csoportban. Egyváltozós analízis során a FXIII-A Leu34 allél jelenléte jelentős védőhatást mutatott a nagyobb vérrögök (CBS 0-9) kialakulásával szemben (OR: 0,52; 95% CI: 0,30-0,92; p=0,0227).

#### *4.1.6.2 A CBS összefüggése a rövid- ill. hosszú távú funkcionális kimenetellel*

Annak felderítésére, hogy mely klinikai vagy laboratóriumi paraméterek mutatnak összefüggést a trombolízis kimenetelével, bináris, backward, többváltozós logisztikus regressziós statisztikai modellt hoztunk létre. Az egyváltozós elemzések alapján az alacsony CBS, a felvételi magasabb NIHSS, a korábbi stroke és felvételi magasabb plazminogén szint szignifikáns összefüggést mutatott a kedvezőtlen rövid távú kimenetellel. A FXIII-A Leu34 allél szignifikánsan gyakoribb volt a CBS 10-es betegcsoportban, a polimorfizmus ugyanakkor nem mutatott összefüggést a rövid távú kimenetelekkel. A többszörös logisztikus regressziós modell alapján (elemei: életkor, nem, előző stroke, felvételi NIHSS, felvételi plazminogén aktivitás, ill. CBS) csak az életkor, az NIHSS és a CBS bizonyult a rossz rövid távú kimenetel független prediktorának (CBS 0-9 vs. 10: OR: 2,78; 95% CI: 1,44-5,36; p=0,002).

A hosszú távú kimenetel vizsgálata során az egyváltozós analízisek alapján az idősebb kor, diabetes mellitus, alacsonyabb CBS, magasabb felvételi NIHSS, emelkedett szérum glükóz, emelkedett CRP, emelkedett kreatinin, magasabb felvételi D-dimer érték, magasabb felvételi fibrinogén szint és az alacsonyabb 24 órás FXIII aktivitás szignifikáns összefüggést mutatott a kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel. A rövid távú kimenetel esetén megfigyeltekhez hasonlóan a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus nem mutatott összefüggést a hosszú távú kimenetelekkel ebben a betegcsoportban. A bináris, backward többszörös regressziós modellben a CBS (CBS 0-9 vs. 10: OR: 2,50; 95% CI: 1,18-5,31; p=0,017), továbbá az életkor, felvételi NIHSS és felvételi kreatinin bizonyult a hosszú távú funkcionális kimenetel független prediktorának.

### **4.1.7 Experimentális vizsgálatok a fibrinolízis regulációjának jobb megértése érdekében**

#### *4.1.7.1 A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus hatása a celluláris elemeket is tartalmazó vérrögök súlyára*

Mivel vizsgálataink alapján úgy találtuk, hogy a trombolízis sikerének egyik legfontosabb korlátja a lizálandó alvadék mérete, felmerül a kérdés, hogy milyen mechanizmusok felelősek a vérrögök méretének ill. tömegének szabályozásáért. A celluláris elemeket is tartalmazó vérrögök tömegének meghatározó tényezőit *in vitro* rekonstitúciós modellekben vizsgáltuk. Mivel eset-kontroll tanulmányunkban, egyváltozós analízisben a FXIII-A Leu34 allél jelenléte jelentős védőhatást mutatott a nagyobb vérrögök (CBS 0-9) kialakulásával szemben (OR: 0,52; 95% CI: 0,30-0,92; p=0,0227), továbbá irodalmi adatok a Leu34 allél protektív szerepét írták le myocardialis infarctus kialakulásával szemben, a polimorfizmus hatását érdekes volt *in vitro* kísérletekben is vizsgálni a celluláris elemeket is tartalmazó vérrögök súlyára nézve. Továbbra is kihívás annak a látszólagos struktúra-funkció ellentmondásnak a feloldása, mely szerint a

FXIII-A Leu34 allél jelenlétében a FXIII aktiváció mértéke mintegy 2,5-szeresre gyorsul a FXIII-A Val34 variánshoz képest, ugyanakkor FXIII-A Leu34 allél jelenlétében megfigyelt gyorsabb FXIII aktiváció klinikai szempontból védő hatásként érvényesül az aterotrombotikus eseményekkel (myocardialis infarctus) szemben.

Az első kísérletsorozatban 86 ismert FXIII-A p.Val34Leu genotípusú (n=40 FXIII<sup>Val/Val</sup>, n=28 FXIII<sup>Val/Leu</sup> és n=18 FXIII<sup>Leu/Leu</sup>) egészséges egyéntől nyertünk trombotocitaszegény plazmát. Az ismert FXIII-A p.Val34Leu genotípusú alanyok nem különböztek az alábbi paraméterekben: életkor, FXIII aktivitás, APTI, PI ill. a trombin generációs paraméterek közül a lag time és a time to peak paraméter. A FXIII<sup>Val/Val</sup> genotípusú alanyok fibrinogén szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a FXIII<sup>Val/Leu</sup> és FXIII<sup>Leu/Leu</sup> genotípusú alanyokhoz képest. A FXIII<sup>Val/Leu</sup> genotípusú egyének esetén fokozott volt a peak thrombin paraméter a FXIII<sup>Val/Val</sup> ill. FXIII<sup>Leu/Leu</sup> genotípusú egyénekhez képest. Az ETP szignifikánsan különbözött a csoportok között, bár a különbségek marginálisak voltak.

Az egyes plazma mintákat 0 negatív vércsoportú donoroktól származó vörösvértestekkel és FXIII<sup>Val/Val</sup> donortól izolált mosott vérlemezkékkel egészítettük ki, majd szöveti faktor/foszfolipidek és CaCl<sub>2</sub> hozzáadásával vérrögöket képeztünk. A vérrögök képződését és retrakcióját követően megmértük az egyes vérrögök tömegét. Az átlagos normalizált vérrög tömeg szignifikánsan korrelált az életkorral, a fibrinogénnel, a protrombin idővel és a trombin generációs paraméterek közül a lag time, time to peak és ETP paraméterekkel.

A különböző FXIII-A p.Val34Leu fenotípusú plazmákból képzett vérrögök tömegét összehasonlítva úgy találtuk, hogy az átlagos normalizált vérrögtömeg nem különbözött a csoportok között. A FXIII-A Val34 allélt hordozó egyének (FXIII<sup>Val/Val</sup> és FXIII<sup>Val/Leu</sup>) plazmájából képzett vérrögök tömege szignifikánsan korrelált a fibrinogén szinttel, azonban a FXIII-A Leu34 homozigóta egyének plazmájából képzett vérrögök tömegével a fibrinogén szint nem mutatott összefüggést. A FXIII<sup>Val/Val</sup> plazma mintákból képzett vérrögökben a vérrög tömege az életkorral, a FXIII aktivitással, a protrombin idővel és a trombin generáció idő paramétereivel (lag time és time to peak) is korrelált, míg a FXIII-A Leu34 allélt hordozó egyének (FXIII<sup>Val/Leu</sup> és FXIII<sup>Leu/Leu</sup>) plazmájából képzett vérrögök esetén ezek az összefüggések nem voltak megfigyelhetőek.

Tekintettel a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus fibrinszerkezetre gyakorolt módosító hatásaira, melyről korábban kimutatták, hogy fibrinogén koncentráció függő módon valósul meg, tovább elemeztük a fibrinogén és a vérrög tömeg közötti összefüggéseket minden FXIII-A p.Val34Leu genotípus esetében. A különböző FXIII-A p.Val34Leu genotípusok esetén képződött vérrög tömegek alacsony és normál fibrinogén koncentrációk esetén nem különböztek egymástól (normalizált alvadék súly FXIII<sup>Val/Val</sup>: 0,93±0,07; FXIII<sup>Val/Leu</sup>: 0,92±0,08 és FXIII<sup>Leu/Leu</sup>: 0,93±0,04; p=0,1090). A legmagasabb fibrinogén szinttel (>3,5 g/L) rendelkező plazmák esetén azonban a FXIII-A Val34 allélt hordozó egyének plazmájából képzett vérrögök tömege szignifikánsan nagyobb volt, mint a FXIII-A Leu34 homozigóta egyének plazmájából származó vérrögök tömege, és a különbség az életkorra, nemre és a trombin generációs paraméterekre való korrigálást követően is szignifikáns maradt (normalizált alvadék súly FXIII<sup>Val/Val</sup>: 1,02±0,08; FXIII<sup>Val/Leu</sup>: 1,02±0,05 és FXIII<sup>Leu/Leu</sup>: 0,93±0,06; p<0,002).

Az életkor, a trombin generáció vagy egyéb módosító tényezők alvadék súlyra gyakorolt potenciális hatásainak kísérleti megkerülésére következő lépésként tisztított rendszert használtunk. Ezen kísérletek során kereskedelmi forgalomban kapható FXIII-mentesített plazmát, mosott 0 negatív vörösvértesteket, mosott vérlemezkéket (FXIII<sup>Val/Val</sup> donor) és FXIII-mentes fibrinogént használtunk, melyhez vagy tisztított FXIII<sup>Val/Val</sup> vagy FXIII<sup>Leu/Leu</sup> zimogént adtunk. Ezután szöveti faktor/foszfolipidek és CaCl<sub>2</sub> hozzáadásával alvadékokat képeztünk, és megmértük a vérrögök tömegét. Az individuális plazmákkal végzett kísérletekhez hasonlóan az referencia tartomány felső határa alatti fibrinogén koncentráció (<4 g/L) jelenlétében képződött

vérrögök tömege hasonló volt mindkét vizsgált genotípus esetén. A fibrinogén hozzáadása a rendszerhez a FXIII<sup>Val/Val</sup> vérrög tömegének koncentrációfüggő növekedését idézte elő ( $R^2=0,9536$ ,  $p<0,005$ ). Érdekes módon ebben a kísérleti összeállításban a fibrinogén inverz hatását tártuk fel a FXIII<sup>Leu/Leu</sup>-val képződött vérrögök tömegére, a vérrög tömege a fibrinogén koncentráció növekedésével párhuzamosan csökkent ( $R^2=0,8416$ ,  $p<0,03$ ). Ezek a meglepő eredmények azt sugallják, hogy a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus még nagyobb specifikus hatást gyakorol a vérrög szerkezetére ill. tömegére, mint ami a heterogén individuális plazma minták elemzéséből látható. A különböző kísérleti körülményekből származó kombinált megfigyelések együttesen azt sugallják, hogy a FXIII-A Leu34 allél jelentősen mérsékli a megemelkedett fibrinogén szint protrombotikus hatását a vérrög tömegére vonatkozóan.

#### 4.1.7.2 A FV<sub>Leiden</sub> polimorfizmus hatása a fibrinolízis regulációjára

A celluláris elemeket is tartalmazó vérrögök súlyát befolyásoló tényezők között az előző alfejezetben leírt kísérletsorozatban megfigyelhettük a trombin generáció egyes paramétereinek hatását. Felmerül a kérdés, hogy a FV<sub>Leiden</sub> mutáció hatására kialakuló fokozott trombin generáció a FXIII aktiváción keresztül milyen mértékben befolyásolja az  $\alpha$ 2-PI alvadékba való beépülését és végeredményben a fibrinolízist. A FXIII aktivációja különböző FV<sub>Leiden</sub> genotípusú egyéneknél eltérő. Korábbi vizsgálatainkban már leírtuk, hogy a rekombináns humán trombomodulin (rhTM) jelenléte jelentősen lassította a FXIII aktivációját a FV vad genotípusú egyéneknél, mely hatás a FV<sub>Leiden</sub> hordozók esetében elmaradt.

A fenti eredmények birtokában, ill. annak ismeretében, hogy az aktivált FXIII a fibrinolízis egyik legfőbb szabályozója, kutatásunk következő fázisában különböző FV genotípusú egyéneknél megvizsgáltuk az rhTM  $\alpha$ 2-PI-fibrin keresztkötésekre és fibrinolízisre gyakorolt hatását. Plazmából készített, mosott alvadékok Western blotting analízise során megfigyeltük, hogy a FV vad típusú egyének plazmaiban rhTM jelenlétében a  $\alpha$ 2-PI-fibrin  $\alpha$ -lánc közti heterodimerek kialakulása szignifikánsan később kezdődik és lassabban zajlik le, mint rhTM hiányában; ugyanakkor szignifikáns különbséget észleltünk a nagy molekulatömegű  $\alpha$ 2-PI tartalmú polimerek megjelenésében is. Ezzel ellentétben, a FV<sub>Leiden</sub> plazma mintákban eltűnik az rhTM nélküli és az azt tartalmazó plazmaminták közti különbség, sőt egyetlen mutáns allél jelenléte is szignifikánsan csökkentette az rhTM hatását.

Az  $\alpha$ 2-PI-fibrin  $\alpha$ -lánc közti heterodimerek 50%-ának kialakulásához szükséges rhTM jelenlétében és hiányában mért  $T_{1/2}$  közti különbségeket is kiszámoltuk. A FV vad típusú egyének és a FV<sub>Leiden</sub> heterozigóták ill. homozigóták között észlelt különbségek szignifikánsak, viszont a két FV<sub>Leiden</sub> hordozó csoport közti különbség ez esetben sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

A celluláris elemeket is tartalmazó alvadékok tömegét vizsgáló kísérletekhez hasonlóan ezekben a kísérleteinkben is, az alvadék kialakulását befolyásoló plazma komponensek individuális különbségeinek kiküszöbölése érdekében, valamint a kapott eredmények megerősítése céljából, FV vad és FV<sub>Leiden</sub> homozigóta egyének kevert plazmaiból FV-öt izoláltunk, majd ezzel kiegészítettük a FV hiányplazmát. Az így kapott plazmákban is megvizsgáltuk, hogy a különböző genotípusú FV hogyan befolyásolja az rhTM  $\alpha$ 2-PI-fibrin keresztkötésre gyakorolt hatását. Abban az esetben, amikor a hiányplazmát vad típusú FV-al egészítettük ki, az rhTM szignifikánsan lelassította az  $\alpha$ 2-PI fibrinhez való keresztkötését. Amennyiben a hiányplazmához homozigóta FV<sub>Leiden</sub>-t adtunk, az rhTM-nek e késleltető hatása minimális mértékben érvényesült.

Mivel az  $\alpha$ 2-PI fibrinhez való keresztkötődése jelentősen befolyásolja az alvadék lízisét, ezért a következőkben az rhTM-nek a t-PA-indukált lízis folyamatára kifejtett hatását vizsgáltuk FV

vad és FV<sub>Leiden</sub> homozigóta egyének plazmaiban. Az rhTM hiányában végzett kísérletekben nem tapasztaltunk különbséget a két genotípus között. Az rhTM jelenléte mindkét genotípus esetén szignifikánsan megnyújtotta az alvadék lízis idejét, azaz a fibrinolízis mértékét csökkentette, bár az rhTM FV<sub>Leiden</sub> homozigóták esetén szignifikánsan hatékonyabb volt, mint a FV vad típusú egyéneknél. rhTM hatására a FV<sub>Leiden</sub> homozigóta egyének plazmájában az 50%-os lízis szignifikánsan, mintegy 40 perccel később következett be, mint a FV vad típusú egyének plazmájában.

Ismert, hogy a TM TAFI aktivációra kifejtett hatásán keresztül befolyásolja a fibrinolízist. Annak bizonyítására, hogy a TM  $\alpha$ 2-PI-fibrin keresztkötésre kifejtett hatásának szintén fontos szerepe van a fibrinolízis szabályozásában, *in vitro* lízis vizsgálatokat végeztünk TAFIa inhibitor jelenlétében, ill. olyan feltételek mellett is, amikor a TAFIa-t és FXIIIa-t egyszerre gátoltuk. A TAFIa gátlása mellett, az rhTM hatására felgyorsult a fibrinolízis a FV vad típusú egyénektől származó plazmákban, míg a FV<sub>Leiden</sub> mutáció esetén ez a gyorsulás elmaradt. Ennek hátterében az állhat, hogy rhTM jelenlétében a vad típusú FV-öt tartalmazó plazmákban a FXIII aktiváció lelassulása miatt az FXIIIa által katalizált  $\alpha$ 2-PI-fibrin keresztkötés is lelassul, míg ezek a hatások FV<sub>Leiden</sub> esetén nem érvényesülnek. A lassúbb FXIII aktiváció szerepét az rhTM jelenlétében – TAFIa gátlása mellett – felgyorsult fibrinolízisben úgy bizonyítottuk, hogy a lízis vizsgálatokat TAFIa és FXIIIa együttes gátlása mellett is elvégeztük. Ez esetben – az rhTM jelenlététől függetlenül – az FXIIIa gátlása miatt a lízis mindegyik plazma mintában jelentősen felgyorsult, és az egyes genotípusok közötti különbség is eltűnt. Ezek az eredmények megerősítik a FXIII aktiváción és az  $\alpha$ 2-PI-fibrin keresztkötések kialakulásán keresztül ható mechanizmus fontosságát a FV<sub>Leiden</sub> mutáció antifibrinolitikus hatásában.

#### *4.1.7.3 Új módszer kifejlesztése az alvadékba beépülő $\alpha$ 2-PI mennyiségének meghatározására. A módszer tesztelése és összehasonlítása a kimenetekkel intravénás trombolízisben részesülő AIS betegekben*

Az előző alfejezetben látott eredmények jól tükrözik az ismert tényt, hogy az  $\alpha$ 2-PI alvadékba való beépülésének mértéke jelentős mértékben befolyásolja a fibrinolízis mértékét. Feltételezhetjük, hogy az  $\alpha$ 2-PI alvadékba való beépülésének mértéke AIS betegekben a trombolízis kimenetelét is befolyásolhatja, azonban ezt korábban még nem vizsgálták. A FV<sub>Leiden</sub> mutáción kívül természetesen számos olyan tényező lehet, ami potenciálisan befolyásolhatja egy egyén esetén az  $\alpha$ 2-PI alvadékba való beépülésének mértékét. Annak érdekében, hogy individuális plazma minták esetén számszerűsíteni tudjuk, hogy az  $\alpha$ 2-PI milyen mértékben épül be a fibrin alvadékba, egy új módszert dolgoztunk ki. A módszer elve, hogy citráttal alvadásgátolt plazma mintát trombin és kalcium hozzáadásával megalvasztunk, majd a keletkező szérumból és az eredeti plazmából párhuzamosan meghatározzuk ELISA módszerrel az  $\alpha$ 2-PI antigén koncentrációt. A plazma és szérum  $\alpha$ 2-PI koncentrációk különbsége adja az alvadékba bekötődött  $\alpha$ 2-PI mennyiségét (lásd Módszerek fejezet).

A módszer beteg-, ill. kontrollmintákon való alkalmazása előtt megvizsgáltuk a trombin koncentrációjának és az alvadási időnek a hatását az  $\alpha$ 2-PI beépülésének mértékére. Úgy találtuk, hogy az  $\alpha$ 2-PI maximális beépülése az alvadékba megközelítőleg 45%, mely összhangban van az ismert irodalmi adatokkal. Az  $\alpha$ 2-PI beépülése a fibrin alvadékba viszonylag gyorsan megtörténik 2 U/mL trombin koncentráció mellett. A maximális beépülés szintjét már relative alacsony trombin koncentráció mellett el tudjuk érni (0,5-2 U/mL), magasabb trombin koncentrációnak már nincs további hatása.

A további kísérletekhez ezért 2 U/mL trombin koncentrációt és a 30 perces olvasztási időt választottuk ki. Ezen paraméterek mellett az egészséges kontroll mintákban az  $\alpha$ 2-PI beépülésének mértéke  $44,0 \pm 4,6\%$  volt (n=10).

A FXIII koncentráció hatását az  $\alpha$ 2-PI beépülésére ismét tisztított rendszer segítségével vizsgáltuk, FXIII deficiens plazmát kiegészítve különböző koncentrációjú FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> preparátummal. Korábbi tanulmányokkal szemben, ahol a FXIII koncentráció hatását az  $\alpha$ 2-PI beépülés mértékére csak a 8%-os FXIII aktivitásnak megfelelő szintig vizsgálták, mi a FXIII koncentráció folyamatos növelésével a magasabb FXIII koncentrációk (200%-ig) hatását is megvizsgáltuk. Az átlagos plazma FXIII koncentráció (21 mg/L) eléréséig a beépülés mértéke a FXIII emelésével párhuzamosan, gyorsan nőtt, ~40% beépülést eredményezve. Ez után a görbe már kissé ellaposodik, de a FXIII koncentrációt tovább emelve még 5-10%-kal nőtt a beépült  $\alpha$ 2-PI mennyisége.

A FXIII koncentráció hatását az  $\alpha$ 2-PI alvadékba való beépülésének mértékére Western blottal is megvizsgáltuk. Az alvadékokat alapos mosás után 8 M ureát tartalmazó Laemmli-féle mintapufferben feloldottuk, majd redukáló SDS-PAGE-t követően a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk, ahol az  $\alpha$ 2-PI-t az összes formát felismerő poliklonális anti- $\alpha$ 2-PI antitesttel jelöltük meg. Eredményeink alapján a FXIII koncentráció emelkedésével fokozatosan nő a fibrin  $\alpha$ -lánc polimerekhez kötött  $\alpha$ 2-PI és csökken a kisebb molekulatömegű termékek mennyisége. Igen magas (>30 mg/L) FXIII szintnél már olyan erős a fibrin  $\alpha$ -láncok keresztkötése, hogy nem sikerült az alvadékokat oly mértékben feloldani, hogy az a gélbe be tudjon diffundálni. Ezért ezzel a módszerrel az emelkedett FXIII koncentráció hatása már nem vizsgálható az extrém mértékű fibrin keresztkötés miatt. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a trombusokban fellelhető polimorfonukleáris granulocitákból felszabaduló proteázok képesek az FXIIIa inaktivációjára és a keresztkötések kialakulásának down-regulációjára, mely megakadályozhatja a túlzottan keresztkötött, fibrinolízis révén nehezen eltávolítható alvadékok kialakulását.

A fentiekben ismertetett módszert alkalmaztuk annak vizsgálatára, hogy az  $\alpha$ 2-PI plazma alvadékba történő beépülésének mértéke összefügg-e a trombolízis kimenetelével AIS betegekben. Meghatároztuk az  $\alpha$ 2-PI beépülésének mértékét, valamint a fibrinogén és a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> szinteket 57 intravénás trombolízis kezelésben részesülő AIS beteg trombolízis előtti, valamint 26 korban illesztett egészséges kontroll citráttal alvadásgátolt plazma mintájából. A vizsgált betegeket az első prospektív kohorszból választottuk ki, a lízis rövid távú kimenetele szerint csoportosítva (7. napi  $\Delta$ NIHSS ill. a hemorrhagiás transzformáció alapján, lásd Módszerek). A csoportok egyes klinikai alapadatai ill. hemosztázis tényezői szignifikánsan eltértek. A trombolízist követően hemorrhagiás transzformációt szenvedett betegek szignifikánsan idősebbek voltak és súlyosabb stroke-ot szenvedtek el a felvételtől NIHSS pontok alapján, szemben azokkal, akik jó kimenetellel rendelkeztek. A FXIII szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak minden betegcsoportban, szemben a kontrollokkal. A fibrinogén szintek magasabbak voltak azokban a betegekben, akiknél sikertelen volt a trombolízis terápia és stagnáló/rossz kimenetellel rendelkeztek, szemben a kontrollokkal. Meg kell említeni, hogy a felvételtől CRP szint szignifikánsan emelkedett volt azoknál a betegeknél, akik stagnáló/rossz kimenetellel rendelkeztek, ill. akik hemorrhagiás transzformációt szenvedtek, az egészséges kontrollokhöz viszonyítva. A lízis után intrakraniális vérzést szenvedett betegek csoportjában a plazma  $\alpha$ 2-PI szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollokhöz képest.

Az  $\alpha$ 2-PI inkorporációjának mértéke a fibrin alvadékba szignifikánsan alacsonyabb volt a betegekben a kontrollokhöz képest. Amikor a betegeket a trombolízis kimenetele szerint csoportosítottuk, az  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való beépülésének mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt a stagnáló/rossz kimenetellel rendelkező és lízis utáni intrakraniális vérzést szenvedett betegek esetén (41,5±11,8% és 37,3±14,0%) összehasonlítva az egészséges kontrollokkal (49,4±4,6%). Az  $\alpha$ 2-PI alvadékba való beépülésének mértéke a jó kimenetellel rendelkező betegeknél (47,4±6,7%) nem különbözött szignifikánsan az egészségesektől.

Figyelemreméltó, hogy az  $\alpha$ 2-PI beépülése lényegesen alacsonyabb volt azokban a betegekben, akik hemorrhagiás transzformációt szenvedtek, nem csak a kontrollokhoz képest, hanem a jó kimenetellel rendelkező betegekhez képest is. Ugyanakkor megemlítendő, hogy az alvadék lízis vizsgálatok eredményei nem különböztek az egyes csoportok között.

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az  $\alpha$ 2-PI beépülés mértéke a fibrin alvadékba milyen korrelációt mutat egyes alapvető klinikai ill. hemosztázis paraméterekkel. A kontroll csoportban a fibrinogén statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott az  $\alpha$ 2-PI beépülésének mértékével. A betegcsoportban pozitív, szignifikáns korrelációt találtunk a plazma  $\alpha$ 2-PI, a FXIII szintek és az  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba történő beépülése között. Továbbá, negatív, szignifikáns korrelációt találtunk a betegekben a felvételi NIHSS és az  $\alpha$ 2-PI beépülés mértéke között. Ebből arra lehet következtetni, hogy súlyosabb stroke esetén *in vitro* kevesebb  $\alpha$ 2-PI épül be az alvadékba. Mivel az  $\alpha$ 2-PI beépülése a fibrin alvadékba limitált (45-50%), ennek az összefüggésnek a legvalószínűbb oka az lehet, hogy az akut esemény során bekövetkező jelentős *in vivo* fogyasztás miatt az  $\alpha$ 2-PI forma, mely képes a fibrinhez kötődni és beépül az alvadékba, kisebb mennyiségben van jelen azon betegek plazma mintáiban, akik súlyosabb stroke-ot szenvedtek el. Az NIHSS és az  $\alpha$ 2-PI beépülésének mértéke közötti negatív összefüggés különösen erős volt a lízis után intrakraniális vérzést szenvedett betegek alcsoportjában ( $r = -0,627$ ,  $p = 0,039$ ).

#### **4.1.8 Globális hemosztázis tesztek a hemorrhagiás transzformáció kialakulásának előrejelzésére**

Az intravénás trombolízis szövődményeként kialakuló hemorrhagiás transzformáció rettegett szövődmény, és világszerte az egyik oka annak, hogy a trombolízis meglehetősen alulhasznált a klinikai gyakorlatban, különösen kisebb kórházakban. Ha rendelkezésünkre állna laboratóriumi teszt, mely előrejelezné a betegekben a hemorrhagiás transzformáció kialakulásának veszélyét, az alapjaiban javíthatná az akut stroke ellátás minőségét és növelné a kezelésbe vetett bizalmat. A hemosztázis és fibrinolízis rendszer komplexitása ill. számos egyéni befolyásoló tényező potenciális jelenléte miatt erre a célra feltehetőleg nem individuális fehérjék vagy markerek meghatározása, hanem globális hemosztázis ill. fibrinolízis tesztek lehetnek alkalmasak (pl. trombin generáció, CLA).

##### *4.1.8.1 In vitro alvadék lízis vizsgálatok a hemorrhagiás transzformáció kialakulásának előrejelzésére*

Az előző alfejezetben leírt kísérleti eredmények rámutattak arra, hogy az  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való beépülésének mértéke lényegesen alacsonyabb volt azokban a betegekben, akik hemorrhagiás transzformációt szenvedtek. A vizsgált kohorszban azonban a konvencionális *in vitro* CLA nem mutatott különbséget a különböző kimenetelű csoportok között. Ez arra utal, hogy a módszer érzékenysége nem elégséges az általunk vizsgálni kívánt célra.

Annak érdekében, hogy a CLA módszer jobban tükrözze az *in vivo* körülményeket, egyes kutatócsoportok különböző sejtes elemeket, aktivátorokat, inhibitorokat adnak a rendszerhez a vizsgálat során. Kolev és munkacsoportja a CLA módszert az *in vivo* trombusokban fellelhető NET-ek imitálása érdekében cfDNA és hiszton hozzáadásával módosította. Az *in vivo* körülményeket imitáló koncentrációban hozzáadott cfDNA és hiszton együttes hatásaként elnyújtott alvadék lízist tapasztaltak, és úgy találták, hogy az ilyen körülmények között létrehozott alvadékok rigiditása és viszkoelasztikus paraméterei jelentősen módosultak. Vizsgálataink során ezen kísérletes előzményeket alapul véve egy új, módosított *in vitro* CLA vizsgálatot (mCLA) dolgoztunk ki, mely a NET-ek jelenlétének imitálása érdekében cfDNA-t és hiszton is tartalmaz, és alkalmas lehet AIS betegminták vizsgálatára. Megvizsgáltuk, hogy az mCLA módszer képes-e megjósolni a hemorrhagiás transzformáció kialakulásának esélyét



intravénás trombolitikus kezelésben részesülő AIS betegekben. A módszert nem traumás vérzéses stroke-ot szenvedett betegekben is teszteltük, feltételezve, hogy összefüggést mutathat a stroke kimenetelével.

A CLA és mCLA módszerek leírását a Módszerek fejezet tartalmazza. A vizsgálatokat összesen 231 AIS miatt intravénás trombolízisben részesülő beteg trombolízis előtti, citráttal alvadásgátolt plazmamintáján végeztük el. A betegek beválogatása a vizsgálatba 2016 szeptemberében kezdődött és 2019 áprilisáig tartott, a betegek beválogatásának menete és vizsgált kimenetek megegyeztek a fent leírt obszervációs tanulmányok esetén leírtakkal. A betegek alapadatai és a stroke kimenetelei hasonlóan alakultak a korábbi obszervációs tanulmányok esetén leírtakhoz, a pontos adatok tekintetében racionális terjedelmi korlátok miatt utalunk az eredeti közleményben közölt adatokra. Az AIS betegek korának mediánja 67 (IQR: 50-76) év volt, 54,6%-uk férfi volt. A felvételtől NIHSS mediánja 7 (IQR: 4-11) volt. A tünetek kialakulása és a kezelés megkezdése közötti idő mediánja 150 (IQR: 111-206) percnél adódott. A cerebrovaszkuláris rizikók közül az artériás hipertónia volt a legnagyobb arányban jelen (81,4%). A betegek 44,1%-nál kedvező rövid távú kimenetel volt megfigyelhető, 3 hónappal a kezelést követően pedig 45,5%-nak javult az állapota. A teljes betegpopuláció 7,8%-nál, vagyis 18 főnél volt megfigyelhető terápiával összefüggő intrakraniális vérzéses szövődmény, mely 6 esetben tünetképző, 12 esetben pedig nem tünetképző komplikáció volt.

Ahogy az korábbi irodalmi adatok alapján várható volt, a kísérleti rendszerhez hozzáadott cfDNA és hiszton szignifikánsan befolyásolta az alvadék képződést, és elnyújtott alvadék lízist eredményezett.

A vizsgált betegcsoportban mind a CLA, mind az mCLA módszer esetén az 50%-os lízis idő (50%CLT) paraméter és a stroke kórházi felvételtől meghatározott súlyossága (NIHSS) között lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető. Azok a betegek, akik felvételtől súlyosabb stroke tüneteit mutatták, szignifikánsan alacsonyabb 50%CLT értékekkel rendelkeztek a kisebb NIHSS értékkel rendelkező betegekhez képest.

A hemorrhagiás transzformációt szenvedett betegekben a CLA görbe alatti terület (AUC paraméter) ill. az mCLA 50%CLT és mCLA AUC paraméterek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a komplikációmentes esetekhez viszonyítva.

Az egyéb vizsgált hemosztázis ill. fibrinolízis fehérjék közül a D-dimer és a plazminogén aktivitás mutatott összefüggést a lízist követően kialakuló intrakraniális vérzés kialakulásával. Az mCLA módszer diagnosztikai hatékonyságát összevetettük a hagyományos CLA módszer diagnosztikai hatékonyságával, a terápia-asszociált intrakraniális vérzés előrejelzésének vonatkozásában. A ROC analízis eredménye azt mutatta, hogy a cfDNA és hiszton hozzáadása a mintaoldathoz jelentősen javította a CLA diagnosztikai teljesítményét, mely leginkább az 50%CLT paraméter esetében volt kiemelkedő a lízist követő ICH előrejelzésében (ROC AUC DNS és hiszton jelenléte nélkül: 0,56; 95% CI: 0,43-0,69;  $p=0,371$ ; ROC AUC DNS és hiszton jelenlétében: 0,66; 95% CI: 0,54-0,78;  $p=0,024$ ). Az összes teszt paraméter közül az AUC mutatta a legjobb diagnosztikai teljesítményt a lízist követő ICH becslésére a módosított (mCLA) eljárás során (ROC AUC cfDNA és hiszton jelenlétében: 0,69; 95% CI: 0,59-0,80;  $p=0,006$ ). A ROC analízis során meghatározott optimális küszöbérték (29,9 OD\*perc) alapján az mCLA AUC paramétere kiemelkedően magas negatív prediktív értéket mutatott a trombolízis után kialakuló ICH előrejelzésére (97,9%; 95% CI: 92,7-99,8%).

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a CLA paraméterek független prediktorai-e a trombolízis kimenetelének. Az alkalmazott backward bináris logisztikus regressziós modell (elemei: életkor, nem, felvételtől NIHSS értékek, BMI, hipertónia, hiperlipidémia, specifikus hemosztázis/fibrinolízis fehérjék: fibrinogén, D-dimer, plazminogén aktivitás,  $\alpha$ 2-PI aktivitás, az 50%CLT és CLA AUC paraméterek mindkét módszer esetében) feltárta, hogy a módosított CLA mérés során kapott alacsony mCLA AUC (<29,9 OD\*perc) paraméter a hemorrhagiás

transzformáció szignifikáns, független prediktora (OR: 5,85; 95% CI: 1,24-27,7;  $p=0,026$ ). Ezen paraméter mellett csak a felvételt kapott NIHSS>15 érték maradt a step-wise backward regressziós modellben, mint a lízist követő intrakraniális vérzés független előrejelzője (OR: 5,32; 95% CI: 1,69-16,75;  $p=0,004$ ).

A CLA és mCLA vizsgálatokat nem traumás vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek felvételi plazmamintáin is elvégeztük. Az IRONHEART tanulmányban 89 konzekutív, nem traumás ICH-t elszenvedett beteget vizsgáltunk a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikájával kollaborálva. A vizsgálat során egy beteget kizártunk a tanulmányból, mivel a kórházba kerülést követően SARS-CoV-2 fertőzés jelenlétét igazolták nála. Egy másik betegnél 25 nappal az eseményt követően alakult ki koronavírus fertőzés, ezért a hosszú távú követési periódusból származó adatok feldolgozása során ezen beteg eredményét nem vettük figyelembe. Az ICH betegek átlag életkora  $68 \pm 11,6$  év volt, a betegek 64%-a férfi volt. A felvételt kapott NIHSS mediánja 14 (IQR: 8-20), a medián ICH score 1 (IQR: 1-3) volt. A cerebrovaszkuláris rizikófaktorok közül az artériás magasvérnyomás volt a legnagyobb arányban jelen (96,6%). A koagulációs szűrőtesztek és a fibrinogén szintek eredményei nem utaltak hemorrhagiás diathesisre egyetlen betegnél sem. A felvételt kapott becsült vérzésvolumen érték mediánja  $20,0 \text{ cm}^3$ -nek (IQR:  $3,7-48,0 \text{ cm}^3$ ) adódott, és 46 betegnél (51,7%) alakult ki intraventriculáris hemorrhagia. A betegpopuláció mortalitása az első 14 napban 29,0% volt, mely 43,8%-ra nőtt 90 nappal az eseményt követően.

Összehasonlítottuk az ICH betegek felvételi plazmamintáiból meghatározott CLA ill. mCLA paramétereket egészséges önkéntesek plazmamintáiból meghatározott lízis idő paraméterekkel. A vártak megfelelően az ICH betegek szignifikánsan rövidebb lízis idővel rendelkeztek az önkéntesek alvadék lízis idejéhez viszonyítva. A vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek esetén meglepődve tapasztaltuk, hogy az alvadékképződés szignifikánsan gyorsabb volt az *in vitro* kísérletek során (mely hiperkoagulabilitásra utal), ugyanakkor a kialakult alvadék rt-PA-indukálta lízise is gyorsabban végbement az egészséges egyének alvadék líziséhez képest.

A konvencionális CLA paraméterek nem mutattak összefüggést a stroke súlyosságával és a kimenetekkel a vizsgált betegpopulációban. Az mCLA mérés során ezzel ellentétben szignifikánsan rövidebb 10%CLT értékeket detektáltunk a súlyosabb stroke-ot (NIHSS>10) elszenvedő betegek esetén, az enyhébb stroke-kal (NIHSS 0-10) felvételre kerülő betegekhez képest. Az mCLA 10%CLT paraméter szignifikáns összefüggést mutatott az ICH score értékekkel, a 14. napig bekövetkező mortalitással és a kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel is. Az mCLA paraméterek diagnosztikai hatékonyságának vizsgálata érdekében ROC analízist végeztünk. A legjobb diagnosztikai hatékonyságot a 10%CLT paraméter esetén figyeltük meg a kedvező hosszú távú kimenetel (mRS 0-1 vs. 2-6) előrejelzésére (ROC AUC 0,73; 95%CI: 0,57-0,89). A Youden index által meghatározott optimális küszöbérték (32,25 perc) esetén a módosított teszt esetén a 10%CLT paraméter szenzitivitása 77,0%, specificitása 67,7% volt a hosszú távú kimenetel (mRS 0-1 vs. 2-6) előrejelzésére.

A ROC analízist a 14. és 90. napig bekövetkező mortalitásra vonatkozóan elvégezve az egyes mCLA paraméterek esetén hasonló küszöbértékeket kaptunk. Kaplan-Meier analízis alapján a >38,5 perc 10%CLT paraméterrel rendelkező betegek szignifikánsan jobb túlélést mutattak ( $p=0,010$ ).

Eredményeink alapján a mCLA mérés cfDNA és hiszton jelenlétében ígéretes módszertani alapot jelenthet a jövőben a trombolízissal kezelt AIS betegek terápia asszociált vérzéses szövődményeknek előrejelzésére, valamint az ICH betegek hosszú távú funkcionális kimenetelének és mortalitásának előrejelzésére. AIS betegek esetén természetesen a hemorrhagiás transzformáció előrejelzésére a klinikai gyakorlatban kizárólag olyan módszer képzelhető el, mely nagyon rövid idő (percek) alatt eredményt szolgáltat, így a jövőben a cél az

ígéretesnek tűnő módszerek továbbfejlesztése betegágy melletti teszteké (point-of-care testing, POCT).

#### *4.1.8.2 A trombin generáció vizsgálata a hemorrhagiás transzformáció kialakulásának előrejelzésére*

A trombin generációs teszt még nem rutin laboratóriumi eljárás, de a módszer igen ígéretesnek mutatkozik hipo- és hiperkoagulációs állapotok jelzésére. Hipotézisünk szerint a trombin generáció egyes paraméterei előrejelezhetik trombolízissel kezelt AIS betegekben a hemorrhagiás transzformáció lehetőségét. A tesztet nem traumás vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek felvételi plazmamintáin is elvégeztük, összefüggést keresve a betegek kimenetelével.

A vizsgálati kohorsz alapvetően megegyezett az első kohorszként leírt (2011-2013 között beválogatott) intravénás trombolízissel kezelt AIS betegek csoportjával, de az antikoaguláns terápián lévő betegek (n=12) kizárásra kerültek. Hemorrhagiás transzformáció 13 beteg esetén volt megfigyelhető, mely 6 esetben tünetképző komplikáció (SICH) volt. A trombin generációs paraméterek közül csak a time to peak paraméter mutatott összefüggést a stroke súlyosságával. Az ETP és peak thrombin paraméterek szignifikánsan alacsonyabbak voltak azokban a betegekben, akik esetén SICH alakult ki, a vérzést nem szenvedett ill. aSICH csoportba képest. Többszörös logisztikus regressziós analízis eredményei (elemi: kor, nem, CRP, dohányzás, vérlemezkegátló terápia, felvételi NIHSS érték) azt mutatták, hogy a betegek felvételekor mért, alsó kvartilisbe tartozó ETP és peak thrombin eredmények a tünettel járó intrakraniális vérzés kialakulásának független előrejelzői (ETP <1265,9 nM\*perc esetén OR: 17,54; 95% CI: 1,45-212,72; p<0,05 és peak thrombin <204,7 nM esetén: OR: 15,12; 95% CI: 1,38-166,02; p<0,05). Az eredmények igazolására az alacsony esetszámok miatt további, megerősítő vizsgálatok szükségesek.

A trombin generáció vizsgálatát nem traumás vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek felvételi plazmamintáin is elvégeztük. A vizsgált betegkohorsz megegyezett az IRONHEART tanulmány kereteiben vizsgált kohorsszal (n=2 beteg technikai okok miatt kizárásra került). Mivel a trombin generációs teszt esetén nincs rendelkezésre álló referencia tartomány, kontrollként 164 egészséges, 18 év feletti egyént vontunk be (főbb kizárási kritériumok: lásd eredeti közlemény). A peak thrombin paraméter szignifikánsan magasabb volt az ICH betegekben a kontrollokhoz képest (397,2±93,9 vs. 306,3±85,3 nM; p<0,0001), míg a time to peak szignifikánsan rövidebb volt a kontrollokhoz képest. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a betegekben hiperkoagulabilis állapot áll fenn a kontrollokhoz képest. Az elsőre kissé meglepő eredmény valójában összhangban áll a korábban az alvadék lízis kísérletek során megfigyelt eredményeinkkel (rövidebb maximális abszorbancia eléréséhez szükséges idő), ill. ismert irodalmi adatokkal, mely szerint az agyvérzett betegekben a vénás tromboembólia rizikó igen magas. A lag time, peak thrombin és ETP paraméterek szignifikáns korrelációt mutattak a CRP paraméterrel mindkét csoportban. A betegek peak thrombin értéke szignifikánsan magasabb volt a rosszabb hosszú távú funkcionális kimenetellel rendelkező csoportban (mRS 2-6 medián: 402,5; IQR: 344,8-473,8 vs. mRS 0-1: 326,4; IQR: 294,2-416,1 nM; p=0,0096). A statisztikailag optimális határértéket alapul véve (339,1 nM) a peak thrombin paraméter szenzitivitása ill. specifitása az mRS 2-6 kimenetel megítélésére 80,8% és 64,7%-nak adódott.

## 4.2 Hemosztázis vizsgálatok a vérlemezkégtlő terápiák hatástalanságának felismerésére

### 4.2.1 Új, P2Y12 ADP receptor specifikus trombotocita aggregációs módszer kidolgozása és a módszer összehasonlítása a clopidogrel terápia monitorozására alkalmas egyéb laboratóriumi módszerekkel

A clopidogrel terápia monitorozásával kapcsolatos vizsgálatainkat 2011-2015 között végeztük, mely időszakban a hagyományos ADP-indukálta trombotocita aggregációs módszer volt a legelterjedtebb módszer a clopidogrel terápia hatékonyságának ellenörzésére. A hagyományos ADP-indukálta trombotocita aggregációs módszer esetén probléma, hogy nem specifikus a P2Y12 receptor gátlás mértékére, továbbá aszpirin terápia befolyásolja az eredményt. Az ADP-indukálta trombotocita aggregációs módszert használva clopidogrelre jól reagáló beteg esetén is mindig látható alakváltozás és valamilyen mértékű primer aggregáció a görbén, ami a P2Y1 receptor hatásának tudható be. A módosított teszt során, amikor a PRP mintát PGE1-el előkezeltük, az ADP-indukálta aggregációs görbén hiányzott az alakváltozás jel és a hatékony clopidogrel kezelés teljesen megszüntette az ADP által indukált aggregációt. Clopidogrel terápiára hatástalan válasz esetén a trombotocita aggregáció a kontrollnak megfelelő volt. A PGE1 előkezelés által kifejtett hatás erősen korrelált ( $r=0,89$ ,  $p=0,001$ ) a P2Y1 antagonistá A3P5P hatásával, mely igazolta, hogy a PGE1 hozzáadása a trombotocitákhoz megszüntette a jelátvitelt a P2Y1 receptoron keresztül.

#### 4.2.1.1 A clopidogrel monoterápiával kezelt betegek különböző laboratóriumi módszerekkel végzett tesztelésének eredményei

A clopidogrel terápia monitorozására alkalmas módszereket (ADP-indukálta trombotocita aggregáció, VerifyNow P2Y12 teszt, VASP foszforilációs vizsgálat, ADP(PGE1) trombotocita aggregáció) 111, AIS szekunder prevenciójaként clopidogrel monoterápián lévő betegen és 140 egészséges, gyógyszert nem szedő kontrollon teszteltük. A gyógyszert nem szedő kontrollok vizsgálatának célja a referencia határértékek meghatározása volt.

A clopidogrel terápia hatástalanságának ("laboratóriumi non-responder") küszöbértékeit valamennyi módszer esetén az általunk felállított referencia intervallum alsó határánál húztuk meg. Az így kapott diagnosztikai határértékek alapján a clopidogrelre nem megfelelően reagáló aránya módszertől függően 12-54% között változott. A hagyományos ADP-indukálta trombotocita aggregációs módszerrel a betegek körülbelül fele bizonyult non-respondernek (50,5% és 51,4%, 5  $\mu\text{M}$  és 20  $\mu\text{M}$  ADP esetén). A P2Y12-specifikus VerifyNow teszttel diagnosztizált non-responder aránya hasonló volt a hagyományos ADP-aggregációs módszerrel kapott eredményhez (54%). A másik P2Y12-specifikus módszer, a VASP foszforilációs teszt alkalmazásával kissé eltérő eredményeket kaptunk. Ebben az esetben a betegek eredményei igen széles eloszlást mutattak. A CLSI irányelvek szerint meghatározott referencia intervallumot használva (72% PRI) a clopidogrellel kezelt betegek eredményeinek igen nagy százaléka (88,3%) mutatott ezen határérték alatti eredményt, jelezve a clopidogrel terápiának megfelelő hatást. Az eredmények széles eloszlása azonban felvetette annak a lehetőségét, hogy a tesztben megfigyelhető clopidogrel hatás (P2Y12 gátlás) mértéke a betegek egy részében nem elégséges. A vizsgálatot megelőző években számos tanulmány a klinikai eseményekhez kapcsolható clopidogrel rezisztencia határértékének az 50%-os PRI-határértéket javasolta. Ezt a küszöbértéket a betegpopulációnkra alkalmazva a betegeknek csak 43,2%-a volt a klinikailag hatásos tartományban. Ezeket a betegeket erős válaszadóknak ("strong responder") tekintjük, míg a referencia intervallum alatti, de 50% feletti PRI értéket mutató betegeket gyenge válaszadóknak ("weak responder"). Az újonnan kidolgozott, P2Y12-

specifikus ADP(PGE1) vérlemezke aggregációs módszert szintén teszteltük a vizsgált populációban. Ezzel a teszttel a betegek 28,8%-a bizonyult non-respondernek, az eredmények a kontrollokéval megegyező tartományban voltak. A betegek 39,7%-ánál nem alakult ki aggregáció, őket erős válaszadóknak ("strong responder") tekintjük, míg a betegek 31,5%-ánál részleges aggregáció mutatkozott (<9,1%, gyenge válaszadók).

#### *4.2.1.2 A clopidogrel hatás kimutatására használt laboratóriumi vizsgálatok korrelációja és diagnosztikai hatékonysága*

Tekintettel arra, hogy a VASP foszforilációs vizsgálat a P2Y12 gátlására specifikus, és kimutatták, hogy eredménye a legjobban korrelál az aktív metabolit plazma szintjével, ezt a tesztet választottuk ki arra, hogy eredményeit összehasonlítsuk a többi laboratóriumi vizsgálat eredményeivel. Valamennyi vizsgált módszer közül a legjobb korrelációt az általunk kidolgozott ADP(PGE1) aggregációs teszt és a VASP foszforilációs teszt mutatta ( $r=0,79$ ,  $p<0,0001$ ). A hagyományos ADP-indukálta aggregációs vizsgálat és a VerifyNow P2Y12 csak gyengébb mértékben korreláltak a VASP foszforilációs teszttel. A vizsgált módszerek közül az ADP(PGE1) újonnan kidolgozott aggregációs teszt esetén kaptuk a legmagasabb diagnosztikai hatékonyság értéket (85,6%). Az általunk kidolgozott ADP(PGE1) trombocita aggregációs teszt tehát P2Y12 receptor specifikus, megbízható, könnyen elvégezhető és olcsó teszt, mely a clopidogrel hatás tesztelésére alkalmasnak bizonyult.

### **4.2.2 Aszpirin monoterápián és clopidogrel monoterápián lévő betegek vérmintáinak tesztelése a clopidogrel és aszpirin terápia monitorozására használt módszerekkel**

#### *4.2.2.1 A clopidogrel monoterápia hatása az aszpirin hatását detektáló tesztekre*

Az aszpirin hatás tesztelésére alkalmas laboratóriumi vizsgálatokat 53, biztosan hatásos clopidogrel monoterápián lévő betegen végeztük el, míg a clopidogrel hatás tesztelésére alkalmas laboratóriumi vizsgálatokat 52, biztosan hatásos aszpirin monoterápián lévő beteg vérmintáján végeztük el. Valamennyi vizsgálatot elvégeztünk továbbá 140 egészséges kontroll egyén vérmintáján, melynek célja a referencia határértékek meghatározása volt. A betegek és kontrollok klinikai alapadatait illetően terjedelmi korlátok miatt utalunk az eredeti közleményben publikált táblázatra.

Az aszpirin hatást detektáló tesztek közül a clopidogrel monoterápia szignifikánsan gátolta az AA-indukálta trombocita aggregációt és szekréción. A kontroll csoporthoz viszonyítva a clopidogrel kezelés a betegek 41,5%-ban csökkentette az AA-indukálta trombocita aggregációt. Az AA-indukálta trombocita szekréción még kifejezettebb csökkenést mutatott, a betegek 79,2%-ában a szekréción mértéke a referencia tartomány alsó határa alatt volt. Hasonló eredményeket tapasztaltunk a clopidogrellel kezelt betegek esetében a PRP-ből mért AA-indukálta TXB2 termelés esetén, a clopidogrel monoterápián lévő betegek 81,1%-a mutatott jelentősen csökkent AA-indukálta TXB2 képződést. A VASP foszforilációs teszt eredménye (azaz a clopidogrel által kiváltott P2Y12 receptor blokkolás mértéke) és az AA-indukálta trombocita aggregáción jó korrelációt mutatott a clopidogrelt szedő betegek esetében (Spearman  $r=0,49$ ,  $p<0,001$ ). Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy az AA-indukálta trombocita aggregációs útvonalat a clopidogrel befolyásolja. Annak ellenére, hogy a clopidogrel egyértelműen gátolja az AA-indukálta trombocita aggregációt és szekréción, a VerifyNow Aspirin teszt (ami szintén AA indukcióra épül) eredményeit azonban gyakorlatilag nem befolyásolta a clopidogrel. A teszt esetén a kontroll egyének (átlag: 657; IQR: 650-661 ARU) és a hatásos clopidogrel terápian levő egyének eredményei (átlag: 661; IQR: 652-666 ARU) hasonlóak voltak. A clopidogrel monoterápián lévő betegek közül csak 3 esetben mértünk 550 ARU alatti értéket, ami az effektív aszpirin hatást jelző szélső érték.

#### 4.2.2.2 Az aszpirin monoterápia hatása a clopidogrel hatását detektáló tesztekre

A vártak megfelelően a clopidogrel hatást vizsgáló módszerek közül az aszpirin monoterápia szignifikánsan gátolta az ADP-indukálta trombocita aggregációt és szekréción. Annak ellenére, hogy a clopidogrel monoterápia esetén a gátlás mértéke lényegesen nagyobb volt, mint aszpirin monoterápia esetén, az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy az aszpirin terápia hatással lehet az ADP-indukálta aggregációra és kettős trombocitagátló terápia esetén befolyásolja a clopidogrel hatásának megítélését. Az aszpirin monoterápia nem volt hatással az általunk kifejlesztett, PGE1-el előkezelt trombocitákon végzett ADP(PGE1) trombocita aggregációra, ill. a szintén P2Y12 receptor specifikus VASP foszforilációs teszt eredményeire. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a clopidogrel hatást vizsgáló módszerek közül a P2Y12 receptorra specifikus tesztek nem befolyásolja az aszpirin hatása.

### 4.3 Hemosztázis vizsgálatok pitvarfibrilláló betegekben a tromboembóliás szövődmények (stroke rizikó) jobb megértése érdekében

#### 4.3.1 Lokális, intrakardiális hemosztázis és fibrinolízis eltérések azonosítása pitvarfibrilláló betegekben

##### 4.3.1.1 Vizsgálati csoport

Összesen 32 pitvarfibrilláló beteg és 18 kontroll került beválogatásra. A mintavételkor felmerülő technikai problémák miatt 8 pitvarfibrilláló beteget és 4 kontrollt ki kellett zárni a vizsgálatból (vérvétel közben véralvadék kialakulása a mintában, a katéterben kialakuló alvadék miatt azonnali heparin adása, stb.). A vizsgálati populációba ennek megfelelően 24 pitvarfibrilláló beteg és 14 kontroll került. A bal fülcséből származó minta vétele 12 pitvarfibrilláló beteg és 8 kontroll esetén technikai vagy anatómiai okok miatt nem volt lehetséges. A cerebrovaszkuláris rizikófaktorok között csak a dohányzás esetén volt szignifikáns eltérés a két vizsgált csoport között, a kontrollok körében több volt az aktív dohányos. Az elektrofiziológiai beavatkozás közben csak két pitvarfibrilláló betegnél jelentkezett pitvarfibrillációs paroxysmus. A legtöbb pitvarfibrilláló betegnek alacsony vagy közepes fokú stroke rizikója volt a CHADS<sub>2</sub> és CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc pontrendszer szerint.

##### 4.3.1.2 Hemosztázis paraméterek intrakardiális szintjei a vizsgált csoportokban

A vena femoralisból és a bal pitvarból származó minták FVIII aktivitás és VWF antigén szintjei szignifikánsan magasabbak voltak a pitvarfibrillációs csoport esetén a kontroll csoporthoz viszonyítva. A bal fülcséből származó minták esetén is emelkedettek voltak a FVIII aktivitás és VWF antigén szintek a pitvarfibrillációs csoportban a kontroll csoporthoz képest, azonban valószínűleg a bal fülcse minták alacsonyabb száma miatt nem érte el a szignifikancia-küszöböt a két csoport közti különbség. Az emelkedett szintek nem tulajdoníthatók akut fázis reakció következményének, mivel a CRP szintek minden egyén esetén a referencia határérték alatt voltak. A pitvarfibrilláló csoportban a VWF antigén szintek mediánja a referencia tartomány feletti volt mindhárom mintavételi hely esetén: vena femoralis: 171,0% (IQR: 129,4-195,1%), bal pitvar: 176,7% (IQR: 129,3-192,7%), bal fülcse: 164,0% (IQR: 114,8-189,8%). A betegek és kontrollok között megfigyelt szignifikáns különbségek ABO vércsoportra való adjusztálás után is szignifikánsak maradtak. Nem találtunk szignifikáns különbséget a FVIII aktivitás és VWF antigén szintek tekintetében az intrakardiális vérminták és a vena femoralis között sem a pitvarfibrillációs csoportban, sem a kontroll csoportban. A FVIII aktivitás és VWF antigén jó korrelációt mutatott a pitvarfibrillációs csoport (Spearman  $r=0,808$ ; 95% CI: 0,691-0,884;  $p<0,0001$ ) és kontroll csoport (Pearson  $r=0,737$ ; 95% CI: 0,502-0,871;  $p<0,0001$ ) esetében is, ami arra utal, hogy a két fehérje komplexet alkot. A FVIII aktivitás és VWF antigén szintek

korrelációjában nem mutatkozott jelentős különbség mintavételi helyek szerint vizsgálva. A FXIII aktivitás és fibrinogén szintek esetén nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport, valamint a mintavételi helyek összehasonlításakor sem.

### **4.3.2 A koaguláció aktivációját jelző paraméterek intrakardiális szintjei a vizsgált csoportokban**

A vena femoralisból nyert minták fibrin monomer és TAT-komplex szintjeinek medián értékei a referencia határérték felett voltak mind a pitvarfibrillációs csoportban, mind a kontroll csoportban. Mindkét vizsgált csoportra jellemző, hogy az fibrin monomer és TAT-komplex szintek a bal pitvarból származó minták esetén szignifikánsan magasabbak voltak a vena femoralis mintákhoz képest. Ez a mindkét csoportban megfigyelhető szignifikáns különbség azt jelezheti, hogy ezek az eltérések nem specifikusak a pitvarfibrillációra nézve, vagyis feltételezhető, hogy a katéteres beavatkozás közvetlen hatását látjuk az eredményeken. A bal fülcséből származó mintákban a fibrin monomer szintek csökkenését tapasztaltuk a bal pitvarhoz képest, mely csökkenés a pitvarfibrilláló betegek körében volt szignifikáns. A TAT-komplex szintek esetén a bal fülcsében a TAT-komplex csökkenése szintén a pitvarfibrilláló betegek csoportjában ért el szignifikáns mértéket a bal pitvarhoz képest, míg a kontroll csoportban nem láthatunk szignifikáns csökkenést. A vena femoralis mintákhoz hasonlítva a bal fülcséből származó minták TAT-komplex szintje szignifikánsan emelkedett volt mindkét csoportban. Érdekes módon, a pitvarfibrilláló betegcsoport és a kontroll csoport összehasonlításakor, a bal pitvari minták TAT-komplex szintje kis mértékben, mégis szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoportban a pitvarfibrilláló csoporthoz képest.

#### *4.3.2.1 Fibrinolitikus markerek intrakardiális szintjei a vizsgált csoportokban*

A pitvarfibrilláló betegcsoport és a kontroll csoport között nem mutatkozott szignifikáns különbség a plazminogén aktivitás,  $\alpha$ 2-PI, és a PAI-1 aktivitás tekintetében. A D-dimer és PAP-komplex szintek szignifikánsan magasabbak voltak a bal pitvari mintákban a vena femoralis mintákhoz képest, mind a pitvarfibrilláló betegcsoportban, mind a kontroll csoportban, jelezve, hogy a fibrinolitikus rendszer aktiválódott mind a két csoportban a katéteres eljárás során. Az eredményeket részleteiben megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy a bal pitvarban a D-dimer szintek a pitvarfibrilláló betegek és a kontrollok körülbelül felében haladta meg a vénás tromboembóliák diagnosztikája során alkalmazott határértéket (0,5 mg/L). A D-dimer szintek medián értéke a vena femoralis minták esetén a diagnosztikus határérték alatt volt mind a pitvarfibrilláló betegcsoport (0,26; IQR: 0,17-0,48 mg FEU/L), mind a kontroll csoport (0,30; IQR: 0,18-0,48 mg FEU/L) esetén.

### **4.3.3 Hemosztázis aktiváció és fibrinolízis vizsgálata a cryoabláció során különböző preprocedurális antikoagulálási stratégiák mellett**

#### *4.3.3.1 Alapadatok és a beavatkozás adatai*

Összesen 52 beteg került bevonásra, az antikoagulálás nélküli csoportba 24 beteg került, míg megszakítás nélküli VKA kezelésben 11 beteg, megszakítás nélküli dabigatran kezelésben 17 beteg részesült. Az alapvető demográfiai adatokban nem volt különbség a csoportok között.

#### *4.3.3.2 Hemosztázis ill. fibrinolízis markerek szintjének változása cryoabláció során különböző preprocedurális antikoagulálási stratégiák esetén*

Az abláció utáni D-dimer szintek jelentősen emelkedtek az abláció előtti D-dimer szintekhez képest valamennyi vizsgált antikoagulálási stratégia mellett. Az abláció előtti és utáni mintákban is szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk a dabigatran csoportban az OAC

nélküliekhez és a VKA-t szedőkhöz képest. Megjegyzendő, hogy a dabigatran csoportban a procedúra utáni mintákban a D-dimer szint felső interkvartilis értéke nem érte el a vénás tromboembóliák diagnosztikája során használt 0,5 mg FEU/L-es referencia küszöböt, tehát a koaguláció aktiváció mértéke ebben a csoportban az ablációt követően is jelentős mértékben szupresszált volt.

A D-dimerhez hasonlóan az abláció után szignifikánsan emelkedett a PAP-komplex szintje a nem antikoagulált és a VKA csoportban, azonban a dabigatran csoportban csak egy trend volt megfigyelhető, statisztikailag nem volt szignifikáns az emelkedés. Az ablációt követő PAP-komplex szintek szignifikánsan magasabbak voltak a nem antikoagulált csoportban az antikoagulált betegek mintájához képest. Az  $\alpha$ 2-PI aktivitás szignifikáns csökkenést mutatott, jelezve a fokozott fibrinolízist a nem antikoagulált csoportban, azonban nem változott a VKA-val és a dabigatrannal kezelt betegek esetén. Az eddigi eredményekkel összhangban jelentős fibrinogén szint csökkenés, konzumpció szintén csak a nem antikoagulált csoportban volt kimutatható, ellentétben a véralvadást gátlóval előkezelt betegekkel.

Az előző tanulmányunkkal összhangban a fibrin monomer szintek abláció előtti medián és IQR értékei is a referencia tartomány felett voltak mindhárom csoportban a katéterezés és bal pitvari mintavételezés miatti hemosztázis aktiváció következtében. Viszont ennek a fehérvénynek a rövid féléletideje ( $T_{1/2}=2,3$  óra) miatt az abláció után mindhárom csoportban szignifikáns csökkenést észleltünk. Kiemelendő, hogy a dabigatran csoport esetében különösen alacsony fibrin monomer szinteket detektáltunk az abláció után, ebben a csoportban minden betegnél visszaesett a fibrin monomer szintje a koaguláció aktiváció referencia határértéke alá, ami az ablációs eljárás során lényegesen alacsonyabb koaguláció aktivációt jelzett ebben a betegcsoportban a VKA és az OAC nélküli csoportokhoz viszonyítva. A nem antikoagulált csoportban az abláció utáni fibrin monomer szintek a betegek túlnyomó többségében továbbra is a referencia tartomány felett voltak, ami arra utal, hogy az ablációs eljárás során a koaguláció aktivációja tartósan fennállt.

#### *4.3.3.3 Lokális endothel aktiváció a bal pitvarban cryoabláció során különböző preprocedurális antikoagulálási stratégiák mellett*

A VWF antigén szintek hasonló mértékű emelkedést mutattak mindhárom csoportban az abláció után a beavatkozás előtt levett mintákhoz képest, amely alapján a vártnak megfelelően a beavatkozás kapcsán hasonló mértékű endothel károsodás valószínűsíthető mindhárom vizsgált csoportban, függetlenül az alkalmazott antikoagulációs stratégiától. Várakozásainknak megfelelően a FVIII aktivitás szintek a VWF antigén szintekkel párhuzamosan változtak a különböző abláció előtti antikoagulálási stratégiáktól függetlenül.



## 5 MEGBESZÉLÉS

### 5.1 Hemosztázis vizsgálatok akut ischaemiás stroke betegekben az intravénás trombolízis kimenetelének vizsgálatára

#### 5.1.1.1 A trombolízis hatása a vizsgált hemosztázis és fibrinolitikus faktorok szintjére

A szakirodalomban csak kevés olyan tanulmány található, melyek hemosztázis paraméterek és trombolízissel kezelt ischaemiás stroke betegek kimenetelének kapcsolatát vizsgálták, meglepő módon még a fibrinolitikus rendszer kulcsfontosságú résztvevőinek a trombolízis kimenetelében játszott szerepéről is igen limitáltak az irodalmi adatok. A trombolízissel kezelt AIS betegekben végzett hemosztázis kutatások alulreprezentáltságára egy 2019-ben megjelent szisztematikus összefoglaló tanulmány is rámutatott és igyekezett azonosítani a háttérben álló potenciális okokat. Az összefoglaló közlemény szerzői több, mint 6400 publikáció elemzése során mindössze három olyat találtak, ahol a szerzők legalább 100 AIS beteg bevonásával vizsgálták a hemosztázis egyes elemeit trombolízis előtt vett vérmintákból (ezek közül két közlemény a mi kutatócsoportunk munkája volt, további közleményeink ezt követően kerültek publikálásra). Az elemzés tanulságaiként azonosítottak egyes módszertani nehézségeket, és olyan technikai problémákat, melyek ellentmondásos vagy félrevezető adatokat produkálhatnak. Először is, a legtöbb tanulmány viszonylag kis betegpopulációt (<100 fő) vont be a vizsgálatokba, így ezen vizsgálatok statisztikai ereje alacsony. Egy másik kritikus tényező a stroke kezdete és a mintavétel közötti időintervallum. A legtöbb tanulmányban a stroke kezdete után 24 órán belül gyűjtöttek vérmintákat, ami meglehetősen tág időintervallum, hiszen a trombolízis kezelés alapvetően befolyásolja az egyes hemosztázis markerek időbeli alakulását. A trombolízisben részesülő betegeknél elengedhetetlen a trombolízis előtti és utáni vérminták eredményeinek megkülönböztetése és a vérvételek pontos időpontjának ismerete, de külön hangsúlyt kap a trombolízis előtti vérminták vizsgálata. Amennyiben prognosztikai markereket keresünk, úgy az egyes hemosztázis paramétereket feltétlenül a trombolízis megkezdése előtt kell vizsgálni, azonban a mintavételeket és biobankolást rendkívüli módon megnehezíti a rövid időablak és az stroke akut jellege (0-24 órában rendelkezésre álló személyi és technikai háttér szükséges). Tovább nehezítheti a biobankolást, hogy a kutatási kérdéstől függően egynél több mintavételi időpontra is szükség lehet a megalapozott következtetések levonásához.

Tanulmányainkban kezdetben 132, legutóbb publikált munkánkban pedig már 421 trombolízis kezelésben részesülő AIS beteget vontunk be. Ez utóbbi kohorsz hemosztázis vizsgálatok szempontjából eddig a legnagyobb trombolízissel kezelt AIS betegcsoport. A vérminták gyűjtésére minden beteg esetén a trombolízis előtt és 24 órával a terápiát követően került sor, míg a betegek egy részében (n=132) a lízis után azonnali mintavételre is törekedtünk. Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy egyes hemosztázis és fibrinolitikus faktorok szintje a trombolízis során eltérő dinamikával változik. A FVIII aktivitás, a PAI-1 aktivitás és az  $\alpha$ 2-PI aktivitás ill.  $\alpha$ 2-PI antigénszintek trombolízis után közvetlenül nagymértékű, szignifikáns csökkenést mutattak, majd 24 órával később szintjük újra a kiindulási értékekhez közelített. Ennek hátterében a FVIII esetén plazmin-mediált degradáció, míg PAI-1 aktivitás esetén a t-PA-val komplexbe lépés,  $\alpha$ 2-PI esetén a plazminnal való komplexbe lépés (PAP-komplex kialakulása) állhat. A VWF antigén szint mediánja a stroke-on átesett betegekben már beérkezéskor is meghaladta a referencia tartomány felső határát, majd a trombolízis folyamán kismértékű, szignifikáns emelkedést mutatott, melynek hátterében leginkább endothelkárosodás valószínűsíthető. A FXIII aktivitás és antigénszint pedig kismértékű, szignifikáns csökkenést mutatott a trombolízis után a lízis előtti szintekhez képest, melynek legvalószínűbb oka konzumpció lehet.

### 5.1.1.2 A vizsgált hemosztázis tényezők összefüggése a stroke súlyosságával és a trombolízis kimenetelével. A fibrinolízis regulációjának új aspektusai az experimentális eredmények tükrében

Súlyosabb stroke-ot szenvedő betegek esetén (NIHSS 6-16 ill. NIHSS >16 csoportok) a VWF antigén szintek a betegek beérkezésekor szignifikánsan magasabbak voltak az enyhébb stroke-ot elszenvedett betegekhez képest, továbbá lépcsőzetes negatív összefüggést találtunk az  $\alpha 2$ -PI antigénszintek és a stroke súlyossága között. Feltételezhetjük, hogy míg az emelkedett VWF antigén szintek oka súlyosabb stroke-ot szenvedett betegek esetén a nagyobb fokú endothel károsodásra vezethető vissza, az  $\alpha 2$ -PI szintek csökkenésének hátterében súlyosabb stroke-ok esetén elsősorban konzumpció állhat. Érdekes módon felvételkor csak közepesen erős korrelációt találtunk az  $\alpha 2$ -PI aktivitás és az antigén szintek között, mely jelentősen javult a trombolízist követően. Ez abból adódhat, hogy az  $\alpha 2$ -PI beépülése a trombusba az FXIIIa által elsősorban a PB- $\alpha 2$ -PI-t érinti, ráadásul a beépülés mértékének is van határa (45-50%). Korábbi közlemények szerint a tanulmányunkban is használt kromogén  $\alpha 2$ -PI aktivitás tesztek elsősorban a PB- $\alpha 2$ -PI izoforma kimutatására alkalmasak. Ezzel szemben az általunk használt  $\alpha 2$ -PI antigén teszt mind a 4 izoformát egységesen kimutatja, tehát jobban reprezentálja az  $\alpha 2$ -PI csökkenésének mértékét. Ez a jelenség magyarázhatja azt, hogy az  $\alpha 2$ -PI antigén teszt vizsgálatainkban szorosabb összefüggést mutatott a stroke súlyosságával és a kimenetelekkel az  $\alpha 2$ -PI aktivitáshoz képest. Biokémiai vizsgálataink eredménye arra enged következtetni, hogy súlyosabb stroke-ok esetén jelentős annak az  $\alpha 2$ -PI formának a csökkenése, amely képes a fibrinhez kötődni és az alvadékba beépülni. Eredményeink azt mutatták, hogy szignifikáns negatív összefüggés van a felvételtől NIHSS és az  $\alpha 2$ -PI beépülés mértéke között, amit az  $\alpha 2$ -PI jelentős fogyásával magyarázhatunk a plazmában az akut esemény során. Régóta ismert, hogy a súlyosabb stroke kevésbé kedvező trombolízis kimenetellel és lízissel szembeni ellenállással társul és ugyanakkor nagyobb esély van a vérzéses komplikációra, de ennek az összefüggésnek a pontos oka még nem tisztázott. Vizsgálatainkban az  $\alpha 2$ -PI *in vitro* beépülése a fibrin alvadékba szignifikánsan alacsonyabb volt azokban a betegekben, akik trombolízis utáni intrakraniális vérzést szenvedtek, szemben azokkal, akik kedvezőbb kimenettel rendelkeztek. Összhangban az irodalomban leírtakkal, azok a betegek, akik hemorragiás transzformációt szenvedtek, a felvételtől súlyosabb stroke tüneteket mutattak (szignifikánsan magasabb NIHSS pontszámuk volt). A súlyosabb stroke tünetek természetesen függenek a lokalizációtól is, de elméletben nagyobb méretű trombussal társulhatnak, melybe több  $\alpha 2$ -PI épül be és így kevésbé lesz fogékony a trombolízisre, viszont magasabb lesz a vérzéses rizikó. Ezekben az esetekben az  $\alpha 2$ -PI *in vitro* beépülésének kisebb mértéke azt mutathatja, hogy *in vivo* a fibrinolízis egyensúlya a vérzés felé tolódik el a trombus közvetlen környezetében. További tanulmányok szükségesek a különböző  $\alpha 2$ -PI izoformák alvadékba történő beépülésének jobb megismerésére, a trombolízis kimenetelekkel való tanulmányozására és annak felfedezésére, hogy alkalmazhatók-e ezen információk terápiás célpontként.

Az akut stroke után 7 nappal, az NIHSS pontrendszer változása alapján meghatározott rövid távú kimenetellel az általunk vizsgált hemosztázis paraméterek közül kizárólag a felvételi  $\alpha 2$ -PI szintek mutattak összefüggést. Szignifikánsan alacsonyabb felvételi  $\alpha 2$ -PI antigén szintet találtunk azoknál a betegeknél, akiknek kedvezőtlen volt a hosszú távú kimenetele. A betegek felvételtől meghatározott  $\alpha 2$ -PI szintje szignifikáns összefüggést mutatott a betegek hosszú távú mortalitásával is. Többváltozós regressziós analízisünkben azonban, amely a hosszú távú kimeneteleket meghatározó összes releváns tényezőt is magába foglalta, az  $\alpha 2$ -PI nem bizonyult a vizsgált kimenetel szignifikáns független prediktorának, és csak az életkor és az NIHSS maradt a modellben, mint a hosszú távú kimenetelek legfontosabb előrejelzője. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy bár az  $\alpha 2$ -PI beépülése az intracerebrális trombusokba és így a

fehérje konzumpciója feltehetőleg összefügg a stroke súlyosságával és nagy valószínűséggel a trombus méretével is, az  $\alpha$ 2-PI nyilvánvalóan nem tekinthető a kimenetel független prediktorának, így biomarkerként való alkalmazása célszerűtlen lenne. Mindazonáltal ezek az eredmények azt sugallják, hogy az  $\alpha$ 2-PI szerepet játszhat a trombolízis sikertelenségének patomechanizmusában, és fontos tényező lehet a terápia hatástalanságában súlyos stroke esetén. Ezek az eredmények összhangban vannak kutatócsoportunk azon munkájával, ahol kimutattuk, hogy az életkor ill. stroke súlyossága mellett a trombus mérete a trombolízis kimenetelének egyik legfontosabb mutatója, és számos kulcsfontosságú fibrinolízis paraméter (plazminogén aktivitás,  $\alpha$ 2-PI aktivitás, fibrinogén, FXIII aktivitás, D-dimer) felvételnél vagy 24 órával később mért szintje nem mutatott összefüggést a kezelés kimenetelével többváltozós logisztikus regressziós modellben vizsgálva.

Megjegyzendő, hogy azokban a betegekben, akik a terápiát követő 14. napig elhunytak, szignifikánsan alacsonyabb FXIII szintek voltak megfigyelhetők a trombolízist követően. Feltételezésünk szerint ezek az eredmények az ezekben a betegekben lejátszódó nagyobb mértékű konzumpcióra utalhatnak. Vizsgálatunkban bemutattuk, hogy a FXIII aktivitása és antigénszintje fokozatosan csökken a trombolízis során. A FXIII szintek ilyen mértékű csökkenésének mechanizmusa egyelőre nem tisztázott. A közelmúltban kimutatták, hogy a plazmin *in vitro* hasítja és inaktíválja az FXIIIa-t, de a FXIII zimogén formáját nem. A vizsgálatunkban elvégzett FXIII aktivitás és antigén mérések a keringő zimogén FXIII szinteket tükrözik, és ezen inaktív fehérjét a plazmin feltehetőleg nem képes hasítani. Ezt igazolja az is, hogy vizsgálatunkban a trombolízis előtti és közvetlenül utáni FXIII aktivitás és antigénszintek nem különböztek szignifikánsan. Jelentős csökkenés a FXIII szintekben 24 órával a lízis után következett be, ami arra utal, hogy a plazma FXIII szintjének trombolízis során megfigyelt csökkenése nagy valószínűséggel nem társul jelentős plazmin-mediált FXIII degradációval. Ezen túlmenően, mivel a FXIII aktivitás és a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szintje jó korrelációt mutatott a trombolízis előtt és alatt, az FXIIIa plazmin vagy más proteázok általi lebontása feltehetőleg elhanyagolható. A stroke utáni FXIII szintek jelentős csökkenésének legvalószínűbb magyarázata, hogy az aktivált fehérje folyamatosan beépül a növekvő trombusba, ami a vérárvadási rendszer folyamatos aktivitása miatt kialakuló konzumpcióhoz vezet. Ezt a hipotézist egy korábbi tanulmányban is vizsgálták, ahol a FXIII-A alegység szintjét (de nem a FXIII aktivitást) mérték AIS betegek egy kisebb csoportjában. Ebben a kohorszban 41 beteg kapott rt-PA vagy urokináz trombolízist, és eredményeik nem különböztek a trombolitikus kezelésben nem részesülő (n=23) AIS betegek eredményeitől.

Az összes potenciálisan releváns kockázati tényezőt magában foglaló logisztikus regressziós modell segítségével megállapítottuk, hogy a betegek felvétele után 24 órával mért alacsony FXIII szint szignifikáns független előrejelzője a rövid távú mortalitásnak (14 nappal a stroke-ot követően). Ez az eredmény arra utal, hogy a FXIII szint csökkenése közvetlen összefüggést mutat a fatális stroke patomechanizmusával a trombolizált betegekben. Figyelemreméltó, hogy azoknál a betegekknél, akik a stroke utáni első héten meghaltak, szokatlanul alacsony volt a FXIII szint a trombolízist követő napon; elmondható, hogy ezeknél a betegekknél a FXIII szint csak mintegy fele volt a jobb kimenetelű betegek esetén mért FXIII szinteknek. A lízis után 24 órával mért alacsony FXIII szintek nemcsak a rövid távú, hanem a hosszú távú (90. napi) mortalitással is összefüggést mutattak. A logisztikus regressziós modellben azonban a 24 órával a lízis utáni alacsony FXIII szint nem bizonyult a hosszú távú mortalitás független előrejelzőjének. Ennek háttérben hasonló tényezők állhatnak, mint amiket az  $\alpha$ 2-PI esetén már megfogalmaztunk. Fontos azonban megjegyezni, hogy a stroke utáni mortalitást hosszú távon számos tényező befolyásolja, beleértve az életkort, a társbetegségeket, jelentős funkcionális neurológiai deficit kialakulása esetén a szociális háttérrel, ápolási körülményeket, stb., mely

tényezők esetünkben is hozzájárulhatnak a hosszú távú mortalitással kapcsolatos összefüggések eltűnéséhez.

A vizsgált fibrinolízis paraméterek közül a PAI-1 vizsgálata biokémiai szempontból az egyik leginkább kézenfekvőnek tűnt, hiszen a PAI-1 a t-PA legfőbb inhibitora, azonban a PAI-1 szintek nem mutattak összefüggést a trombolízis kimenetelével ill. biztonságosságával. Meg kell azonban jegyezni, hogy a PAI-1 a stroke radiológiailag osztályozott súlyosságával összefüggést mutatott: felvételnél és a lízis után közvetlenül szignifikánsan magasabb volt a PAI-1 antigénszint azoknál a betegeknél, akiknél a 24 órás kontroll CT felvételen súlyosabb, nagyobb kiterjedésű ischaemiás lézió volt (ASPECTS  $\leq 7$ ). Ezeknél a betegeknél a medián PAI-1 antigénszint felvételnél és a lízis után közvetlenül kétszer olyan magas volt, mint a kedvező pontszámú betegeknél. Hasonló, szignifikáns különbséget figyeltünk meg a felvételi PAI-1 aktivitási szintek között a két különböző radiológiai súlyosságú csoport között. A trombolízis sikerével feltételezhetjük, hogy azért nem mutatott összefüggést a PAI-1 szint a betegeknél, mert a t-PA alkalmazási protokollja (bolus majd intravénás infúzió) és dózisa farmakokinetikai szempontból úgy lett beállítva és engedélyeztetve, hogy a trombolízis során végig biztosan jelentős mértékben felülmúlja a PAI-1 által kifejtett gátlás mértékét.

A kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel ( $mRS \geq 3$  az esemény után 90 nappal) az általunk vizsgált hemosztázis paraméterek közül a trombolízis után mért emelkedett FVIII aktivitás és VWF antigén szintek mutattak összefüggést. Logisztikus regressziós modellünk eredményei szerint a vizsgált populációban közvetlenül a trombolízis utáni, referencia tartomány fölötti FVIII aktivitás és VWF antigén a kedvezőtlen hosszú távú funkcionális kimenetel független prediktorai (emelkedett FVIII aktivitás: OR: 7,09; IQR: 1,77-28,38;  $p=0,006$ ; emelkedett VWF antigén: OR: 6,31; IQR: 1,83-21,7;  $p=0,003$ ). Eredményeink szerint mindkét hemosztázis paraméter a hosszú távú funkcionális kimenetel ígéretes, szignifikáns prognosztikus értékkel rendelkező biomarkere lehet. Ezen hemosztázis faktorok biomarkerként való alkalmazása segíthet azon betegek kiválasztásában, akik a trombolízis után/mellett alternatív terápiát igényelnek. Ugyanakkor figyelemmel kell lenni arra, hogy a FVIII aktivitás és VWF antigén trombolízis előtti értékei nem jelzik a trombolízis kimenetelét. Bár eredményeink alapján a trombolízist követően mért FVIII aktivitás és VWF antigén szintek prognosztikus értékűek a terápia kimenetelére vonatkozóan, fontosnak tartjuk kiemelni, hogy ezen eredményeket potenciálisan értékes leíró adatoknak tekintjük, melyek hasznosak lehetnek jövőbeli kutatások számára, de a vizsgálatok klinikai gyakorlati haszna további megerősítésre vár. A mechanikus trombektómia egyre nagyobb térnyerésével a klinikai gyakorlatban új típusú döntéshelyzetek keletkeznek. Alternatív terápiaként újabban egyéb gyógyszeres terápiák lehetősége is felmerül a t-PA mellett kiegészítésként, a fibrinolitikus rendszer hatékonyságának fokozására. A VWF prognosztikai szerepének további vizsgálata különösen hasznos lehet a jövőben, hiszen a VWF inhibitorokat ill. a VWF hasítását végző ADAMTS-13 (a disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin type 1 motif, member 13) alkalmazását tesztelő vizsgálatok már a preklinikai és klinikai fázisban tartanak és az eddig leírtak szerint biztonságos és ígéretes opciók lehetnek a jövőben a kimenetel javítására. Hasonlóképpen, a FXIII-,  $\alpha 2$ -PI és PAI-1 inhibitorok létjogosultsága is felmerült kiegészítő terápiaként. Úgy gondoljuk, hogy az általunk szolgáltatott obszervációs adatok hasznosak lehetnek a trombolízis során végbemenő hemosztázis változások és végső soron a sikertelen trombolízis patofiziológiájának megértésében, mely információk értékesek lehetnek a jövőben a trombolízist segítő alternatív, hemosztázisra ható gyógyszerek kifejlesztése és klinikai alkalmazása során.

5.1.1.3 A trombus mérete és a trombolízis hatásossága közötti összefüggés. A trombus méretét befolyásoló hemosztázis tényezők. A FXIII-A p.Val34Leu hatása az alvadék méretére ill. a FVLeiden hatása az alvadék fibrinolízissel szembeni fogékonyságára

Bár logikusnak tűnik, hogy a trombus mérete a trombolízis sikerének egyik fontos korlátja lehet, az irodalomban ellentmondó közlések is fellelhetők, és a trombusok méretét befolyásoló tényezők szerepe is javarészt ismeretlen. A CBS a trombus méretét és hosszát pontosan osztályozza, és korábbi vizsgálatokban már igazolták hasznosságát az intravénás trombolízisre potenciálisan kedvezőtlenül reagálók azonosításában. Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a magasabb CBS (kisebb trombus méret) kedvezőbb rövid és hosszú távú kimenetellel jár, és a CBS-t az AIS trombolitikus kezelésének prognosztikus markereként lehet használni. Eredményeink alapján a rekanalizáció és a trombolízis kimenetele nagymértékben függ a trombus méretétől, és a várakozásainkkal ellentétben az egyes hemosztázis tényezők szerepe kevésbé meghatározó a lízis kimenetelét tekintve. Tanulmányunkban elsők között vizsgáltuk kulcsfontosságú fibrinolízis paraméterek trombus mérettel való összefüggéseit AIS betegekben. Az irodalomban csak egy olyan közlés található, amelyben a hemosztázis fehérjék kapcsolatát vizsgálták a CBS-sel. Ebben a vizsgálatban kizárólag a fibrinogént mérték AIS betegek egy kisebb csoportjában, és azt állapították meg, hogy a magasabb fibrinogén szint kisebb trombusmérettel van összefüggésben. A jóval nagyobb esetszámú vizsgálatunkban a felvételi és 24 órás lízis utáni fibrinogén szintek gyakorlatilag azonosak voltak a különböző CBS-sel rendelkező betegcsoportokban, vagyis ezt az összefüggést mi nem tudtuk megerősíteni. A fibrin és a fibrinolitikus rendszer mellett a trombus méretét befolyásolhatják a vörösvérsejtek és a trombociták is, amelyek a trombusok fontos celluláris elemei. Tanulmányunkban enyhén, de szignifikánsan csökkent vörösvértetszámot és hemoglobin koncentrációt találtunk azoknál a betegeknél, akiknél magasabb volt a CBS (<10). További vizsgálatok nélkül egyelőre nem lehet azt kijelenteni, hogy mi áll a különbség hátterében (valóban felhasználódás következménye vagy sem), de összességében sem a vörösvértetek száma, sem a vérlemezkeshám nem volt összefüggésben a kimenetellel ebben a kohorszban.

Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus jelentős hatással volt az alvadék méretére *in vivo* és *in vitro* kísérletes körülmények között egyaránt. A FXIII számos mechanizmussal vehet részt az alvadék ill. a trombus méretének korlátozásában, ideértve a vörösvérsejtek trombusokban való retenciójának szabályozását vagy a vérlemezkék és a fibrin kapcsolatának down-regulációját. A FXIII gyakoribb polimorfizmusai közül napjainkig a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus a leginkább vizsgált a trombotikus kórképek rizikójával összefüggésben. Metaanalízisek megerősítették, hogy a FXIII-A Leu34 allél enyhe védő hatást nyújt a koszorúér-betegség és a vénás tromboembóliák kialakulásával szemben, de ischaemiás stroke esetén egyelőre még nincs ezzel kapcsolatos evidencia. A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmusának hatását igazoltan befolyásolják gén-környezeti kölcsönhatások. Számos vizsgálat kimutatta, hogy a Leu34 védő hatása magas fibrinogén koncentráció esetén érvényesül. *In vitro*, kísérletes tanulmányokban korábban igazolták, hogy a FXIII-A Leu34 allél jelenlétében képződött fibrin alvadék kevésbé ellenálló a fibrinolízissel szemben a FXIII-A Val34 allélhez képest. Az eredmények között leírt, a University of North Carolina, Chapel Hill, Prof. Alisa Wolberg által irányított kutatócsoporttal kollaborációban végzett experimentális vizsgálatainkban először mutattuk ki, hogy az *in vitro* kísérletekben rekonstruált, celluláris elemeket is tartalmazó teljes vérrög tömegét jelentősen befolyásolja a FXIII-A p.Val34 Leu polimorfizmus. Magas fibrinogén szintű (>3,5 g/L) plazma minták alkalmazása során az alvadék tömege szignifikánsan nagyobb volt a FXIII-A Val34 genotípusú vérmintákból képzett vérrögök esetén a homozigóta Leu34 genotípusú vérmintákhoz képest. Az eset-kontroll vizsgálatunkba bevont AIS betegek kohorszában a betegek felvételekor a fibrinogén mediánja 3,5 g/L felett volt mindkét vizsgált csoportban (CBS 0-9 vs. CBS 10: 3,88 g/L vs. 3,91 g/L),

ezért a Leu34 allél hatása mindkét csoport esetén érvényesülhetett. A FXIII-A Leu34 allél CBS-re gyakorolt hatásának a fibrinogén szintek rétegzését is magába foglaló, komplex statisztikai elemzése során nem tudtuk ebben a kohorszban az allél fibrinogén szint függő hatását kimutatni, melynek háttérében számos ok állhat, többek között az akut esemény fibrinogén szintekre gyakorolt hatása. Eredményeink igazolták, hogy a FXIII-A Leu34 allél jelenléte szignifikáns védelmet mutatott *in vivo* a nagyobb (CBS 0-9) alvadékok kialakulásával szemben (OR: 0,52; 95% CI: 0,30-0,92;  $p=0,0227$ ) a vizsgált kohorszban. A többváltozós elemzés során a polimorfizmus azonban nem bizonyult a funkcionális kimenetek független prediktorának. Mivel a trombolízis kimenetelét számos tényező befolyásolja, elsősorban a stroke súlyossága és lokalizációja, valószínű, hogy a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus nem járul hozzá jelentősen a betegek általános funkcionális kimeneteléhez. Ez összhangban van az AIS betegekben a FXIII szinteket és főbb FXIII polimorfizmusokat vizsgáló korábbi obszervációs tanulmányunk eredményével, ahol a FXIII-A p.Val34Leu nem volt hatással a kimenetelre a trombolízissel kezelt betegekben. *In vitro* kísérleteinkben úgy találtuk, hogy a FXIII-A Val34Val plazma mintákból képzett vérrögökben a vérrög tömege az életkorral, a FXIII aktivitással, a protrombin idővel és a trombin generáció idő paramétereivel (lag time és time to peak) is korrelált, míg FXIII-A Leu34 allélt hordozó egyének plazmájából képzett vérrögök esetén ezek az összefüggések nem voltak megfigyelhetőek. További vizsgálatok szükségesek a trombusok méretét befolyásoló kulcs tényezők azonosítására, és annak vizsgálatára, hogy ezen tényezők milyen mértékben befolyásolják a trombolízis kimenetelét.

Többváltozós modellek alapján a CBS a rövid és hosszú távú kimenetek független prediktorának bizonyult az általunk vizsgált kohorszban (CBS 0-9 vs. 10: OR: 2,78; 95% CI: 1,45-5,36;  $p=0,002$  és OR: 2,50; 95% CI: 1,18-5,30;  $p=0,017$ ). Korábbi vizsgálatok már felvetették, hogy az alacsonyabb CBS-sel (nagyobb trombusmérettel) rendelkező betegek nagyobb valószínűséggel profitálnak az endovaszkuláris kezeléssel, mint önmagában az intravénás trombolízissel. Másrészt számos korábbi evidencia arra enged következtetni, hogy a trombus méretén kívül az alvadék szerkezete, tulajdonságai (pl. kora) is fontos szerepet játszanak a rekanalizációban intravénás trombolízis és/vagy trombektómia során. Tanulmányunkban igazoltuk, hogy a trombus mérete valóban az egyik legfontosabb, a trombolízist befolyásoló tényezők közé tartozik, és a kulcsfontosságú fibrinolitikus faktorok szintjei kevésbé voltak kórjelzőek a kimenet szempontjából. Egyváltozós modellekben ugyan a magasabb felvételi D-dimer szintek, magasabb felvételi fibrinogén szintek és alacsonyabb 24 órás FXIII aktivitás szignifikáns összefüggést mutattak a kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel, a többszörös logisztikus regressziós modellben ezeket az asszociációkat nem tudtuk igazolni. Eredményeink alátámasztották azokat a klinikai vizsgálatokban azóta egyértelműen igazolt tényeket, mely szerint nagyérokklúzió és nagy trombus tömeg esetén az intravénás trombolízis eredményessége igen alacsony, így a mechanikus trombektómia elengedhetetlen a sikeres rekanalizációra való törekvés során.

Az alvadék szerkezetét és a trombolízis kimenetelét befolyásoló tényezők egyike lehet elméletileg a hiperkoagulabilitás, melynek háttérében állhat FV<sub>Leiden</sub> mutáció is. Korábbi munkánk során kimutattuk, hogy a FV vad típusú egyének plazmájában az APC proteolitikusan hasítja a FVa-t és FVIIIa-t, és ezáltal leregulálja a trombin generációt, így a csökkent trombin generáció csökkent/késleltetett FXIII aktivációhoz vezet. A FV<sub>Leiden</sub> mutáció fibrinolízisre gyakorolt hatása ugyanakkor eddig kevésbé volt ismert. Eredményeink szerint FV vad típusú egyének plazmájában a TM hatására bekövetkező szignifikánsan lassabb FXIII aktiváció következtében a fibrin láncok keresztkötése, valamint az  $\alpha 2$ -PI fibrinhez való kovalens kötése is jelentősen lelassul. A FV<sub>Leiden</sub> mutáció a TM ezen hatásait megszünteti, ami (a TAFI aktivációra kifejtett hatás mellett) a fibrinolízissel szemben ellenállóbb alvadékok kialakulásához vezet. Megjegyzendő, hogy az általunk végzett biokémiai kísérletek során

találtunk ugyan különbséget a FVLeiden hetero- és homozigóták között, de ez statisztikailag nem bizonyult szignifikáns eltérésnek. Ez részben a vizsgálati alanyok kis számával magyarázható. A FVLeiden homozigóták számát az előre meghatározott feltételeink mellett (trombózis mentes anamnézis, ill. FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmusra nézve vad genotípus) nem tudtuk tovább növelni. A vizsgálatban résztvevő öt homozigóta egyént közel 3000 egyén vizsgálatának eredményeként sikerült beválogatni. Másrészt a kísérleti körülmények beállításánál a FVLeiden mutáció hatásának kimutatása volt az elsődleges szempont és nem a heterozigóta ill. homozigóta állapot közti különbség vizsgálata. A kísérleti feltételek változtatásával valószínűleg lehetett volna találni olyan koncentráció viszonyokat, melyeknél a heterozigóták és homozigóták közti különbség markánsabb, ez esetben azonban elképzelhető, hogy a kis vizsgálati szám miatt a vad típus és a heterozigóták közti különbség statisztikai szignifikanciáját elveszíthettük volna.

Érdekes lehet azonban a jövőben ezen eredmények alapján megvizsgálni, hogy a FVLeiden mutáció jelenléte, akár heterozigóta formában rontja-e a trombolízis kimenetelét AIS betegekben. Az irodalomban esettanulmányok alapján feltételezhető a FVLeiden mutáció ilyen jellegű hatása, azonban a relatíve ritkább allélfrekvencia miatt a vizsgálat kivitelezéséhez nagy létszámú AIS kohorszra lenne szükség. Munkacsoportunk jövőbeli tervei között szerepel a FVLeiden mutáció és egyéb protrombotikus ill. antifibrinolitikus hatású polimorfizmusok vizsgálata a trombolízis kimenetelére vonatkozóan nagylétszámú (>500) AIS betegcsoport bevonásával, melyhez a feltételek biobankunkban rendelkezésünkre állnak. Megjegyzendő, hogy az Eredményekben bemutatott fibrinolízis inhibitorok gyakori polimorfizmusai közül egyik sem mutatott összefüggést a trombolízis rövid- ill. hosszú távú kimenetelével (a rekanalizáció sikerével), melynek hátterében az állhat, hogy ezen polimorfizmusok, bár gyakoriak, az alvadékszerkezetre gyakorolt biokémiai hatásuk ill. a fibrinolízisben betöltött szerepük feltételezhetően nem nyilvánul meg a farmakológiai dózisu t-PA hatására generálódó magas lokális plazmin koncentrációk mellett.

#### *5.1.1.4 A hemorrhagiás transzformációt befolyásoló hemosztázis tényezők. Globális tesztek a hemorrhagiás transzformáció kialakulásának előrejelzésére*

*VWF, FVIII szintek és a hemorrhagiás transzformáció.* A hemorrhagiás transzformáció az rt-PA terápia egyik legsúlyosabb mellékhatása, mely korlátot szab a kevésbé tapasztalt központok számára a terápia széleskörű alkalmazásának. Mindazonáltal csak néhány tanulmány áll rendelkezésre olyan hemosztázis vagy fibrinolízis biomarkerekről, melyek előrejelzik a lízis utáni vérzést, mivel a vérzéses komplikációkban szenvedő betegek száma a vizsgált kohorszokban gyakran túl alacsony a megfelelő következtetések levonásához.

Vizsgálatainkban a lízist követően kialakuló intrakraniális vérzéses szövődeményekkel a trombolízis utáni emelkedett VWF antigén szintek mutattak szignifikáns kapcsolatot. Állatkísérletek és biokémiai kísérletek révén közel 40 éve ismert tény, hogy a plazmin *in vitro* degradálja és inaktíválja a FVIII-at, azonban nincs tudomásunk olyan tanulmányról, mely *in vivo*, rt-PA trombolízis terápiában részesült betegeknél vizsgálta volna a plazmin FVIII-ra gyakorolt hatását. Eredményeink szerint a közvetlenül trombolízis terápia után gyűjtött mintákban jelentősen csökken a FVIII aktivitása a trombolízis megkezdése előtti értékekhez képest, a FVIII aktivitás szintek azonban egy vizsgált időpontban sem mutattak összefüggést a vérzéses szövődemények kialakulásával, mely eredmények összhangban vannak az irodalomban fellelhető állatkísérletes eredményekkel. A FVIII aktivitás változásával szemben a VWF antigén értékek a vizsgált időpontokban folyamatos emelkedést mutattak, melynek hátterében elméletileg két tényező állhat. Először is, a plazmin degradálhatja a VWF-t, amint az már

korábról ismert *in vitro* kísérletekből. Az általunk használt diagnosztikai teszt poliklonális antitestek alkalmazásával határozza meg a VWF antigén szintjét, ebből fakadóan, a teszt által mért megemelkedett szintek háttérében a fehérje degradációja is állhat. Egy korábbi tanulmányban, mely rt-PA trombolízisben részesült akut myocardialis infarctusban szenvedő kis létszámú betegpopuláción (n=7) vizsgálta különböző hemosztázis paraméterek változását a terápia során, úgy találták, hogy a trombolízis terápia hatására megemelkedett a VWF antigén szintje, feltehetőleg a VWF multimerek proteolízise következtében. Feltételezések szerint a trombolízissel kezelt akut myocardialis infarctus vérzéses komplikációinak háttérében a VWF multimerek degradációja állhatott. Saját tanulmányunk eredményei szerint 24 órával a trombolízis utáni minták VWF antigén szintjei szignifikánsan magasabbak SICH esetén (n=6), a vizsgált populáció többi tagjához viszonyítva. A SICH esetek alacsony számára tekintettel azonban ezt a megfigyelést nagyobb esetszámú tanulmányokkal szükséges alátámasztani. A trombolízist követő VWF antigén szintek megemelkedésének háttérében másrésről az ischaemiás károsodás következtében kialakuló endothelkárosodás is állhat. Egy akut myocardialis infarctusban szenvedő egyéneket vizsgáló tanulmány eredményei szerint a streptokinázzal végzett trombolízis magasabb VWF antigén szintekkel társult, mely emelkedést a trombolitikus szer hatására kialakult oxidatív stressz következményeként írták le. Vizsgálataink szerint a VWF antigén szintjei azon betegekben emelkedtek meg 24 órával trombolízis után, akiknek súlyosabb neurológiai károsodásuk volt (NIHSS 6-16 és NIHSS >16), míg a kevésbé súlyos esetekben (NIHSS 0-5) nem találtunk VWF antigén szint emelkedést. Ez az eredmény, a FVIII aktivitással megfigyelt jó korreláció ill. a VWF szint 24 órán túli emelkedése arra enged következtetni, hogy legalábbis részben, az emelkedett VWF antigén szintek háttérében inkább endothelkárosodás állhat. Nem kizárható azonban, hogy a VWF szintek trombolízis során megfigyelt emelkedésének háttérében a vérlemezkékből felszabaduló VWF is hozzájárulhat, ezen elméletek igazolására azonban további vizsgálatok szükségesek.

*Fibrinolízis inhibitorok és a hemorrhagiás transzformáció.* Bár kiindulási hipotézisünkben feltételeztük, hogy az alacsony FXIII szint szerepet játszhat a lízist követően kialakuló intrakranialis vérzés patomechanizmusában, tanulmányunk eredménye ezt nem igazolta. Vizsgálatunk alapján feltételezhetjük, hogy a trombolízist követő vérzéses szövődmények kialakulása nem az alacsony FXIII szinthez köthető. Ez a megállapítás összhangban van a néhány korábban publikált, kislétszámú kohorsz bevonásával készült tanulmány eredményével. Bár biológiai értelemben véve elképzelhetőnek tűnt, hogy a lízis után közvetlenül mért alacsony  $\alpha$ 2-PI szint felelős lehet a terápiával összefüggő ICH eseményekért, az általunk vizsgált kohorszban nem találtunk ilyen összefüggést. Az  $\alpha$ 2-PI szintek közvetlenül a lízis után a referencia tartomány alsó határa alatt voltak a kohorsz minden vizsgált betegében, de a vérzéses szövődmények nem voltak ezzel összefüggésben. Bár az  $\alpha$ 2-PI felvételkor mért szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a lízis után ICH-t szenvedett betegeknél, a csoportok közötti különbségek nagyon szerények voltak. Mivel a hemorrhagiás transzformációt szenvedett betegek súlyosabb stroke-ban szenvedtek, feltételezhető, hogy a két csoport  $\alpha$ 2-PI szintjei között megfigyelt szignifikáns különbség a stroke súlyosságában mutatkozó különbségekkel függ össze. Mivel az  $\alpha$ 2-PI szintek a hemorrhagiás transzformációt szenvedett ill. vérzés nélküli csoportokban jelentős átfedést mutattak a felvételkor, ráadásul az  $\alpha$ 2-PI aktivitási szintek nem különböztek a csoportok között, nem valószínű, hogy az alacsony  $\alpha$ 2-PI lenne az egyetlen felelős tényező a lízist követő vérzés kialakulásában. Ezt a feltételezést tovább valószínűsíti az az eredmény, hogy az  $\alpha$ 2-PI szintek nem mutattak szignifikáns korrelációt a lízis utáni hematoma becsült térfogatával.

Bár a trombolízis során meghatározott PAI-1 szintek nem mutattak összefüggést a hemorrhagiás transzformáció kialakulásának valószínűségével, többszörös logisztikus



regressziós modellben, amely a lízis utáni vérzés összes lehetséges szokványos kockázati tényezőjét tartalmazta, a PAI-1 5G/5G genotípus jelenléte a legerősebb független kockázati tényezőnek bizonyult a hemorrhagiás transzformáció kialakulása szempontjából (OR: 4,75 95% CI: 1,18-19,06; p= 0,028). Ezen felül PAI-1 5G/5G genotípusú betegeknel megfigyelhető volt egy tendencia a kialakult intracerebrális hematomák becsült térfogatára vonatkozóan, azonban ezeket az eredményeket nagyobb elemszámú klinikai vizsgálatnak kell igazolnia.

A PAI-1 5G/5G genotípus elméletileg két módon befolyásolhatja a lízis utáni vérzés kialakulását: egyrészt a plazma PAI-1 szintre gyakorolt hatásával, másrészt az agyban a PAI-1 lokális hatásával a parenchymában, korlátozva a túlzott mértékű t-PA aktivitást. A mi vizsgálatunkban a PAI-1 4G/5G polimorfizmus nem volt hatással a plazma PAI-1 szintjére, ami összhangban van korábbi vizsgálatok eredményeivel. Elméletileg a PAI-1 5G/5G genotípus az ICH kialakulásához hozzájárulhat lokálisan is, az intracerebrális lézió helyén fellelhető alacsonyabb PAI-1 szinteken keresztül. A trombus lokális PAI-1 szintje lényegesen eltérhet a periférián detektált szintektől. A PAI-1 szintek a stroke lefolyása során is jelentős változást mutathatnak: egy állatkísérletes modellben akut stroke után az intravaszkuláris PAI-1 szintek növekvő tendenciát mutattak, ugyanezt a jelenséget megfigyelhettük a mi tanulmányunkban, akut stroke betegekben is. A PAI-1 szint ismert befolyásoló tényezőit (pl. BMI és gyulladás) vizsgálatunk is megerősítette. Érdekes módon a lízis utáni ICH-ban szenvedő betegeknel szignifikánsan alacsonyabb volt a BMI. Bár az alacsony PAI-1 szintek, az alacsony BMI és a lízis utáni vérzés között felmerül az összefüggés, az ebben a tanulmányban alkalmazott backward regressziós modell alapján a BMI nem bizonyult a vérzés független kockázati tényezőjének, ennek igazolására további, nagyobb betegszámú vizsgálatokra van szükség. A patomechanizmust illetően feltételezzük, hogy PAI-1 5G/5G genotípus és a vérzéses transzformáció közötti kapcsolat túlmutat az intravaszkuláris fibrinolízis biokémiai folyamatán, és elképzelhető, hogy a polimorfizmus hatása az asztricitákból felszabaduló PAI-1 lokális, a vér-agy gát károsodását csökkentő hatásával magyarázható, mely elmélet igazolására további tanulmányok szükségesek.

*Globális tesztek használata a hemorrhagiás transzformáció kialakulásának előrejelzésére.* Mivel a trombolízis kimenetelét és a vérzéses komplikációkat számos hemosztázis faktor, fibrinolízis fehérje és inhibitoraik közötti kölcsönhatás befolyásolhatja, így logikus megoldás lehet globális tesztek használata a terápiás kimenetek előrejelzésére individuális faktorok szintjeinek időigényes és költségigényes meghatározása helyett. Vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy az AIS betegek felvételi vérmintájából elvégzett mCLA továbbá a trombin generációs teszt is ígéretes vizsgálat lehet nem csak az intravénás trombolízis rövid távú funkcionális kimenetelének, hanem a terápia asszociált intrakraniális vérzéses szövődmények előrejelzésére is.

Az CLA módszer elméletileg jól modellezi az *in vivo* lezajló trombolízis folyamatát. Mivel az általunk alkalmazott módszer során az rt-PA koncentrációk jóval magasabbak, mint az endogén t-PA koncentrációk, a CLA az exogén rt-PA terápiás dózisaival szembeni fibrinoldódás mértékéről ad információt, nem pedig az endogén fibrinolitikus kapacitás mértékéről. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy a CLA egy igen munkaigényes módszer, mely jelenleg még számos limitációval küzd. A módszer nem megfelelően standardizált, annak ellenére, hogy nemzetközi együttműködés keretében elkezdődtek erőfeszítések a vizsgálat standardizációja érdekében. Tanulmányunk során a vizsgálati körülményeket a rendelkezésre álló szakirodalom és az egészséges egyének plazmamintáin végzett előkísérleteink során tapasztalt eredmények alapján választottuk ki. Célunk volt a vizsgálat körülményeinek optimalizálása során még elfogadható analitikai pontosság mellett olyan feltételek megteremtése, mely viszonylag nagy mintaszám félautomata tesztelését lehetővé teszi. A hagyományos CLA módszer további

limitációja, hogy a vizsgálat plazma mintákból történik, ezért a trombolízis során potenciálisan szerepet játszó sejtalkotók nincsenek jelen. A módszer diagnosztikai teljesítményének javítása érdekében a tesztet cfDNA és hiszton hozzáadásával egészítettük ki, imitálva a NET-ek jelenlétét az alvadékképződés és lízis során. Számos tanulmány leírta, hogy a NET-ek a fibrinnel interkalálódva sűrű hálózatot hoznak létre az agyi trombusokban, mely ellenáll a fibrinolízisnek. Vizsgálatunk alapján elmondhatjuk, hogy a cfDNA és hiszton hozzáadása az *in vitro* CLA keverékhez, a vártan megfelelően, szignifikánsan megnyúlt alvadék képződést és lízist eredményezett. Eredményeink arra is rávilágítottak, hogy az alvadék lízisének cfDNA és hiszton jelenlétében történő megnyúlása az egyének között is jelentős különbséget mutatott.

Tanulmányunkban leírtuk, hogy a hagyományos CLA trombolízis kimenetelére vonatkozó diagnosztikai teljesítményét jelentősen javította a cfDNA és hiszton jelenléte. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy a cfDNA és hiszton beépítése a tesztbe egy szimplifikált módja a trombuson belüli NET hatás imitálásának. A NET-ek felszabadulása egy igen összetett folyamat, mely nemcsak a DNS és a hiszton, hanem más fehérjék, köztük a neutrofil granulomok fehérjéinek (pl. humán neutrofil elasztáz, mieloperoxidáz) felszabadulását is magába foglalja, ami komplex interakciók sokféleségéhez vezet a trombuson belül. Bár a cfDNA és hiszton hatása koránt sem azonos az intakt NET-ek hatásával, kimutatták, hogy a DNS-nek és a hisztonnak fontos alvadék-stabilizáló és antifibrinolitikus szerepe van. Egyéb mechanizmusok mellett azt is igazolták, hogy a cfDNA felgyorsítja a t-PA-PAI-1 komplex képződését, lelassítja a t-PA által közvetített plazmin képződést, modulálja az alvadék szerkezetét, és késlelteti a plazmin által indukált lízist, a fibrinszálakkal való interkalációja révén. A hiszton megköti a fibrinogént és a fibrint, valamint a hiszton polimerizált fibrinbe történő beépülésének eredményeként stabilabb alvadék képződik. A biokémiai modellek során alkalmazott koncentrációk, csakúgy, mint az általunk alkalmazott vizsgálati körülmények kórosan magas DNS ill. hiszton koncentrációkat tükröznek, amelyek a trombusok belsejében fordulhatnak elő. Nehéz megbecsülni az alvadékokban előforduló DNS mennyiségét, korábbi vizsgálatok igen magas koncentrációkat valószínűsítettek. Egészséges egyéneknél a keringő cfDNA relatíve alacsony szintjei figyelhetőek meg (0,02-1,7 µg/mL), de emelkedett szintet (5 µg/mL vagy annál magasabb) észleltek számos megbetegedés során, például szepszisben. A tanulmányunk során alkalmazott mCLA mérések során a cfDNA és hiszton optimális koncentrációját korábbi *in vitro* tanulmányok eredményei alapján választottuk.

Fontos eredményünk, hogy az mCLA módszer magas negatív prediktív értékkel bír (97,9%) a lízist követő intrakraniális vérzés előfordulásának kimutatására. A logisztikus regressziós analízis eredménye alapján elmondhatjuk, hogy az mCLA mérés során meghatározott AUC paraméter (<29,9 OD\*perc) a lízist követő intrakraniális vérzéses szövődmény szignifikáns, független előrejelzője (OR: 5,85; 95% CI: 1,24-27,7; p=0,026), hasonlóan az emelkedett felvételtkorai NIHSS értékhez (NIHSS >15 esetén OR: 5,32; 95% CI: 1,69-16,75; p=0,004).

A teszt ilyen jellegű alkalmazása kiemelt jelentőséggel bírhat olyan esetekben, amikor a trombolízist a mechanikus trombektómia előtt alkalmazzák. A legújabb irányelvek azt javasolják, hogy azoknál az AIS betegeknél, akiknél lehetséges, fontolóra kell venni az rt-PA adását még a mechanikus trombektómia megkezdése előtt. E megközelítés biztonságosságának javítása érdekében az új módszerek, mint például az mCLA, hasznosnak bizonyulhatnak a jövőben. Természetesen a módszer gyakorlati alkalmazásához a rövid időablak miatt a módszer továbbfejlesztése és gyors tesztként való alkalmazása fontos lenne. Az mCLA ugyanakkor akár jelenlegi formában is hozzájárulhat a betegek kezelési stratégiájának optimalizálásához: azokban az esetekben, amikor az mCLA megnövekedett vérzés kockázatot jelez, a kapott információ még akkor is releváns lehet a klinikai gyakorlatban, ha a beteg már megkapta a trombolízis terápiát. Ezekben az esetekben a betegeket fokozott megfigyelés alá lehet vonni a potenciális károsodások csökkentése érdekében (pl. hosszabb idejű intenzív ellátás, a magas

vérnyomás agresszív kontrollja, kiterjedt neurológiai követés, stb.). Meg kell azonban jegyezni, hogy eredményeink nem mutattak különbséget az aSICH és a SICH között, ami nagy valószínűséggel annak tudható be, hogy az intrakraniális vérzés során kialakult tüneteket erősen befolyásolja a vérzés lokalizációja.

Miután az mCLA módszer a hemorrhagiás transzformáció előrejelzőjének bizonyult ischaemiás stroke trombolitikus kezelése esetén, megvizsgáltuk, hogy nem-traumás hemorrhagiás stroke-ot szenvedett betegekben összefüggést mutat-e a vizsgálat az intracerebrális hematoma méretével ill. a vérzés kimenetelével. Az akut ICH-t elszenvedő betegek kimenetelét előrejelző, megfelelő prediktív értékű diagnosztikai tesztek potenciálisan fontosak lehetnek a klinikai gyakorlat számára, azonban meglepően kevés tanulmány áll rendelkezésünkre ebben a témában. Keveset tudunk a hemosztázis és fibrinolízis egyensúlyáról ICH-t elszenvedett betegekben, holott fontos terápiás következményekkel bírának ezen ismeretek (pl. az eseményt követő antikoaguláció kezdetének időpontja). Eredményeink alapján az ICH betegek felvételtkor mCLA paraméterei korreláltak a becsült felvételtkori vérzésvolumen nagyságával, ami fontos előrejelzője a kimenetelnek. A gyorsabb alvadék képződés, és a rövidebb lízis idők, amelyek az újonnan képződött alvadék gyorsabb lebomlását jelzik, nagyobb hematoma térfogattal, súlyosabb stroke-kal, és rosszabb kimenetellel társultak a vizsgált betegpopulációban. Ezen eredményeink összhangban állnak korábbi tanulmányok eredményeivel, amelyek azt mutatták, hogy az emelkedett D-dimer szint, amely a trombus fibrinláncainak fokozott lebontását jelzi, az ICH kedvezőtlen kimenetelének prediktora. A CLA korábban már potenciálisan hasznosnak bizonyult egyes kimenetelek előrejelzésében számos olyan kórkép esetén, ahol a fibrinolitikus rendszer egyensúlyának zavara alakult ki. Vizsgálataink a jövőben kiindulási alapot jelenthetnek mindkét stroke altípus esetén nagyobb esetszámú betegkohorszokon végzett tanulmányokhoz, melyek a fibrinolízis egyensúlyában bekövetkezett változások jobb megértését célozzák az intracerebrális hematoma evolúciója ill. a betegek kimenetele vonatkozásában. A teszt további jövőbeni módosításai még jobb diagnosztikai teljesítményt és könnyebb megvalósítást tehetnek lehetővé, ami a jövőben a potenciális klinikai felhasználás esetén további előnyt jelenthet.

A trombin generációt vizsgáló tanulmányunkban kimutattuk, hogy ez a teszt szintén értékes lehet a jövőben az AIS trombolízis terápia hemorrhagiás transzformációjának előrejelzésére. Az alsó kvartilisbe tartozó ETP és peak thrombin paraméterek szignifikáns összefüggést mutattak a trombolízist követően kialakult SICH komplikáció előfordulásával, és többszörös logisztikus regressziós analízisben mindkét paraméter a SICH kialakulásának független előrejelzőjének bizonyult. Az alacsony esetszámok miatt azonban az eredmények igazolására további, megerősítő vizsgálatok szükségesek nagyobb kohorszokban. A trombin generációs teszt a hipo- ill. hiperkoagulációval járó állapotok kimutatására az egyik legígéretesebb globális teszt, melynek a standardizációja még egyelőre várat magára. Úgy gondoljuk, hogy vizsgálataink eredményei tovább fokozhatják a trombin generációs vizsgálat iránti szakmai érdeklődést és felgyorsíthatják a teszt rutin diagnosztikai alkalmazásához vezető lépéseket. Fontos eredményünknek tartjuk, hogy a trombin generációs tesztben meghatározott peak thrombin paraméter agyvérzett betegekben szignifikánsan magasabbnak bizonyult, a time to peak paraméter pedig szignifikánsan rövidebb volt a vizsgált referencia egyénekhez képest. Ezek az eredmények az agyvérzett betegekben fennálló hiperkoagulabilitásra utalnak. A vizsgált kohorszban a fokozott trombin generáció összefüggést mutatott a betegek rossz kimenetelével (mRS 2-6). Ismert tény, hogy a stroke-ot elszenvedett betegek rizikója igen magas vénás tromboembóliákra (VTE) nézve. Prospektív obszervációs tanulmányok igazolták, hogy a hemorrhagiás stroke-ot szenvedett betegek VTE rizikója az egyik legmagasabb a fekvőbetegek között (incidencia: 7%), és a VTE rizikó négyszer nagyobb az agyvérzett betegekben az ischaemiás stroke-ot szenvedett betegekhez képest. Vérzéses stroke-ot

szenvedett betegekben a VTE profilaxis indítása alacsony molekulásúlyú heparinnal a legújabb irányelvek szerint akár már az eseményt követő 24-48 órában is javasolt, egyéni mérlegelés alapján. Mindezek ellenére átfogó tanulmányok szerint a kórházban kezelt ICH betegek kevesebb, mint 20%-a részesül megfelelő VTE profilaxisban és a profilaxis megkezdése megkésett az esetek többségében. Bár a mi vizsgálataink célkitűzésén túlmutatott az agyvérzett betegekben kialakuló VTE események kialakulásának követése, a jövőben fontos lehet olyan prospektív vizsgálatok kivitelezése, melyben felmérnénk, hogy a trombin generáció vagy más hemosztázis teszt segítségével megjósolható-e, hogy mely ICH beteg esetén nagyobb a VTE kockázat és javasolt korai profilaxis. Ezek a vizsgálatok, megfelelő predikciós skálarendszerek részeként, nagylétszámú kohorszon történő validálást követően megeremhetnek a personalizált VTE profilaxis alapjait agyvérzett betegekben.

#### *5.1.1.5 Limitációk*

Tanulmányaink eredményeit a klinikai vizsgálatok ismert korlátainak összefüggésében kell értelmezni. Obszervációs tanulmányaink esetén a mintavételi populáció esetszáma limitált volt, azonban összehasonlítva az eddig publikált vizsgálatokkal, ahol hemosztázis vagy fibrinolízis biomarkereket határoztak meg AIS betegek trombolízis előtt vett vérmintáiból, ill. ICH betegek vérmintáiból, az általunk bemutatott vizsgálatok az eddigi legnagyobb mintaszámot felölelő tanulmányok közé sorolhatóak. Ennek ellenére, az itt bemutatott eredményeinket még nagyobb mintaszámú populációk vizsgálatával is érdemes lesz megerősíteni, különös tekintettel a vizsgált AIS kohorszban hemorrhagiás transzformációt elszenvedett betegek korlátozott számára. Vizsgálataink egycentrumú vizsgálatok voltak, ami hozzájárult a relatíve korlátozott mintaszámhoz, viszont feltétlen előnyének tekinthető a tanulmány során alkalmazott egységes mintakezelés és egységes betegellátási eljárások. A Debreceni Egyetem Klinikai Központ Neurológia Klinika Stroke Centrumja relatíve nagy földrajzi területről fogad akut stroke-ot szenvedett betegeket, ezért a három hónapos követési időszak alatt a betegek némi lemorzsolódása elkerülhetetlen volt. Az AIS betegeket vizsgáló tanulmányainkban a lemorzsolódás mértéke tanulmánytól függően 3,5-17,4% közöttinek adódott, míg az ICH betegek populációjában a három hónapos követési időszak alatt ez mindössze 3,3% volt. Ez a lemorzsolódási arány más, akut stroke betegeket érintő prospektív vizsgálatok esetén látott arányoknak megfelel ill. egyes vizsgálataink esetén alacsonyabbnak is mondható. Megemlítendő azonban, hogy a lemorzsolódás relatíve kis mértéke is bizonyos mértékig befolyásolhatta az eredményeket, ezért a jövőben nagyobb klinikai vizsgálatokra van szükség eredményeink megerősítéséhez. Az agyvérzett betegek és a párhuzamosan vizsgált referencia egyének közötti egyes antropometriai különbségek (pl. kor) szintén a limitációk közé sorolhatók, de mivel a vizsgálataink nem mutattak korfüggést, így ez valószínűleg nem befolyásolta az eredményeket.

## **5.2 Hemosztázis vizsgálatok a vérlemezkegátló terápiák hatástalanságának felismerésére**

A clopidogrelt monoterápiaként gyakran alkalmazzák hazánkban a nem kardiogén eredetű ischaemiás stroke szekunder prevenciójára. Irodalmi adatok alapján ma már egyértelműen tudjuk, hogy a clopidogrel aktív metabolitjának szintje és a clopidogrel által kifejtett trombocita gátlás mértéke nagyfokú egyéni változatosságot mutat. Vizsgálatainkban 111 clopidogrel monoterápián lévő betegen teszteltük a clopidogrel terápia monitorozására alkalmas módszereket, és igazoltuk, hogy a betegek jelentős részében a laboratóriumi tesztek eredménye alapján a clopidogrel terápia hatástalannak bizonyult. A legelfogadottabb P2Y12 specifikus teszttel, a VASP foszforiláció áramlási citometriás vizsgálatával meghatározva a betegeknek

csak 43,2%-a mutatott megfelelő választ a clopidogrel monoterápiára. Mivel tudjuk, hogy a clopidogrel hatástalanságának háttérben elsősorban metabolikus okok állnak (leggyakrabban CYP2C19 \*2 ill. \*3 funkcióvesztő allélek jelenléte), a clopidogrelt szedő betegekben fontosnak tűnik a terápia hatásának ellenőrzése. Sajnos bármennyire is ismerjük a biológiai összefüggéseket a clopidogrel hatástalansága és a rosszabb klinikai kimenet között, jelenleg nincs nemzetközi evidencia a clopidogrel hatás monitorozására vonatkozóan, és az új típusú P2Y<sub>12</sub> gátlók korszakának beköszöntével feltételezhetjük, hogy már nem is fog készülni ezt igazoló randomizált klinikai vizsgálat. A laboratórium szerepe azonban továbbra is fontos lehet, egyéni esetekben a clopidogrel hatástalanságának megítélése szempontjából. Munkánk során arra törekedtünk, hogy kidolgozzunk egy olyan, P2Y<sub>12</sub> receptor hatásra specifikus laboratóriumi tesztet, amely megbízható, relatíve könnyen elvégezhető és olcsó. A módosított, PGE<sub>1</sub>-et tartalmazó ADP-indukálta trombocita aggregációs módszer jó korrelációt mutatott a VASP foszforilációs teszt eredményével és magas diagnosztikus hatékonyságot mutatott clopidogrel monoterápián lévő betegekben. A hagyományos ADP-indukálta aggregációval szemben a teszt nem érzékeny aszpirin hatására és javasolható kettős trombocita gátló terápián lévő betegek vizsgálatára is.

Számos klinikai vizsgálat mutatott rossz egyezést a clopidogrel hatás vizsgálatára alkalmas tesztek között, azonban a vizsgálatok túlnyomó többsége kettős trombocitagátló terápián lévő betegek vérmintáját használta, így, bár nem meglepőek ezek az eredmények, interpretációjukhoz hozzátartozik az aszpirin különböző mértékű hatásának figyelembevétele az egyes tesztekre vonatkozóan. Szintén számos olyan klinikai vizsgálati eredményt publikáltak a múltban, ahol az aszpirin ill. clopidogrel rezisztencia mértékét próbálták a szerzők felfedni különböző betegcsoportokban, de a vizsgálatok nem COX-1 specifikusak vagy P2Y<sub>12</sub> receptor specifikusak voltak, továbbá az eredményeket potenciálisan befolyásolhatta a kettős trombocitagátló terápia. Ezen félrevezető vizsgálatok következménye volt az aszpirin rezisztencia valós mértékének felülbecslése. Számos olyan klinikai körülmény van, ami kettős trombocitagátló kezelést tesz szükségessé és amennyiben szükséges, a megfelelő, specifikus laboratóriumi módszer kiválasztása az egyes antitrombocita szerek hatásának követésére nem egyértelmű. Eredményeinkkel felhívjuk a figyelmet arra, hogy átfedések vannak a vérlemezkegátló gyógyszerek által gátolt intracelluláris mechanizmusokban, így a monoterápia esetén alkalmazott módszerek nem feltétlenül használhatók kettős trombocita gátló kezelés során. Valójában az irodalomban számos, clopidogrel rezisztenciát vizsgáló kutatás kettős trombocita gátláson lévő betegeket vont be, és néhányuk az aszpirin által befolyásolt laboratóriumi technikát alkalmazott. Fontos hangsúlyozni azt, hogy bár az ADP indukálta trombocita aggregációt gyakran „gold standard”-ként tartják számon a clopidogrel hatás monitorozására, az aszpirin hatás befolyásolja ezt a tesztet, és kettős trombocita gátló kezelés esetén nehéz meghatározni, milyen mértékben gátolta a trombocitákat az aszpirin ill. a clopidogrel (vagy más P2Y<sub>12</sub> receptor blokkoló). Eredményeink azt mutatták, hogy a clopidogrel hatást vizsgáló módszerek közül a P2Y<sub>12</sub> receptor specifikus teszteket nem befolyásolja az aszpirin hatása. Ennek megfelelően kettős trombocita gátló terápián lévő betegek vizsgálatára a VASP foszforiláció és az általunk kidolgozott, modifikált ADP aggregációs módszer (ADP[PGE<sub>1</sub>]) javasolható. Megjegyzendő, hogy a jelenlegi nemzetközi trendek abba az irányba mutatnak, hogy a klinikai gyakorlatban a kezelőorvosok nem feltétlenül szeretnék várni arra, hogy a clopidogrel terápia hatása monitorozhatóvá váljon a vérlemezkek gátlásán keresztül, hanem a CYP2C19 funkcióvesztő allélek tesztelésével váltanak ki azt, még a terápia megkezdése előtt. Bár ebben a témakörben sem állnak rendelkezésünkre nagy randomizált klinikai tanulmányok eredményei, a CYP2C19 genotípus alapú egyénre szabott vérlemezkegátlással kapcsolatban kisebb klinikai vizsgálatok és regiszterek szolgáltatnak információkat. Akut koronária szindrómát ill. perkután koronária intervenciókat követően,

amennyiben elsőként clopidogrel terápiára jön szóba és nem újabb típusú P2Y<sub>12</sub> gátló gyógyszert kap a beteg, a CYP2C19 genotípus mielőbbi ismerete fontos lehet, hiszen gyenge metabolizálók esetén így rögtön elkerülhető a hatástalan gyógyszer felírása. Ennek érdekében már elérhetőek olyan POCT készülékek, amelyek akár 1 órán belül eredményt adnak és lehetővé válik a CYP2C19 genotípus alapú perszonalizált trombocitagátló terápia. A módszer elméletileg az AIS szekunder prevenciója esetén alkalmazott clopidogrel terápia során is hasznos lehet.

Az irodalmi adatok fényében felmerülhet a kérdés, hogy az aszpirin terápia hatását kell-e egyáltalán monitorozni, kettős trombocitagátlás vagy akár monoterápia esetén. Az eddig közölt eredmények azt sugallják, hogy akut ischaemiás eseményt követően az aszpirin terápia monitorozása nem szükséges, hacsak non-compliance, vagy gyógyszer interakció nem feltételezhető. Fontos megjegyezni, hogy az „aszpirin rezisztencia” fogalmát többféleképpen definiálhatjuk. Kémiai rezisztencia esetén a trombocita COX-1 nem acetilálható aszpirinnel. Elméletileg a COX-1 gén mutációi eredményezhetnek olyan helyzetet, amiben az aszpirin nem tudja acetilálni az enzimet, de ilyen eset még nem került közlésre. Mivel a laboratóriumi módszerekkel igazolt aszpirin hatástalanságának (laboratóriumi rezisztencia) legfőbb oka maga a non-compliance, az aszpirin hatás ellenőrzése valójában leginkább a betegek compliance-éről szolgálhat információval. Non-szteroid gyulladáscsökkentők (ibuprofen) interferálhatnak az aszpirin hatásával, így az adekvát laboratóriumi teszttel észlelt elégtelen aszpirin hatás ilyen gyógyszerinterakcióra is irányíthatja a figyelmet. Fontos azonban hangsúlyoznunk, hogy csak COX-1 specifikus módszerek alkalmazhatók erre a célra (leggyakrabban AA-indukálta trombocita aggregáció és szekréció), amennyiben monoterápia formában kerül sor aszpirin terápiára. Klinikai rezisztencia alatt azt értjük, ha az aszpirin nem védi meg a beteget egy vaszkuláris eseménytől. Ennek hátterében összetett okok állhatnak, de magas aterotrombotikus rizikó esetén az aszpirin kombinálása egyéb hatásmechanizmusú vérlemezkegátlóval, pl. P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitorral kézenfekvő lehet. Ennek megfelelően gyakori lehet az olyan klinikai körülmény, ami kettős vérlemezkegátló kezelést indokol. Eredményeink alapján új megállapítás, hogy a clopidogrel terápia az aszpirin hatást vizsgáló, AA agonistát használó tesztek többségét jelentős mértékben befolyásolja. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az aszpirin hatást detektáló tesztek közül a clopidogrel monoterápia szignifikánsan gátolta az AA-indukálta trombocita aggregációt és szekréciót, valamint az AA-indukálta TXB<sub>2</sub> termelődést a trombocitákban. A VerifyNow Aspirin teszt eredményeit nem befolyásolta a clopidogrel, így az javasolható kettős trombocita gátló terápian lévő betegek vizsgálatára.

#### *5.2.1.1 A vizsgálatok limitációi*

Vizsgálataink korlátja, hasonlóképpen más, a trombocitagátló terápiák laboratóriumi monitorozásával foglalkozó klinikai vizsgálatokhoz, a betegek esetén potenciálisan tapasztalható non-compliance, mely befolyásolhatta az eredményeket. Bár a clopidogrel monoterápián lévő betegek esetén törekedtünk a non-compliance kiszűrésére a betegek bevonásakor, elképzelhető, hogy a non-responderek magas aránya ennek a jelenségnek is köszönhető. Megjegyzendő, hogy bár a non-responderek arányát és a clopidogrel hatástalanságának mértékét ez a jelenség túlozhatja, a módszerek közötti összehasonlítások eredményeire nincs hatással. A kontrollok és betegek közötti egyes alapvető antropometriai különbségek (pl. kor) szintén a limitációk közé sorolhatók, de a vizsgálatok nem mutattak korfüggést, így ez valószínűleg nem befolyásolta az eredményeket.

## 5.3 Intrakardiális hemosztázis és fibrinolízis markerek vizsgálata pitvarfibrilláló betegekben

### 5.3.1.1 Lokális, intrakardiális hemosztázis és fibrinolízis eltérések azonosítása pitvarfibrilláló betegekben

A Virchow-triász szerint pitvarfibrillációban az intrakardiális környezet trombogénebb a perifériás keringéshez képest, azonban ennek alátámasztására kevés olyan bizonyítékot találunk, melyek intrakardiális vérmintát vizsgáló tanulmányokból származnak. Vizsgálatainkban a hemosztázis ill. fibrinolízis rendszer számos tagját vizsgáltuk intrakardiális vérmintákban pitvarfibrilláló betegekben és nem pitvarfibrilláló kontrollokban, azonban nem találtunk az intrakardiális mintákban a pitvarfibrillációra nézve specifikusnak tekinthető hemosztázis vagy fibrinolízis paramétert. Megjegyzendő azonban, hogy csupán két beteg esetében zajlott pitvarfibrillációs paroxysmus a katéterablációs beavatkozás alatt, vagyis a legtöbb beteg sinus ritmusú volt a mintagyűjtés idején. Annak ellenére, hogy egyes koaguláció aktivációját jelző és fibrinolízis paraméterek (fibrin monomer, TAT-komplex, PAP-komplex, D-dimer szintek) esetén megfigyeltünk lokális különbségeket az intrakardiális és perifériás vérminták között, ezen különbségek nemcsak a pitvarfibrilláló csoport, hanem a kontroll csoport esetében is megfigyelhetők voltak. Korábbi, kontroll csoportot nem alkalmazó tanulmányokban ezen általunk megfigyelt különbségeket a pitvarfibrilláció patofiziológiájára vezették vissza. Ugyanakkor, jelen tanulmányunk eredményei szerint ezen paraméterek változásai nem specifikusak a pitvarfibrillációra, hanem a megfigyelt változások valószínűleg az elektrofiziológiai beavatkozás invazivitásának köszönhetőek, beleértve a transseptális szúrást és a következményes szövetkárosodást.

Az általunk vizsgált hemosztázis és fibrinolízis paraméterek közül egyedül a FVIII aktivitás és VWF antigén szintek hozhatók összefüggésbe a pitvarfibrilláció patomechanizmusával, hiszen mindkét fehérje szintje szignifikánsan magasabb volt pitvarfibrilláló betegekben a kontrollokhoz képest. Érdekesség, hogy mind a perifériás, mind az intrakardiális minták esetén megfigyelhető volt az emelkedett FVIII aktivitás és VWF antigén szint pitvarfibrilláló betegekben. Különösen a VWF emelkedése figyelemre méltó a pitvarfibrilláló betegek körében, hiszen a VWF antigén szintek medián értéke magasabb volt a referencia tartomány felső határánál minden mintavételi hely esetén. Korábbi közlésekben már kimutatták a FVIII és VWF szintek emelkedését pitvarfibrilláló betegek perifériás mintáiban, azt feltételezve, hogy a VWF szintje endothel károsodás következtében emelkedett meg. Vizsgálatunkban mindhárom mintavételi hely FVIII és VWF szintjei jó korrelációt mutattak, mely arra utal, hogy egymással komplexet képezve fordulnak elő. Mivel az endothelsejtek Weibel-Palade testjei a VWF mellett FVIII-t is raktároznak, a párhuzamosan emelkedett FVIII és VWF szintek endothelkárosodásra utalnak, mely nem feltétlenül korlátozódik a bal pitvarra. Megjegyzendő, hogy FVIII aktivitás és VWF antigén szintek esetén a bal fülcsében szintén emelkedő tendenciát figyelhattunk meg a pitvarfibrillációs betegcsoportban a kontroll csoporthoz képest, azonban valószínűleg a kisebb elemszámú bal fülcséből származó minta miatt ez a tendencia nem érte el a szignifikancia határértéket.

A fibrinolitikus rendszer fontos regulátorainak intrakardiális szintje egyelőre még kevésbé feltárt terület pitvarfibrilláló betegekben. Tanulmányunkban a fibrinolitikus rendszer számos paraméterét határoztuk meg intrakardiális és perifériás mintákban, pitvarfibrilláló betegekben és nem pitvarfibrilláló kontrollokban. A két csoport, valamint a különböző mintavételi helyek között azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a legtöbb vizsgált fibrinolitikus paraméter tekintetében (FXIII aktivitás,  $\alpha$ 2-PI, PAI-1 aktivitás), a plazminogén aktivitás szintek kis mértékű szignifikáns csökkenése kivételével, mely a pitvarfibrilláló betegek bal fülcse

mintában volt megfigyelhető a vena femoralishoz képest. A PAP-komplex és D-dimer szintek sem mutattak szignifikáns különbséget a pitvarfibrillációs csoport és kontroll csoport között. Ezen megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a fibrinolitikus rendszer ezen vizsgált paraméterei nem mutatnak szoros összefüggést a pitvarfibrilláció patomechanizmusával.

#### *5.3.1.2 Hemosztázis aktiváció és fibrinolízis vizsgálata a cryoabláció során különböző preprocedurális antikoagulációs stratégiák mellett*

Eredményeink igazolták, hogy a cryobalonnal végzett pulmonális véna izoláció előtti orális antikoaguláns kezelés jelentősen gátolja a hemosztázis aktiválódását, valamint a dabigatran hatásosabb gátlást biztosít az intrakardiális hemosztázis aktivációja és következményes fibrinolízissel szemben, mint a K-vitamin antagonisták. Kimutattuk, hogy a dabigatranal kezelt betegeknel az ablációs eljárással kapcsolatos lokális, intraatriális koaguláció aktiváció markánsan gátolt. A D-dimer szintje a hiperkoaguláció általánosan elfogadott határértéke (0,5 mg FEU/L) alatt maradt az abláció utáni intrakardiális vérmintákban a dabigatranal kezelt betegek esetén, azonban VKA terápián, és a nem antikoagulált betegek esetén emelkedett volt. Hasonló eredményeket kaptunk a hemosztázis aktiváció és fibrinolízis heparin-érzékenlen markereinek komplex értékelésekor. A fibrin monomerek szintje, amely a pretrombotikus állapotok igen érzékeny markere, lényegesen alacsonyabb volt a dabigatranal kezelt betegeknel az abláció után a másik két vizsgált csoporthoz képest. Markáns koaguláció-aktivációt figyelhattunk meg azoknál a betegeknel, akik nem részesültek preoperatív antikoaguláns terápiában, ami a tromboembóliás szövődmények potenciális kockázatát hordozza ebben a betegpopulációban.

Összességében az eredményeink átfogó értékelése azt sugallja, hogy a vizsgált preprocedurális antikoagulációs stratégiák közül a dabigatran fejtette ki a legerősebb hatást a bal pitvari ablációs eljárás során kialakuló hiperkoagulábilis állapot megelőzésére nézve, míg a megszakítás nélküli VKA antikoaguláció esetén ehhez képest jelentősebb hemosztázis aktiváció volt megfigyelhető. Vizsgálataink óta klinikai tanulmányok sora megerősítette a megszakítás nélküli DOAC, beleértve a dabigatran hatásosságát és biztonságát pulmonális véna izoláció esetén.

Kutatásunk során azt tapasztaltuk, hogy a cryoballoon abláció az alkalmazott preoperatív antikoagulációs stratégiától függetlenül szignifikáns endothel aktivációt váltott ki, amit az emelkedett VWF antigénszint és fokozott FVIII aktivitás jelzett az abláció utáni vérmintákban. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az ablációs technológia és az abláció által lefedett terület az endothel károsodás mértékének meghatározó tényezője lehet, melyet az antitrombotikus terápia önmagában nem vagy igen korlátozottan képes enyhíteni. Ez a megállapítás felhívja a figyelmet az antikoaguláció fontosságára a posztablációs időszakban is.

#### *5.3.1.3 Limitációk*

Tanulmányaink eredményeit természetesen azok limitációinak ismeretében kell értékelni. Az első tanulmányba beválogatott pitvarfibrilláló betegek és kontrollok száma korlátozott volt, melynek hátterében a mintagyűjtés invazivitása, továbbá a mintagyűjtés során gyakorta fellépő technikai problémák álltak. Mindazonáltal fontosnak tartjuk megemlíteni, hogy az általunk vizsgált betegpopuláció jóval nagyobb volt a hasonló mintagyűjtési technikát alkalmazó, korábban publikált tanulmányok átlagos betegszámához viszonyítva, továbbá korábbi publikációkkal ellentétben vizsgálatainkba nem pitvarfibrillációban szenvedő kontroll csoportot is bevontunk. A bal fülcséből történő vérminta-gyűjtés különösen nehéz, és potenciálisan kockázatos technika, ennek ellenére a bevont betegektől sikerült számításba vehető mennyiségű mintát venni, mely irodalmi ritkaságnak számít. A limitált mintaszámot tekintetbe véve fontosnak tartjuk leírni, hogy tanulmányunk eredményeinek megerősítésére nagyobb mintaszámú betegcsoport vizsgálata lenne ideális.



További limitáció a vizsgálatba bevont pitvarfibrillációban szenvedő betegek többségének alacsony vagy közepes CHADS<sub>2</sub> és CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc skálák szerinti stroke kockázata volt. Ez a tény korlátozza megfigyeléseink kiterjeszhetőségét az átlagos pitvarfibrillációban szenvedő betegpopulációra. A legtöbb ablációs centrum jelen gyakorlata szerint az általunk vizsgált pitvarfibrillációs betegpopulációhoz hasonlóan többnyire fiatalabb, általában paroxysmalis pitvarfibrillációban szenvedő, strukturálisan normális szívű, jelentős komorbiditások nélküli betegek körében alkalmazza a katéterablációs terápiát, így ez a betegpopuláció állt rendelkezésre a vizsgálat kivitelezésére. Az első vizsgálatba bevont pitvarfibrilláló betegek közül csak két esetben volt megfigyelhető pitvarfibrillációs epizód a beavatkozás és vérvétel közben, mely limitálhatja a levonható következtetéseket. Természetesen, ha több betegnél tapasztaltunk volna pitvarfibrillációs epizódot, akkor további érdekes megfigyelésekre tehattünk volna szert. A második vizsgálat esetén hangsúlyoznunk kell, hogy nem-randomizált, obszervációs tanulmányt végeztünk, amelyben a betegek a beavatkozás előtti antikoaguláció típusa ill. egyéni preferenciák szerint kerültek egy adott preablációs antikoagulációs stratégiára, mely megszokott séma a legtöbb centrum esetén. A klinikai alapadatokban és a beavatkozás egyes paramétereiben nem volt különbség a csoportok között.

## 6 ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Elsőként írtuk le relatíve nagylétszámú ( $n > 130$ ), intravénás trombolízisben részesülő AIS kohorszban egyes hemosztázis és fibrinolízis tényezők szintjeinek a változását a trombolízis kezelés során. Eredményeink alapján a FVIII aktivitás, a PAI-1 aktivitás és  $\alpha 2$ -PI aktivitás közvetlenül trombolízis után nagymértékű, szignifikáns csökkenést mutattak, majd 24 órával később szintjük újra a kiindulási értékekhez közelített. Ennek hátterében a FVIII esetén plazmin-mediált degradáció, PAI-1 aktivitás esetén a t-PA-val komplexbe lépés,  $\alpha 2$ -PI esetén a plazminnal való komplex képzés állhat. A VWF antigén szint mediánja AIS betegekben már beérkezésükkor is meghaladta a referencia tartomány felső határát, majd a trombolízis folyamán további kismértékű, szignifikáns emelkedést mutatott, melynek hátterében elsősorban endothel károsodás valószínűsíthető. A FXIII aktivitás és antigénszint kismértékű, szignifikáns csökkenést mutatott a trombolízis után a lízis előtti szintekhez képest, melynek legvalószínűbb oka konzumpció lehet.

2. Súlyosabb AIS-t szenvedett betegek esetén (NIHSS  $> 6$ ) a VWF antigén szintek a betegek beérkezésekor szignifikánsan magasabbak voltak, az  $\alpha 2$ -PI szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az enyhébb stroke-ot elszenvedett betegekhez képest.

3. Többváltozós logisztikus regressziós modellt alkalmazva igazoltuk, hogy a trombolízist követően azonnal és 24 órával később detektált emelkedett FVIII és VWF antigén szintek a rossz hosszú távú kimenetel (90 napos mRS  $\geq 3$ ) független rizikótényezői. Kaplan-Meier túlélési analízisben a felvételkor a legmagasabb kvartilisbe tartozó  $\alpha 2$ -PI antigénnel rendelkező betegek szignifikánsan jobb hosszú távú túlélést mutattak azokhoz képest, akiknél a legalacsonyabb kvartilisben volt az  $\alpha 2$ -PI antigén (HR: 4,54; 95% CI: 1,92-10,8;  $p < 0,001$ ); azonban többváltozós analízisben az alacsony felvételi  $\alpha 2$ -PI antigén nem bizonyult a rossz hosszú távú kimenetel független kockázati tényezőjének. Azokban a betegekben, akik a terápiát követő 14. napig elhunytak, szignifikánsan alacsonyabb FXIII szintek voltak megfigyelhetők a trombolízist követően, mely nagyobb mértékű konzumpcióra utal.

4. Többváltozós analízisek eredménye alapján az intravénás trombolízis sikerének meghatározó tényezői a stroke súlyossága ill. maga a trombus mérete, míg a vizsgálatainkban megfigyelt egyes fibrinolízis marker változások feltehetőleg a trombus kialakulásának és a protrombotikus hemosztázis egyensúly kialakulásának másodlagos jeleként, mintsem a lízis kimenetelét dominánsan meghatározó tényezőként értékelhetők.

5. Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus jelentős hatással volt az alvadék méretére *in vivo* és *in vitro* kísérletes körülmények között egyaránt. A különböző kísérleti körülményekből származó kombinált megfigyeléseink együttesen azt sugallják, hogy a FXIII-A Leu34 allél jelentősen mérsékli a megemelkedett fibrinogén szint protrombotikus hatását a vérrög tömegére vonatkozóan.

6. Kimutattuk, hogy FV vad típusú egyénekben a trombomodulin lassítja a trombin által indukált FXIII aktivációt, ezáltal a fibrin láncok keresztkötését és az  $\alpha 2$ -PI fibrinhez történő keresztkötését. A FV<sub>Leiden</sub> mutáció a trombomodulin ezen hatásait megszünteti, ami (a TAFI aktivációra kifejtett hatás mellett) szerepet játszhat a mutáció antifibrinolitikus/protrombotikus hatásában.

7. A hemorrhagiás transzformációval a vizsgált hemosztázis paraméterek közül csak a felvételtkor mért alacsony  $\alpha$ 2-PI, valamint lízis utáni emelkedett VWF antigén szintek mutattak szignifikáns kapcsolatot. Az általunk vizsgált kohorszban a PAI-1 5G/5G genotípus a lízist követő intrakraniális vérzés független prediktorának bizonyult (OR: 4,75; 95% CI: 1,18-19,06;  $p=0,028$ ). Kimutattuk, hogy az AIS betegek felvételi vérmintájából elvégzett módosított alvadék lízis vizsgálat sejtmentes DNS-el és hisztonnal kiegészítve, ill. a trombin generációs teszt ígéretes kiindulási alapot jelenthetnek a jövőben a hemorrhagiás transzformációt előrejelző tesztek fejlesztésére.

8. Nem traumás intracerebrális vérzést szenvedett betegeket vizsgáló kohorszban a kórházi felvételtkor a trombin generációs tesztben meghatározott peak thrombin paraméter szignifikánsan magasabbnak bizonyult a vizsgált referencia egyénekhez képest és összefüggést mutatott a betegek hosszú távú kimenetelével. Az eredmények az agyvérzett betegekben potenciálisan fennálló hiperkoagulabilitást igazolják, és rámutatnak a megfelelő VTE profilaxis alkalmazásának fontosságára ebben a betegcsoportban.

9. Kidolgoztunk egy módosított, PGE1-et tartalmazó ADP-indukálta trombocita aggregációs módszert, mely a clopidogrel hatás tesztelésére alkalmasnak bizonyult. A teszt P2Y12 receptor specifikus, megbízható, könnyen elvégezhető és olcsó. A teszt jó korrelációt mutatott a VASP foszforilációs teszt eredményével és magas diagnosztikus hatékonyságot mutatott clopidogrel monoterápián lévő betegekben. A hagyományos ADP-indukálta aggregációval szemben a teszt nem érzékeny aszpirin hatására és javasolható kettős trombocitagátló terápián lévő betegek vizsgálatára is.

10. Kimutattuk, hogy az aszpirin hatást detektáló tesztek közül a clopidogrel monoterápia szignifikánsan gátolta az AA-indukálta trombocita aggregációt és szekréciót, valamint az AA-indukálta TXB2 termelődést a trombocitákban. A VerifyNow Aspirin teszt eredményeit nem befolyásolta a clopidogrel, így az javasolható kettős trombocitagátló terápián lévő betegekben aszpirin hatás vizsgálatára.

11. Eredményeink azt mutatták, hogy a clopidogrel hatást vizsgáló módszerek közül a P2Y12 receptor specifikus tesztek nem befolyásolja az aszpirin hatása. Ennek megfelelően kettős trombocitagátló terápián lévő betegekben a clopidogrel hatás vizsgálatára a VASP foszforiláció és az általunk kidolgozott, PGE1 jelenlétében végzett, módosított ADP aggregációs módszer javasolható.

12. Pitvarfibrilláló betegek és nem pitvarfibrilláló kontrollok intrakardiális és perifériás vérmintáiból megvizsgálva a hemosztázis és fibrinolitikus rendszer egyes markereit megállapítottuk, hogy a FVIII aktivitás és a VWF antigén szint a pitvarfibrilláló betegekben szignifikánsan emelkedett a kontrollokhoz képest mind az intrakardiális, mind a perifériás vérmintákban. Az FVIII aktivitás és VWF szintek közötti jó korreláció arra utalt, hogy a magas szintek hátterében endothelkárosodás állhat.

13. Eredményeink igazolták, hogy a cryobalonnal végzett pulmonális véna izoláció előtt a megszakítás nélküli orális antikoaguláns kezelés jelentősen gátolja a hemosztázis aktiválódását, valamint a dabigatran hatásosabb gátlást biztosít az intrakardiális hemosztázis aktivációja és következményes fibrinolízissel szemben, mint a VKA. A cryoballon abláció az alkalmazott preoperatív antikoagulálástól függetlenül jelentős endothel aktivációt okozott, amit az emelkedett FVIII aktivitás és VWF szintek jeleztek az abláció utáni vérmintákban. Az eredmények felhívják a figyelmet az antikoaguláció fontosságára a posztablációs időszakban is.

## 7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Prof. Muszbek László akadémikus úrnak, hogy elindított a kutatói pályán és ösztönözte, mentorálta tudományos tevékenységemet TDK hallgató korom óta.

Köszönöm Prof. Csiba László akadémikus úrnak, hogy számos általa irányított klinikai kutatásban részt vehettem, melynek során nem csak a betegek adataihoz, mintáihoz való hozzáférést biztosította, hanem egy valódi szakmai kollaborációra épülő csapatot épített fel maga körül és a kutatásokhoz szükséges feltételeket is biztosította. Hálásan köszönöm Prof. Kappelmayer János intézetvezetőnek a kutatói, oktatói és diagnosztikai munkám során nyújtott töretlen támogatását és biztatását. Köszönöm Prof. Oláh László intézetvezetőnek, valamint Dr. Bereczky Zsuzsanna tanszékvezetőnek, hogy támogatják a mindennapok során a kutatómunkámat és ezáltal hozzájárultak, hogy ez a doktori mű elkészüljön. Köszönöm Prof. Csanádi Zoltán intézetvezetőnek, hogy a kollaborációs vizsgálatainkat aktívan támogatta és a klinikai háttérrel, szakértelmet biztosította. Köszönet Dr. Katona Éva tanárnőnek az egyes vizsgálatokban nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom valamennyi társszerzőnek a DE Neurológiai Klinikáról, Kardiológiai Klinikáról, Radiológiai Klinikáról, Megelőző Orvostani Intézetből, akik a vizsgálatokban részt vettek. Hálásan köszönöm Haramura Gizellának, hogy a laboratóriumi módszerek széles skálájára megtanított és biztos technikai háttérrel nyújtott a kísérletek során. Köszönet illeti a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék és a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársait a szakmai, laboratóriumi és a pályázati, adminisztrációs teendőikben való segítségéért.

Köszönettel tartozom volt és jelenlegi PhD hallgatóimnak, Dr. Tóth Noémi Klárának, Dr. Szegedi Istvánnak, Dr. Orbán-Kálmándi Ritának, Lóczi Lindának, Dr. Stercel Viviennek, Dr. Hodossy-Takács Rebekának, Dr. Székely Edinának kitartó és lelkes munkájukért és a kiváló csapatmunkáért. Köszönöm azon PhD hallgatók munkáját is, akikkel együtt dolgoztam és a közös eredmények az értekezés részét képezték (Dr. Koncz Zsuzsa, Dr. Hudák Renáta, Dr. Homoródi Nóra, Dr. Batta-Hajas Orsolya és Dr. Baráth Barbara). Köszönöm valamennyi graduális hallgatóm munkáját, akik a kutatásokban részt vettek. Hálásan köszönöm az értekezés alapját képező közlemények külföldi társszerzőinek munkáját (Dr. Alisa Wolberg és munkatársai, University of North Carolina, Chapel Hill, USA) ill. az itt fel nem sorolt hazai ill. nemzetközi kollaborációs partnereink támogatását.

Hálával tartozom Dr. Enyedi Attilának és Dr. Brugós Lászlónak, valamint a DE SI Mellkassebészeti Osztály dolgozóinak, hogy ez az értekezés létrejöhett.

Legfőképpen hálás köszönetemet szeretném kifejezni a Családomnak, hogy feltétel nélküli szeretetükkel mindig biztos háttérrel nyújtottak ahhoz, hogy szakmai feladataimat elvégezhessem. Köszönöm férjemnek, Dr. Krasznai Zoárdnak, hogy társam volt az ide vezető úton, gyermekeimnek, Dávidnak, Laurának és Zorkának, valamint nagyszüleiknek a szerető megértésüket és támogatásukat. Az értekezést szüleimnek ajánlom, akik mindig mindent megtettek azért, hogy elérhessem a kitűzött céljaimat.

Pályázati támogatások: MTA Gyermeket Nevelő Kutatók Támogatása, NKFI K109712, K120042, FK128582, PD111929, GINOP-2.3.2-15-2016-00043, MTA-DE Cerebrovascularis és Neurodegeneratív Kutatócsoport, HUN-REN-DE Cerebrovascularis Kutatócsoport, ÚNKP-17-4-III-DE-381, MTA Bólyai János-ösztöndíj, Debreceni Egyetem Szodoray Lajos-díj.

## 8 A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Székely, E., Orbán-Kálmándi, R., Szegedi, I., Katona, É., Baráth, B., Czuriga-Kovács, K., Lóczi, L., Vasas, N., Fekete, I., Fekete, K., Berényi, E., Oláh, L., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: Low [alfa]2-Plasmin Inhibitor Antigen Levels on Admission Are Associated With More Severe Stroke and Unfavorable Outcomes in Acute Ischemic Stroke Patients Treated With Intravenous Thrombolysis. *Front. Cardiovasc. Med.* 9, 1-14, 2022. IF: 3,6 (Q1)
2. Lóczi, L., Orbán-Kálmándi, R., Árokszállási, T., Fekete, I., Fekete, K., Héja, M., Tóth, J., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: Thrombin generation as a predictor of outcomes in patients with non-traumatic intracerebral hemorrhage. *Front. Neurol.* 13, 1-12, 2022. IF: 3,4 (Q2)
3. Orbán-Kálmándi, R., Szegedi, I., Sarkady, F., Fekete, I., Fekete, K., Vasas, N., Berényi, E., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: A modified in vitro clot lysis assay predicts outcomes and safety in acute ischemic stroke patients undergoing intravenous thrombolysis. *Sci. Rep.* 11 (1), 1-14, 2021. IF: 4,996 (D1)
4. Orbán-Kálmándi, R., Árokszállási, T., Fekete, I., Fekete, K., Héja, M., Tóth, J., Sarkady, F., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: A Modified in vitro Clot Lysis Assay Predicts Outcomes in Non-traumatic Intracerebral Hemorrhage Stroke Patients: the IRONHEART Study. *Front. Neurol.* 12, 1-11, 2021. IF: 4,086 (Q2)
5. Szegedi, I., Orbán-Kálmándi, R., Nagy, A., Sarkady, F., Vasas, N., Sik, M., Láncki, L., Berényi, E., Oláh, L., Crişan, A., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: Decreased clot burden is associated with factor XIII Val34Leu polymorphism and better functional outcomes in acute ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *PLoS One.* 16 (7), 1-16, 2021. IF: 3,752 (Q1)
6. **Bagoly, Z.**, Baráth, B., Orbán-Kálmándi, R., Szegedi, I., Kissné Bogáti, R., Sarkady, F., Csiba, L., Katona, É.: Incorporation of [alfa]2-Plasmin Inhibitor into Fibrin Clots and Its Association with the Clinical Outcome of Acute Ischemic Stroke Patients. *Biomolecules.* 11 (3), 1-13, 2021. IF: 6,064 (Q2)
7. Kattula, S., **Bagoly, Z.**, Tóth, N., Muszbek, L., Wolberg, A.: The factor XIII-A Val34Leu polymorphism decreases whole blood clot mass at high fibrinogen concentrations. *J. Thromb. Haemost.* 18 (4), 885-894, 2020. IF: 5,824 (Q1)
8. **Bagoly, Z.**, Hajas, O., Urbancsek, R., Kiss, A., Fiak, E., Sarkady, F., Tóth, N., Orbán-Kálmándi, R., Kovács, K., Nagy, L., Nagy, A., Kappelmayer, J., Csiba, L., Csanádi, Z.: Uninterrupted Dabigatran Administration Provides Greater Inhibition against Intracardiac Activation of Hemostasis as Compared to Vitamin K Antagonists during Cryoballoon Catheter Ablation of Atrial Fibrillation. *J Clin Med.* 9 (9), 1-13, 2020. IF: 4,241 (Q1)
9. **Bagoly, Z.**, Szegedi, I., Orbán-Kálmándi, R., Tóth, N., Csiba, L.: Markers of Coagulation and Fibrinolysis Predicting the Outcome of Acute Ischemic Stroke Thrombolysis Treatment: a Review of the Literature. *Front. Neurol.* 10, 1-13, 2019. IF: 2,889 (Q2)

10. Szegedi, I., Nagy, A., Székely, E., Czuriga-Kovács, K., Sarkady, F., Láncki, L., Berényi, E., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: PAI-1 5G/5G genotype is an independent risk of intracranial hemorrhage in post-lysis stroke patients. *Ann. Clin. Trans. Neurol.* 6 (11), 2240-2250, 2019. IF: 3,66 (D1)
11. Tóth, N., Székely, E., Czuriga-Kovács, K., Sarkady, F., Nagy, O., Láncki, L., Berényi, E., Fekete, K., Fekete, I., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: Elevated factor VIII and von Willebrand factor levels predict unfavorable outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *Front. Neurol.* 8, 1-10, 2018. IF: 2,635 (Q2)
12. Székely, E., Czuriga-Kovács, K., Bereczky, Z., Katona, É., Mezei, Z., Nagy, A., Tóth, N., Berényi, E., Muszbek, L., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: Low factor XIII levels after intravenous thrombolysis predict short-term mortality in ischemic stroke patients. *Sci. Rep.* 8 (1), 1-9, 2018. IF: 4,011 (D1)
13. Tóth, N., Csanádi, Z., Hajas, O., Kiss, A., Nagy-Baló, E., Kovács, K., Sarkady, F., Muszbek, L., Bereczky, Z., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: Intracardiac hemostasis and fibrinolysis parameters in patients with atrial fibrillation. *Biomed Res. Int.* 1-10, 2017. IF: 2,583 (Q1)
14. Hudák, R., Székely, E., Czuriga-Kovács, K., Nagy, A., Hofgárt, G., Berényi, E., Csiba, L., Kappelmayer, J., **Bagoly, Z.**: Low thrombin generation predicts poor prognosis in ischemic stroke patients after thrombolysis. *PLoS One.* 12 (7), 1-13, 2017. IF: 2,766 (Q1)
15. **Bagoly, Z.**, Homoródi, N., Kovács, E., Sarkady, F., Csiba, L., Édes, I., Muszbek, L.: How to test the effect of aspirin and clopidogrel in patients on dual antiplatelet therapy?. *Platelets.* 27 (1), 59-65, 2016. IF: 2,465 (Q2)
16. **Bagoly, Z.**, Sarkady, F., Magyar, M., Kappelmayer, J., Pongrácz, E., Csiba, L., Muszbek, L.: Comparison of a New P2Y<sub>12</sub> Receptor Specific Platelet Aggregation Test with Other Laboratory Methods in Stroke Patients on Clopidogrel Monotherapy. *PLoS One.* 8 (7), e69417, 2013. IF: 3,534 (Q1)
17. **Bagoly, Z.**, Koncz, Z., Hársfalvi, J., Muszbek, L.: Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb. Res.* 129 (3), 382-387, 2012. IF: 3,133 (Q2)
18. **Bagoly, Z.**, Katona, É., Muszbek, L.: Factor XIII and inflammatory cells. *Thromb. Res.* 129 (Suppl.2), S77-S81, 2012. IF: 3,133 (Q2)
19. Koncz, Z., **Bagoly, Z.**, Haramura, G., Mezei, Z., Muszbek, L.: Thrombomodulin-dependent effect of factor V Leiden mutation on the cross-linking of alfa<sub>2</sub>-plasmin inhibitor to fibrin and its consequences on fibrinolysis. *Thromb. Res.* 130 (3), 528-534, 2012. IF: 3,133 (Q2)
20. Komáromi, I., **Bagoly, Z.**, Muszbek, L.: Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J. Thromb. Haemost.* 9 (1), 9-20, 2011. IF: 5,731 (D1)

## 9 EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

A PhD fokozat megszerzése óta lektorált tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

1. Stercel, V., Lóczi, L., Kadenczki, O., Nemes, É., Nagy, B. Jr., Hodossy-Takács, R., Szabó, A.Á., Fagyas, M., Kappelmayer, J., Szabó, T., **Bagoly, Z.**: Effect of anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccination on thrombin generation in children with inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.* 14, 1257072, 2023. IF: 7.3 (Q1)
2. Natorska, J., Corral, J., de la Morena-Barrio, M.E., Bravo-Pérez, C., **Bagoly, Z.**, Bereczky, Z., Treliński, J., Witkowski, M., Klajmon, A., Undas, A., Ząbczyk, M.: Antithrombin Deficiency Is Associated with Prothrombotic Plasma Fibrin Clot Phenotype. *Thromb. Haemost.* 123 (9), 880-891, 2023. IF: 6.7 (Q1)
3. Árokszállási, T., Balogh, E., Orbán-Kálmándi, R., Pásztor, M., Árokszállási, A., Nagy, E., Belán, I., May, Z., Csépany, T., Csiba, L., **Bagoly, Z.\***, Oláh, L.: Elevated Blood Alcohol Concentration Is Associated with Improved Clinical Outcomes of Intravenous Thrombolysis Treatment in Acute Ischemic Stroke Patients: A Retrospective Study. *J Clin Med.* 12 (6), 1-13, 2023. IF: 3.9 (Q1) \*megosztott utolsó szerző
4. Papp, T., Kiss, Z., Rokszin, G., Fábrián, I., Márk, L., **Bagoly, Z.**, Becker, D., Merkely, B., Aradi, D., Dézsi, C., Járai, Z., Csanádi, Z.: Mortality on DOACs Versus on Vitamin K Antagonists in Atrial Fibrillation: Analysis of the Hungarian Health Insurance Fund Database. *Clin. Ther.* 45 (4), 333-346, 2023. IF: 3.2 (Q1)
5. Ghansah, H., Bekéné Debreceni, I., Váróczy, L., Rejtő, L., Lóczi, L., **Bagoly, Z.\***, Kappelmayer, J.: Patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance have variably increased thrombin generation and different sensitivity to the anticoagulant effect of activated protein C. *Thromb. Res.* 223, 44-52, 2023. IF: 7.5 (Q1) \*megosztott utolsó szerző
6. **Bagoly, Z.**: ABO blood group type and the risk of venous thromboembolism: the impact of interactions. *Pol. Arch. Intern. Med.* 132 (12), 1-2, 2022. (Editorial letter)
7. Falanga, A., Leader, A., Ambaglio, C., **Bagoly, Z.**, Castaman, G., Elalamy, I., Lecumberri, R., Niessner, A., Pabinger, I., Szmít, S., Trincherro, A., Ten Cate, H., Rocca, B.: EHA Guidelines on Management of Antithrombotic Treatments in Thrombocytopenic Patients with Cancer. *HemaSphere.* 6 (8), 1-25, 2022. IF: 8.3 (Q1)
8. Sadeghi, F., Sarkady, F., Zsóri, K., Szegedi, I., Orbán-Kálmándi, R., Székely, E., Vasas, N., Berényi, E., Csiba, L., **Bagoly, Z.**, Shemirani, A.: High Neutrophil-Lymphocyte Ratio and Low Lymphocyte-Monocyte Ratio Combination after Thrombolysis Is a Potential Predictor of Poor Functional Outcome of Acute Ischemic Stroke. *J. Pers. Med.* 12 (8), 1-12, 2022. IF: 3.4 (Q2)
9. Ariens, R., Hunt, B., Agbani, E., Ahnström, J., Ahrends, R., Alikhan, R., Assinger, A., **Bagoly, Z.**, Balduini, A., Barbon, E., Barrett, C., Batty, P., Carneiro, J., Chan, W., de Maat, M., de Wit, K., Denis, C., Ellis, M., Eslick, R., Fu, H., Hayward, C., Ho-Tin-Noé, B., Klok, F., Kumar, R., Leiderman, K., Litvinov, R., Mackman, N., McQuilten, Z., Neal, M., Parker,

- W., Preston, R., Rayes, J., Rezaie, A., Roberts, L., Rocca, B., Shapiro, S., Siegal, D., Sousa, L., Suzuki-Inoue, K., Zafar, T., Zhou, J.: Illustrated State-of-the-Art Capsules of the 2022 Congress. *Res Pract Thromb Haemost.* 6 (5), 1-45, 2022. IF: 4.6 (Q1)
10. Wieringa, G., Queralto, J., Homšak, E., Jassam, N., Cavalier, E., Svinarov, D., Krleža, J., Christou, S., Pikner, R., Larsen, T., Tomberg, K., Linko-Parvinen, A., Sapin, V., Baum, H., Kroupis, C., **Bagoly, Z.**, Costelloe, S., Sciacovelli, L., Stasulans, J., Vitkus, D., Meunier, D., Solnica, B., Reguengo, H., Mambet, C., Kovac, G., Krhin, B., Ohlson, M., Buhagiar, G., Simundic, A.: A proposed common training framework for specialists in laboratory medicine under EU directive 2013/55/EC (The recognition of professional qualifications). *Clin. Chem. Lab. Med.* 59 (3), 505-512, 2021. IF: 8.49 (Q1)
  11. **Bagoly, Z.**, Behme, D., Kaesmacher, J., Martinez De Lizarrondo, S.: Editorial: hemostasis and Stroke. *Front. Neurol.* 12 1-4, 2021. (Editorial letter)
  12. Krasznai, Z., **Bagoly, Z.**, Nagy, E., Farkas, Z., Póka, R., Török, P., Lampé, R., Hernádi, Z.: Multimodális hyper-spektroszkópia: előrelépés a digitális technológia felé a méhnyakrákszűrésben. *Orv. hetil.* 162 (20), 790-799, 2021. IF: 0.707 (Q4)
  13. Fekete, K., Tóth, J., Horváth, L., Márton, S., Héja, M., Csiba, L., Árokszállási, T., **Bagoly, Z.**, Sulina, D., Fekete, I.: Neurophysiological examinations as adjunctive tool to imaging techniques in spontaneous intracerebral haemorrhage: IRONHEART study. *Front. Neurol.* 12, 1-15, 2021. IF: 4.086 (Q1)
  14. Árokszállási, T., Héja, M., **Bagoly, Z.**, Kovács, K., Orbán-Kálmándi, R., Sarkady, F., Tóth, J., Fekete, K., Fekete, I., Csiba, L.: Prognostic value of various hemostasis parameters and neurophysiological examinations in spontaneous intracerebral hemorrhage: the IRONHEART study protocol. *Front. Neurol.* 12, 1-6, 2021. IF: 4.086 (Q1)
  15. Gindele, R., Kerényi, A., Kállai, J., Pfliegler, G., Schlamadinger, Á., Szegedi, I., Major, T., Szabó, Z., **Bagoly, Z.**, Kiss, C., Kappelmayer, J., Bereczky, Z.: Resolving Differential Diagnostic Problems in von Willebrand Disease, in Fibrinogen Disorders, in Prekallikrein Deficiency and in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia by Next-Generation Sequencing. *Life (Basel).* 11 (3), 1-23, 2021. IF: 3.251 (Q2)
  16. Szegedi, I., Orbán-Kálmándi, R., Csiba, L., **Bagoly, Z.**: Stroke as a Potential Complication of COVID-19-Associated Coagulopathy: a Narrative and Systematic Review of the Literature. *J Clin Med.* 9 (10), 3137-3148, 2020. IF: 4,241 (Q1)
  17. Lóczy, L., Kappelmayer, J., Tarr, T., **Bagoly, Z.**: Antiphospholipid syndrome and the risk of myocardial infarction: current evidence and uncertainties. *Kardiol. Pol.* 78 (1), 6-14, 2020. IF: 3.108 (Q3)
  18. Hajas, O., **Bagoly, Z.**, Tóth, N., Urbancsek, R., Kiss, A., Kovács, K., Sarkady, F., Nagy, A., Oláh, A., Nagy, L., Clemens, M., Csiba, L., Csanádi, Z.: Intracardiac Fibrinolysis and Endothelium Activation Related to Atrial Fibrillation Ablation with Different Techniques. *Cardiol Res Pract.* 2020, 1-8, 2020. IF 1,866 (Q3)



19. Santoso, C., Bramantoro, T., Nguyen, M., **Bagoly, Z.**, Nagy, A.: Factors Affecting Dental Service Utilisation in Indonesia: a Population-Based Multilevel Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17 (15), 1-11, 2020. IF: 3.39 (Q2)
20. Majer, R., Adeyi, O., **Bagoly, Z.**, Simon, V., Csiba, L., Kardos, L., Hortobágyi, T., Frecska, E.: Neuropsychiatric symptoms, quality of life and caregivers' burden in dementia. *Open Med.* 15 (1), 905-914, 2020. IF: 2.199 (Q3)
21. Ząbczyk, M., Natowska, J., **Bagoly, Z.**, Sarkady, F., Baráth, B., Katona, É., Bryk, A., Zettl, K., Wisniewski, J., Undas, A.: Plasma fibrin clots of pulmonary embolism patients present increased amounts of factor XIII and alpha2-antiplasmin at 3 months' anticoagulation since the acute phase. *J. Physiol. Pharmacol.* 71 (4), 519-524, 2020. IF: 3.011 (Q2)
22. Bryk, A., Siudut, J., Broniatowska, E., **Bagoly, Z.**, Baráth, B., Katona, É., Undas, A.: Sex-specific alteration to  $\alpha$ 2-antiplasmin incorporation in patients with type 2 diabetes. *Thromb. Res.* 185, 88-62, 2020. IF: 3.944 (Q1)
23. Orosz, A., Csapó, A., **Bagoly, Z.**, Székely, E., Tóth, E., Kovács, B., Bereczky, Z., Muszbek, L., Katona, É.: A new ELISA method for the measurement of total  $\alpha$ 2-plasmin inhibitor level in human body fluids. *J. Immunol. Methods.* 471, 27-33, 2019. IF: 1.901 (Q2)
24. **Bagoly, Z.**, Muszbek, L.: Factor XIII: what does it look like? *J. Thromb. Haemost.* 17 (5), 714-716, 2019. (Editorial letter)
25. Bereczky, Z., Balogh, L., **Bagoly, Z.**: Inherited thrombophilia and the risk of myocardial infarction: current evidence and uncertainties. *Kardiol. Pol.* 77 (4), 419-429, 2019. IF: 1.874 (Q3)
26. **Bagoly, Z.**: Altered fibrin clot phenotype as predictor of the risk of recurrent venous thromboembolism: evidence is growing. *Pol. Arch. Intern. Med.* 128 (10), 569-571, 2018. (Editorial letter)
27. **Bagoly, Z.**, Ariens, R., Rijken, D., Pieters, M., Wolberg, A.: Clot Structure and Fibrinolysis in Thrombosis and Hemostasis. *Biomed Res. Int.* 2017, 1-2, 2017. (Editorial letter)
28. **Bagoly, Z.**: Uncovering the genetic background of natural anticoagulant deficiencies: time to look behind the scenes. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 127 (7-8), 465-467, 2017. IF: 2.658 (Q3)
29. Csomós, K., Kristóf, E., Márkus, B., Csomós, I., Kovács, G., Rotem, O., Hodrea, J., **Bagoly, Z.**, Muszbek, L., Balajthy, Z., Csősz, É., Fésüs, L.: Protein cross-linking by chlorinated polyamines and transglutamylation stabilizes neutrophil extracellular traps. *Cell Death Dis.* 7 (8), e2332, 2016. IF: 5.965 (D1)
30. Mezei, Z., Katona, É., Kállai, J., Bereczky, Z., Molnár, É., Kovács, B., Ajzner, É., **Bagoly, Z.**, Miklós, T., Muszbek, L.: Regulation of plasma factor XIII levels in healthy individuals; a major impact by subunit B intron K c.1952+144 C>G polymorphism. *Thromb. Res.* 148, 101-106, 2016. IF: 2.65 (Q2)

31. **Bagoly, Z.:** Cancer and thrombosis: a fresh look at an old story. *Thromb. Res.* 136, 1-2, 2015. IF: 2.32 (Q2)
32. Katona, É., Péntes-Daku, K., Csapó, A., Fazakas, F., Udvardy, M., **Bagoly, Z.**, Orosz, Z., Muszbek, L.: Interaction of factor XIII subunits. *Blood.* 123 (11), 1757-1763, 2014. IF: 10.452 (D1)
33. Lahav, J., Tvito, A., **Bagoly, Z.**, Dardik, R., Inbal, A.: Factor XIII improves platelet adhesion to fibrinogen by protein disulfide isomerase-mediated activity. *Thromb. Res.* 131 (4), 338-341, 2013. IF: 2.427 (Q2)
34. Simon, Á., **Bagoly, Z.**, Hevessy, Z., Csáthy, L., Katona, É., Vereb, G., Ujfalusi, A., Szerafin, L., Muszbek, L., Kappelmayer, J.: Expression of coagulation factor XIII subunit A in acute promyelocytic leukemia. *Cytom. Part B. Clin. Cytom.* 82B (4), 209-216, 2012. IF: 2.231(Q1)
35. Koncz, Z., **Bagoly, Z.**, Haramura, G., Mezei, Z., Muszbek, L.: Thrombomodulin-dependent effect of factor VLeiden mutation on factor XIII activation. *Thromb. Res.* 129 (4), 508-513, 2012. IF: 3,133 (Q2)
36. Muszbek, L., Bereczky, Z., **Bagoly, Z.**, Komáromi, I., Katona, É.: Factor XIII: a Coagulation Factor With Multiple Plasmatic and Cellular Functions. *Physiol. Rev.* 91 (3), 931-972, 2011. IF: 26.866 (D1)
37. Muszbek, L., **Bagoly, Z.**, Cairo, A., Peyvandi, F.: Novel aspects of factor XIII deficiency. *Curr. Opin. Hematol.* 18 (5), 366-372, 2011. IF: 4.52 (D1)
38. Muszbek, L., Bereczky, Z., **Bagoly, Z.**, Shemirani, A., Katona, É.: Factor XIII and Atherothrombotic Diseases. *Semin. Thromb. Hemost.* 36 (1), 018-033, 2010. IF: 4.169 (Q1)
39. **Bagoly, Z.**, Fazakas, F., Marosi, A., Török, O., Bereczky, Z., Haramura, G., Tóth, J., Kappelmayer, J., Muszbek, L.: Variant type Glanzmann thrombasthenia caused by homozygous p.724R>X mutation in beta3 integrin. *Thromb. Res.* 125 (5), 427-431, 2010. IF: 2.372 (Q2)
40. Nagy, B., Simon, Z., **Bagoly, Z.**, Muszbek, L., Kappelmayer, J.: Binding of plasma factor XIII to thrombin-receptor activated human platelets. *Thromb. Haemost.* 102 (1), 83-89, 2009. IF: 4.451 (Q1)
41. Lahav, J., Karniel, E., **Bagoly, Z.**, Sheptovitsky, V., Dardik, R., Inbal, A.: Coagulation factor XIII serves as protein disulfide isomerase. *Thromb. Haemost.* 101 (5), 840-844, 2009. IF: 4.451 (Q1)

A PhD fokozat elnyerése előtt megjelent közlemények jegyzéke:

1. **Bagoly, Z.**, Fazakas, F., Komáromi, I., Haramura, G., Tóth, E., Muszbek, L.: Cleavage of factor XIII by human neutrophil elastase results in a novel active truncated form of factor XIII A subunit. *Thromb. Haemost.* 99, 668-674, 2008. IF: 3.803 (Q1)
2. Muszbek, L., **Bagoly, Z.**, Bereczky, Z., Katona, É.: The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovasc. Hematol. Agents. Med. Chem.* 6, 190-205, 2008. IF:-(Q1)
3. Mendelboun Raviv, S., Horváth, A., Aradi, J., **Bagoly, Z.**, Fazakas, F., Batta, Z., Muszbek, L., Hársfalvi, J.: 4-thio-deoxyuridylate modified thrombin aptamer and its inhibitory effect on fibrin clot formation, platelet aggregation and thrombus growth on subendothelial matrix. *J. Thromb. Haemost.* 6 (10), 1764-1771, 2008. IF: 6.291 (D1)
4. **Bagoly, Z.**, Haramura, G., Muszbek, L.: Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thromb Haemost.* 98 (2), 359-367, 2007. IF: 3.501 (Q1)
5. Shemirani, A., Haramura, G., **Bagoly, Z.**, Muszbek, L.: The combined effect of fibrin formation and factor XIII A subunit Val34Leu polymorphism on the activation of factor XIII in whole plasma. *Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom.* 1764 (8), 1420-1423, 2006. IF: 3.311 (D1)
6. Piccardoni, P., Manarini, S., Federico, L., **Bagoly, Z.**, Pecce, R., Martelli, N., Piccoli, A., Totani, L., Cerletti, C., Evangelista, V.: SRC-dependent outside-in signalling is a key step in the process of autoregulation of beta2 integrins in polymorphonuclear cells. *Biochem. J.* 380, 57-65, 2004. IF: 4.278 (D1)

Magyar nyelvű könyvfejezetek:

1. **Bagoly Z.:** A klinikai kutatások előfeltételeinek biztosítása. In: Bereczky Z., Muszbek L. A klinikai kutatások tervezése és kivitelezése; elméleti és módszertani alapok. Medicina Kiadó, Budapest, 2011.
2. **Bagoly Z.:** Kérdőívek tervezése, interjúk. In: Bereczky Z., Muszbek L. A klinikai kutatások tervezése és kivitelezése; elméleti és módszertani alapok. Medicina Kiadó, Budapest, 2011.
3. **Bagoly Z.:** Intézményen kívüli, multicentrikus és nemzetközi tanulmányok. In: Bereczky Z., Muszbek L. A klinikai kutatások tervezése és kivitelezése; elméleti és módszertani alapok. Medicina Kiadó, Budapest, 2011.

Bagoly Zsuzsa (Klinikai orvostudományok) tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása  
MTA V. Orvostudományi Osztálya (2023.12.01)

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Tudományos folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	62			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		49	544	675
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		1	0	0
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként <sup>3</sup>		0	0	0
összefoglaló közlemény		9	708	811
rövid közlemény		3	15	17
<b>II. Könyvek</b>	0			
<b>a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként</b>	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
<b>b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként</b>	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
<b>III. Könyvrészlet</b>	3			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		3	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		0	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>4</sup></b>	0		0	0
<b>Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)</b>		0	0	0
<b>Tudományos közlemények összesen (I-IV)</b>		65	1267	1503
<b>Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)</b>	65		1267	1503
<b>V. További tudományos művek</b>	5			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is		2	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		3	12	14
Oltalmak (szabadalmak)		0	0	0
<b>VI. Hivatkozott absztraktok<sup>5</sup></b>	2		3	8
<b>Összes hivatkozás<sup>1</sup></b>			1282	1525
<b>Hirsch index<sup>6</sup></b>	20			
<b>g index<sup>6</sup></b>	38			

Speciális tudánymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	13	277
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	16	124
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2008) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	56	1225
Az utolsó 10 év (2013-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	44	379
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	377	24,72%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		71 + 0
Jelentés, guideline	1	21
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő <sup>7</sup>	0	0