



Prof. Dr. Klivényi Péter
egyetemi tanár, MTA doktora
Szegedi Tudományegyetem, Neurológiai Klinika

Tisztelt Professzor Úr!

Köszönettel tartozom, hogy elvállalta a “Hemosztázis vizsgálatok cerebrovaszkuláris kórképekben: új biokémiai és klinikai vonatkozások” című MTA doktori értekezésem opponensi bírálatát. Köszönöm a doktori értekezés gondos áttanulmányozását, a részletes bírálatot, és az elgondolkodtató, építő jellegű észrevételeket, kérdéseket.

A dolgozat terjedelmével kapcsolatos megjegyzést köszönettel veszem. A 167 oldalnyi tudományos rész terjedelmét részben az is eredményezte, hogy a dolgozat alapját 20 közlemény adja, melyek irodalmi háttérét és módszertanát csak részben lehetett összevontan tárgyalni. A dolgozat írásánál célom volt, hogy az értekezés önmagában, további irodalomkutatás nélkül is érthető legyen. Ennek megfelelően törekedtem arra, hogy mind a hemosztázissal kapcsolatos eredmények biokémiai és laboratóriumi diagnosztikai háttérét, mind a neurológiai ill. kardiológiai kórképek és vizsgálatok megfelelő értelmezéséhez szükséges ismereteket leírjam. Összehasonlítva egyéb, folyamatban lévő doktori eljárások értekezéseivel, úgy ítélt meg a dolgozat benyújtásakor, hogy az értekezés terjedelme átlagosnak mondható. Természetesen a Bírálnak jogos a felvetése, mely szerint rövidebb Bevezetés fejezet és kevesebb táblázat ill. irodalmi hivatkozás talán jobban segíthette volna az új eredmények kiemelését.

Az értekezéssel kapcsolatban felmerülő kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

A közlemények egy részében a véralvadási kaskád ill. a fibrinolízis aktuális változásait tanulmányozta a jelölt magyar akut ischaemiás stroke-on átesett betegekben. A magyar betegpopuláció jellegzetességeit tekintve elmondható, hogy közülük sajnos számos alkoholbeteg is található. Mivel a hemostasisban részt vevő faktorok döntő többsége a májban keletkezik, így joggal felmerül a kérdés, hogy vajon a májérintettség hogyan befolyásolja az eredményeket. Ennek ellenére csak a thrombocyta aggregációs vizsgálatoknál került megemlítésre a májfunkció. A többi vizsgálatnál hogyan zárták ki a májérintettséget?

Köszönöm az igen releváns kérdést. A máj központi szerepet játszik a hemosztázis rendszer egyensúlyának fenntartásában, mivel a máj szintetizálja a véralvadási faktorok és a fibrinolízisben részt vevő fehérjék többségét, ezenkívül a trombopoetin termelése révén a vérlemezkék számának fenntartásáért is felelős. Ennek következtében az előrehaladott krónikus vagy akut májbetegségek jelentős hatással lehetnek a hemosztázis rendszerére. A dolgozatban bemutatott klinikai tanulmányok közül a májfunkció jelentős mértékű zavara, ill. az ismert

hemorrhagiás diathesis, beleértve a trombociták számbeli ill. funkciózavarát kizárási kritérium volt a betegek és egészséges kontrollok esetén is valamennyi tanulmányban az akut stroke betegek vizsgálatát kivéve (vérlemezkegátló terápiákkal kapcsolatos vizsgálatok, pitvarfibrilláló betegek bevonásával végzett vizsgálatok, intracerebrális vérzést szenvedett betegekkel kapcsolatos vizsgálatok). Az akut ischaemiás stroke-ot szenvedett betegek esetén a vizsgálatok beválogatási és kizárási kritériumai megegyeztek az érvényben lévő irányelvek szerinti intravénás trombolízis kezelés beválogatási és kizárási kritériumaival. Ezek a kritériumok a májfunkció zavarát külön ugyan nem említik, azonban a hemosztázis szempontjából kizáró tényező a kismértékű INR megnyúlás ($INR > 1,7$), az alacsony trombocitaszám ($< 100\ 000\ G/L$), a megnyúlt hemosztázis szűrőteszt (protrombin idő > 15 sec, APTT > 40 sec). Amennyiben a máj szintetikus funkciója (így az alvadási faktorok szintézise) jelentős mértékben érintett, a beteg ezen feltételeket nem tudja teljesíteni. Ennek megfelelően a mi tanulmányainkban sem szerepeltek olyan betegek, akik a fenti kritériumnak nem feleltek meg, így arra következtethetünk, hogy nem volt közöttük olyan májbeteg, akinél a máj szintetikus funkciójának olyan mértékű károsodása állt volna fenn, mely jelentős mértékben befolyásolta volna a hemosztázis, ill. fibrinolitikus faktorok szintézisét, továbbá a trombopoietin termelést. Megjegyzendő az is, hogy a dolgozat fókuszában lévő hemosztázis tényezők közül számos nem a májban termelődik, így ezen faktorok szintjeit a máj szintetikus funkciója egyáltalán nem vagy csak áttételesen befolyásolhatta, pl. a FXIII-A alegysége, a von Willebrand faktor, vagy a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1).

Irodalom:

1. Lisman T, Porte RJ. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. Blood. 2010;116(6):878-85.

2.) Epidemiológiai adatok támasztják alá azt a megfigyelést, hogy azok az egyének, akiknél XI-es faktor hiány vagy deficiencia van, azok között az ischaemiás stroke előfordulása sokkal alacsonyabb. Ennek a kórállapotnak a genetikai formája különösen gyakori az askenázi zsidó leszármazottak között, míg a szerzett formája a májbetegek között. A jelölt végzett-e XI-es faktor aktivitással kapcsolatos vizsgálatokat és vajon ezek hogyan befolyásolták az eredményeket?

A kérdés érdekes és aktuális, különösen a jelenleg klinikai kipróbálás alatt álló XI-es faktor (FXI)-gátló gyógyszerek viszonylatában. A FXI deficienciája igen ritka, világszerte 1:1 000 000 gyakorisággal fordul elő, azonban valóban, askenázi zsidó leszármazottak esetén jóval magasabb a prevalencia, akár 1:450 is lehet. Mivel a FXI deficiencia elméletileg a stroke előfordulásának esélyét csökkenti, azonban nagyon ritka kórállapot, igen nagy létszámú egészséges kontroll ill. stroke betegből álló kohorsz összehasonlítását kellene elvégezni annak érdekében, hogy érdemi információt nyerjünk ezzel kapcsolatban. A mi vizsgálataink fókusz a stroke incidenciájának vizsgálatára nem terjedt ki. Az általunk vizsgált betegkohorszban nem vizsgáltuk a FXI aktivitást. A FXI jelentős mértékben csökkent szintjét, deficienciáját nem feltételeztük sem veleszületett, sem szerzett módon, sem az ischaemiás stroke-ot szenvedett, sem a hemorrhagiás stroke-ot szenvedett betegkohorsz esetén, hiszen a vizsgálatba csak olyan betegek kerültek be, akiknél a hemosztázis szűrőteszt (beleértve az APTT-t) nem mutattak megnyúlást (lásd első kérdésre adott válasz). Érdekes lehet, és terveink között szerepel azonban a FXI szinteket megvizsgálni olyan szempontból, hogy milyen arányban fordul elő akut ischaemiás stroke betegekben emelkedett FXI aktivitás, és az milyen összefüggést mutat a terápia kimenetelével. Az emelkedett FXI aktivitás ismert rizikótényezője a rekurrens stroke-

nak. A FXI gátló új típusú antikoagulánsok ígéretesek lehetnek a jövőben a trombotikus események kivédésére, ugyanakkor, a vérzés rizikóját feltehetőleg nem, vagy csak kis mértékben fokozzák. Biztonságossági profiljuk révén elsősorban szekunder stroke profilaxisként, de teoretikusan akár a trombolízis adjuváns kezelésekként is szóba jöhet használatuk, mely hipotézisek igazolására további vizsgálatok szükségesek.

Irodalom:

1. Barg AA, et al. Factor XI deficiency: phenotypic age-related considerations and clinical approach towards bleeding risk assessment. *Blood*. 2024;143(15):1455-64.
2. Rohmann JL, et al. Coagulation factor XII, XI, and VIII activity levels and secondary events after first ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2020;18(12):3316-24.
3. Nolte CH. Factor XI inhibitors - Rising stars in anti-thrombotic therapy? *J Neurol Sci*. 2024;464:123157.

3.) A Leyden mutáció az egyik leggyakoribb hereditár eltérés a hemosztázisban. Ennek ellenére 5 heterozigóta és 5 homozigóta beteg került tanulmányozásra, mely megítélésem szerint nem alkalmas statisztikai elemzésre és valamiféle következtetések levonására.

Valóban, az V-ös faktor Leiden mutációja (FVLeiden) relatíve gyakori eltérésnek számít az európai populációban, azonban a megjegyzés második fele magyarázatra szorul. A Bíráló által említett közleményben (Koncz et al, *Thromb Res*, 2012) leírt munka teljes mértékben *in vitro*, biokémiai kísérleteken alapuló vizsgálat volt, és nem obszervációs jellegű klinikai (keresztmetszeti vagy kohorsz) vizsgálat. Célkitűzése volt *in vitro* kísérletek révén kimutatni, hogy a fokozott trombin képződéssel járó állapotokban (FVLeiden heterozigóta ill. homozigóta egyéneknél) a fokozott FXIII aktiváció a fibrinolízissel szemben ellenállóbb fibrin alvadékhoz vezet. A FVLeiden trombin generáción túlmutató közvetett hatásai kevésbé ismertek, és munkacsoportunk vizsgálta elsőként a mutációnak a FXIII aktivációra, az alvadék keresztkötéseinek kialakulására és a fibrinolízisre gyakorolt hatását az említett biokémiai kísérletekben. A kísérletek során vad típusú és FVLeiden mutációval rendelkező betegek plazmájában a véralvadást rekombináns humán tromboplasztinnal és Ca^{2+} -al aktiváltuk, és 16 különböző időpontban nyert alvadékot SDS PAGE és Western blotting technikával analizáltunk a FXIII aktiválódás, a fibrin keresztkötések kialakulására vonatkozóan és az α 2-plazmin inhibitor fibrin α láncához történő keresztkötésre vonatkozóan, rekombináns humán trombomodulin jelenlétében ill. hiányában. Az alvadék kialakulását befolyásoló plazma komponensek individuális különbségeinek kiküszöbölése érdekében, valamint a kapott eredmények megerősítése céljából, FV vad típusú és FVLeiden homozigóta egyének kevert plazmáiból FV-öt izoláltunk, majd ezzel kiegészítettünk FV hiányplazmát. Az így kapott plazmákban is megvizsgáltuk, hogy a különböző genotípusú FV hogyan befolyásolja az rhTM α 2-PI-fibrin keresztkötésre gyakorolt hatását. A plazmamintákból különböző *in vitro* lízisvizsgálatokat is végeztünk, trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor (TAFI) ill. FXIIIa inhibitorok jelenlétében, rekombináns humán trombomodulin jelenlétében és hiányában is. Ezeket a kísérleteket szintén elvégeztük tisztított FVvad és FVLeiden homozigóta egyének kevert plazmáiból izolált FV-el kiegészített FV hiányplazmából. Az eredmények statisztikai értékelhetősége az elemszám mellett a kísérletek reprodukálhatóságától (szórás, ill. variációs koefficiens mértékétől) is függ. Ahogy az a 43. ábrán látható, a biokémiai kísérletek eredményei nagyon kis szórás mellett, egyértelműen megerősítették a FXIII aktiváción és az α 2-PI-fibrin keresztkötések kialakulásán keresztül ható mechanizmus fontosságát a FVLeiden mutáció antifibrinolitikus hatásában (variációs koefficiens < 10%). Fontosnak tartom megjegyezni, hogy *in vitro*, biokémiai jellegű vizsgálatok során a kísérletek technikai nehézségei miatt általánosan elfogadott a megfelelő kontrollok mellett megtervezett kísérletek kevészer (minimálisan n=3 alkalommal) történő ismétlése, és statisztikai értékelése, amennyiben az eredmények reprodukálhatósága megfelelő.

Feltételezem, hogy a Bíráló megjegyzése arra (is) vonatkozhatott, hogy az általunk végzett kísérletek során találtunk ugyan különbséget a FVLeiden hetero- és homozigóta egyének között, de ez statisztikailag nem bizonyult szignifikáns eltérésnek. Ez valóban elképzelhető, hogy részben a vizsgálati alanyok számával magyarázható. A FVLeiden homozigóták számát az adott feltételek mellett (trombotikus események szempontjából negatív anamnézis, antikoagulánstól mentes állapot, továbbá a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusra nézve vad genotípus) nem tudtuk tovább növelni. A vizsgálatban résztvevő öt FVLeiden homozigóta egyént közel 3000 egyén vizsgálatának eredményeként sikerült beválogatnunk. Másrészt a kísérleti körülmények beállításánál a FVLeiden mutáció hatásának kimutatása volt az elsődleges szempont és nem a heterozigóta és a homozigóta állapot közti különbség vizsgálata. Tekintettel a vizsgálati eredmények kis szórására, nem gondolnám, hogy az esetszám növelésével jelentősen növelni tudtuk volna a két csoport közötti különbséget. A kísérleti feltételek változtatásával elképzelhető, hogy találtunk volna olyan viszonyokat, amelyben az alvadás során a következményes FXIII aktivációban és a fibrinolízisre gyakorolt hatásokban a heterozigóták és a homozigóták markánsabban különböznek, ez azonban teljesen új kísérletsorozatok és új vizsgálatok alapjait képezte volna, amelyek kivitelezését a kísérletek elvégzésekor nem tartottuk igazán lényegesnek.

4.) Az utóbbi időben került előtérbe a Protein Z szerepe a véralvadásban, illetve az ellene (és más véralvadási faktorok ellen) képződő antitestek szerepe a vascularis események kialakulásában. Ennek szerepéről van-e információja a jelöltnek, illetve elképzelhetőnek tartja-e, hogy ezek az antitestek befolyásolhatják-e az eredményeit.

A protein Z (PZ) egy K-vitamin-függő plazmafehérje, amelyről felmerült, hogy a véralvadás egyensúlyának szabályozásában szerepe lehet. A PZ szerkezeti homológiát mutat más K-vitaminfüggő véralvadási plazma-glikoproteinekkal, köztük a VII-es, IX-es és X-es faktorról, a protein C és protein S-el, de ezekkel a szerin proteáz zimogénekkal ellentétben nincs proteolitikus funkciója. Bár pontos funkciója nem teljesen ismert, úgy tudjuk, hogy a PZ a protein Z-függő proteáz inhibitornak kofaktora, amely gátolja az aktivált X-es véralvadási faktort (FXa). A protein Z antikoaguláns funkciója mellett irodalmi adatok szerint fokozza a trombin kötődését a foszfolipid felületekhez, ami elősegítheti a trombusképződést. Egy vizsgálatban alacsony PZ szintet találtak ismeretlen eredetű vérzésben szenvedő betegeknél, azonban két másik vizsgálatban nem sikerült összefüggést kimutatni a PZ szintek és a vérzési hajlam között. Ezzel szemben egyre több bizonyíték utal arra, hogy a PZ hiánya fokozza a trombózis rizikót. Egyes vizsgálatokban a PZ fehérje alacsony plazmaszintje a vénás trombózis, az akut koronária szindróma fokozott kockázatával járt együtt. A PZ szintje és az ischaemiás stroke közötti kapcsolatot vizsgáló tanulmányok azonban igen ellentmondásos eredményeket mutattak. Egyes kutatások szerint az alacsony PZ szint növelheti az ischaemiás stroke kockázatát, míg mások éppen ellenkezőleg, a magas PZ szintet találták kockázati tényezőnek. A PZ gén (PROZ) polimorfizmusainak vizsgálata során Zhang és munkatársai megállapították, hogy egyes genetikai variánsok alacsonyabb PZ szinttel társulnak, ami csökkentette az ischaemiás stroke kockázatát. Eredményük arra utalt, hogy a magasabb PZ szint összefügghet a fokozott trombózis hajlammal. Több vizsgálat azonban egyáltalán nem talált összefüggést a PZ szintek és az ischaemiás stroke kialakulásának esélye között, vagy csak fiatalabb egyéneknél volt összefüggés kimutatható. Felmerült az is, hogy a PZ szintek nem játszanak oki szerepet a trombotikus események kialakulásában, hanem a fehérje szintjét pusztán másodlagosan befolyásolják egyéb, ismert rizikótényezők. A PZ ellenes antitesteket először habituális vetélésel társultan írták le antifoszfolipid szindrómás nőkben, így felmerült etiológiai szerepük a terhességi komplikációk kialakulásában. Egy 2008-ban, Ingrid Pabinger

munkacsoportja által kivitelezett vizsgálatban azonban úgy találták, hogy az anti-protein Z antitestek nem mutattak összefüggést sem a trombózis kialakulásának esélyével, sem a terhességi komplikációk kialakulásával lupus antikoagulánssal rendelkező betegekben. A PZ ellenes antitestek szerepét a stroke kialakulására és különösen a stroke kimenetelére nézve nem vizsgálták széleskörűen, és jelenleg nem áll rendelkezésünkre elegendő megfelelő minőségű adat ezen antitestek potenciális klinikai jelentőségéről.

Irodalom:

1. Vasse M. Protein Z, a protein seeking a pathology. *Thromb Haemost.* 2008;100(4):548-56.
2. Sofi F, et al. Protein Z: "light and shade" of a new thrombotic factor. *Clin Lab.* 2004;50(11-12):647-52.
3. Zhang L, et al. Circulating protein Z concentration, PROZ variants, and unexplained cerebral infarction in young and middle-aged adults. *Thromb Haemost.* 2017;117(1):149-57.
4. Sailer T, et al. Clinical significance of anti-protein Z antibodies in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Res.* 2008;122(2):153-60.

5.) A thrombin antithrombin komplex szint megemelkedését tapasztalták az intracardiálisan nyert vérmintákban pitvarfibrilláció esetén. Azonban van arra vonatkozólag is, hogy a TAT szint az elzáródás közelében és a stroke etiológiájától függően is más-más értéket mutathat. Végeztek-e arra vonatkozóan vizsgálatokat, hogy a TAT szint hogyan változik a különböző etiológiájú stroke-ok esetén, ill. hogy a stroke-ot nem elszenvedő, de pitvarfibrilláló betegekben ez hogyan változik?

A trombin-antitrombin (TAT) komplex szintje a vérárvadási rendszer aktiválódását jelzi, és emelkedett szintje ennek megfelelően összefüggésbe hozható pretrombotikus, hiperkoagulációs állapotokkal. Munkacsoportunk nem vizsgálta, hogy a TAT szint hogyan változik különböző etiológiájú stroke-ok esetén. Egy nemrégiben közölt szisztematikus összefoglaló és meta-analízis szerint valamennyi stroke etiológia közül a kardioemboliás eredetű stroke-ok esetén találták a legmagasabb TAT-komplex szinteket, azonban a vizsgálatok többségénél a mintavétel igen széles időskálát foglalt magába a stroke kialakulásához képest, továbbá az alkalmazott kezelést sem vették figyelembe, így az eredményeket fenntartással érdemes kezelni. Korábbi munkánkban a pretrombotikus állapotok kimutatására igen érzékeny trombin generációs tesztet használtuk 120 akut ischaemiás stroke-ot szenvedett beteg trombolízis előtti vérmintája esetén a hiperkoagulabilitás mértékének kimutatására. Úgy találtuk, hogy az ETP és peak thrombin paraméterek szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak kardioemboliás háttérű stroke-ok esetén az aterotrombotikus eredetű stroke-okhoz viszonyítva, tehát a trombin generáció mértéke aterotrombotikus eredetű akut stroke esetekben volt magasabb, szemben a kardioemboliás háttérű stroke-okkal. Könyökvéna mintákból nem végeztünk TAT-komplex meghatározást pitvarfibrilláló, stroke-ot nem szenvedett betegekben, ilyen célkitűzésű vizsgálatunk nem volt. Számos irodalmi adat utal azonban arra, hogy a TAT komplex vizsgálata hasznos marker pitvarfibrilláló betegekben a hiperkoagulabilitás mértékének megítélésére (antikoaguláns kezelés mellett vagy anélkül), és az emelkedett szintek szoros összefüggést mutattak számos vizsgálatban a stroke rizikójának mértékével.

Irodalom:

1. Song P, et al. Effect of plasma thrombin-antithrombin complex on ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* 2023;12(1):17.
2. Asakura H, et al. Prothrombin fragment F1 + 2 and thrombin-antithrombin III complex are useful markers of the hypercoagulable state in atrial fibrillation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1992;3(4):469-73.
3. Soncini M, et al. Hypercoagulability and chronic atrial fibrillation: the role of markers of thrombin generation. *Minerva Med.* 1997;88(12):501-5.

6.) Sőt, az is felmerült, hogy a TAT szint korrelál a vérzéses transzformáció gyakoriságával. Erre vonatkozóan végeztek-e elemzést?

Ilyen vizsgálatot sem végeztünk. Saját vizsgálatainkban a TAT komplex vizsgálata helyett a hipo- ill. hiperkoagulabilis állapotok megítélésére egyaránt alkalmas trombin generációs vizsgálatot használtunk, a vizsgálat eredményét 120 akut ischaemiás stroke-ot szenvedett beteg esetén vetettük össze a terápia kimenetelével. Úgy találtuk, hogy az alsó kvartilisbe tartozó endogén trombin potenciál (ETP) és peak thrombin paraméterek szignifikáns összefüggést mutattak a trombolízist követően kialakult szimptomás hemorrhagiás transzformáció (SICH) előfordulásával, és többszörös logisztikus regressziós analízisben mindkét paraméter a SICH kialakulásának független előrejelzőjének bizonyult. Ennek megfelelően a mi vizsgálataink a trombin generáció csökkent mértéke (hipokoagulabilitás) és a vérzéses transzformáció kialakulása között mutattak összefüggést. A TAT komplex és a hemorrhagiás transzformáció viszonylatában az irodalom nem egységes, de elenyésző azon vizsgálatok száma, amelyek preanalitikai szempontból is elfogadható, helyesen interpretált eredményeket mutatnak be relatíve nagy esetszámú akut ischaemiás stroke-ot szenvedett betegkohorszban. Fernandez-Cadenas és munkatársai 89 akut ischaemiás stroke miatt intravénás trombolízis kezelésben részesült betegben határozták meg a TAT komplex szinteket a trombolízis kezelés előtti vérmintákból, azonban nem találtak összefüggést a TAT komplex szintek és a hemorrhagiás transzformáció előfordulása között. A TAT komplex emelkedett szintje (hiperkoagulabilitást jelezve) vizsgálatukban elsősorban a rekanalizáció elmaradásának volt előrejelzője. Mivel a TAT komplex meghatározása a leggyakrabban használt ELISA módszer esetén időigényes és relatíve drága, úgy vélem, a jövőben feltehetőleg inkább a trombin generáció meghatározásának standardizálását ill. automatizációját követően várhatjuk, hogy ismereteink bővülni fognak ezen a területen.

Irodalom:

1. Bagoly Z, et al. Markers of Coagulation and Fibrinolysis Predicting the Outcome of Acute Ischemic Stroke Thrombolysis Treatment: A Review of the Literature. *Front Neurol.* 2019;10:513.
2. Hudak R, et al. Low thrombin generation predicts poor prognosis in ischemic stroke patients after thrombolysis. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180477.
3. Fernandez-Cadenas I, et al. Lower concentrations of thrombin-antithrombin complex (TAT) correlate to higher recanalisation rates among ischaemic stroke patients treated with t-PA. *Thromb Haemost.* 2009;102(4):759-64.

7.) A hemostasis vizsgálatok során a thrombolysisben részesült betegek analizésénél a klinikai hatékonyság megítélésére a 90 napos időpontot választottak, holott az irodalomban legtöbbször a 30 napos állapotot értékelik. A rövidebb időtartam választásnak az lehet az oka, hogy a 30 és 90 nap közötti állapotváltozásban nem csak a stroke, hanem az azt követő rehabilitáció hozzáférhetősége, ill. az ápolás minősége is szerepet játszhat. A munkájukban miért a 90 napos időpontot választották?

A kérdés természetesen jogos, és a Bírálónak teljes mértékben igaza van abban, hogy a 30. és 90. nap közötti állapotváltozásban nem csak a stroke, hanem az azt követő rehabilitáció hozzáférhetősége, ill. az ápolás minősége is fontos szerepet játszhat. Egyes vizsgálataink esetén (pl. FXIII szintek és mortalitás) a rövid távú mortalitás között tudtunk összefüggést kimutatni, míg a hosszú távú mortalitási adatokkal nem mutattak szignifikáns összefüggést a vizsgált paraméterek. A dolgozatban ennek megfelelően fontosnak tartottam megjegyezni, hogy a stroke utáni mortalitást hosszú távon nyilvánvalóan számos tényező befolyásolja, beleértve az

életkort, a társbetegségeket, jelentős funkcionális neurológiai deficit kialakulása esetén a szociális háttér, ápolási körülményeket, stb., mely tényezők esetünkben is hozzájárulhatnak a hosszú távú mortalitással kapcsolatos összefüggések eltűnéséhez.

A 90. napos időpont választását azonban több érv is alátámaszthatja a trombolízisben részesült betegek klinikai hatékonyságának vizsgálatakor. Bár a szakirodalomban gyakran a 30 napos állapotot értékelik, számos nagy randomizált kontrollált vizsgálat, például a NINDS, ECASS, és DAWN tanulmányok is a 90 napos kimenetelt használták primer végpontként. Az mRS (modified Rankin Scale) 90 napos értékelése az egyik legelterjedtebb standard skálarendszer a stroke utáni funkcionális kimenetel mérésére. A trombolízis nemcsak az akut túlélést és rövid távú javulást befolyásolja, hanem a hosszabb távú neurológiai regenerációs folyamatokra is hatással lehet. Való igaz, hogy a 30 és 90 nap közötti állapotváltozásban szerepet játszhat a rehabilitációhoz való hozzáférés és az ápolás minősége, ugyanakkor a hosszabb követési időszak azt is lehetővé teszi, hogy jobban meg lehessen különböztetni a kezelés valódi hatását a rövid távú fluktuációktól vagy az esetleges kórházi szövődményekről. Összességként a 90 napos végpont választása a stroke vizsgálatokban bevett gyakorlat, amely számos nagy randomizált vizsgálat és klinikai ajánlás szerint megfelelően tükrözi a kezelés hosszabb távú hatásait, és összehasonlíthatóvá teszi az eredményeket a nagy nemzetközi vizsgálatok eredményeivel.

Irodalom:

1. Hacke W, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. N Engl J Med. 2008;359(13):1317-29.
2. Boysen G, et al. European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS): (rt-PA-Thrombolysis in acute stroke) study design and progress report. Eur J Neurol. 1995;1(3):213-9.
3. Alberts MJ, et al. Dawn of a New Era for Stroke Treatment: Implications of the DAWN Study for Acute Stroke Care and Stroke Systems of Care. Circulation. 2018;137(17):1767-9.
4. de Havenon A, et al. Variability of the Modified Rankin Scale Score Between Day 90 and 1 Year After Ischemic Stroke. Neurol Clin Pract. 2021;11(3):e239-e44.

8.) A clopidogrel rezisztencia vizsgálatok kapcsán mind a nem specifikus, mind a jelölt munkacsoportja által vizsgált specifikus tesztekben magas (megkockáztatom igen magas) rezisztenciát, vagy gyenge hatást mutattak ki. Ennek hátterében azért genetikai faktorok szerepe szokott felmerülni, de ismert, hogy az ezért felelős CYP2C19*2 polimorfizmusok előfordulása a kaukázusi populációban 2-5% közé tehető. Akkor a fennmaradó esetekben mi játszhat szerepet a rezisztencia kialakulásában?

A CYP2C19*2 funkcióvesztő allél gyakorisága a különböző populációkban eltérő lehet. Irodalmi adatok szerint a magyar általános populációban a CYP2C19*2 allél gyakorisága megközelítőleg 12,6%. Ezzel szemben a magyarországi roma populációban ez az arány jóval magasabb, körülbelül 20,5%. Ezek az eredmények összhangban vannak más európai vizsgálatokkal, ahol a CYP2C19*2 allél gyakorisága általában 10% és 20% között mozog, tehát az intermedier metabolizáló (*1/*2 genotípus) és a gyenge metabolizáló (*2/*2 genotípus) egyének aránya a populációban kb. 20-40% közé tehető. A Pécsi Tudományegyetem Orvosi Genetika Intézetében végzett kutatás szerint, melyben 370 magyar és 500 roma származású egyén CYP2C19 polimorfizmusait vizsgálták, úgy találták, hogy az intermedier metabolizáló *1/*2 genotípus frekvenciája 23% vs. 31,8% volt a magyar ill. roma kohorszban, míg a gyenge metabolizáló *2/*2 genotípus frekvenciája 1,1% vs. 4,6% volt. (Ennek megfelelően az intermedier és gyenge metabolizálók aránya a magyar kohorszban 24,1% vs. a roma kohorszban 36,4% volt). Vizsgálatukban nem találtak olyan egyént, aki a *3 funkcióvesztő allélt hordozta volna. Munkacsoportunk 2015-ben egy TDK pályamunka keretében vizsgálta ugyanezen CYP2C19 polimorfizmusokat a clopidogrel rezisztencia vonatkozásában. Munkánk

során az értekezésben is bemutatott 111, tartósan 75 mg clopidogrel monoterápián lévő, ischaemiás stroke-ot szenvedett beteg vérmintájából, továbbá 140 kontroll egyén esetén végeztük el CYP2C19 funkcióvesztő (*2, *3) allélek vizsgálatát és vetettük össze clopidogrel terápia esetén a funkcionális tesztek eredményeivel. A CYP2C19 allélfrekvenciájára vonatkozó eredményeink a pécsi munkacsoport eredményeinek megfeleltek (roma származással kapcsolatban nem voltak adataink). Vizsgálatunkban a CYP2C19*2 allél gyakorisága 13% volt a kontrollok és 12,2% volt a betegek esetén, egy olyan egyént találtunk, aki a *3 allélt hordozta (a betegcsoportban). Az intermedier és gyenge metabolizálók aránya ennek megfelelően 26% volt a kontrollok és 24,4% a betegek esetén. A *2 allél hordozása és a clopidogrel hatástalansága között gén-dózis-hatás összefüggés volt megfigyelhető mindhárom alkalmazott P2Y12-specifikus módszer (VASP-foszforiláció vizsgálata, VerifyNow P2Y12 teszt, PGE1[ADP40] tesztek) esetén. A *3 allél hordozása szintén a clopidogrel csökkent hatásával társult, mely mindhárom módszer esetén megfigyelhető volt. Annak érdekében, hogy a clopidogrel hatástalanság hátterében lévő egyéb potenciális okokat is felfedjünk, a gyógyszerinterakciók közül a legjelentősebbnek tartott két gyógyszer –a sztatinok ill. a protonpumpa-gátlók– hatását is megvizsgáltuk a clopidogrel hatására nézve ezen gyógyszerek egyidejű alkalmazásakor. A betegek 60%-a (67 beteg) részesült sztatin terápiaiban a clopidogrel mellett. Megvizsgáltuk a clopidogrel rezisztenciával való összefüggést, azonban nem volt szignifikánsan magasabb a clopidogrel non-responderek aránya a sztatin terápián lévő csoportban egyik vizsgált módszer esetén sem. A betegek 9,9%-a (11 beteg) részesült protonpumpa-gátló kezelésben a clopidogrel terápia mellett. Bár nem túl magas az esetszám (amely feltehetőleg abból is adódik, hogy a betegek nem kaptak aspirint), de megvizsgáltuk a protonpumpa-gátló kezelés hatását a clopidogrel rezisztenciára nézve. A clopidogrel non-responderek aránya nem volt magasabb a protonpumpa terápián lévő csoportban egyik vizsgált módszer esetén sem. A clopidogrel terápia hatástalanságának hátterében álló egyéb potenciális okokat nem vizsgáltunk (egyéb, ritka funkcióvesztő mutációk szerepe, pl. a CYP2C19 *4, *5, *6, *7 és *8 allélek, egyéb gyógyszer-interakciók, stb.) de feltételezhetjük, hogy a betegek egy része esetén non-compliance is szerepet játszhatott a hatástalanságban vagy csökkent hatásban. Megjegyzendő, hogy általunk vizsgált clopidogrel monoterápián lévő kohorsz esetén a relatíve magasnak ítélt laboratóriumi rezisztencia ill. hatástalanság hátterében az is állhat, hogy a nemzetközi irodalomban a legtöbb tanulmány kettős trombocita-gátlás mellett ad véleményt a „clopidogrel-rezisztencia” mértékéről, annak ellenére, hogy az aspirin nyilvánvalóan befolyásolja a legtöbb módszer, különösen a nem-P2Y12 specifikus módszerek eredményét, így a clopidogrel hatástalanságának vagy csökkent hatásának arányát ezek a vizsgálatok feltehetőleg alulbecslik.

Irodalom:

1. Petrovic J, et al. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(1):88-94.
2. Sipeky C, et al. High prevalence of CYP2C19*2 allele in Roma samples: study on Roma and Hungarian population samples with review of the literature. *Mol Biol Rep.* 2013;40(8):4727-35.
3. Bádogos Á. CYP2C19 polimorfizmusok szerepe a clopidogrel rezisztencia vizsgálatában ischaemiás stroke-ot szenvedett betegekben. Debreceni Egyetem ÁOK, TDK pályamunka 2015. (témavezető: Dr. Bagoly Zsuzsa, OTDK I. helyezett előadás)

9.) A BMI is befolyásolhatja a trombocita aggregáció szerek hatékonyságát/hatástalanságát. Érdekes módon a jelölt munkájában a vizsgált esetekben a páciensek csak túlsúlyosak voltak, holott a mindennapi gyakorlatban a vascularis betegek sokszor (súlyosan) elhízottak. Ennek mi lehetett az oka?

A felvetés valóban elgondolkodtató. Több vizsgálat felvetette, hogy a clopidogrel rezisztencia hátterében elhízás is állhat. Az általunk vizsgált clopidogrel monoterápián lévő kohorszban a betegek többsége túlsúlyos volt (medián BMI: 25,95, IQR: 24-28 kg/m²), de 30 kg/m² feletti BMI csak a betegek kis százalékában volt jelen (a betegek mintegy 11%-a esetén). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a clopidogrel hatás és a BMI között (VASP foszforiláció PRI vs. BMI $r=0,052$, 95%CI: -0,3526-0,4407, $p=0,7996$). Megemlítendő, hogy az aszpirin monoterápián lévő koszorúérbetegek csoportja esetén a BMI medián értéke 30 kg/m² volt (IQR: 26,5-34,0 kg/m²), ami szignifikánsan magasabb volt a clopidogrel monoterápián lévő betegekhez és a kontrollokhoz képest. A clopidogrel monoterápián lévő, stroke-ot szenvedett betegek esetén több ok is elképzelhető a relatíve alacsonyabb BMI hátterében. Az elmúlt évtizedekben az elhízás gyakorisága világszerte növekedett, így elméletileg elképzelhető, hogy 2012-ben a vizsgált betegkohorszban még alacsonyabb volt a súlyosan elhízottak aránya, mint napjainkban. Egy olyan vizsgálatban, amelyben 2005-2010 között az USA egy meghatározott régiójában stroke-ot szenvedett valamennyi beteg BMI-jét megvizsgálták ($n=1791$ beteg), úgy találták, hogy a medián BMI 27,1 kg/m², IQR:23,7-31,2 kg/m² volt, mely mindössze 1,1 kg/m² egységgel magasabb az általunk vizsgált kohorsz BMI értékeihez képest. Fontos hangsúlyozni, hogy az értekezésben leírt másik kohorsz esetén, ahol akut ischaemiás stroke-ot szenvedett betegeket vizsgáltunk, a BMI mediánja 28 kg/m² volt, azaz mintegy 2 kg/m² egységgel magasabb, mint a clopidogrel monoterápián lévő kohorszban. A különbség hátterében állhat a tény, hogy az elhízás (emelkedett BMI) nemcsak a stroke kialakulásának rizikóját, hanem a mortalitását is szignifikánsan növeli. Ennek megfelelően a clopidogrel monoterápián lévő kohorszban tapasztalt relatíve alacsonyabb BMI hátterében az is állhatott, hogy a túlsúlyos stroke-ot szenvedett betegek egy részét a stroke-ot követően hamar elveszíthettük és így esetükben nem kerülhetett sor a szekunder prevencióként alkalmazott clopidogrel terápia vizsgálatára. Elképzelhető, hogy a súlyosabb mértékű elhízás a stroke-ot követően (esetleg mozgáskorlátozottsággal társultan) szintén negatívan befolyásolta a kutatásban való részvételi hajlamot.

Irodalom:

1. Puccini M, et al. Being Overweight or Obese Is Associated with an Increased Platelet Reactivity Despite Dual Antiplatelet Therapy with Aspirin and Clopidogrel. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2023;37(4):833-7.
2. Gao Q, et al. Global trends in ischemic stroke burden attributable to high BMI. *Medicine (Baltimore).* 2024;103(45):e40196.
3. Skolarus LE, et al. Association of body mass index and mortality after acute ischemic stroke. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2014;7(1):64-9.

10.) Tudomásom szerint arra nézve nem végeztek vizsgálatokat (és ezzel kapcsolatban az irodalom sem egységes), hogy a laboratóriumi clopidogrel rezisztencia, hogyan korrelál a klinikai rezisztenciával/hatástalansággal, holott ez lenne az egyik legfontosabb paraméter.

A laboratóriumi clopidogrel rezisztencia és a klinikai hatástalanság közötti összefüggés valóban egy összetett és vitatott kérdés. Számos nagy obszervációs klinikai vizsgálat és meta-analízis is igazolta, hogy clopidogrel terápia esetén a magas kezelés alatti trombocita reaktivitás (trombocita aggregációs vizsgálatokkal, VASP foszforilációs teszttel vagy betegágy melletti tesztekkel, pl. VerifyNow P2Y12 használatával kimutatva) összefügg a rekurrens ischaemiás események fokozott kockázatával (lásd Bonello et al. *JACC*, 2010, 1. táblázat, ahol 28 ilyen tanulmányt összegez). Ugyanakkor tény, hogy egyes tanulmányok nem tudták kétséget kizáróan igazolni az összefüggést a laboratóriumi vizsgálatok eredményei és a klinikai értelemben vett rezisztencia között. Több randomizált klinikai tanulmány is vizsgálta a

clopidogrel laboratóriumi rezisztencia vagy farmakogenetika alapján módosított terápia (pl. dózis-emelés vagy váltás új típusú P2Y₁₂ antagonistára) és a klinikai kimenetek közötti összefüggéseket (pl. GRAVITAS, ARCTIC, ANTARCTIC, ARTIC-GENE, stb.) melyek nem erősítették meg a laboratóriumi tesztek eredménye által vezérelt, perszonalizált terápia hasznosságát, néhány ellenpélda mellett (pl. TIMI, EFFICIENT trial). Ugyanakkor két átütő hatású tanulmány (TRITON-TIMI 38, PLATO) eközben egyértelműen igazolta, hogy az új típusú P2Y₁₂ antagonisták (prasugrel ill. ticagrelor) használata esetén az ischaemiás események ill. mortalitás előfordulási aránya szignifikánsan csökken a clopidogrelt használókhoz képest akut koronária szindrómás betegekben, így a clopidogrel hatás tesztelése az ezt követő időszakban a nemzetközi irányelvek szerint okafogyottá vált.

Annak, hogy a clopidogrel hatás laboratóriumi tesztelésére alapuló klinikai döntéshozatal hasznosságát nem sikerült kétséget kizáróan igazolni, több oka lehet. Egyik oka, hogy a clopidogrel hatást vizsgáló laboratóriumi tesztek igen eltérő érzékenységgel és specifitással rendelkeznek. A legtöbb tanulmányban nem, vagy nem kizárólag P2Y₁₂ specifikus laboratóriumi módszereket használtak a clopidogrel rezisztencia definiálására. Ezek a vizsgálatok nem mutatnak erős korrelációt egymással, így az eredmények variabilitása megnehezítette a múltban a megfelelő következtetések levonását. Problémát jelentett a hatástalanságot jelző határértékek definiálása is. A legtöbb módszer esetén a non-responder státusz határértékeit nem sikerült egyértelműen meghatározni, sőt, a laboratóriumi rezisztencia (gyógyszert nem szedő kontrollnak megfelelő eredmény) ill. a klinikai rezisztencia (újabb aterotrombotikus esemény) esetén ezek a határértékek eltérhetnek. Fontos megemlíteni, hogy a legtöbb clopidogrel rezisztenciát vizsgáló tanulmány kettős trombocita-gátló (aszpirin és clopidogrel) kezelésben részesülő betegeket vont be, amelyek esetén az aszpirin mind a laboratóriumi vizsgálatok eredményét, mind a klinikai kimeneteket befolyásolhatta, így korlátozottan lehet csak ezekből a vizsgálatokból direkt összefüggéseket levonni a clopidogrel hatásra vonatkozóan. Bonyolítja a helyzetet, hogy a trombocita-reaktivitás mértéke a betegek jelentős részében az idő függvényében eltéréseket mutathat, és mindössze egy vizsgálati eredményből levont következtetés a beteg responder/non-responder státuszára vonatkozóan nem biztos, hogy hosszú távon is igaz marad. A farmakogenetikai tényezők esetén elméletileg ilyen időfaktorral nem kell számolni. Jól ismert, hogy a CYP2C19 polimorfizmusok befolyásolják a clopidogrel aktív metabolitjának képződését, és a funkcióvesztő allélok (pl. CYP2C19 *2 és *3) csökkent metabolizmust és ezáltal csökkent hatékonyságot eredményezhetnek, azonban számolni kell az aktív metabolitot nagyobb mértékben átalakító, funkciónyerő allélok potenciális jelenlétével is (pl. CYP2C19*17), melyek esetében a clopidogrel trombocita-gátló hatása nő. Ennek megfelelően a kizárólag CYP2C19*2 allél és klinikai hatástalanság közötti összefüggést vizsgáló tanulmányok esetén sem volt feltétlenül elvárható, hogy a szoros kapcsolatot tudjanak igazolni.

Az egyik legfontosabb ok, ami a clopidogrel laboratóriumi hatástalanság és az erre épülő perszonalizált döntéshozatal eredménytelenségét magyarázhatja, az a vizsgált klinikai kimenetek, vagyis az aterotrombotikus események komplexitásában rejlik. A „klinikai rezisztencia” azért sem mindig azonos a laboratóriumi rezisztenciával, mert annak létrejöttében a trombociták aggregációján kívül egyéb rizikótényezők, pl. diabetes mellitus, hipertónia, az atherosclerosis mértéke, hiperlipidaemia, dohányzás, társbetegségek (pl. pitvarfibrilláció, krónikus vesebetegség), gyulladás, egyéb, ritkább rizikótényezők (pl. antifoszfolipid szindróma), és nem utolsósorban a terápia adherencia, vagyis a compliance is közrejátszhatnak. Ennek megfelelően előfordulhat, hogy egy beteg laboratóriumi vizsgálatok alapján clopidogrel rezisztenciát mutat, mégsem jelentkeznek nála klinikai szövődmények (különösen kettős trombocita-gátlás esetén), míg másoknál anélkül is kialakulhat trombotikus esemény, hogy ezt a clopidogrel hatást tükröző laboratóriumi tesztek egyértelműen jeleznék (pl. pitvarfibrilláló vagy antifoszfolipid szindrómás betegben).

Összességében elmondható, hogy mindezek miatt a clopidogrel laboratóriumi és klinikai rezisztencia közötti összefüggés, valamint a laboratóriumi eredményeken alapuló personalizált klinikusi döntéshozatal vitatott terület, és a kérdés pontos megválaszolásához megfelelően tervezett, nagy létszámú beteg bevonásával készült, prospektív, kontrollált vizsgálat(ok)ra lenne szükség. A felsorolt okok következménye az is, hogy jelenleg nincs nemzetközi evidencia a clopidogrel hatás monitorozására vonatkozóan, és az új típusú P2Y₁₂ receptor inhibitorok korszakának beköszöntével feltételezhetjük, hogy már nem is fog elkészülni a clopidogrel hatás monitorozásának szükségességét igazoló randomizált klinikai vizsgálat.

Irodalom:

1. Michelson AD, et al. How I use laboratory monitoring of antiplatelet therapy. *Blood*. 2017;130(6):713-21.
7. Bonello L, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(12):919-33.
2. Cattaneo M. Diagnosis and management of high platelet reactivity on treatment with clopidogrel. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(7):645-51.
2. Collet JP, et al. Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. *N Engl J Med*. 2012;367(22):2100-9.
3. Mega JL, et al. Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA*. 2011;306(20):2221-8.
4. Collet JP, et al. Genetic and platelet function testing of antiplatelet therapy for percutaneous coronary intervention: the ARCTIC-GENE study. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015;71(11):1315-24.
5. Cayla G, et al. Platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy in elderly patients stented for an acute coronary syndrome (ANTARCTIC): an open-label, blinded-endpoint, randomised controlled superiority trial. *Lancet*. 2016;388(10055):2015-22.
6. Price MJ, et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA*. 2011;305(11):1097-105.
8. Bonello L, et al. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(14):1404-11.
9. Ari H, et al. The EFFECT of hIgh-dose CloPIdogrel treatmENT in patients with clopidogrel resistance (the EFFICIENT trial). *Int J Cardiol*. 2012;157(3):374-80.
10. Wiviott SD, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2001-15.
11. Wallentin L, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1045-57.

Végezetül szeretném újra megköszönni Professzor Úr idejét, melyet MTA doktori értekezésem opponensi véleményezésével töltött, az alapvetően dícsérő, építő kritikát és az érdekes, elgondolkodtató kérdéseket.

Debrecen, 2025. február 18.

Dr. Bagoly Zsuzsa