

**MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**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

## Előszó

A biokémia szeretete orvostanhallgató koromból ered: számomra a biokémia az élet alapjainak rejtelseit mutatta meg, csodálatra méltó szabályozási folyamatokat tárt fel, melyek némán és pontosan teszik a dolgukat a szervezetünkben. A hemosztázis iránti rajongás egyenesen következett ebből- a rendszer komplexitása, erősen szabályozott egyensúlya, különleges biokémiája, farmakológiája végzett orvosként is mindig gondolkodásra, problémamegoldásra készítetett egy vérző- vagy éppen trombotikus eseményt szenvedett beteg laboratóriumi vizsgálata esetén. Mindig is foglalkoztatott az egyes, hemosztázisra ható terápiák sikertelenségének oka: az akut ischaemiás stroke kezelésére alkalmazott trombolízis, vagy az aterotrombotikus események szekunder prevenciójára alkalmazott egyes trombocita funkció gátló terápiák hatástalansága a betegek prognózisát nagyban befolyásolja. Mégis, míg az egyéb aterotrombózis rizikófaktorok pl. diabetes mellitus, hiperlipidémia vagy hipertónia esetén a terápia hatékonyságának ellenőrzése minden esetben megtörténik, a hemosztázisra ható készítmények hatását sok esetben nem vizsgáljuk, nem monitorozzuk. Ennek oka összetett: a háttérben állhat a hatástalansággal kapcsolatos ismereteink hiánya, a megfelelő laboratóriumi marker vagy teszt hiánya, vagy a laboratóriumi vizsgálatra vonatkozó megfelelő evidencia hiánya. Hálás vagyok, hogy munkám során az “elméleti oldalról” olyan iskolateremtő mesterek tanítványa lehettem, akik kiváló biokémiai és laboratóriumi diagnosztikai ismeretekkel gazdagítottak, a “klinikai oldalról” pedig olyan magas színvonalú szakmai kollaborációkra volt lehetőségem, ahol a klinikus mentorok valódi problémát jelentő, a betegellátást közvetlenül érintő kérdéseket tettek fel és tényleges segítséget kaptam a kérdések megválaszolásához. Az értekezésben összefoglalt eredmények alapját hemosztázis biokémiai és laboratóriumi ismeretek adják, de reményeink szerint kutatásaink hosszú távon közvetlenül is a betegek gyógyulását szolgálják majd.

## TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	6
2	BEVEZETÉS .....	9
2.1	A hemosztázis rendszer.....	9
2.1.1	A koaguláció iniciációs, amplifikációs és propagációs fázisa .....	9
2.1.2	A koaguláció regulációja .....	13
2.1.3	Az alvadék szerkezetét, stabilitását befolyásoló sejtes elemek. A neutrofil extracelluláris csapdák.....	14
2.1.4	A fibrinolízis összefoglalása .....	16
2.1.5	A fibrinolízis inhibitorai .....	18
2.1.6	A fibrinolízis laboratóriumi vizsgálata .....	26
2.2	A stroke.....	28
2.2.1	A stroke epidemiológiája, definíciója, típusai .....	28
2.2.2	Rizikótényezők .....	29
2.2.3	A stroke diagnosztikája.....	30
2.2.4	Az akut ischaemiás stroke kezelése .....	34
2.2.5	Az ischaemiás stroke prognózisa, rehabilitáció, másodlagos prevenció .....	36
2.2.6	Trombocitagátló terápia alkalmazása szekunder stroke prevencióként.....	37
2.3	A pitvarfibrilláció.....	43
2.3.1	A pitvarfibrilláció epidemiológiája, rizikófaktorai .....	43
2.3.2	A pitvarfibrilláció patofiziológiája, osztályozása .....	44
2.3.3	A hiperkoagulabilitás patofiziológiája pitvarfibrillációban .....	45
2.3.4	A pitvarfibrilláció diagnózisa és kezelése.....	47
3	CÉLKITŰZÉSEK.....	53
4	BETEGEK ÉS MÓDSZEREK .....	55
4.1	Hemosztázis vizsgálatok akut ischaemiás stroke betegekben az intravénás trombolízis kimenetelének vizsgálatára .....	55
4.1.1	Betegek bevonása.....	55
4.1.2	Mintagyűjtés és laboratóriumi vizsgálatok .....	56
4.1.3	VWF antigén és FVIII aktivitás meghatározása .....	57
4.1.4	FXIII aktivitás, FXIII-A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> antigénszintek és főbb FXIII polimorfizmusok meghatározása .....	57
4.1.5	$\alpha$ 2-PI aktivitás, $\alpha$ 2-PI antigénszintek és az $\alpha$ 2-PI Arg6Trp polimorfizmus vizsgálata .....	58
4.1.6	PAI-1 aktivitás, PAI-1 antigénszintek és a PAI-1 4G/5G polimorfizmus vizsgálata .....	58
4.1.7	Egyéb, speciális koagulációs és fibrinolízis markerek vizsgálata .....	59

4.1.8	Globális hemosztázis ill. fibrinolízis tesztek vizsgálata .....	59
4.1.9	Nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek vizsgálata globális hemosztázis ill. fibrinolízis tesztek révén .....	62
4.2	Experimentális vizsgálatok a fibrinolízis regulációjának jobb megértése érdekében . .....	63
4.2.1	A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus hatásának tanulmányozása a celluláris elemeket is tartalmazó vérrögök súlyára .....	63
4.2.2	A FVLeiden mutáció hatása a fibrinolízis regulációjára, az $\alpha$ 2-PI alvadékba való beépülésének mértékére.....	64
4.2.3	Új módszer kifejlesztése az alvadékba beépülő $\alpha$ 2-PI mennyiségének meghatározására .....	66
4.3	Hemosztázis vizsgálatok a vérlemezkegátló terápiák hatástalanságának felismerésére .....	68
4.3.1	Új, P2Y12 ADP receptor specifikus trombocita aggregációs módszer kidolgozása és a módszer összehasonlítása a clopidogrel terápia monitorozására alkalmas egyéb laboratóriumi módszerekkel .....	68
4.3.2	Aszpirin monoterápián és clopidogrel monoterápián lévő betegek vérmintáinak tesztelése a clopidogrel és aszpirin terápia monitorozására használt módszerekkel.....	70
4.4	Hemosztázis vizsgálatok pitvarfibrilláló betegekben a tromboembóliás szövődmények (stroke rizikó) jobb megértése érdekében .....	72
4.4.1	Betegek és kontrollok .....	72
4.4.2	Elektrofiziológiai beavatkozás és mintagyűjtés.....	73
4.5	Etikai engedélyek.....	75
4.6	Statisztikai analízis.....	75
5	EREDMÉNYEK.....	77
5.1	Hemosztázis vizsgálatok akut ischaemiás stroke betegekben az intravénás trombolízis kimenetelének vizsgálatára .....	77
5.1.1	Prospektív obszervációs tanulmányok: a betegek alapadatai és kimenetele ...	77
5.1.2	A trombolízis hatása a vizsgált hemosztázis ill. fibrinolitikus faktorok szintjére .....	80
5.1.3	A vizsgált hemosztázis tényezők összefüggése a stroke súlyosságával és etiológiájával .....	84
5.1.4	A vizsgált hemosztázis tényezők összefüggése a stroke kimenetelével .....	87
5.1.5	A vizsgált fibrinolízis inhibitorok gyakori polimorfizmusainak összefüggése a trombolízis kimenetelével .....	93
5.1.6	A trombus méretének (clot burden) szerepe a trombolízis sikerére nézve .....	94
5.1.7	Experimentális vizsgálatok a fibrinolízis regulációjának jobb megértése érdekében.....	100
5.1.8	Globális hemosztázis tesztek a hemorrhagiás transzformáció kialakulásának előrejelzésére .....	117



5.2	Hemosztázis vizsgálatok a vérlemezkegátló terápiák hatástalanságának felismerésére .....	129
5.2.1	Új, P2Y12 ADP receptor specifikus trombocita aggregációs módszer kidolgozása és a módszer összehasonlítása a clopidogrel terápia monitorozására alkalmas egyéb laboratóriumi módszerekkel .....	129
5.2.2	Aszpirin monoterápián és clopidogrel monoterápián lévő betegek vérmintáinak tesztelése a clopidogrel és aszpirin terápia monitorozására használt módszerekkel.....	134
5.3	Hemosztázis vizsgálatok pitvarfibrilláló betegekben a tromboembóliás szövődmények (stroke rizikó) jobb megértése érdekében .....	138
5.3.1	Lokális, intrakardiális hemosztázis és fibrinolízis eltérések azonosítása pitvarfibrilláló betegekben.....	138
5.3.2	A koaguláció aktivációját jelző paraméterek intrakardiális szintjei a vizsgált csoportokban .....	141
5.3.3	Hemosztázis aktiváció és fibrinolízis vizsgálata a cryoabláció során különböző preprocedurális antikoagulálási stratégiák mellett .....	143
6	MEGBESZÉLÉS .....	149
6.1	Hemosztázis vizsgálatok akut ischaemiás stroke betegekben az intravénás trombolízis kimenetelének vizsgálatára .....	149
6.2	Hemosztázis vizsgálatok a vérlemezkegátló terápiák hatástalanságának felismerésére .....	166
6.3	Intrakardiális hemosztázis és fibrinolízis markerek vizsgálata pitvarfibrilláló betegekben.....	170
7	ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	174
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	177
9	A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	178
10	EGYÉB KÖZLEMÉNYEK.....	180
11	IRODALOMJEGYZÉK .....	185

## 1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA	arachidonsav
AC	adenilát cikláz
ACA	arteria cerebri anterior
ACI	arteria carotis interna
ACM	arteria cerebri media
ADAMTS-13	a disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin type 1 motif, member 13
ADP	adenozin-5'-difoszfát
AIS	akut ischaemiás stroke
ANOVA	varianciaanalízis
ANCOVA	variancia-kovariancia-analízis
APC	aktivált protein C
APCE	antiplazmin hasító enzim
APTI	aktivált parciális tromboplasztin idő
ARU	Aspirin Reactivity Units
aSICH	aszimptomatikus intrakraniális vérzés
ASPECTS	Alberta Stroke Program Early CT Score
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
AUC	görbe alatti terület
$\alpha$ 2-PI	$\alpha$ 2-plazmin inhibitor
A3P5P	adenozin-3', 5'-difoszfát
BMI	testtömeg index
CHADS <sub>2</sub>	Congestive Heart failure, Hypertension, Age $\geq$ 75, Diabetes, Stroke
CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc	Congestive Heart failure, Hypertension, Age $\geq$ 75, Diabetes, Stroke, Vascular disease, Age 65-74, Sex Category
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CBS	clot burden score
cfDNA	szabad, sejten kívüli DNS
CI	konfidencia intervallum
CLA	alvadék lízis teszt
CLA AUC	alvadék lízis teszt görbe alatti területe
CLT	alvadék lízis idő
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institutes
COX-1	ciklo-oxigenáz 1
COVID-19	koronavírus-betegség-2019
CPI	karboxipeptidáz inhibitor
CT	komputertomográfia
CTA	komputertomográfia angiográfia
CTAD	nátrium-citrátot, teofillint, adenzint és dipyridamolt tartalmazó vérvételi cső
CYP	citokrómp
DE	diagnosztikai hatékonyság
DNS	deoxiribonukleinsav
DOAC	direkt orális antikoaguláns
DW-MRI	Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging
ECASS	European Cooperative Acute Stroke Study
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav

EKG	elektrokardiográfia
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens technika
EPCR	endothelsejt protein C receptor
ESO	European Stroke Organisation
ETP	endogén trombin potenciál
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FEU	fibrinogén ekvivalens unit
FRET	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
FV	V-ös véralvadási faktor
FV <sub>Leiden</sub>	V-ös véralvadási faktor Leiden mutációja
FVIII	VIII-as véralvadási faktor
FXIII	XIII-as véralvadási faktor
FXIIIa	XIII-as véralvadási faktor aktivált formája
F1+2	protrombin fragmens 1+2
GCS	Glasgow Kóma Skála
GP	glikoprotein
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
HDL	magas denzitású lipoprotein
HR	veszélyhányados
HRPO	tormaperoxidáz
hsCRP	nagy érzékenységű C-reaktív protein meghatározás
ICAM-1	intercelluláris adhézios molekula-1
ICE	intrakardiális ultrahang
ICH	intracerebrális vérzés
INR	nemzetközi normalizált ráta
IQR	interkvartilis tartomány
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
LVEF	bal kamrai ejectiós frakció
LVO	nagyérelzáródás
mCLA	módosított alvadék lízis teszt
MFI	átlagos fluoreszcencia intenzitás
MRI	mágnesesrezonancia-képalkotás
mRS	módosított Rankin Skála
NET	neutrofil extracelluláris csapda
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
NO	nitrogén-monoxid
NPV	negatív prediktív érték
OAC	orális antikoaguláns
OR	esélyhányados
PAD4	peptidilarginin-deimináz 4
PAI-1	plazminogén aktivátor inhibitor-1
PAP	plazmin- $\alpha$ 2-plazmin inhibitor
PBS	foszfáttal pufferolt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PDP	trombocita-depletált plazma
PF	pitvarfibrilláció
PGE1	prostaglandin E1
PGI2	prostaglandin-I2
PI	protrombin idő
POCT	point-of-care testing

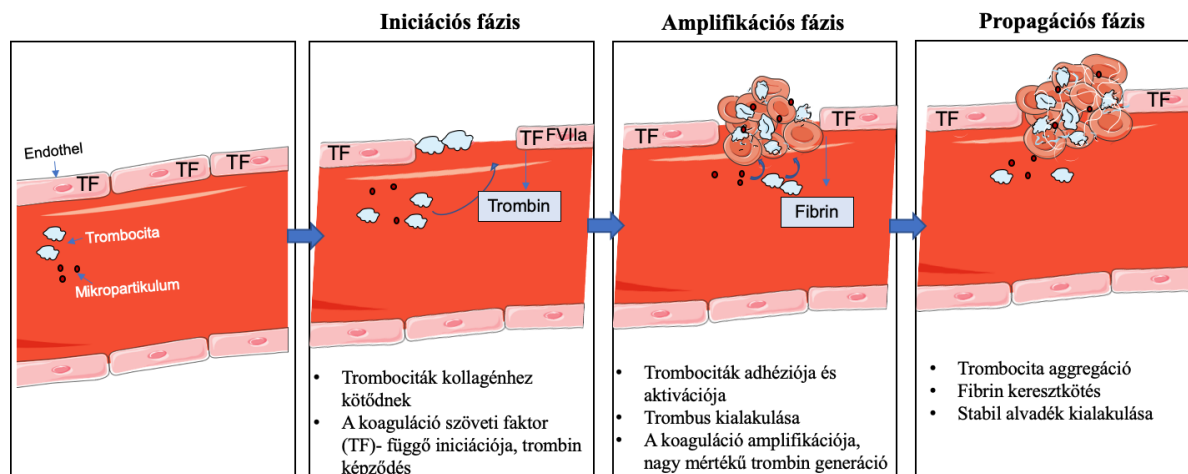
PPACK	D- fenilalanil-L-prolil-L-arginin chloromethyl keton
PPV	pozitív prediktív érték
PPP	trombocita szegény plazma
PRI	platelet reactivity index
PRP	trombocita dús plazma
PRU	P2Y12 reaction unit
ROC	receiver operating characteristics
ROTEM	rotációs tromboelasztometria
RR	relatív kockázat
rt-PA	rekombináns szöveti típusú plazminogén aktivátor
rhTM	rekombináns humán trombomodulin
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SCI	néma cerebrális ischaemia
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SICH	szimptomatikus intrakraniális vérzés
TAFI	trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor
TAT	trombin-antitrombin
TEG	tromboelasztográfia
TFPI	szöveti faktor útvonal inhibitor
TGFβ	transzformáló növekedési faktor β
TI	trombin idő
TIA	transziens ischaemiás attack
TM	trombomodulin
TNFα	tumor nekrosis faktor α
TOAST	Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment
t-PA	szöveti típusú plazminogén aktivátor
TXA2	tromboxán A2
TXB2	tromboxán B2
u-PA	urokináz típusú plazminogén aktivátor
VASP	vazodilátor stimulált foszfoprotein
VASP-P	vazodilátor stimulált foszfoprotein foszforilált formája
VCAM-1	vaszkuláris adhéziós molekula-1
VKA	K-vitamin antagonist
VTE	vénás tromboembólia
VWF	von Willebrand faktor

## 2 BEVEZETÉS

### 2.1 A hemosztázis rendszer

A hemosztázis az érrendszeri sérülésekre adott fiziológias védekező mechanizmus (1). 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 (1).

A koaguláció kaszkádra vagy vízesésre emlékeztető aktiválódási rendszerét 1964-ben MacFarlane és munkatársai, valamint Davie és Ratnoff írták le először (2, 3). Az általuk felvázolt kaszkádszerű aktiválódási folyamatot két szakaszra tagolták: az intrinsic és az extrinsic útra, mely a közös útvonalban folytatódott. A modell alapján a koagulációs folyamat egy proteolitikus reakciósorozat, mely során mindegyik résztvevő proteáz hasítja és aktiválja a soron következőt (2). Napjainkban a vízesésre emlékeztető kaszkádszerű elméletét felváltotta a hemosztázis sejt alapú modellje, melyet Hoffman és Monroe 2001-ben definiált (4). Az általuk leírt rendszer a hemosztázist három egymással átfedő részre bontja: az iniciációs, az amplifikációs és a propagációs fázisra (1. ábra) (4, 5).

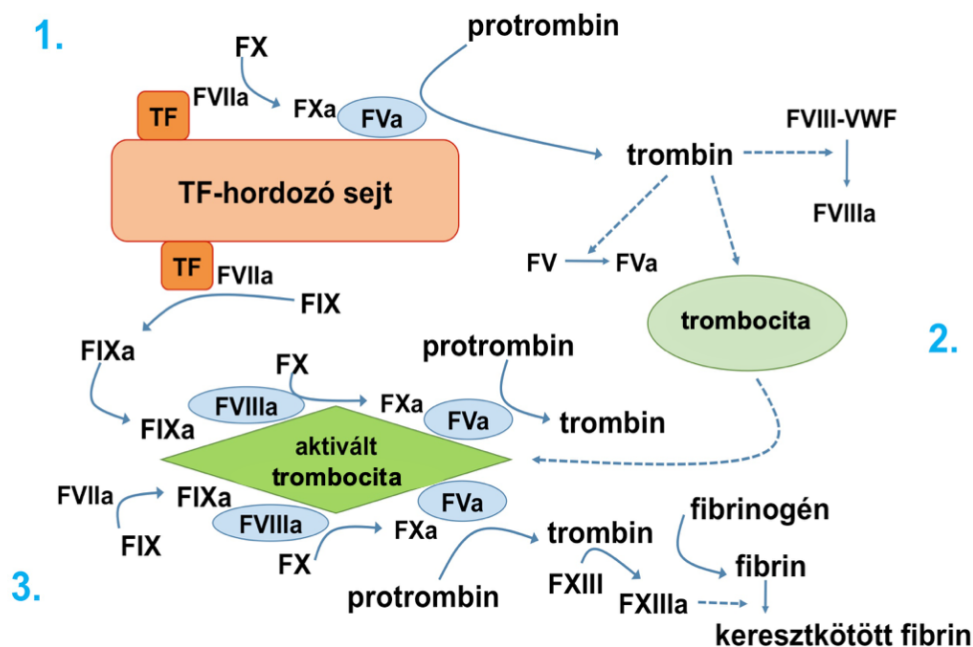


**1. ábra. A hemosztázis sejt alapú modellje.** FVIIa: aktivált VII-es faktor, TF: szöveti faktor. Forrás: Mackman N et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007 alapján (1)

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

A koaguláció sejt alapú modelljét sematikusán a 2. ábra mutatja be. Az iniciációs fázis a szöveti faktort expresszáló sejtekre (endothel, szubendotheliális struktúrák) lokalizálódik (6). 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, benne a koaguláció propagációját elősegítő faktorokkal, pl. FV. A folyamat által marad lokalizált, hogy a sejt felszínhez kötött FXa védett marad a plazma proteáz inhibitorokkal szemben. 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 aktív koagulációs fehérje képződik (2, 4).

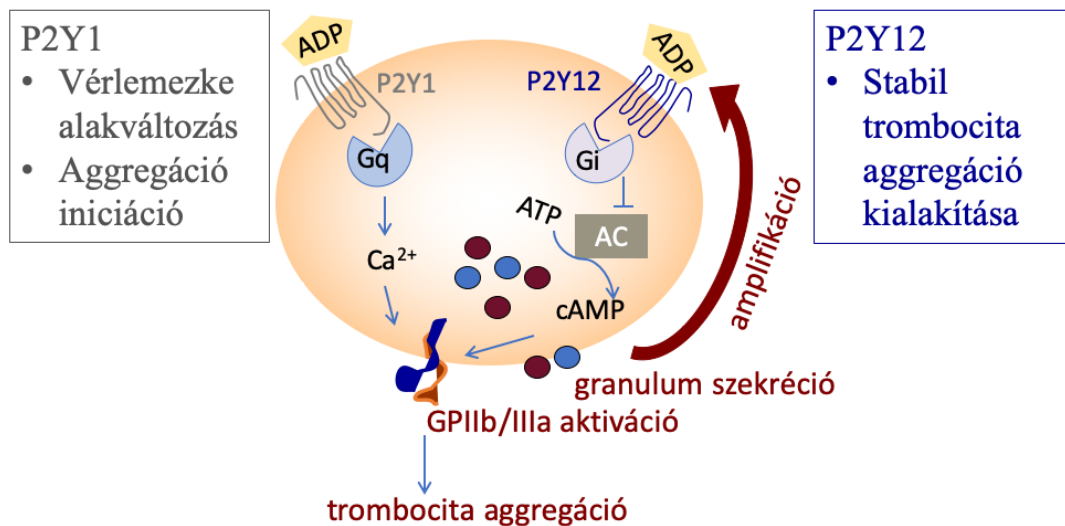


**2. ábra. A koaguláció sejt alapú modellje.** 1.: iniciációs fázis, 2.: amplifikációs fázis, 3.: propagációs fázis. a: aktivált forma, F: faktor, TF: szöveti faktor, VWF: von Willebrand faktor. Forrás: Versteeg HH et al, Physiol Rev, 2013 alapján (7)

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, például I-es, III-as és VI-os típusú kollagénekhez 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 (8). A koaguláció során keletkező trombin a trombociták GPIb/IX/V komplexe és proteáz aktivált receptorai (PAR) révén aktiválja a trombocitákat (9).

Az aktiváció hatására a trombociták alakváltozáson mennek keresztül, membránjuk külső és belső felszíne közötti aszimmetrikus foszfolipid-megoszlás megváltozik, megjelennek a külső felszínen a prokoaguláns, negatív töltésű foszfolipidek, úgymint a foszfatidil-szerin és foszfatidil-etanolamin. 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 (10). 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 (11, 12). A trombociták mindeközben szekretálják különböző granulumaik tartalmát, melyek a koaguláció folyamatát segítik, például az  $\alpha$ -granulumok fibrinogén, VWF, GPIb/IX/V komplex, FV és FIX tartalma, továbbá a denz granulumok  $\text{Ca}^{2+}$  és polifoszfát tartalma révén. Az aktivált trombociták a tromboxán A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) és az adozin-5'-difoszfát (ADP) szekréciója révén további trombociták aktivációját és aggregációját is előidézik. A trombocita aggregáció központi receptora a fibrinogén receptor, mely a GPIIb ( $\alpha_{\text{IIb}}$  integrin) és a GPIIIa ( $\beta_3$  integrin) által alkotott heterotetramer (GPIIb/IIIa) (13). Trombocita aktiváció során az  $\alpha$  granulumokból rövid idő alatt nagy mennyiségű fibrinogén receptor jut a trombociták felszínére. A receptor nyugvó trombocitákon inaktív állapotban van, valamilyen trombocita agonista (pl. TXA<sub>2</sub>, ADP, trombin, stb.) receptorához történő kötődése által elindított biokémiai folyamatok szükségesek ahhoz, hogy belülről kifelé történő (inside-out) szignalizáció következtében a receptor aktiválódjon és kialakuljon a ligandot kötni képes aktív formája (14). 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 (3. ábra) (15). Mindkét receptor által közvetített mechanizmus fontos szerepet játszik a trombocita aktiváció és aggregáció folyamatában. A P2Y<sub>1</sub> receptor Gq fehérjéhez kötött útvonalon keresztül intracelluláris kalcium mobilizációt hoz létre, amely a trombociták alakváltozását és az aggregáció iniciációját hozza létre. A P2Y<sub>12</sub> receptor hatása gátló Gi fehérjén keresztül érvényesül: csökkenti a ciklikus adozin-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 P2Y<sub>12</sub> receptor

felelős a tartós, irreverzibilis trombocita aggregáció kialakításáért (15). Mind a TXA2 képződését gátló aszpirin, mind az ADP hatását gátló specifikus P2Y<sub>12</sub> ADP receptor inhibitorok képesek gátolni a trombociták aggregációját, ezért ideális farmakológiai célpontnak bizonyultak az artériás trombusok elleni védelemben (lásd később). Az amplifikációs fázis végére már jelentős mértékű trombin generáció jön létre (4).



**3. ábra. A vérlemezkék legfontosabb ADP receptorai és az általuk közvetített intracelluláris útvonalak egyszerűsített folyamatábrája.** AC: adenilát cikláz, ADP: adenzin-5'-difoszfát, ATP: adenzin-5'-trifoszfát, cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát, GPIIb/IIIa: glikoprotein IIb/IIIa komplex. Forrás: Bagoly Z, American Association of Clinical Chemistry, Pearls of Laboratory Medicine, 2014 alapján (16)

A propagációs fázis az aktivált vérlemezkék felszínén történik, kialakulásában számos koagulációs fehérje játszik szerepet (5). Ebben a lépésben az iniciáció során aktivált FIX (FIXa) a trombocita felszínén kötődik az FVIIIa-hoz, pozitív feedback mechanizmussal létrehozva nagy mennyiségben a tenáz komplexet. A FXa egyesülve kofaktorával, a FVa-val ezt követően nagy mennyiségben kialakítja a protrombináz komplexet. Ebben a fázisban már nagy mennyiségű protrombin alakul át trombinná. A propagációs fázis során tehát a prokoaguláns komplexek aktivitása robbanásszerű trombinképződést eredményez, mely fibrinogénből fibrin hoz létre a fibrinopeptidek kiharítása 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 inhibitor (α2-PI, antiplazmin) a kialakult alvadékhoz köti, így stabilizálva az alvadékot (4).



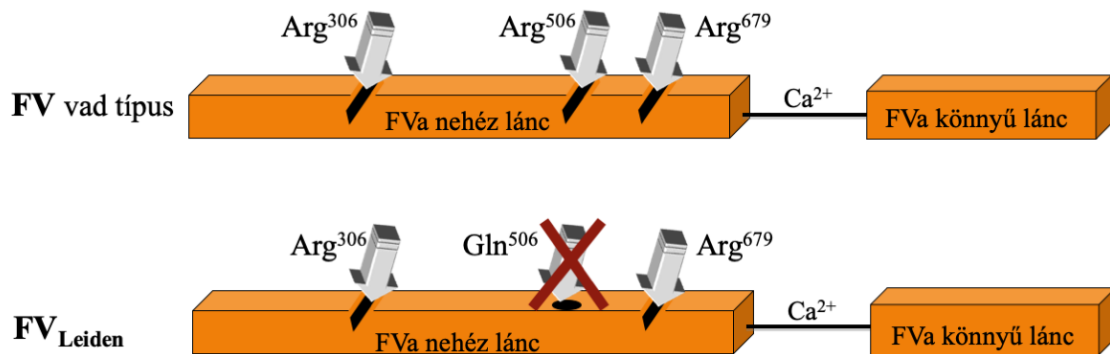
### 2.1.2 A koaguláció regulációja

A koaguláció regulációjáért több fehérje összetett hatása felelős, melyek gátló hatásukat a koaguláció különböző szakaszaiban fejtik ki (9). A koaguláció regulációjáért felelős az inaktívátor rendszerként ismert (aktivált) protein C, protein S, a trombocitákban, endothelsejteken és szolubilis formában előforduló TFPI, valamint az antitrombin, mely utóbbi a FXa és trombin gátlásával (kisebb mértékben a FIXa gátlása révén) a koaguláció egyik legfontosabb inhibitora (3, 9). A trombin-antitrombin 1:1 arányú komplexe (TAT-komplex) az *in vivo* trombin generáció érzékeny markere (7). 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 a fibrinszál megjelenése, vagyis az alvadék képződés kezdete, melyet kevesebb, mint a teljes képződő trombin mennyiség 5%-a befolyásol (17). Mivel a képződött trombin legnagyobb része (>95%) az alvadék létrejöttét követően generálódik, az alvadási időket mérő tesztek nem adnak pontos információt a képződött trombin mennyiségéről. A trombin generációs teszt egy globális hemosztázis teszt, mely egy adott idő intervallum alatt képződött teljes trombin mennyiségét és a képződés kinetikáját méri. 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. inaktívátorainak (protein C, ill. kofaktorként a protein S) hatásait is (18).

A koaguláció regulációjáért felel továbbá az endothelsejteken jelen lévő transzmembrán trombomodulin, ill. a transzmembrán glikoprotein EPCR (endothelsejt protein C receptor). Az inaktívátor 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 inaktívátor 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 (VTE) kialakulására nézve (19, 20). 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 (4. ábra) (21, 22).



**4. ábra.** Az aktivált protein C (APC) hasítási helyei (szürke nyilak) a FV nehézláncon fiziológias körülmények között (FV vad típus), ill. FV<sub>Leiden</sub> mutáció esetén. A piros X a FV<sub>Leiden</sub> mutáció következtében elveszített APC hasítási helyet jelöli. FV: V-ös véralvadási faktor, FVa: V-ös véralvadási faktor aktivált formája. Forrás: Bertina RM et al, Nature, 1994 alapján (22)

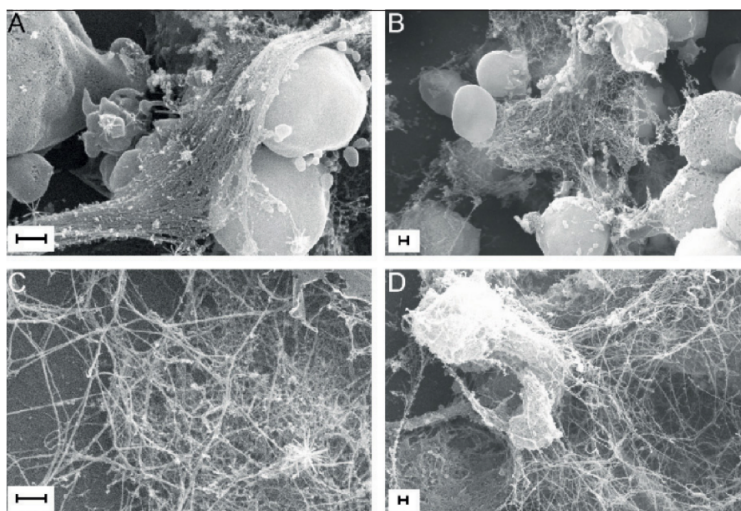
FV<sub>Leiden</sub> mutáció esetén a FVa prokoaguláns aktivitásának down-regulációja csökkent, így a trombin generáció APC okozta csökkenése elmarad (22). A FV<sub>Leiden</sub> trombin generáción túlmutató közvetett hatásai kevésbé ismertek, így pl. munkacsoportunk vizsgálta elsőként a mutációnak a FXIII aktivációra, az alvadék kereszt kötéseinek kialakulására és a fibrinolízisre gyakorolt hatását (lásd Eredmények).

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

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a véralvadás során kialakult alvadék minőségét nagymértékben befolyásolják a sérülés helyén lévő vörösvérsejtek, celluláris elemek és sejtöböl származó komponensek. A legújabb tanulmányok a trombociták és vörösvértestek szerepén túl a neutrofil extracelluláris csapdák (NET) korábban nem ismert hatásait tárták fel a fibrin képződésére, szerkezetére és stabilitására vonatkozóan (23). A NET fogalmát 2004-ben Brinkmann és kutatócsoportja írta le először, mint gyulladáshoz vezető stimulus hatására az aktivált neutrofilekből felszabaduló, főként DNS-ből, hisztonból és granulás fehérjékből álló extracelluláris hálózatot (5. ábra) (24). A NET-ek legfontosabb strukturális összetevője maga a DNS: számos DNS-interkaláló festék erőteljesen festi a NET-ek hálózatát, a dezoxiribonukleázzal (DNÁzzal) történő kezelés a NET-ek szétesését eredményezi. A NET-ek további fontos alkotóelemei a hisztonok: a NET-ek H1, H2A, H2B, H3 és H4 hiszton

antitestekkel és a H2A-H2B-DNS komplex ellenes antitestekkel is jelölhetők (24, 25). Brinkmann és munkacsoportja írta le, hogy 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, például 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 (24).

Steinberg és Grinstein 2007-ben megjelent tanulmányukban megalkották a NET-ek kialakulásához vezető NETózis fogalmát (26). A NETózis során az aktivált neutrofilek drámai morfológiai változásokon mennek keresztül. Az aktiválás után percekkel ellapulnak, majd a kromatin dekonzenzáció, a belső és a külső maghártya fokozatosan leválik egymásról. Ezzel egyidejűleg a granulomok dezintegrálódnak, és a peptidilarginin-deimináz 4 (PAD4) enzim hatására a hiszton H3 citrullinálódik. Később a sejtburrok vezikulákká bomlik szét, a nukleoplazma és a citoplazma homogén masszát képez. Végül a sejtek összehúzódnak mindaddig, míg a sejtmembrán fel nem szakad, és a sejt belseje kilökődik az extracelluláris térbe, NET-et képezve (27).

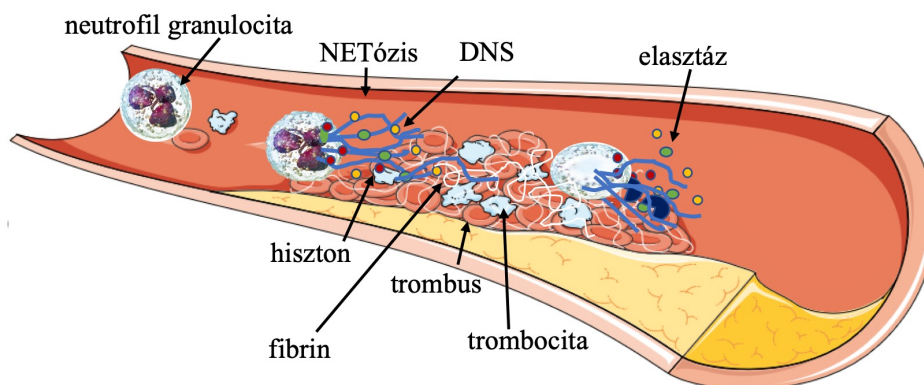


**5. ábra. Pásztázó elektron-mikroszkóppal készített képek a neutrofil extracelluláris csapdákról.** A hálószerű struktúrák körülveszik és vázként alátámasztják a sejteket és a sejtől származó törmelékeket (A, B). Neutrofil extracelluláris csapdák fibrin gazdag környezetben (C, D). Méretarány=1 $\mu$ m. Forrás: Varjú I et al, Thromb Haemost, 2015 (28)

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 (29). 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 (például a VWF, fibrinogén, FXII, szöveti faktor) kötődésének, továbbá gátolják a TFPI-t. Legújabb adatok szerint a NET-ek DNS-hisztin komplexből álló gerince stabilizálja a fibrint, és az így kialakult alvadék vékonyabb fibrinrostokból álló, sűrűbb hálózat lesz, mely fokozottan ellenáll a fibrinolízisnek (6. ábra) (30, 31).

A NET-ek jelenlétét mind artériás (myocardialis infarctus, stroke), mind vénás (mélyvénás trombózis, tüdőembólia) trombusokban kimutatták (32, 33). Legújabb irodalmi adatok szerint a NET-ek fokozott jelenléte jelentősen hozzájárul a COVID-19 megbetegedést okozó új típusú koronavírus (SARS-CoV-2) fertőzés során megfigyelt fokozott trombózis rizikó patomechanizmusához (34). 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 (35-37). Újabb vizsgálatok kimutatták a keringő NET-ek mennyiségének összefüggését az AIS súlyosságával, a betegek kedvezőtlen rekanalizációs válaszával ill. kimenetelével (33). 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 (37).



**6. ábra. NETózis szerepe a trombus képződésben (sematikus ábra).** A neutrofil granulociták gyulladáshoz vezető stimulus hatására főként DNS-ből, hisztinből és granuláris fehérjékből álló neutrofil extracelluláris csapdát (NET-et) hoznak létre, ami fibrinnel interkalálódva sűrű hálózatot hoz létre, mely ellenáll a fibrinolízisnek. Forrás: a szerző ábrája

#### 2.1.4 A fibrinolízis összefoglalása

A koagulációs enzimrendszer összjátékának eredményeként képződő véralvadék a szöveti gyógyulást követően gátolná a helyi véráramlást, ezért lebontása szükségessé válik. A fibrin

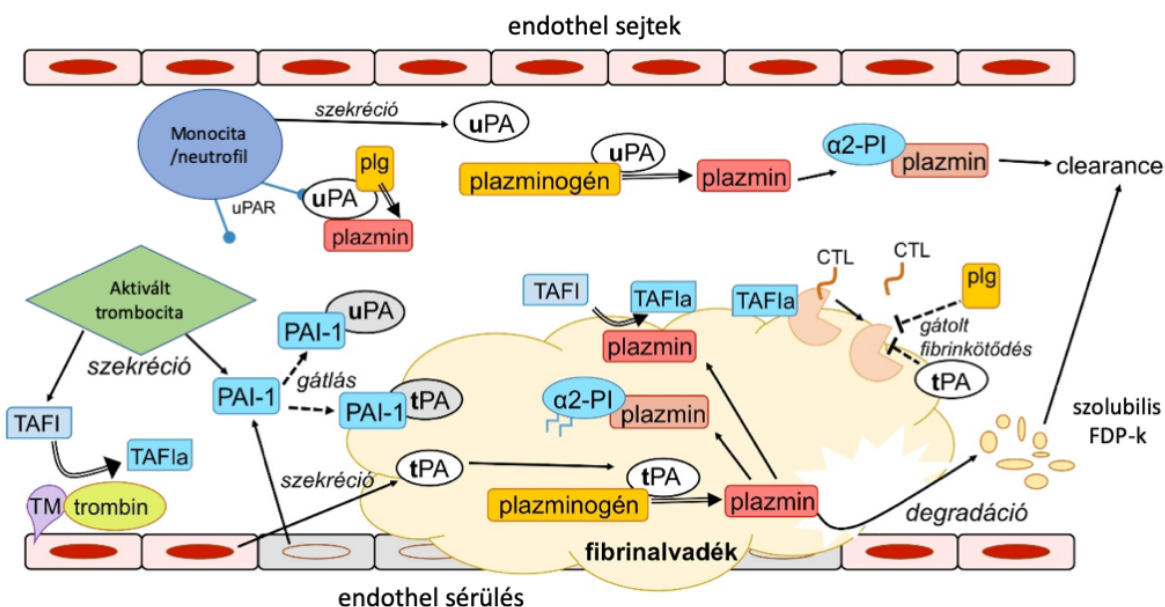
alvadék lokalizált, megfelelő időben történő lebontásáért a fibrinolitikus rendszer felelős, melynek központi proteáza a plazmin (7. ábra) (38). A plazmin plazminogén aktivátorok hatására keletkezik plazminogénból, mely egyláncú glikoprotein, szintézisének legfőbb helye a máj, de a legtöbb szövet extravaszkuláris terében, valamint a trombociták  $\alpha$  granulumaiban is megtalálható (38). A fibrinolízis első lépéseként a plazminogén a fibrin felszínén található lizincsoportokhoz kötődik és aktiválódik. A keletkező szerin proteáz plazmin a fibrin alvadékot 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, mely nem kovalensen komplexet képezhet az E-fragmentummal is (23). A részlegesen degradált fibrin C-terminális lizin reziduumokat tartalmaz, melyek fokozzák a plazminogén affinitását a részben degradálódott fibrinhez, ezáltal további plazmin generálódik (38).

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 (39). A plazmin, pozitív feedback mechanizmus útján mind a t-PA-t, mind az u-PA-t hasítja, ezáltal egy láncú polipeptidből aktívabb két láncú polipeptiddé alakítja őket (38).

A t-PA egy szerin proteáz típusú glikoprotein, kisebb erek endothelsejtjei szintetizálják és expresszálják aktivációs ingerek hatására (pl. trombin, hisztamin, adrenalin, nyíróerő) (40). 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 (lásd később) (41). 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 (42). Magas trombinkoncentráció esetén figyelték meg sűrűbb, vékonyabb fibrinrostokból álló fibrin alvadék képződését, mely fokozott trombólízis rizikóval társul, alacsony trombinkoncentrációnál pedig lazább szerkezetű,

vastagabb fibrinszálakból álló alvadék keletkezik, mely fokozottabb vérzési kockázattal jár együtt (23, 42).



**7. ábra. A fibrinolízis egyensúlya.**  $\alpha$ 2-PI:  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor, CTL: C-terminális lizin reziduum, FDP: fibrin degradációs termék, PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor-1, plg: plazminogén, TAFI: trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor, TAFIa: aktivált TAFI, TM: trombomodulin, t-PA: szöveti típusú plazminogén aktivátor, u-PA: urokináz típusú plazminogén aktivátor, uPAR: u-PA receptor. Forrás: Cesarman-Maus G et al, Br J Haematol, 2005 alapján (38)

A szerin proteáz glikoprotein u-PA ugyanazon hasítási helyen aktiválja a plazminogént, azonban működéséhez nem igényli a fibrin kofaktor funkcióját, ezért farmakológiai szempontból nem optimális jelölt a trombusok oldására, rekanalizáció elősegítésére. Számos sejtípus szintetizálja (fibroblaszt-szerű sejtek, epitheliális sejtek, endothelsejtek, monociták és makrofágok), és sokféle sejt felszínén megtalálható az u-PA receptora, melynek az a szerepe, hogy lokalizálja az u-PA-t és a plazminogént a sejt felszínén (38). A sejt felszínén aktivált plazmin fontos szerepet játszik az extracelluláris mátrix lebontásában és egyes növekedési faktorok aktiválásában, de az u-PA fiziológiás körülmények között az intravaszkuláris fibrin lebontásában nem vesz részt (38, 43, 44).

### 2.1.5 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 (45). A

plazminogén aktivátorok legfőbb fiziológias inhibitora a t-PA-t és u-PA-t egyaránt hatékonyan gátló plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) (46). Az elsőként placentából kinyert PAI-2 gyengébb inhibitor tulajdonságokkal rendelkezik, elsősorban az u-PA gátlásában vesz részt hatékonyan. A PAI-2 egészséges egyénekben lényegében nem mutatható ki, de a terhesség alatt plazmakoncentrációja drasztikusan megemelkedik (47).

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 (48).

A fibrinolízis nem szerpin-függő szabályozása többek között a trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor (TAFI) révén valósul meg. A TAFI-t a máj és a megakariociták inaktív zimogénként szintetizálják. 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 alvadéket (49, 50).

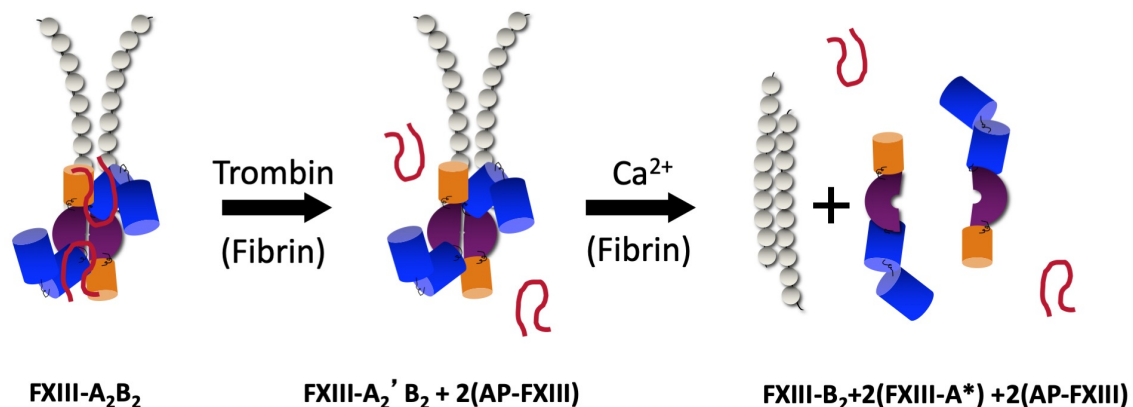
Az értekezésben később tárgyalt fibrinolízis inhibitorok legfontosabb biokémiai tulajdonságait és gyakori polimorfizmusait a következő alfejezetek részletezik.

#### *2.1.5.1 A XIII-as faktor és főbb polimorfizmusai*

A FXIII a koagulációs kaszkád utolsó alvadási faktora, egyben a fibrinolízis egyik legfőbb inhibitora. Fiziológias funkciója a fibrin keresztkötésekkel történő stabilizálása és ellenállóvá tétele a fibrinolízis gyors hatásával szemben. A plazmában található FXIII heterotetramer szerkezetű (FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>), 325 kDa molekula tömegű fehérje. A tetramert két potenciálisan katalitikus A alegység (FXIII-A) és két hordozó/gátló B alegység (FXIII-B) alkotja. Fiziológias körülmények között a plazmában mért koncentrációja 14-28 mg/L, ahol az inaktív fehérje fibrinogénhez kötött formában kering (51, 52). A FXIII-A csontvelői eredetű sejtekben, míg a FXIII-B hepatocitákban termelődik, az alegységekből a plazmában alakul ki a tetramer szerkezet. A feleslegben rendelkezésre álló B alegység körülbelül 50%-a szabad, nem komplex formában fordul elő a plazmában. A FXIII celluláris formája csupán a két potenciálisan katalitikus alegységből (FXIII-A<sub>2</sub>) áll, mely számos sejttípus citoplazmájában megtalálható (pl. monocitákban/makrofágokban, vérlemezkékben, oszteoblasztokban). A vérlemezkékben a FXIII-A<sub>2</sub> mennyisége 46-82 fg/trombocita, ami az összes vérlemezke-fehérje 3%-ának felel



meg (53, 54). A FXIII a transzglutaminázok családjába tartozó zimogén (protranszglutamináz). A katalitikus A alegységet 5 domén építi fel: a 37 aminosav hosszúságú N-terminális aktivációs peptid domén, egy  $\beta$ -szendvics, egy katalitikus központi domén, és két  $\beta$ -hordó domén. A katalitikus domén hordozza az enzim reakcióért felelős katalitikus triádot, ami az inaktív enzimben a szubsztrát számára hozzáférhetetlen. A B alegység egy kb. 8,5% szénhidrátot tartalmazó glikoprotein, mely összesen tíz, egyenként két diszulfid-híddal stabilizált, ún. sushi doménből áll. A B alegység protektív szerepet tölt be, gátolja a katalitikus alegység degradációját, ezáltal annak féléletidejét 3 nappól átlagosan 11 napra növeli. Korábbi kutatási eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a fibrinogén és a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> zimogén közötti kölcsönhatást a FXIII-B alegységek közvetítik (55, 56). A plazmában található FXIII protranszglutamináz aktivációja a véralvadási kaszkád utolsó lépésében történik, a trombin és a Ca<sup>2+</sup> összehangolt hatása révén alakul át a fehérje aktív transzglutaminázzá (8. ábra).



**8. ábra. A XIII-as faktor (FXIII) proteolitikus aktivációjának sematikus ábrázolása.** Az ábrán a FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> tetrameren belül a két FXIII-A alegység egyes doménjeit különböző színek mutatják: N-terminális aktivációs peptid (piros vonal),  $\beta$ -szendvics domén (narancssárga henger), katalitikus központi domén (sötétlila félkör),  $\beta$ -hordó domének (sötétkék hengerek). A FXIII-B alegységeket 10 tagból álló szürke gyöngysorok reprezentálják. FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>: tetramer pro-transzglutamináz, FXIII-A<sub>2</sub>'B<sub>2</sub>: trombin által hasított tetramer, FXIII-A\*: aktív transzglutamináz (nyitott konformációjú aktív centrum: lyukas sötétlila félkör), AP-FXIII: aktivációs peptid. Forrás: Bagoly Z et al, J Thromb Haemost, 2019 alapján (57)

A FXIII aktivációja során első lépésként a FXIII-A alegységek N-terminálisáról a trombin lehasítja az aktivációs peptidet (58). Ezt követően Ca<sup>2+</sup> hatására a B alegységek disszociálnak, majd a hasított katalitikus alegység konformáció változáson megy keresztül. Ennek hatására az aktív hely hozzáférhetővé válik, kialakul az aktív forma (59). A fibrin jelenléte 80-100-szorosra gyorsítja az aktivációs folyamatot, a plazmában pedig az újonnan képződött fibrin felületén aktiválódik a FXIII (60). FXIII-B hiányában a FXIII celluláris formája nem igényel proteolitikus hasítást, az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció emelkedése elegendő az aktív konfiguráció létrejöttéhez (61). Az FXIIIa egy acil-transzfer reakciót katalizál, amelyben az



acil donor egy peptidláncban található glutamin  $\gamma$ -karboxamid-csoportja, az acil akceptor egy primer amin. A folyamatban a primer amin izopeptid kötéssel kovalensen kapcsolódik a  $\gamma$ -glutamil oldallánchoz. Ha a primer amin egy peptidben/fehérjében lévő lizin  $\epsilon$ -amino csoportja, az FXIIIa intermolekuláris  $\epsilon$ -N-( $\gamma$ -glutamil)-lizil keresztkötés révén kovalensen keresztköti a két polipeptid láncot (62).

Az FXIIIa meghatározó szerepet tölt be fibrinolízis szabályozásában. 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, ezáltal hatékony védelmet nyújt az idő előtti plazmin közvetített proteolitikus fibrinbontással szemben (63). A második mechanizmus a fibrin  $\alpha$ - és  $\gamma$ -láncainak keresztkötése, mely mechanikusan stabilizálja a fibrin alvadékot a véráramlás okozta nyírófeszültséggel szemben és közvetlenül befolyásolja a fibrin alvadék fibrinolízissel szembeni érzékenységét. Harmadrészt, a fibrin  $\alpha$ -láncok C-terminális lizinjeinek keresztkötése következtében csökken a plazminogén és t-PA számára elérhető kötőhelyek száma a fibrinen, tehát csökken a plazminogén aktiváció mértéke. A FXIII hiány következtében vérékenység alakul ki, mely a deficiencia mértékétől függően súlyos, akár életveszélyes is lehet. Veleszületett forma esetén jellegzetes a köldökcsomk elhúzódó vérzése, lassú sebgyógyulás, de jellemző a bőr-, izom-bevérzések, nyálkahártyavérzések kialakulása, továbbá rettegett következményként igen súlyos, akár végzetes intrakraniális vérzés is kialakulhat (62-64).

A humán FXIII-A-t kódoló gén (F13A1) több mint 160 kb méretű, és a 6p24-25 kromoszómán lokalizálódik. A FXIII-B-t (F13B) kódoló gén 28 kb hosszú; az 1q31-32.1 kromoszómán található, és 12 exonból és 11 intronból áll (65, 66). 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) (53, 62).

A FXIII leginkább tanulmányozott polimorfizmusa a FXIII-A p.Val34Leu. Ez az egy pontos nukleotid polimorfizmus az A alegységet kódoló gén 103-as kodonját érintő G>T csere, melynek következménye a 34-es pozícióban található valin leucinra történő cseréje (67). A p.Val34Leu polimorfizmus az aktivációs doménen belül található trombin hasítási hely közelében helyezkedik el, ezáltal befolyásolja FXIII aktiváció sebességét. A Leu34 variáns esetében a trombin hasítás 2,5-szer gyorsabban megy végbe, így a Leu34 allél jelenléte fokozott FXIII aktivációval jár együtt. Ennek megfelelően a növekvő alvadékban gyorsabban megy végbe a fibrin keresztkötése (68, 69). A polimorfizmus hatással van a keresztkötött fibrinháló

szerkezetére is, melyet a fibrinogén koncentrációja is befolyásol. Magas fibrinogén koncentráció mellett a Leu34 allélre homozigóta egyénekben vastagabb fibrinrostokkal, lazább szerkezettel és fokozott permeabilitással jellemezhető alvadék alakul ki, mely a fibrinolízissel szemben kevésbé ellenálló (69). 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 VTE kialakulásával szemben, ugyanakkor védőhatását ischaemiás stroke kialakulására nézve még egyértelműen nem igazolták (70-72).

A FXIII-A alegység további gyakori polimorfizmusainak patofiziológiás szerepével kapcsolatban lényegesen kevesebb irodalmi adat áll rendelkezésre (73, 74). Pruissen és munkatársai szoros összefüggést találtak a p.Tyr204Phe variáns és a fiatal nők ischaemiás stroke kockázata között. Az általuk vizsgált kohorszban a Phe204 allél hordozása által jelentett kockázatot tovább növelte az orális fogamzásgátlók használata. Adataik alapján a FXIII-A p.Pro564Leu polimorfizmus viszont nem befolyásolta az ischaemiás stroke kialakulásának kockázatát az általuk vizsgált populációban (75). Ugyanakkor Reiner és munkatársai azt találták, hogy a 45 év alatti nők esetében a FXIII Phe204 és Leu564 variánsai a hemorrhagiás stroke-ra való genetikai hajlam markereiként szolgálhatnak (74).

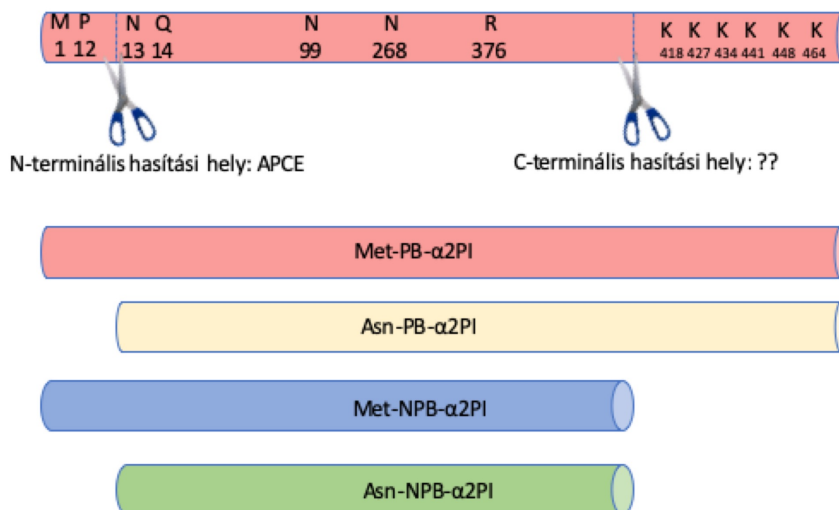
Molekuláris genetikai és biokémiai technikák két fő polimorfizmust tártak fel az F13B génben. A 3. exonon belüli A>G csere His-Arg aminosavcseréhez vezet az érett fehérje 95. pozíciójában. Az Arg95 viszonylag ritka (7,5%) a kaukázusi populációban. A p.His95Arg polimorfizmust a VTE kockázati tényezőjeként azonosították, továbbá kimutatták, hogy 1,7-szeresére növelte az ischaemiás stroke kockázatát a fiatal nőknél (75, 76).

A FXIII-B génben leírt másik polimorfizmus az intron K 29756. nukleotid pozíciójában található C>G csere, ami egy új splice akceptor helyhez vezet. A polimorfizmus egy allélspecifikus splicing terméket eredményez, amelyben az utolsó 10 aminosav egy 25 aminosavból álló alternatív szekvenciával cserélődik ki. A variáns szekvencia két további lizint és egy glutaminsavat tartalmaz, melyek megváltoztatják a fehérje izoelektromos pontját. A polimorfizmus jellemzően ázsiaiakban fordul elő, a kaukázusi populációban az allélgyakoriság 14,2% (77).

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

Az  $\alpha 2$ -PI-t először 1976-ban írta le három különböző kutatócsoport (Mullertz, Moroi és Collen és munkatársai) a plazmin gyorsan ható inhibitoraként (78-80). Az emberben az  $\alpha 2$ -PI szintézisének elsődleges helye a máj. Az  $\alpha 2$ -PI körülbelül 70 kDa méretű, 464 aminosavból álló egyláncú polipeptidként szekretálódik a plazmába. Az  $\alpha 2$ -PI egyedi szerkezeti elemeket mutató szerpin, mely egy 12 aminosavból álló N-terminálissal, központi szerpin doménnel és egy ~55 aminosav hosszúságú C-terminális farokkal rendelkezik (81, 82).

A keringésbe kerülve mind az amino-terminális, mind pedig a karboxi-terminális rész proteolitikus módosításokon esik át (9. ábra). Ennek következtében négy heterogén, eltérő aktivitású  $\alpha 2$ -PI izoforma jön létre (83). A szekretálódó fehérje N-terminálisán metionint hordoz (Met- $\alpha 2$ -PI). A keringésbe kerülve azonban az  $\alpha 2$ -PI körülbelül 70%-a egy olyan proteolitikus hasításon megy keresztül, amely során az antiplazmin hasító enzim (APCE) az amino-terminális vég felől eltávolít egy 12 aminosavból álló oligopeptidet (81, 84). Lee és munkatársai kimutatták, hogy a hasított (Asn- $\alpha 2$ -PI) izoforma 13-szor gyorsabban inkorporálódik a fibrinszálak közé, mint a teljes hosszúságú Met- $\alpha 2$ -PI fehérje (84). Az  $\alpha 2$ -PI fibrinhez történő keresztkötését az FXIIIa katalizálja, a keresztkötött inhibitor ellenállóbbá teszi a fibrint 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 (84).



**9. ábra. Az  $\alpha 2$ -plazmin inhibitor ( $\alpha 2$ -PI) természetes heterogenitása.** A keringésben az  $\alpha 2$ -PI N-terminális és C-terminális hasításon megy keresztül, melynek következtében 4 különböző izoformában fordul elő (Met-PB- $\alpha 2$ -PI, Asn-PB- $\alpha 2$ -PI, Met-NPB- $\alpha 2$ -PI, Asn-NPB- $\alpha 2$ -PI). APCE: antiplazmin hasító enzim, NPB: plazminogén kötésre nem képes forma, PB: plazminogén kötésre képes forma. Forrás: Abdul S et al, Blood, 2016 alapján (83)

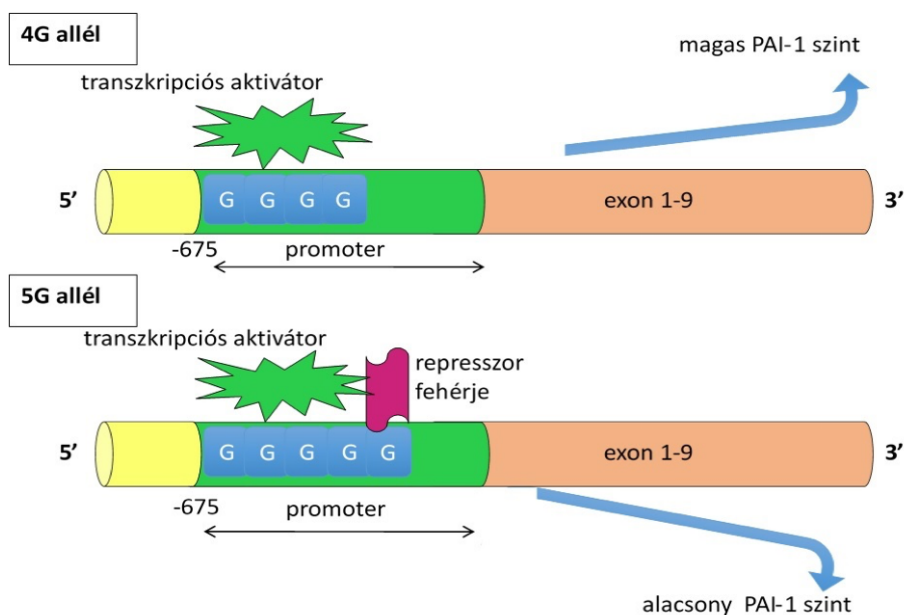
Az  $\alpha$ 2-PI C-terminális része is átesik poszttranszlációs módosításokon, de a hasításért felelős enzimét még nem azonosították. Az itt található lizin oldalláncok kulcsfontosságú szerepet töltenek be a plazminogén lizin-kötő helyeivel való kölcsönhatásban (85). E kölcsönhatás alapján két izoformát különböztetünk meg. A nem hasított, hosszabb, plazminogén kötésre képes forma (PB- $\alpha$ 2-PI) a keringésben lévő  $\alpha$ 2-PI hozzávetőleg 65%-át teszi ki és PAP-komplexek kialakulása révén hatékonyan gátolja a szabad plazmint. Ezzel szemben a rövidebb, hasított izoforma nem képes kötődni a plazminogénhez (NPB- $\alpha$ 2-PI) (86). Az  $\alpha$ 2-PI C-terminális hasítása jelentős klinikai következményekkel járhat, mivel az FXIIIa által mediált  $\alpha$ 2-PI-fibrin keresztkötés létrejöttéhez elsősorban a PB- $\alpha$ 2-PI formára van szükség. Ebből következik, hogy a C-terminális hasítás szabályozza az  $\alpha$ 2-PI aktivitását is (83, 87).

Az  $\alpha$ 2-PI heterogenitását a felsorolt módosításokon kívül az azt kódoló SERPINF2 gén genetikai variációi is befolyásolják. Egy vérzésre hajlamos család vizsgálata során Lind és munkatársai az  $\alpha$ 2-PI gén 3 polimorfizmusát azonosították (88). Ezek egyike a Met- $\alpha$ 2-PI gén 6. aminosavát kódoló nukleotidokat érintő C/T egyponthoz nukleotid polimorfizmus volt, ami arginint vagy triptofánt eredményezhet a hatos pozícióban. A tanulmány továbbá igazolta, hogy mindkét forma előfordul egészséges humán plazmában (88). Christiansen és munkatársai bizonyították, hogy 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 (89). Az  $\alpha$ 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus patofiziológiai ill. klinikai jelentősége jelenleg még kutatások tárgyát képezi. Intézetünk egyik munkacsoportja korábban úgy találta, hogy a Trp allél jelenléte magas APCE szintek mellett védő hatásúnak bizonyult a vénás trombózisok kialakulására nézve (90). Bridge és munkatársai a p.Arg6Trp polimorfizmus és a hasi aorta aneurysma kialakulása közötti összefüggéseket vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a Trp allél hordozása esetén megfigyelhető egy trend, mely szerint csökkentheti az aneurysma kialakulásának kockázatát. Eredményeik azt mutatták, hogy az  $\alpha$ 2-PI egy másik polimorfizmusa (p.Arg407Lys) azonban szignifikánsan összefügg az hasi aorta aneurysma kialakulásával, a Lys407 allélt hordozókban 23%-kal csökkentve annak kockázatát (91).

### 2.1.5.3 A plazminogén aktivátor inhibitor-1 és főbb polimorfizmusai

A PAI-1 egy egyláncú glikoprotein, mely a szerin proteáz inhibitorok családjába tartozik és kiemelkedően fontos szerepet játszik a fibrinolízis szabályozásában (92). A PAI-1 endothel sejtekben, simaizom sejtekben, adipocitákban, a májban, ill. a lépben képződik. A PAI-1 gén expresszióját indukálják egyes citokinek, a  $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta$ , az inzulin és egyéb hormonok, proteázok és a hipoxia (93). 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 (92). A PAI-1 keringésben detektálható szintjét számos tényező szabályozza, például gyulladásozó folyamatok, elhízás, cirkadián ritmus és genetikai tényezők (94-96). Az emelkedett PAI-1 szintet több tanulmányban a kardio- és cerebrovaszkuláris kórképek rizikótényezőjeként azonosították (94, 97, 98).

A PAI-1 fehérjét a SERPINE1 gén kódolja, mely emberben a 7. kromoszómára lokalizálódik. A SERPINE1 több polimorfizmusát írták le a gén promóter régiójában ill. introni szakaszokban, melyek a PAI-1 szinteket befolyásolhatják (99). A gén inzerció/deléción eltérései közül leginkább a 4G/5G polimorfizmus tanulmányozott, mely a promóter régió -675. helyén található (10. ábra). Ez a régió 4 vagy 5 guanin bázist tartalmazhat (4G ill. 5G allél). A polimorfizmus mindkét allélja képes megkötni transzkripciós faktorokat, azonban az 5G alléllal rendelkező promóter már egy represszor fehérje megkötésére is alkalmassá válik (100, 101). Ennek köszönhetően az 5G allél alacsonyabb PAI-1 transzkripciós aktivitást mutat a 4G allélhoz képest. A 4G allélt hordozó egyének esetén a PAI-1 plazma szintje emiatt magasabb, míg az 5G allélt hordozók esetén a PAI-1 szint alacsonyabb lesz (102), azonban több tanulmány eredménye arra utal, hogy a keringő PAI-1 szinteket a PAI-1 ismert polimorfizmusai mellett jóval nagyobb mértékben befolyásolják szerzett tényezők, pl. a BMI, lipid anyagcsere, inzulin rezisztencia (99). Korábbi tanulmányok összefüggésbe hozták a 4G allél hatását fokozott trombózishajlammal, emelkedett szívinfarktust követő halálozással, ill. szepszist követő halálozással is (103-105), de az irodalomban fellelhető eredmények sokszor ellentmondásosak (105, 106).



**10. ábra. A plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1) 4G/5G polimorfizmus sematikus ábrázolása.** A promóter régió -675. helyének megfelelő régió 4 vagy 5 guanin bázist tartalmazhat. Felső panel: a 4G allélel rendelkező promóter szakasz transzkripció aktivátort köt. Alsó panel: az 5G allélel rendelkező promóter szakasz a transzkripció aktivátor mellett represszor fehérjét is meg tud kötni. Forrás: a szerző ábrája

### 2.1.6 A fibrinolízis laboratóriumi vizsgálata

A fibrinolízis szerepét a hemosztázis egyensúlyi állapotának fenntartásában már viszonylag korán felismerték, azonban a fibrinolízist vizsgáló tesztek fejlődése, mind az individuális, mind a globális tesztek szintjén jelentősen elmaradt a koagulációs tesztek fejlődéséhez, standardizációjához képest. Mind a rutin laboratóriumi diagnosztikában, mind a kutató laboratóriumi gyakorlatban kevés módszer áll rendelkezésünkre a fibrinolízis folyamatának komplex vizsgálatára a koaguláció vizsgálatához képest. Ennek háttérében részben az áll, hogy a koagulációval ellentétben a fibrinolízis egy igen lassú folyamat, fiziológias körülmények között a lízis vizsgálatához órák, akár napok szükségesek, ezért az alkalmazott tesztekben módosítani kell a reakciók sebességét (107). A fibrinolízist vizsgáló módszerek alkalmazása során vagy inhibitorokat veszünk el, vagy aktivátorokat adunk a rendszerhez, ezáltal viszont a teszt eredményei nem teljesen tükrözik a valóságot. A legtöbb fibrinolízist vizsgáló módszert technikailag körülményes kivitelezni, ezáltal a tesztek többsége nem alkalmas az automatizációra. Nehézséget jelent az is, hogy a fibrinolízis veleszületett deficienciái ritkák, a fibrinolízis mérsékelt túlsúlya, vagy alulműködése által képviselt rizikók ismerete véralvadási rendellenességek ill. egyéb kórképek esetén is (pl. habituális vetélés, sebgyógyulási zavarok) még gyerekcipőben jár (107).

A fibrinolízis vizsgálata azonban több okból kifolyólag is fontos lehet. A fibrinolízis egyensúlyának felborulása vérzékenységgel vagy túlzott mértékű fibrin lerakódással járhat, és ezen állapotokra hatékony gyógyszeres kezelések állnak rendelkezésünkre. A fokozott fibrinolízis (hiperfibrinolízis) vérzékenységgel, akár életveszélyes mértékű vérvesztéssel társulhat. A veleszületett hiperfibrinolízis a fibrinolízis inhibitorok (pl. PAI-1,  $\alpha$ 2-PI) deficienciája miatt ritka, de ezen kórképekben akár súlyos vérzékenység is előfordulhat, és a PAI-1 deficiencia nőkben habituális vetélést is okoz (107). A szerzett hiperfibrinolízis számos kórképben előfordulhat; például sokk, trauma, műtétek, májcirrózis, veseelégtelenség, szülési komplikációk esetén. Ezen kórképek esetén a fibrinolízis vizsgálata mellett szól, hogy az időben diagnosztizált hiperfibrinolízis jól kezelhető fibrinolízis gátlószerekkel ( $\epsilon$ -aminokapronsavval, tranexámsavval, vagy aprotininnel) (108). A fibrinolízis alulműködése hipofibrinolízishez vezet. Az egyik legsúlyosabb kórkép, amelyben a hipofibrinolízis következményei megnyilvánulnak, a plazminogén deficiencia, melynek során a lerakódott fibrin számos szerv esetén okoz funkcionális károsodást, például lignosus conjunctivitist, elzáródásos hydrocephalust, nőgyógyászati, gasztrointesztinális tüneteket és sebgyógyulási zavart. A hipofibrinolízist néhány közleményben összefüggésbe hozták trombotikus események kialakulásával is, különösen a VTE rizikójának emelkedésével (109).

A fibrinolízis vizsgálatára alkalmazhatunk egyedi vagy individuális teszteket (pl. a plazminogén, plazminogén aktivátorok, plazminogén aktivátor inhibitorok, és plazmin inhibitorok szintjének meghatározása, ill. a fibrinolízis aktivációját jelző egyes markerek szintjének meghatározása), valamint globális teszteket (107). A fibrinolízis globális tesztjeinek vizsgálata történhet teljes vérből, például viszkoelasztikus módszerek révén, mint a tromboelasztográfia (TEG) és rotációs tromboelasztometria (ROTEM) (110, 111). 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 ma már inkább történelmi jelentőségű euglobulin lízis idő meghatározása során a plazmából képzett euglobulin frakciót használjuk a fibrinolízis globális vizsgálatára. 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 (28, 107, 111).

## 2.2 A stroke

### 2.2.1 A stroke epidemiológiája, definíciója, típusai

Világszerte a stroke a halálozás második leggyakoribb és a rokkantság leggyakoribb oka (112). 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, melynek a teljes népességre vonatkozó előfordulási gyakorisága Magyarországon 40/10000 fő (113). A stroke esetek fennmaradó 20%-a vérzéses stroke: a vérzéses csoporton belül további két alcsoportot különítünk el: nem traumás állományvérzések (15%) ill. subarachnoidealis vérzések (5%) (az értekezésben a subarachnoidealis vérzések nem szerepelnek, így ezt az altípust a továbbiakban részleteiben nem tárgyaljuk) (114). Bár a vérzéses stroke-ok az összes stroke esetek kis hányadát teszik ki, halálozási arányuk jóval magasabb (115).

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 (116).

#### 1. *Nagyér ateroszklerózis*

Ezen betegeknél képalkotó vizsgálati eredmények alapján az agyat ellátó fő artériák területén 50%-nál nagyobb szűkület vagy elzáródás található, melyet feltehetően ateroszklerózis okoz. Az agykérgi, cerebellaris ischaemiás léziók, ill. 1,5 cm-nél nagyobb agytörzsi vagy szubkortikális léziók valószínűleg nagyér eredetűek. Klinikailag kérgi, agytörzsi vagy cerebellaris tünetek jellemzőek.

#### 2. *Kisérbetegség (lacunaris stroke)*

Ezen betegeknél érdemi nagyérszűkület nincs. Képalkotó vizsgálattal akut infarktus nem mutatható ki, vagy a releváns lézió 1,5 cm-nél kisebb. Klinikai szempontból ide tartoznak a lacunaris szindrómák (tisztán motoros vagy tisztán szenzoros tünetek). Egyidejű hipertónia és/vagy diabetes mellitus támogatja a klinikai diagnózist.

#### 3. *Kardiogén stroke*

Ebben a kategóriában olyan betegek találhatóak, akiknél az érelzáródás háttérében egy szívből származó embólus áll. Az előzményben ismert valamilyen trombus képződésére hajlamosító kardiológiai betegség, pl. pitvarfibrilláció, dilatatív cardiomyopathia. Klinikai és képalkotó vizsgálati szempontból hasonló jellegzetességei vannak, mint a nagyér



ateroszklerózis csoportnak. Előző stroke vagy keringészavar, mely több vaszkuláris régiót is érint, támogatja a klinikai diagnózist. A napi tevékenység során kialakuló stroke, a kérgi tünetek szintén a kardiogén eredet mellett szólnak.

#### 4. *Egyéb eredetű stroke*

Különbféle ritka kórállapotok tartoznak ebbe a csoportba: trombofiliák, vasculitisek, hematólógiai betegségek kapcsán kialakult stroke, stb. Képzalkotó és laboratóriumi vizsgálattal igazolható az akut infarktus, tekintet nélkül annak méretére.

#### 5. *Ismeretlen eredetű stroke (kriptogén stroke)*

Amennyiben alapos átvizsgálás ellenére sem található az agyi infarktus háttérében etiológiai tényező, ismeretlen eredetű, másnéven kriptogén stroke-ról beszélünk. Ide sorolhatók azok a betegek is, akiknél a stroke háttérében két vagy több lehetséges ok is állhat, így nem lehet definitív diagnózist felállítani.

Az ischaemiás agyi működészavarok további típusa a tranziens ischaemiás attack (TIA). Egy régebbi definíció szerint ez olyan átmeneti neurológiai tünetegyüttes, melyet fokális agyi, gerincvelői vagy retina ischaemia okoz, és 24 óránál kevesebb ideig tart. A jelenlegi definíció szerint abban az esetben beszélünk TIA-ról, ha a tünetek átmenetiek, és kialakulásuk nem jár akut infarktus kialakulásával (117). A TIA-k kb. egyharmadát egy hónapon belül stroke követi. Az ABCD2 skála alkalmazásával megbecsülhető az esetleges stroke veszélye (118).

Az állományvérzéseket a vérzés anatómiai helye vagy a feltételezett etiológiája szerint osztályozzák. Az állományvérzések leggyakoribb lokalizációja supratentoriális (85-95%), ezen belül elkülöníthetünk kiterjedt féltekei (roncsoló), mediális ill. laterális törzsdúci, thalamus-, valamint lebenyvérzéseket. Az infratentoriális vérzésekhez az agytörzsi vérzés és a cerebellaris vérzés tartozik.

### **2.2.2 Rizikótényezők**

A stroke alapvetően időskori betegség, az előfordulási gyakorisága az életkor előrehaladtával folyamatosan nő, megduplázódik minden évtized után 55 éves életkor felett (119). A stroke rizikó nemi különbségeket is mutat. Idősebb korban a relatív kockázat valamivel magasabb a férfiak körében (120). Ennek ellenére a betegség gyakoribb nőknél, mivel hosszabb a várható élettartamuk, így a prevalencia 80-85 év felett a nők felé tolódik el (119).

Az ischaemiás stroke-nak számos befolyásolható és nem befolyásolható rizikófaktora van. A befolyásolható rizikófaktorok közül a leggyakoribb a hipertónia, mely egyenes összefüggést mutat a betegség kialakulásával (121). A cukorbetegség a stroke független kockázati tényezője, a cukorbetegéknél kétszer nagyobb a stroke kockázata. A cukorbetegek mortalitásának körülbelül 20%-áért stroke felelős (122). A dyslipidemia szintén befolyásolja az ischaemiás stroke kialakulásának kockázatát: az emelkedett össz-koleszterinszint növeli, a magasabb HDL szint csökkenti a rizikót (123, 124). A pitvarfibrilláció, billentyűhibák az ischaemiás stroke jelentős rizikófaktorai (125). Az életmód is hozzájárul az ischaemiás stroke kialakulásához: a fizikai inaktivitás, elhízás és a következményes metabolikus szindróma fontos kockázati tényezők (126-128). A dohányzás a stroke kialakulásának egyik jelentős rizikófaktora, a kockázat arányos az elszívott cigaretta mennyiségével (129).

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 malformáció (3-8%), az esetek mintegy 5-20%-ában pedig a kiváltó ok meghatározhatatlan (130). Kockázati tényezőként tartjuk számon továbbá a diabetes mellitust, dohányzást, az előrehaladott életkort (>50 év), alkoholfogyasztást ill. egyes drogok használatát is (131). Agyvérzés kialakulhat meglévő cerebrális lézió talaján is, pl. központi idegrendszeri tumor, granuloma, encephalitis, abscessus esetén is. Noha a magasvérnyomás eredetű ICH továbbra is a leggyakoribb forma, a visszatérő vérzés magas kockázata és a rendelkezésre álló kezelési lehetőségek miatt fontos minden esetben mérlegelni a mögöttes érrendellenességek lehetőségét is (130, 131).

### **2.2.3 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 (130). A diagnosztikus eljárások célja, hogy azonosítsa a stroke altípusát, megállapítsa lokalizációját, kizárja az egyéb stroke-ot utánzó betegségeket (132). A stroke diagnózisa anamnesztikus adatok, klinikai és agyi képalkotó vizsgálati eredményeken alapul, a laboratóriumi diagnosztika jelentősége az akut stroke diagnosztikájában csekély.

---

**1. táblázat. A National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) pontrendszer**

---

1A. Éberségi állapot	0: Éber 1: Aluszékony 2: Nehezen ébreszthető 3: Comatosus / nem ébreszthető
1B. Tájékozottság (2 kérdés)	0: Mindkét kérdésre helyesen válaszol 1: Egy kérdésre válaszol helyesen 2: Egyik kérdésre sem ad helyes választ
1C. Utasítások végrehajtása (2 utasítás)	0: Mindkét feladatot elvégzi 1: Egy feladatot végez csak el 2: Egyik feladatot sem végzi el
2. Horizontális tekintés	0: Normális horizontális tekintés 1: Részleges tekintésbénulás 2: Teljes tekintésbénulás, konjugált deviáció
3. Látótér	0: Nincs látótérzavar 1: Részleges hemianopia 2: Teljes hemianopia 3: Kétoldali vakság
4. Facialis paresis	0: Nincs, szimmetrikus arcmozgás 1: Enyhe fokú arcmozgás-gyengeség 2: Részleges facialis paresis 3: Komplet egy- vagy kétoldali facialis paresis
5. Motoros funkció (kar) a. bal kar b. jobb kar (mindkét oldal pontozandó)	0: Nem süllyed 1: 10 mp-en belül süllyed 2: 10 mp-en belül leesik 3: Mozgás van, de emelni gravitációval szemben nem tudja 4: Nincs mozgás a felső végtagban
6. Motoros funkció (alsó végtag) a. bal alsó végtag b. jobb alsó végtag (mindkét oldal pontozandó)	0: Nem süllyed 1: 5 mp-en belül süllyed 2: 5 mp-en belül leesik 3: Mozgás van, de emelni gravitációval szemben nem tudja 4: Nincs mozgás az alsó végtagban
7. Végtagataxia	0: Nincs ataxia 1: Ataxia egy végtagon 2: Ataxia két végtagon
8. Érzészavar	0: Nincs érzészavar 1: Enyhe-közepes fokú érzéscsökkenés 2: Súlyos fokú érzéscsökkenés/érzékiesés
9. Beszéd	0: Rendben van 1: Enyhe-mérsékelt aphasia 2: Súlyos aphasia 3: Beszédképtelenség vagy globális aphasia
10. Artikuláció	0: Rendben van 1: Enyhe-közepes fokú dysarthria 2: Súlyos fokú dysarthria/anarthria
11. Extinctio/neglect	0: Nincs 1: Enyhe fokú (egy szenzoros modalitást érint) 2: Súlyos fokú (egynél több szenzoros modalitást érint)
Összpontszám: 0-42	

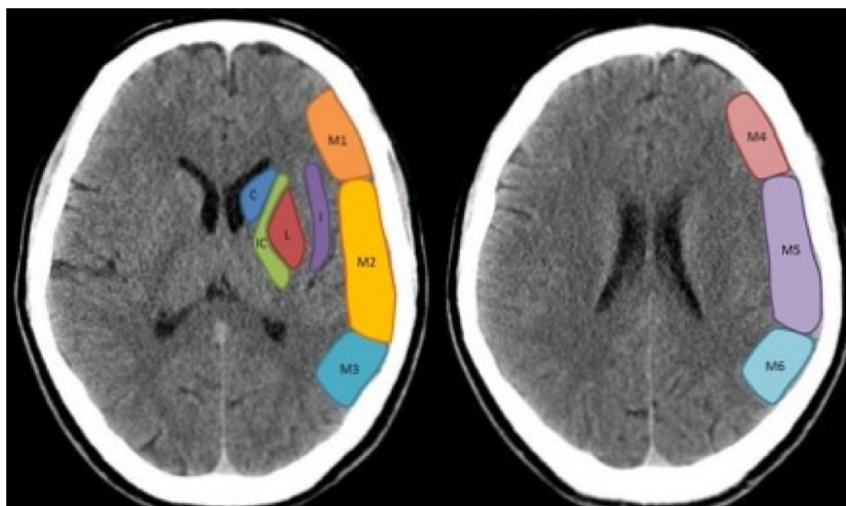
---

A részletes neurológiai vizsgálat során a stroke súlyosságának megállapítására az NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) rendszer használatos, melynek 11 eleme van, a különféle elemek pontozása 0 és 4 pont közötti (1. táblázat). A pontozórendszer maximális pontszáma 42 (133). Más pontozóskálákhoz hasonlóan az NIHSS pontozás is korlátozott értékű, ha a betegnek már a stroke előtt is voltak neurológiai tünetei (pl. hemi- vagy tetraparesis, súlyos látáscsökkenés vagy nyelvi akadály, demencia korlátozza az NIHSS értékét).

A fizikális vizsgálat és pontos anamnézis felvételének fontos célja a differenciáldiagnosztika egyéb, stroke-ot utánzó betegségektől ill. állapotoktól (pl. hipoglikémia, encephalitis, migrén, epilepsziás rohamot követő átmeneti bénulás, központi idegrendszeri tumor, stb.) és annak felmérése, hogy ischaemiás stroke esetén alkalmas-e a beteg valamilyen dezobliterációs kezelésre (134).

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. ICH esetén fontos tisztázni, hogy emelkedett-e a beteg szisztolés vérnyomása, szed-e antikoagulánst, van-e intraventriculáris kiterjedés, hydrocephalus, van-e bizonyíték makrovaszkuláris vérzési forma jelenlétére (fistula, aneurysma, agyi vénás sinus trombózis), valamint, hogy van-e kockázata a hematoma expansiójának. Mindezek az adatok kritikusak lehetnek az ICH gyors diagnózisának és kezelési protokolljának felállítása szempontjából (mivel az értekezés témaköréhez szorosan nem tartozik hozzá, az ICH kezelési stratégiáit a továbbiakban nem részletezzük) (135).

Az arteria cerebri media (ACM) területi ischaemiás stroke kiterjedésének meghatározására rutinszerűen az Alberta Stroke Program Early CT Score (ASPECTS) használatos, mely egy 10 pontos kvantitatív rendszer (11. ábra) (136). A rendszer az ACM ellátási területét 10 szegmentumra osztja fel: 1 pont kerül levonásra, ha egy adott szegmentumban megfigyelhető ischaemiás lézió. A felvételi CT vizsgálat során a  $\leq 7$  pont a kedvezőtlen funkcionális kimenetel prediktora intravénás trombolízis esetén (136).

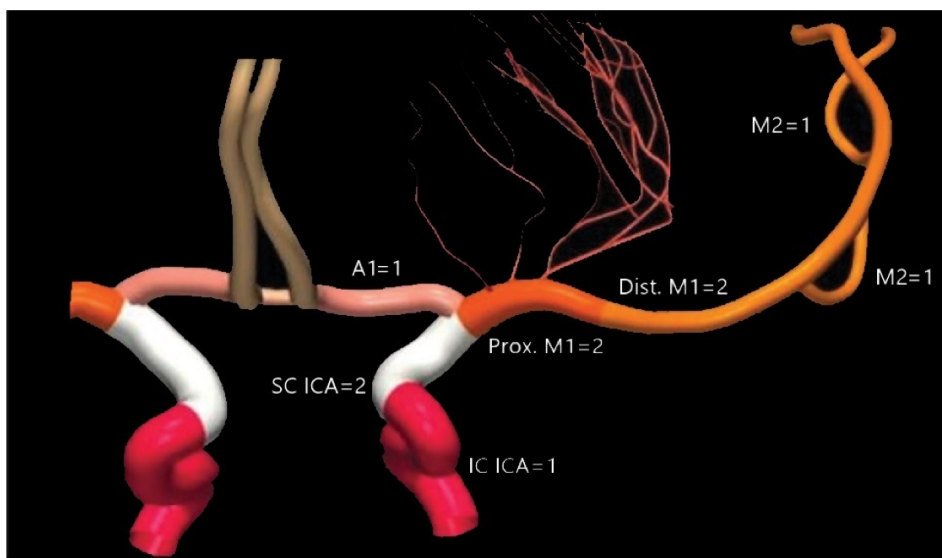


**11. ábra. ASPECTS pontrendszer.** A különféle színekkel jelölt területek jelzik az arteria cerebri media által ellátott agyállomány 10 szegmentumát. C: nucleus caudatus, IC: capsula interna, L: nucleus lentiformis, M1-6: arteria cerebri media által ellátott régiók. Forrás: Alwalid et al, Radiopaedia.org, rID: 72706 (137)

A diagnosztika fontos része az angiográfiás 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. Ez egy 10 pontos rendszer, mely segítségével az anterior keringés vizsgálható CTA felvételeken a kontrasztanyag telődés megléte alapján, különféle érszakaszokon: supraclinoidalis arteria carotis interna (ACI), proximalis ACM M1, distalis ACM M1 (2 pontos érszakaszok), ACM M2 ágak, arteria cerebri anterior (ACA) A1 ág, ill. infraclinoidalis ACI (1 pontos érszakaszok). Az ACM M1 és az ACA az ACI két végága. Az ACM M1 oszlása változó, leggyakrabban kettő, egy felső és alsó törzsre oszlik (M2 ágak). Általánosan elfogadott, hogy minél distalisabb a szívhez viszonyítva egy érszakasz, annál kisebb a lehetősége a jó kollaterálisnak. 10 pontot kap a beteg abban az esetben, ha minden érszakaszon van telődés (12. ábra) (138).

Az akut dezobliterációs kezelés megkezdése előtt további vizsgálatokra van szükség: vérnyomásmérés, vércukorszint, vérkép, különös tekintettel a trombocitaszámmra, 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 trombocitaszámmra, ill. véralvadási zavarra pl. gyógyszeresedés kapcsán) (139).

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.

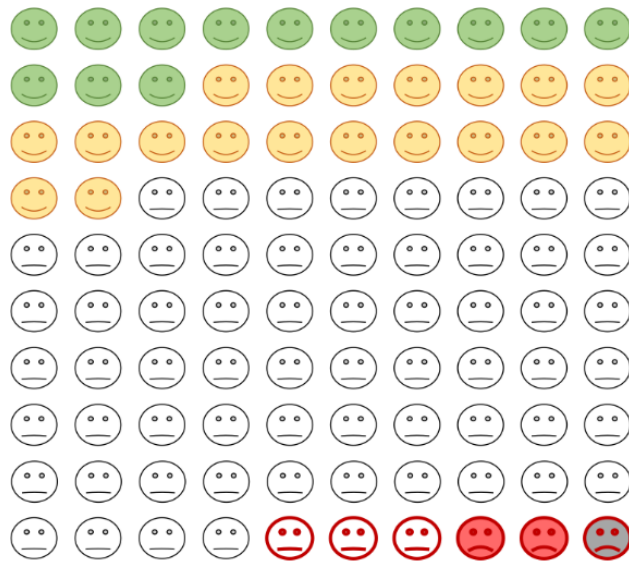


**12. ábra. Clot burden score.** A különféle színekkel jelölt, 1 vagy 2 pontot érő érszakaszok jelzik az anterior keringés különböző szegmenseit. A1: arteria cerebri anterior, Dist. M1: arteria cerebri media M1 distalis szakasza, IC ICA: infraclinoid arteria carotis interna, M2: arteria cerebri media, Prox. M1: arteria cerebri media M1 proximalis szakasza; SC ICA: supraclinoid arteria carotis interna. Forrás: Menon BK et al, JAMA, 2018 alapján (140)

#### 2.2.4 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 (141). Jelenleg az AIS intravénás trombolízisére hazánkban az egyetlen törzskönyvezett szer az alteplase (rt-PA; rekombináns szöveti plazminogén aktivátor). A dózisa 0,9 mg/kg, a maximális adag 90 mg. Ennek a 10%-át bólusban, 90%-át pedig perfúzorban kapja a beteg 60 perc alatt (139). 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 (13. ábra). Az rt-PA alkalmazásával a korai rekanalizáció aránya kb. 25% azoknál a betegeknél, akiknél proximális ACM elzáródás van, és csak 10% azoknál a betegeknél, akiknél ACI elzáródás áll fenn (142). Ezen kívül az ismételt elzáródás esélye elérheti a 30%-ot (143). A rekanalizációs sikertelenség mellett intrakraniális vérzés is kialakulhat mellékhatásként, a

vérzési kockázat minimalizálása mellett is (144). Számos kiindulási klinikai faktor befolyásolhatja az rt-PA terápia kimenetelét, ideértve a férfi nemet, a stroke súlyosságát felvételtkor, az infarktus nagyságát, az előrehaladott életkort, a hiperglikémiát, stb. Tekintettel azonban az alacsony prediktív értékükre egyéni kezelési döntésekhez ezek nem használhatóak (145). Jelenleg nem ismert olyan specifikus laboratóriumi marker, amely segítséget nyújthatna a betegek szelektálásában azáltal, hogy előrejelezhetővé a rossz kimenetelt vagy a vérzéses szövődményeket.



**13. ábra. Az ischaemiás stroke rekombináns szöveti plazminogén aktivátorral (rt-PA) végzett intravénás trombolízis terápiajának kimenetele (sematikus összefoglaló).** Zöld fej (13%): tökéletes vagy közel tökéletes hosszú távú kimenetel; sárga fej (19%): javulás; üres fej (65%): nincs számottevő változás a terápia hatására; üres fej bordó körvonallal (3%): korai rosszabbodás és intrakranialis hemorrhagia jelentkezett, de hosszú távon nincs számottevő változás; piros fej bordó körvonallal (2%): korai rosszabbodás és intrakranialis hemorrhagia, a felvételhez képest rosszabb hosszú távú kimenetel; szürke fej bordó körvonallal (1%): korai rosszabbodás és intrakranialis hemorrhagia, hosszú távon súlyosan rokkant állapot vagy halál. Forrás: Gadhia J et al, Stroke, 2010 alapján (146)

Az AIS vérzéses transzformációja spontán, vérrögoldó kezelés nélkül is előfordul, főleg embóliás infarktusban és emelkedett vércukor mellett. A csak CT-n detektált gyakoriság 13-43%, a tüneteket is okozó gyakoriság 0,6-20% között ingadozik az irodalom szerint (147, 148). Munkatársaink agyoncolás során tett megfigyelései szerint a különböző méretű vérzéses transzformáció gyakorisága 38% (148).

A trombolitikus terápia alternatív formája az intraarteriális lízis, melyre nagyérelzáródás esetén van lehetőség a tünetek kialakulásától számított 6 órán belül. Az eljárás invazív, intervenciós szakembert és komoly műszeres háttérrel igényel, így hétköznapi ritkábban használt kezelésként van szó. Egységesen elfogadott intraarteriális dózis nincs (~10-80 mg rt-PA), és a vérzéses szövődmények aránya is meghaladja az intravénás terápia szövődményeit (139).

Az AIS másik fontos kezelési stratégiája a mechanikus trombektómia, melyre kizárólag nagyérelzáródás esetén van lehetőség. Az eljárást a tünetek kialakulásától számított 6 órán belül lehet elvégezni olyan betegeknél, akiknél az ACI és/vagy ACM (ill. ACA, arteria vertebralis, arteria basilaris, vagy arteria cerebri posterior) záródott el, nincsenek kiterjedt korai ischaemiás jelek (ASPECT  $\geq 6$ ), szignifikáns neurológiai deficit van jelen (NIHSS  $\geq 6$  vagy alacsonyabb pontérték korlátozó tünettől társulva), nincsenek súlyos társbetegségek, valamint megfelelő a stroke előtti funkcionális állapot (149). Válogatott betegcsoportnál kiterjesztett, 24 órás időablakon belüli kezelésre is sor kerülhet, ez azonban speciális képalkotó vizsgálatot igényel (perfúziós CT vagy MR) (150). A mechanikus trombektómia esetén a kedvező hosszú távú kimenetel aránya az intravénás trombolízishez hasonló, a különböző tanulmányokban kb. 30-40% közöttinek adódott (151). 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 (152).

### **2.2.5 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 (153). A tartósan fennálló tünetek általában rokkantságot okoznak, a betegek nagy része tartós ápolásra, gondozásra szorul, kb. negyedük intézeti elhelyezést igényel (153). A hosszú távú funkcionális kimenetel vizsgálatára a módosított Rankin Skálát (mRS) használjuk (2. táblázat) (154).

A stroke ismétlődésének kockázata igen magas, altípustól függően mintegy 7-20% egy éven belül és 16-35% öt éven belül (155, 156). 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 rizikótényezőktől függően a 0-14. napon megkezdett antikoaguláns terápia szintén csökkenti az ismétlődő stroke kockázatát (130). A személyre szabott rehabilitáció fontos eleme a stroke utáni gondozásnak, funkcionális javulásnak (130, 157).

---

## 2. táblázat. A módosított Rankin Skála (mRS)

---

0	Egyáltalán nincs tünete/tünetmentes.
1	Tünetei ellenére nincs érdemi rokkantság, minden szokásos feladatot és cselekvést képes kivitelezni.
2	Enyhe rokkantság, nem képes korábbi mindennapos feladatai mindegyikét elvégezni, de saját maga ellátására segítség nélkül képes.
3	Mérsékelt rokkantság, tevékenységeiben némi segítséget igényel, járni azonban segítség nélkül tud.
4	Mérsékeltlen súlyos rokkantság, segítség nélkül nem tud járni, és testi szükségleteit sem tudja segítség nélkül elvégezni.
5	Súlyos rokkantság, ágyhoz kötött, inkontinens, állandó ellátást és felügyeletet igényel.
6	Elhunyt

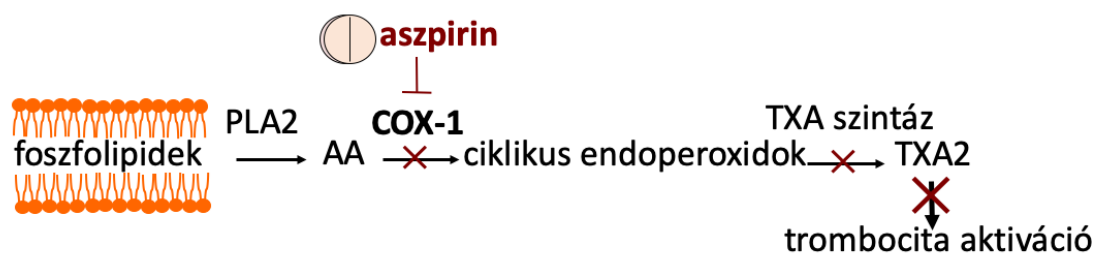
---

### 2.2.6 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 betegekben, így pl. akut koronária szindrómában szenvedő betegek esetén és újabban AIS betegek esetén is (158). 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 (159). Randomizált kontrollált vizsgálatok metaanalízise szerint ischaemiás stroke betegekben a kettős vérlemezke gátlás, amellyel, hogy jelentősen csökkentette a visszatérő stroke rizikót (RR: 0,76, 95%CI: 0,68-0,83), jelentősen növelte a major vérzés kritériumának megfelelő események rizikóját is (RR: 2,22, 95%CI: 1,14-4,34) (160). Megjegyzendő, hogy a CHANCE (Clopidogrel in High-risk patients with Acute Non-disabling Cerebrovascular Events)

vizsgálatban, ahol a kettős vérlemezkegátlás időtartama mindössze 21 nap volt, a major vérzés előfordulási aránya nem különbözött az aszpirin monoterápiához képest, a visszatérő stroke rizikójának csökkenése mellett (161). Mindezeket figyelembe véve, a jelenleg érvényben lévő ESO irányelvek szerint az ischaemiás stroke-ot szenvedett betegekben 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 (159).

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 (14. ábra) (16, 162). Mivel a TXA<sub>2</sub> több trombocita aktivációs útvonal amplifikáló szignáljaként működik, az aszpirin hatékonyan gátol többféle trombocita aktivációs útvonalat.

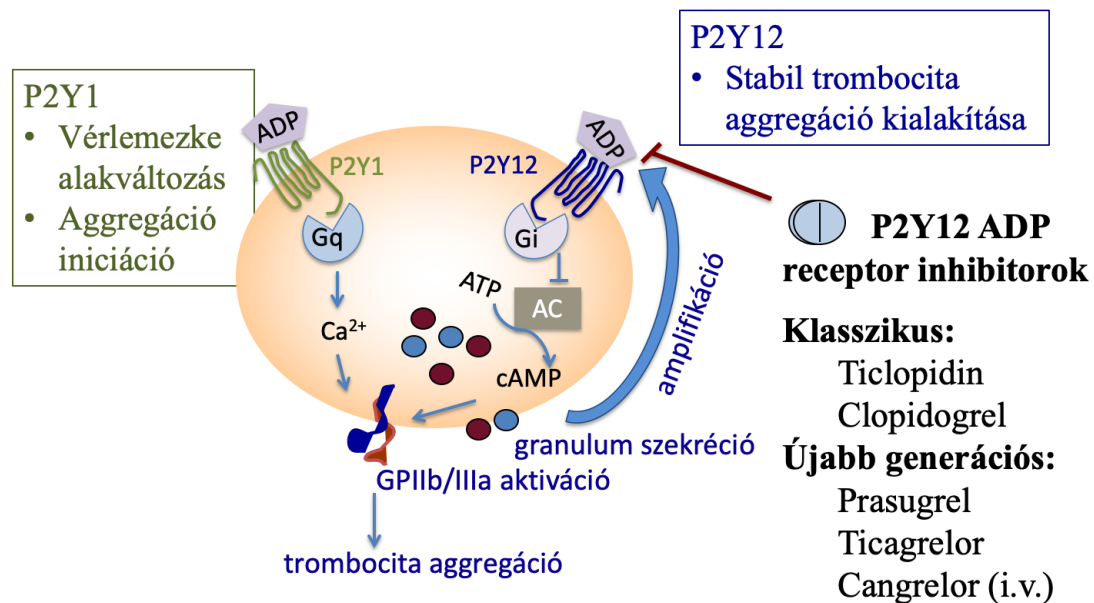


**14. ábra. Az aszpirin hatásmechanizmusának sematikus ábrázolása.** A piros vonalak gátlást jelölnek. AA: arachidonsav, COX-1: ciklo-oxigenáz-1, PLA<sub>2</sub>: foszfolipáz A<sub>2</sub>, TXA: tromboxán. Forrás: Bagoly Z, American Association of Clinical Chemistry, Pearls of Laboratory Medicine, 2014 alapján (16)

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 (163). Az ADP receptor gátló gyógyszerek a trombociták felszínén található ADP receptorok közül a P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> ADP receptorra nincsenek hatással, kizárólag a P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> ADP receptor inhibitorai (15. ábra).

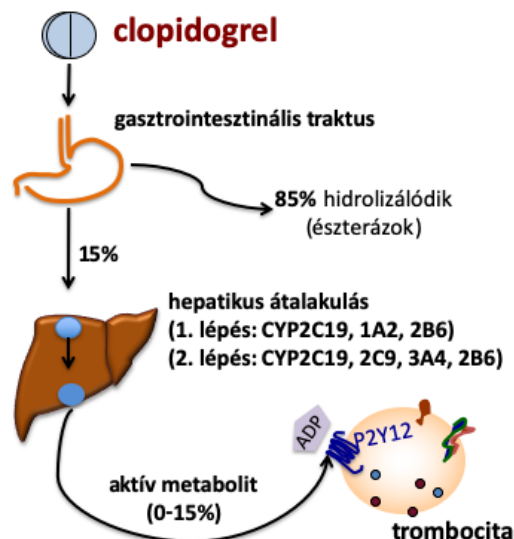
A clopidogrel egy pro-drug, mely a májban, a citokróm P450 (CYP) rendszer enzimek segítségével, kétlépéses reakcióban alakul át aktív metabolittá (16. ábra) (163). A keringésbe jutott clopidogrel 80-85%-a gyorsan degradálódik a plazmában található észterázok által. A gyógyszer 10-15%-a alakul át aktív metabolittá a májban, amely a reaktív tiol csoportjával képes diszulfid-híd kialakítására a P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> receptor extracelluláris cisztein csoportjával, ezáltal a clopidogrel a P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> receptor irreverzibilis gátlását éri el és hatása a vérlemezke teljes

élettartama alatt érvényesül. A clopidogrel metabolizmusában fontos szerepet játszanak a CYP enzimcsalád 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 (163, 164).



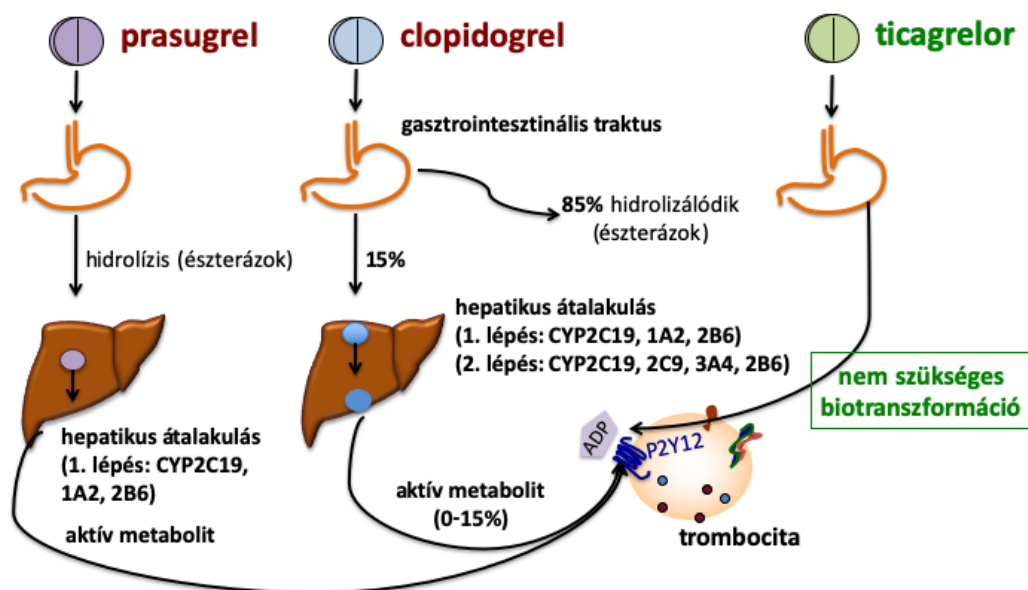
**15. ábra. A P2Y12 ADP receptor inhibitorok.** A piros vonal gátlást jelöl. AC: adenilát cikláz, ADP: adenozin-5'-difoszfát, ATP: adenozin-5'-trifoszfát, cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát, GPIIb/IIIa: glikoprotein IIb/IIIa komplex, i.v.: intravénás. Forrás: Bagoly Z, American Association of Clinical Chemistry, Pearls of Laboratory Medicine, 2014 alapján (16)

Az aspirin 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 aspirin esetében ma már ismert, hogy a terápiára nem kellően reagálók gyakoriságát a múltban erősen túlbecsülték olyan laboratóriumi módszerek használatával, amelyek nem specifikusak az aspirin COX-1 gátlására (165, 166). Napjainkban már általánosan elfogadott tény, hogy az aspirin "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 (165, 166).



**16. ábra. A clopidogrel átalakulása aktív metabolittá.** ADP: adenzin-5'-difoszfát, CYP: citokróm P450. Forrás: Bagoly Z, American Association of Clinical Chemistry, Pearls of Laboratory Medicine, 2014 alapján (16)

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 különböző tanulmányok esetén 10-50%-ban fordult elő, legtöbbször 30-40%-ban volt jelen (167). 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 (163). A prasugrel aktív metabolitja egy lépéses átalakulás révén keletkezik a májban, így hatástalansága a clopidogrelhez képest jóval ritkább (<10%) (17. ábra). 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 (163). Az új generációs szerek esetén azonban a hatásosság gyakrabban társulhat a vérzéses rizikó növekedésével, és ezek a gyógyszerek költségesebbek a clopidogrelhez képest.



**17. ábra.** Az újabb generációs P2Y12 inhibitorok a clopidogrelhez képest kedvezőbb metabolikus profillal rendelkeznek. ADP: adenzin-5'-difoszfát, CYP: citokróm P450. Forrás: Bagoly Z, American Association of Clinical Chemistry, Pearls of Laboratory Medicine, 2014 alapján (16)

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 (167, 168).

Amennyiben mégis sor kerül a trombotagátó 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 vérlemezkekben a TXA2-függő gátlást specifikusan jelzi, vagyis specifikus a COX-1 gátlásra (169). Ezt a gyakorlatban legegyszerűbben a vérlemezkek AA-indukálta aktivációjával érhetjük el. Az aszpirin hatás tesztelésére alkalmas (COX-1 specifikus) módszereket a 3. táblázat foglalja össze (16, 168). Mivel a TXA2 féleletideje *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 (170). Megjegyzendő, hogy a TXA2 a vérlemezkekben 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 (169). 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 (168).

---

### 3. 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: adenzin-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 (16)

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 válasszuk a clopidogrel hatás tesztelésére. Bár az irodalomban számos módszer fellelhető e célra, a clopidogrel hatás laboratóriumi vizsgálata esetén is fontos a gátolt biokémiai útvonalra specifikus módszer használata (4. táblázat) (16, 168). 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 P2Y12 receptor gátlás mértékének vizsgálatára, vagyis a clopidogrel hatásra (168). Az ADP és PGE1 kombinációját alkalmazó lumiaggregometriás módszert munkacsoportunk írta le először (lásd Eredmények).

---

#### 4. táblázat. Az clopidogrel hatás laboratóriumi vizsgálata

---

##### **P2Y12 receptor gátlásra specifikus módszerek, az agonista ADP, PGE1 jelenlétében (terápia monitorozásra ajánlott):**

*Trombocita aggregációs, agglutinációs tesztek:*

- Trombocita aggregáció vizsgálata (lumiaggregometria, ADP+PGE1)
- Multiplate® módszer (ADP+PGE1)
- VerifyNow® P2Y12 módszer
- PFA-100 P2Y

*Egyéb:*

- VASP foszforilációs teszt (áramlási citometria vagy ELISA)

##### **P2Y12 receptor gátlásra nem specifikus módszerek:**

- ADP-indukálta trombocita aggregáció és szekréció (lumiaggregometria, Multiplate®)
- 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, PGE1: prosztoglandin E1, VASP: vazodilatátor stimulált foszoprotein. Forrás: Bagoly Z, American Association of Clinical Chemistry, Pearls of Laboratory Medicine, 2014 alapján (16)

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 specifitásáról egy adott vérlemezkegátló gyógyszerrel kapcsolatban ill. más vérlemezkegátlók által ezen tesztekre gyakorolt hatás mértékéről, munkacsoportunk ezt a lehetőséget vizsgálta (lásd Eredmények).

## 2.3 A pitvarfibrilláció

### 2.3.1 A pitvarfibrilláció epidemiológiája, rizikófaktorai

A pitvarfibrilláció az ischaemiás stroke egyik legismertebb rizikófaktor. A pitvarfibrilláció a leggyakoribb tartós arrhythmia, világszerte körülbelül 33,5 millió embert érint, gyakorisága az életkor előrehaladtával nő (171). A sinus csomótól vezérelt ritmusos, időben és térben rendezett elektromechanikai szív működést nevezünk sinus ritmusnak. 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. Pitvarfibrilláció esetén az EKG-n gyors, szabálytalan fibrillációs hullámokat és rendszertelen kamrai ütések látunk. A fibrilláló pitvarok valójában nem húzódnak össze. Az AV-csomó a supraventricularis impulzusoknak csak egy részét engedi lefutni a szívkamrákra, melyek elektromos és mechanikai működése így irreguláris és gyakran gyors is marad. A kamrafrekvencia emiatt huzamosan, akár nyugalomban is nagy lehet (120-160/perc) és emiatt szisztolés szívelégtelenség alakul ki. A pitvari kontrakció kiesése miatt a perctérfogat akár 20%-kal is csökkenhet. A különböző diasztolés telődési idők és a szabálytalan kamrai kontrakciók következménye az erősen változó pulzustérfogat, a szisztolés vérnyomás változó értékei és pulzusdeficit. A tachyarrhythmia fokozódásával a perctérfogat csökken (172).

A pitvarfibrilláció kialakulhat organikus szívbetegség nélkül primer vagy idiopátiás módon, esetleg genetikus hajlam révén, továbbá szekunder módon. A szekunder forma kialakulhat kardiális okok miatt pl. vicium, koszorúér betegség vagy bal szívfél elégtelenség, de akár cardiomyopathia vagy myocarditis/pericarditis miatt is. A szekunder forma kialakulhat extrakardiális okok miatt is, ilyen pl. a hipertónia, tüdőembólia, hipertireózis vagy a toxikus gyógyszerhatás, az idősebb korosztályban gyakori társbetegség a hipertónia mellett a szívelégtelenség, a krónikus veseelégtelenség, az obstruktív alvási apnoe szindróma és a cukorbetegség (173).

### **2.3.2 A pitvarfibrilláció patofiziológiája, osztályozása**

A pitvarfibrilláció beindítását közvetlenül gyors elektromos kisülések váltják ki, ami gyakran a tüdővénaiba bekúszó izomrostokban lévő aritmogén göcökből származik. A ritmuszavar fennmaradásában számos különböző tényező szerepet játszhat, pl. a pitvari feszülés okozta fibrózis, a hipokontraktilitás, a zsíros beszűrődés, a gyulladás, a vaszkuláris remodelling, az ischaemia, stb. (174). Mindezek a pitvarfibrilláció kialakulásának, ill. fennmaradásának lehetőségén túl elősegítik a pitvarfibrillációhoz társuló hiperkoagulábilis állapot létrejöttét is (lásd később). A kontrakciók megszűnése csökkenti a helyi endotheliális nyíróerőt, és endothel diszfunkció alakul ki. Tartósan fennálló pitvarfibrilláció során elektromos remodelling lép fel, ami tovább kedvez a ritmuszavar fennmaradásának. Ezek az elváltozások kezdetben reverzibilisek, ha a sinus ritmus helyreáll, azonban a pitvarfibrilláció perzisztálása esetén további strukturális átalakulások jönnek létre, amely megmagyarázhatja a kórkép progresszív jellegét (175). A pitvarfibrilláció osztályozása a ritmuszavar időbeli viselkedésén és klinikai lefolyásán alapul (5. táblázat) (172).



**5. táblázat. A pitvarfibrilláció osztályozása**

<b>Kategória</b>	<b>Leírás</b>
Első alkalommal diagnosztizált pitvarfibrilláció	
Paroxysmalis pitvarfibrilláció	Általában 48 órán belül önmagától megszűnik, bár időnként 7 napig is tarthat. Abban az esetben is paroxysmalis pitvarfibrillációnak tekintendő a ritmuszavar, ha 7 napon belül kardiovertálták.
Persistens pitvarfibrilláció	Több mint 7 napon keresztül fennálló ritmuszavar. Ebbe a csoportba tartozik a 7 nap után kardiovertált pitvarfibrilláció is.
Tartós persistens pitvarfibrilláció	A pitvari ritmuskontroll terápia elkezdésekor már legalább 1 éve folyamatosan tartó pitvarfibrilláció.
Permanens pitvarfibrilláció	A pitvarfibrilláció tényét elfogadta a beteg és az orvos. Ha mégis pitvari ritmuskontroll terápia indulna, akkor a beteg újraserolandó tartós persistens pitvarfibrilláció csoportba.

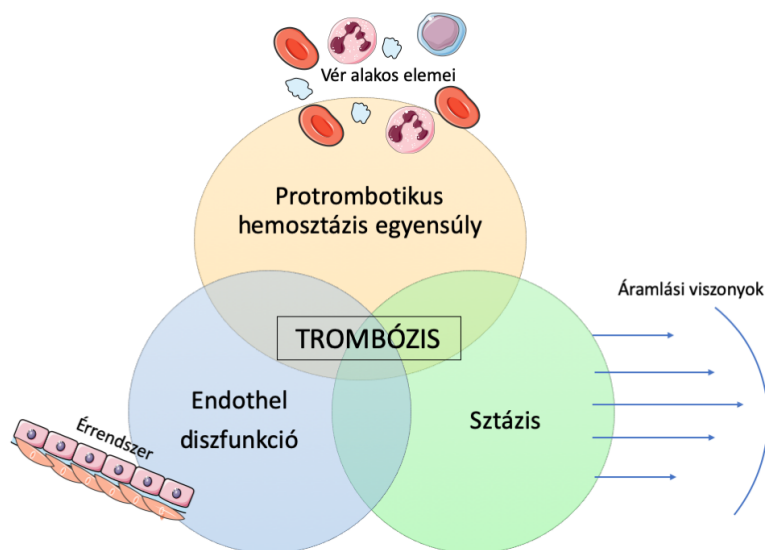
Forrás: Fazekas T et al, Pitvarfibrilláció. Kardiológia alapok és irányelvek, 2010 alapján (172)

A paroxysmalis és persistens pitvarfibrilláció – különösen fiatalokban – általában jelentősen rontja a fizikai teljesítőképességet. Gyakori tünetek: palpáció érzés, nehézlégzés, fizikai teljesítőképesség csökkenés, szédülés. A panaszokat okozó és a tünetmentes pitvarfibrilláció lefolyása és kimenete hasonló (172). A pitvarfibrilláció két legfőbb szövődménye: az akut szívelégtelenség, melynek oka a perctérfogat kritikus csökkenése, ill. az artériás, leginkább nagyvérköri embolizáció, melynek oka a pitvari trombusképződés (173). Pitvarfibrilláció következtében a rendezetlen szív működés miatt a szívben vérrög képződhet, mely a szívből az agyba jutva kardioemboliás stroke-ot okoz. Az ischaemiás stroke események ötöde szív eredetű okokra vezethető vissza, melynek hátterében az esetek többségében maga a pitvarfibrilláció áll (172).

### **2.3.3 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 (18. ábra) (176).



**18. ábra. A Virchow-triász elemei.** Forrás: Kumar DR et al, Clin Med Res, 2010 alapján (176)

A pitvarfibrilláció esetén kialakuló endothel károsodás jelenlétét több irodalmi adat, köztük biomarker vizsgálatok is alátámasztják. A pitvarfibrillációban jelentkező reológiai változások és a bal pitvar falának csökkent kontrakciója a bal pitvari endothelium csökkent NO szintézisét eredményezi. Az endothel diszfunkció következtében a Weibel-Palade testekből VWF szekretálódik, továbbá megnő a sejtfelszíni adhéziós molekulák száma (E-szelektin, P-szelektin, ICAM-1: intercelluláris adhéziós molekula-1, VCAM-1: vaszkuláris adhéziós molekula 1). Az endothel károsodás következtében emelkedik a keringő mikropartikulák száma, melyek vazoaktív és prokoaguláns mediátorokat tartalmaznak (177). Az endothel károsodás további klinikai jele a pitvarfibrilláló betegeknél is megfigyelhető csökkent áramlás indukálta dilatáció (177, 178). Pitvarfibrillációban az endothel diszfunkcióhoz társuló gyulladáshoz közvetlen összefüggést mutatnak a hiperkoagulabilitással (179).

A pitvarfibrillációban megfigyelhető strukturális és funkcionális bal pitvari változások lassult bal pitvari áramlási viszonyokat és sztázist idéznek elő (180). A bal pitvar mellett a bal pitvari fülcsé felépítése, szűk szájadéka, a pitvar átmérőjében bekövetkezett változások különösen hajlamosítanak sztázis kialakulására (179). A nem valvuláris pitvarfibrillációban embólia kialakulásakor az esetek több mint 90%-ban a bal fülcsében található trombus az embóliaforrás (180).

A pitvarfibrilláció és hemosztázis kapcsolatának vizsgálatok a legtöbb tanulmány elsősorban a koagulációs oldalt vizsgálta, főként perifériás vérmintákból (181-183). A vizsgálatok többsége endothelsejt károsodást jelző markereken és gyulladáshoz társuló markereken kívül

protrombotikus markereket, valamint a trombocita aktiválódás keringő markereit vizsgálta, összefüggést találtak a pitvarfibrilláció és a megemelkedett protrombin fragmens 1+2 (F1+2), TAT-komplex, fibrinogén szintek, továbbá az endothelsejt diszfunkció markereként is számontartott VWF szintek között (184-188).

A hemosztázis aktivációját jelző markerek közül a pitvarfibrillációhoz társuló stroke rizikó előrejelzésével kapcsolatban a D-dimerrel kapcsolatos a legtöbb adat. A klinikai rizikófaktorokat is figyelembe véve, irodalmi adatok szerint az emelkedett D-dimer szintek prognosztikus értékűek stroke-rizikóra nem valvuláris eredetű pitvarfibrillációban, orális antikoaguláns terápiában részesülő betegeknél is (189). A pitvarfibrilláció és fibrinolitikus rendszer kapcsolatát vizsgáló kevés tanulmány azonban ellentmondásos eredményekre jutott (190). Egyes kutatások hipofibrinolízist jelző emelkedett PAI-1 szinteket találtak, míg más tanulmányok hiperfibrinolízisre utaló emelkedett t-PA és PAP-komplex szinteket írtak le (191-195).

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 manifesztálna. Erre olyan korábbi kutatások is engednek következtetni, melyek a bal pitvar és a szisztémás keringés között különbséget mutattak ki pitvarfibrillációban: az intrakardiális környezetre korlátozódott protrombotikus változásokat írtak le (196, 197). Azonban, valószínűleg az intrakardiális vérminta bonyolult gyűjtése miatt az elmúlt évtizedben mindössze néhány, kevés pitvarfibrilláló beteget bevonó tanulmányban vizsgálták a hemosztázis rendszert bal pitvari mintákból. Az eddig publikált, bal pitvari mintákat vizsgáló tanulmányok azonban csupán a hemosztázis rendszer válogatott tagjait vizsgálták (VWF, P-szelektin, TAT-komplex, trombocita faktor 4, stb.), a fibrinolitikus rendszer pedig még kevésbé tanulmányozott ebben a vonatkozásban (198-201), 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 (202).

### **2.3.4 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 (203).

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.

#### *2.3.4.1 Stroke prevenció: antikoagulálás*

Az antikoagulálás célja a stroke prevenciója, mely a pitvarfibrilláció terápiájának központi kérdése (203). 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 a stroke rizikójának megítélésére a CHADS<sub>2</sub> skála továbbfejlesztett változata, a CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc pontrendszer a legalkalmasabb (6. táblázat), mely a rizikótényezőket súlyozott mértékben veszi figyelembe (204). 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) (ha a terápiás tartományban töltött idő >70%, INR: 2-3), ill. direkt orális antikoaguláns (DOAC): faktor Xa inhibitor vagy direkt trombin inhibitor (203, 205). VKA alkalmazásával a stroke rizikója 64%-kal (206), az ösztörtalitás pedig 26%-kal csökkenthető. Ezzel szemben a trombocitagátló terápia alkalmazása a stroke kockázatát mindössze 22%-kal csökkenti, az ösztörtalitást pedig nem csökkenti szignifikáns mértékben (203). A DOAC és VKA terápiákat pitvarfibrilláló betegekben összehasonlító fázis III. klinikai vizsgálatok eredményeinek metaanalízise szerint a DOAC terápia a stroke és tromboemboliás események kockázatát további 19%-kal csökkentette a VKA terápiahoz képest (207). A legújabb európai irányelvek ezen eredmények alapján a DOAC alkalmazását részesítik előnyben a VKA terápiával szemben (208).

A HAS-BLED pontrendszer a vérzési kockázat becslésére szolgál (6. táblázat), magas kockázat (≥3 pont) esetén az antitrombotikus terápia dózisa csökkentendő, a potenciálisan reverzibilis vérzéses kockázatot növelő faktorok kezelendők (209).

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 (181).

#### 6. táblázat. Pitvarfibrillációban alkalmazott klinikai rizikóbecslő skálák

Klinikai pontrendszer	Leírás
CHADS <sub>2</sub> pontrendszer	congestiv szívelégtelenség (1 pont), hipertónia (1 pont), kor $\geq 75$ év (1 pont), diabetes mellitus (1 pont), stroke/TIA (2 pont)
CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc pontrendszer	szívelégtelenség (1 pont), hipertónia (1 pont), $\geq 75$ éves kor (2 pont), diabetes mellitus (1 pont), stroke, TIA (2 pont), vaszkuláris betegség (perifériás artériás betegség, aorta plakk) (1 pont), 65-74 éves kor (1 pont), női nem (1 pont)
HAS-BLED pontrendszer	hipertónia (1 pont); kóros vese és máj funkció (1-1 pont); korábbi stroke (1 pont); korábbi major vérzés vagy vérzési hajlam (1 pont); labilis INR: $<60\%$ a terápiás tartományban (1 pont); $>65$ éves kor (1 pont); korábbi túlzott alkoholfogyasztás, vérzéses kockázatot növelő gyógyszer alkalmazása: trombocitagátló, nem szteroid gyulladásgátló (1-1 pont)

Stroke rizikó becslése CHADS<sub>2</sub> pontrendszer és CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc pontrendszer segítségével (204), vérzési kockázat becslése HAS-BLED pontrendszer segítségével (209).

#### 2.3.4.2 Farmakológiai ritmus- és frekvenciakontroll

Akut és hosszú távú gyógyszeres frekvencia kontroll céljából alkalmazható bradikardizáló szerek a béta-blokkolók, a non-dihidropiridin típusú kalcium-csatorna blokkolók és a digitális. Akut ritmuskontroll céljából gyógyszeres és elektromos kardioverzió végezhető, hosszú távú ritmuskontroll céljából antiarrhythmias szerek alkalmazhatók. A sinus ritmus 1 éven keresztül történő fenntartásának esélye a rendelkezésre álló gyógyszerek mellett azonban nem haladja meg az 50%-ot (210). Ez a korlátozott hatékonyság magyarázza a nem gyógyszeres módszerek, elsősorban a katéterablációs kezelések fontosságát és létjogosultságát.

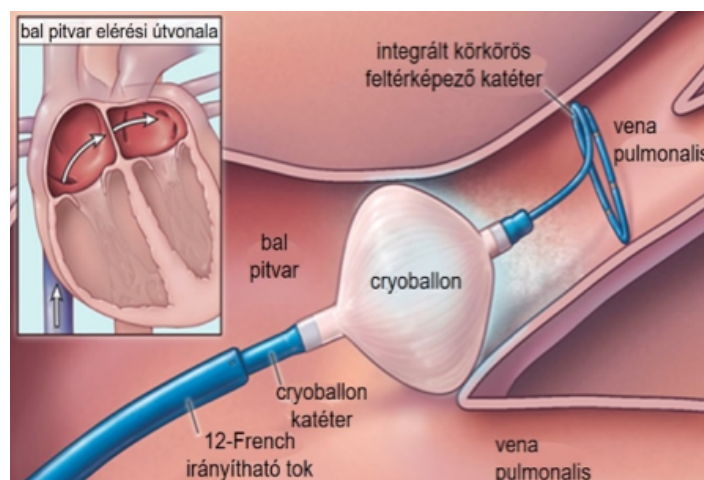
#### 2.3.4.3 A pulmonális véna izoláció

A pitvarfibrilláció transzkatóteres kezelésének sarokköve a tüdővénák, ill. az azokba bekúszó pitvari izomrostok és a bal pitvar elektromos izolációja. Katéteres abláció nem tolerált vagy sikertelen antiarrhythmias gyógyszeres kezelést követően paroxysmalis, persistens és hosszan fennálló persistens pitvarfibrilláció kezelésekor indikált. Elsővonalbeli terápiaként alkalmazható tünettel járó paroxysmalis pitvarfibrilláció esetén (203).

A katéterablációs technikák kifejlesztésével lehetővé vált a pitvarfibrilláció triggereinek izolálása és eliminálása, fenntartó pályáinak módosítása. Leggyakrabban a pulmonális vénák szájadékában találhatók a triggererek, azonban hosszan tartó pitvarfibrillációkor egyéb elektrofiziológiai és strukturális változások következnek be, melyek fogékonyá teszik a pitvart

a pitvarfibrilláció fenntartására. Ezért a pulmonális vénaszájadékok kizárólagos izolálása csak paroxysmalis pitvarfibrillációban eredményes. Persistens vagy hosszan fennálló persistens pitvarfibrilláció esetén kiterjedtebb abláció szükséges. A bal fülcséből származó triggererek gyakoriak nem paroxysmalis pitvarfibrillációnál, izolációjuk csökkenti a pitvarfibrilláció visszatérését abláció után (203).

A katéterablációs technikákat folyamatosan fejlesztik. A beavatkozás során a vena femoralison keresztüli behatolást követően katétert vezetnek a jobb pitvarba, ahol a pitvari septum punkcióját követően jutnak a bal pitvar üregébe, felkeresve a tüdővénák szájadékát. Elsőként a radiofrekvenciás elvű katéter terjedt el, mely fokális laesiókat, myocardialis nektrózisokat hoz létre (point-by-point technika) (203). A beavatkozás technikai részét nagyban könnyítette, ezáltal a beavatkozás időtartamát jelentősen rövidítette a fázisos radiofrekvenciás multielektrod katéter használata a pulmonális vénák ablációjára (PVAC) (211). A cryoballon (fagyasztásos ballon) technikával szintén jelentősen könnyebben lehet a pulmonális vénák szájadékát izolálni a point-by-point technikához képest (212) (19. ábra). A cryoballon abláció kapcsán ritkábban jelentkezik súlyos komplikáció (pl. tamponád, vena pulmonalis stenosis, tromboembólia) a radiofrekvenciás ablációhoz képest (212). A katéterabláció sikeressége a pitvarfibrilláció típusától, társbetegségek jelenlététől és az operáló orvos tapasztaltságától is függ. Normális szívfunkcióval és struktúrával társuló, paroxysmalis pitvarfibrilláció esetén a legjobb az egyszeri beavatkozás sikerességi rátája (60-97%), emiatt újabban a cryoballon abláció akár elsővonalbeli kezelésként is ajánlott paroxysmalis pitvarfibrilláció esetén (213). Persistens és hosszú ideje fennálló persistens pitvarfibrilláció esetén az egyszeri abláció sikerességi rátája 45-60% (203).



**19. ábra. A vena pulmonalis cryoballon ablációja pitvarfibrillációban.** Forrás: Kuck KH et al, N Engl J Med, 2016 alapján (214)

#### 2.3.4.4 *A periprocedurális antikoagulálás*

A pitvarfibrilláció transzkatóteres kezelése egy komplex beavatkozás, amelyet olyan betegeknél hajtanak végre, akiknél a tromboembóliás szövődmények, köztük a stroke eleve magasabb kockázatú, mint a nem pitvarfibrilláló betegeknél. Ezért nem meglepő, hogy a cerebrovaszkuláris szövődmények a pitvarfibrilláció abláció kezdete óta a legrettegettebb szövődmények közé tartoznak (215). Irodalmi adatok alapján a tromboembóliás (cerebrovaszkuláris) szövődmények aránya a transzkatóteres beavatkozást követően jellemzően 1% körüli vagy az alatti (216, 217). Hátterében legvalószínűbb okként a bal pitvari endokardiális szövetsérülés következtében kialakult hiperkoagulabilitás áll. A posztoperatív manifeszt cerebrális embolizáció mellett előfordulhat tünetmentes, klinikailag néma cerebrális ischaemia (Silent Cerebral Ischemia: SCI), ami a pitvarfibrilláció ablációt követő 48 órán belül elvégzett diffúziós MR (DW-MRI: Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging) vizsgálattal kimutatható, mint kis kiterjedésű fehérállomány lézió, ami az abláció előtt még nem volt detektálható (218). A pitvarfibrilláció abláció utáni SCI előfordulását több vizsgálat megerősítette, gyakoriságát 5-40% között igazolták (219-221). A SCI jelentősége bár vitatott, nem zárható ki esetleges szerepe a betegek kognitív funkciójának hosszú távú romlásában.

A katóterablációs beavatkozások periprocedurális antikoaguláns terápiáját illető szakmai irányelvek az elmúlt években módosultak. A 2008-as és 2010-es irányelvek javasolták az orális antikoaguláns terápia átmeneti felfüggesztését a katóterabláció előtt, a beavatkozás előtti napig, a beavatkozás alatt pedig heparin adását javasolták (222, 223). A legújabb ajánlások nem javasolják az orális antikoagulánsok felfüggesztését, hanem a periprocedurális tromboembóliás rizikó miatt a katóteres abláció előtt (VKA/DOAC), alatt (heparin) és után (VKA/DOAC) trombózis profilaxis folytatását javasolják (205, 222). Ezen legújabb irányelvek szerint a beavatkozás után minimum 2-3 hónapig ajánlott orális antikoagulálásban részesíteni a beteget. Ez után a stroke rizikója alapján ítélandó meg a terápia folytatásának szükségessége (CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc:  $\geq 1$  férfiaknál és  $\geq 2$  nők esetén) (222).

A periprocedurális antikoagulálással kapcsolatos szemléletváltozás lassan formálódott az elmúlt évtizedben, melynek hátterében több ok áll, köztük a biztonságra való törekvés. A beavatkozás során alkalmazott heparin, a transzseptális szúrás és a vékony falú pitvarban történő katóter 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 terápiás dózisban folyamatosan adott VKA típusú antikoagulánsok

biztonságosságát és fölényét igazolták a stroke rizikó csökkenésére nézve (224, 225). A közelmúltban végzett számos különböző esetszámú és tervezésű kutatás, ill. metaanalízisek eredménye alapján a direkt orális FXa, ill. direkt trombin gátlók folyamatos („uninterrupted”) antikoagulálási 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 (226-229). Egy multicentrikus, nem randomizált obszervációs vizsgálatban a tromboembóliás és a vérzéses szövődmények aránya is statisztikailag szignifikánsan magasabb volt a folyamatosan adagolt dabigatran alkalmazásakor, szemben a hasonlóképpen alkalmazott VKA kezeléssel (228). A dabigatran folyamatos adása mellett végzett randomizált kontrollált tanulmányokban viszont szignifikánsan kevesebb vérzéses szövődményről számoltak be a folyamatos VKA terápiával összehasonlítva, de újabban a „minimálisan megszakított” DOAC alkalmazásának lehetősége is felmerül (226, 227, 230).

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



### 3 CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során három témakörben vizsgáltuk az ischaemiás cerebrovaszkuláris kórképek 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 FV<sub>Leiden</sub> 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 fülesei) vérmintáinak összehasonlításával célunk volt olyan hemosztázis és fibrinolízis eltérések azonosítása, amelyek magyarázzák a lokálisan fokozott tromboembóliás rizikót.
2. Célul tűztük ki a pitvarfibrilláció transzkatóterés 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.

## 4 BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

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

#### 4.1.1 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 nem konzekutív 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 (139). Minden beteg intravénás trombolízisben részesült standard protokoll alapján a 4,5 órás terápiás időablakon belül rt-PA alkalmazásával (139). 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 elemezte a vizsgálatok során, és meghatározták az ASPECTS értékeket (136). Minden betegnél regisztrálták a tünetek jelentkezésének időpontját, az alapvető demográfiai és klinikai jellemzőket (életkor, nem, BMI, korábbi gyógyszerek, cerebro- és kardiovaszkuláris betegségek jelenléte, rizikótényezők, beleértve a dohányzást, stb.). 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 (133). A

stroke etiológiáját a TOAST kritériumrendszer alapján osztályozták (116). A lízist követő hemorrhagiás transzformációt tünettel járó (SICH: szimptomatikus intrakraniális hemorrhagia) vagy tünettel nem járó (aSICH: aszimptomatikus intrakraniális hemorrhagia) vérzéseként határozták meg az ECASS II (European Cooperative Acute Stroke Study II) kritériumai szerint. Tünettel 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 (231). A betegek hosszú távú funkcionális kimenetelét 3 hónappal az eseményt követően a mRS használatával állapították meg (232).

A tanulmány során a következő kimeneteleket 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 (232, 233).
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 (154, 234).
3. *Terápiával összefüggő intracerebrális vérzés (ICH):* SICH vagy aSICH az ECASS II kritériumai szerint, a lízist követő napon (231).

#### **4.1.2 Mintagyűjtés és 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 dózisának beadása után is történt mintavétel. A rutin laboratóriumi vizsgálatok (ionok, glükózsint, vese- és májfunkciós vizsgálatok, nagy érzékenységű C reaktív fehérje meghatározás, vérkép) standard laboratóriumi módszerek segítségével történtek (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország és Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Németország) a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében.

A specifikus hemosztázis tesztek elvégzéséhez a 0,109 M nátrium-citrátot (Becton Dickinson, Franklin Lane, NJ) ill. nátrium-citrátot, teofillint, adenzint és dipiridamolt tartalmazó csövekbe (Vacuette CTAD csövek, Greiner Bio-One, Ausztria) 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 (Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország). 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 határréteg sejtjeiből (buffy coat) végeztük a QIAamp DNA Blood Mini Kit segítségével, a gyártó leírását követve (Qiagen, Hilden, Németország).

#### **4.1.3 VWF antigén és FVIII aktivitás meghatározása**

A VWF antigén szintek meghatározása (Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország, referencia tartomány: 50-160%) immunturbidimetriás módszerrel történt. A reagensben a VWF ellenes specifikus antitestek kovalens módon polisztrén részecskékhez vannak kötve. A plazma minta VWF tartalma az antitestekhez kötődve a polisztrén részecskék aggregációját idézi elő, mely a minta turbiditásának fokozódásához vezet. A FVIII aktivitás meghatározása kromogén módszerrel (Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország, referencia tartomány: 60-168%) történt. A plazmamintában lévő FVIII aktiválása trombin hozzáadásával történik. A FVIIIa, a FIXa, foszfolipidek és  $Ca^{2+}$  jelenlétében katalizálja a FX aktiválódását. A FXa aktivitásának mérése specifikus p-nitroanilid szubsztráttal történik. A 405 nm-en fotometriásan detektált p-nitroanilin felszabadulásának kezdeti sebessége arányos a FX aktivitásával, így a minta FVIII aktivitásával. A méréseket Siemens BCS koagulométeren végeztük a gyártó utasításai alapján.

#### **4.1.4 FXIII aktivitás, FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigénszintek és főbb FXIII polimorfizmusok meghatározása**

A plazma FXIII aktivitás szinteket ammónia felszabaduláson alapuló teszttel határoztuk meg egy kereskedelmi forgalomban kapható reagenskészlettel (REA-chrom FXIII kit, Reanal-ker, Budapest, Magyarország, referencia tartomány: 69-143%, CV: 3,8%) (235). A FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigénszinteket szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg, amely a B alegység elleni biotinizált monoklonális befogó antitestből és az A alegység elleni peroxidázzal jelölt monoklonális antitestből állt (referencia tartomány: 14-28 mg/L, CV: 2,0%) (236). 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)

polimorfizmusait tanszékünk laboratóriumában beállított valós idejű PCR-módszerekkel határoztuk meg fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer (FRET) detektálás és olvadási görbe elemzése segítségével LightCycler® 480 készüléken (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) (237, 238).

#### **4.1.5 $\alpha$ 2-PI aktivitás, $\alpha$ 2-PI antigénszintek és az $\alpha$ 2-PI Arg6Trp polimorfizmus vizsgálata**

Az  $\alpha$ 2-PI aktivitást kromogén tesztben BCS koagulométeren határoztuk meg, a gyártó utasításait követve (Berichrom  $\alpha$ 2-PI aktivitás, Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország, referencia tartomány: 80-120%). A vizsgálat elve a következő: az  $\alpha$ 2-PI-t tartalmazó betegplazmát inkubáljuk a plazmint feleslegben tartalmazó reagenssel. A plazmin gyorsan inaktiválódik az  $\alpha$ 2-PI hatására, és a maradék plazmin aktivitást a plazmin-specifikus kromogén szubsztrát (D-norvalil-ciklohexilalanil-lizil-nitroanilid) hasításán alapuló amidolitikus tesztben mérjük. Az  $\alpha$ 2-PI aktivitás fordítottan korrelál az abszorpció váltoásaival 405 nm-en. A totál  $\alpha$ 2-PI antigénszintet a tanszékünkön beállított in house ELISA módszerrel mértük (239). Ez a vizsgálat az  $\alpha$ 2-PI minden izoformáját kimutatja, és nem befolyásolja a PAP-komplexek jelenléte (a plazma totál  $\alpha$ 2-PI antigénszintjének referencia tartománya: 48-85 mg/L). Az  $\alpha$ 2-PI Arg6Trp (rs2070863) polimorfizmust tanszékünk laboratóriumában beállított valós idejű PCR-módszerrel azonosítottuk FRET detektálással és olvadási görbe elemzésével LightCycler® 480 készüléken (240).

#### **4.1.6 PAI-1 aktivitás, PAI-1 antigénszintek és a PAI-1 4G/5G polimorfizmus vizsgálata**

A PAI-1 aktivitás és antigén szinteket szendvics ELISA esszék segítségével végeztük (Technozym PAI-1 Actibind ELISA, referencia tartomány: 1-7 U/mL és Technozym PAI-1 Antigen ELISA, Technoclone, Bécs, Ausztria, referencia tartomány: 7-43 ng/mL). A PAI-1 mérésekhez felhasznált plazma mintákat CTAD vérlemezke gátlót is tartalmazó csövekbe vett vérmintákból nyertük, annak érdekében, hogy vérminta szállítása, tárolása során a vérlemezkekből utólagosan PAI-1 ne szabadulhasson fel. Az Actibind esszé kizárólag a szabad, aktív PAI-1 meghatározására alkalmas. A Technozym PAI-1 antigén esszé a szabad, a t-PA-val komplexben lévő és latens PAI-1-et is méri. A PAI-2 vagy más plazminogén aktivátor inhibitorok nincsenek hatással a vizsgálatokra. A PAI-1 4G/5G polimorfizmust a LightMix®

PAI-1 4G/5G kit segítségével (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) a gyártó leírása szerint, LightCycler® 480 készüléken határoztuk meg.

#### **4.1.7 Egyéb, speciális koagulációs és fibrinolízis markerek vizsgálata**

A plazminogén aktivitás meghatározása kromogén tesztben történt (Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország, referencia tartomány: 75-150%), Siemens BCS koagulométeren, a gyártó utasításai alapján. A reagensben lévő plazminogén streptokinázzal komplexet képezve enzimatikusan aktív streptokináz-plazmin komplexet hoz létre, mely egy kromogén szubsztrát hasításával p-nitroanilint szabadít fel. A minta abszorbancia növekedését 405 nm-en követjük, mely arányos a kiindulási plazminogénszinttel. Valójában tehát a plazminogén aktiválódását követően kialakuló streptokináz-plazmin komplex aktivitását vizsgáljuk, a teszt általánosan elfogadott elnevezése megtévesztő lehet.

A D-dimer szinteket immunturbidimetriás vizsgálattal határoztuk meg, szintén BCS koagulométeren (Siemens Innovance D-dimer, Marburg, Németország, diagnosztikai határérték: <0,5 mg FEU/L).

A fibrin monomer kvantitatív meghatározását (diagnosztikai határérték: <10 mg/L) immunturbidimetriás módszerrel végeztük, az Instrumentation Laboratory ACL TOP 500 koagulométerén, a gyártó utasításai alapján.

A PAP-komplex meghatározásához (Technozym PAP complex, Technoclone, Bécs, Ausztria, referencia tartomány: 0-514 ng/m) szendvics típusú enzim immunesszét használtunk. Az ELISA-lemez felszíne olyan monoklonális antitestekkel fedett, melyek a PAP-komplex neoantigén részére specifikusak. A neoantigén csak a komplexben fejeződik ki, ezért a PAP-komplexre specifikus, a neoantigén ellenes antitest nem kötődik a szabad  $\alpha$ 2-PI-hoz vagy a plazminogénhez. A detektálást TECAN Infinite m200 típusú ELISA olvasóval végeztük.

A TAT-komplex meghatározása (Enzygnost TAT micro, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Németország, referencia tartomány: <2,0-4,2  $\mu$ g/L) szendvics típusú ELISA módszer segítségével történt. A detektálást TECAN Infinite m200 típusú ELISA olvasóval végeztük.

#### **4.1.8 Globális hemosztázis ill. fibrinolízis tesztek vizsgálata**

##### *4.1.8.1 A trombin generációs teszt kivitelezése*

A vizsgálat elvégzéséhez a fluoreszcens mérésen alapuló, Thrombinoscope CAT tesztet használtuk (Calibrated Automated Thrombogram, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine,

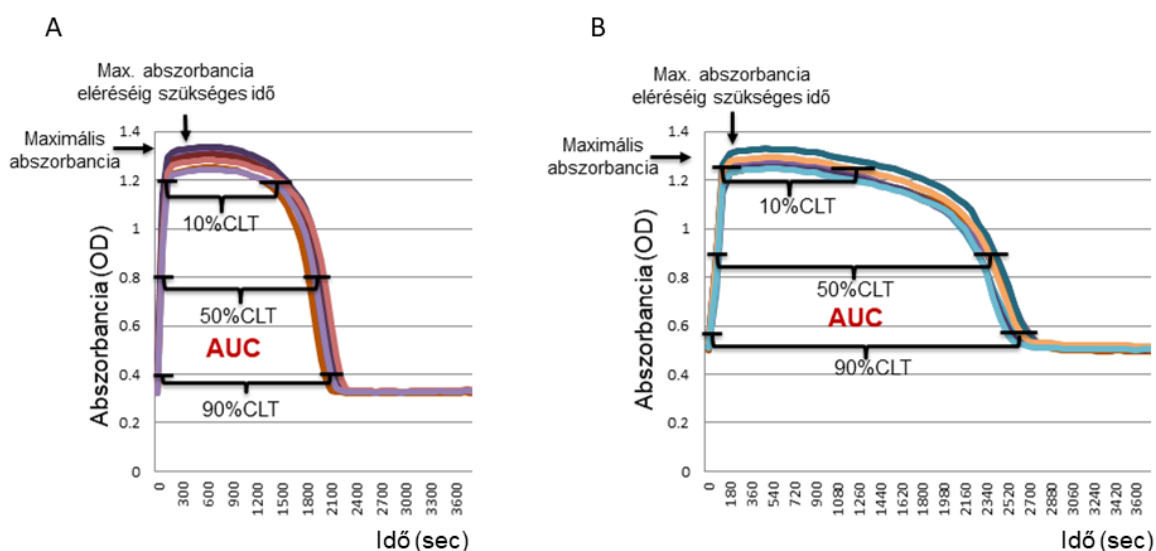
Franciaország) a gyártó utasításai szerint. Röviden, 80  $\mu\text{L}$  plazmához 20  $\mu\text{L}$  PPP-Reagent<sup>TM</sup> (tartalma: 5 pM rekombináns szöveti faktor és 4  $\mu\text{M}$  foszfolipid) reagenst adtunk és az elegyet 10 percig inkubáltuk, U-aljú, 96 lyukú, fekete polipropilén mikrolemezt használva (Greiner Bio-One). 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 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük, a Thrombinoscope szoftvert (Diagnostica Stago) 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.

#### 4.1.8.2 *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. Az általunk alkalmazott vizsgálati körülmények alapjául már megjelent publikációk metodikái szolgáltak (109, 241-244). A mérések során két kísérleti beállítást alkalmaztunk, mindkét módszer során valamennyi mintát négy párhuzamos méréssel vizsgáltunk. A következőkben leírt valamennyi koncentráció végkoncentrációt jelent. A betegek plazmamintáit a kísérletek elvégzése előtt 10 percig 37 °C-os vízfürdőben olvasztottuk fel. Az első kísérleti elrendezésben (CLA) a citráttal alvadésgátolt mintákhoz 1000-szeresre hígított rekombináns humán szöveti faktort és foszfolipidet tartalmazó reagenst (Innovin, Siemens, Marburg, Németország) és 100 ng/mL rt-PA-t (Alteplase, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Németország) 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, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország) és 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hisztont (borjú thymus, TIII S, Calbiochem, La Jolla, Ca, USA) adtunk imitálva a NET-ek jelenlétét (módosított CLA, mCLA). A cfDNA és hisztion optimális koncentrációját az irodalomban leírt előkísérletek alapján állítottuk be, ahol a hisztion (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 (31). 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 mikrolemez olvasó segítségével. Az alvadék lízis görbék analízisét a Shiny App ClotlysisCL online kiértékelő szoftver segítségével végeztük (245). 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). A különböző időpontokban meghatározott alvadék lízis időket úgy határoztuk meg, hogy a maximális turbiditás 10%, 50% vagy 90%-ához tartozó időpontok ill. a maximális turbiditás elérését követően a vonatkozó 10%, 50% vagy 90%-os abszorbancia csökkenés időpontok közötti időtartamokat vettük figyelembe. Az analitikai pontosságot mindkét kísérleti elrendezés során meghatároztuk a Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI dokumentum, EPO05-A3) irányelvei alapján (246). A pontosság meghatározása egészséges önkéntesektől származó plazma mintákból történt, a kísérleteket 20 napig végeztük 4 párhuzamosban mérve. A sorozaton belüli és a laboratóriumon belüli pontosság meghatározása során a variációs koefficiens 8,6 és 8,9%-nak adódott, mindkét kísérleti beállítás során. Egy egészséges önkéntes 4 párhuzamos plazmamintáin elvégzett CLA és mCLA mérés során detektált reprezentatív turbidimetriás görbék és főbb paramétereik az 20. ábrán láthatóak.



**20. ábra.** In vitro alvadék lízis módszer (CLA) és módosított in vitro alvadék lízis módszer, hozzáadott sejtmentes DNS (cfDNA) és hiszton jelenlétével (módosított CLA, mCLA). Az ábrán a CLA mérés alvadék lízis görbéi (A) és az mCLA turbidimetriás görbéi (B) ill. a görbe főbb paramétereit láthatók. A különböző színek ugyanazon plazmamintának a 4 párhuzamos mérését mutatják egy mérési

sorozaton belül. AUC: görbe alatti terület, 10%CLT: 10% alvadék lízis idő, 50%CLT: 50% alvadék lízis idő, 90%CLT: 90% alvadék lízis idő

#### **4.1.9 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 vizsgálatok) 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 (247). A vizsgálatba bevont betegek 18. életévüket betöltött, CT-vel igazolt nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot szenvedett személyek voltak. Kizárási kritériumok közé tartozott az agyi aneurysma, AV malformációk, epidurális hematoma, subdurális hematoma, malignus elváltozások, súlyos máj- és vesekárosodás, hemorrhagiás diathesis és a SARS-CoV-2 vírusfertőzés jelenléte. 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 (248). A neurológusok emellett számos klinikai és demográfiai adatot regisztráltak (tünetek jelentkezésének ideje, kor, nem, gyógyszerek, cerebro- és kardiovaszkuláris kórtörténet, cerebrovaszkuláris rizikó faktorok, dohányzás) a kórházba kerülés pillanatában. A stroke súlyosságának meghatározására az NIHSS skálarendszert alkalmazták, felvételnél és az eseményt követő 7. napon (133). A mortalitás veszélyének becsülésére a klinikusok az ICH score pontrendszert alkalmazták minden beteg esetén (249). A betegek hosszú távú funkcionális kimenetelének értékelésére az mRS pontrendszert használták (250). 2020 márciusától, vagyis a COVID-19 fertőzés magyarországi megjelenésétől számítva, minden ICH beteg esetében odafigyelték a vírusfertőzés jelenlétére már a kórházi felvételtől egészen a 3 hónapos követési időszakig. Valamennyi beteg esetén felvételekor orr/garat váladékból származó RNS mintából reverz transzkripció polimeráz-lánreakció (RT-PCR) vizsgálat történt a koronavírus jelenlétének kimutatására/kizárására.

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 (234, 250).

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

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

#### *4.2.1.1 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 (251).

#### *4.2.1.2 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 vérlemezke dús plazmát (platelet rich plasma, PRP) nyertünk, melyet prosztoglandin-I<sub>2</sub>-vel kezeltük (50 ng/mL), majd újra centrifugáltuk, hogy vérlemezkékben szegény plazmát (platelet poor plasma: PPP, 700 g, 10 perc) vagy vérlemezkéket (400 g, 20 perc) kapjunk. A vérlemezke-pelleteket 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 vérlemezkék és a vörösvértestek elkészítése és felhasználása mindig a kísérlet napján történt.

Az első kísérletsorozatban újraszuszpendált vérlemezkék ( $10^5/\mu\text{L}$ ), mosott vörösvértestek ( $4,5 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) 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 (1 pM szöveti faktor, Innovin, Siemens, Marburg, Németország) 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 vérlemezkéken ( $10^5/\mu\text{L}$ ) és mosott vörösvértesteken ( $4,5 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) kívül FXIII deficiens plazmát használtunk, és tisztított FXIII<sup>Val/Val</sup> vagy FXIII<sup>Leu/Leu</sup> fehérje (21  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) hozzáadásával állítottuk elő a teljes vért.

## **4.2.2 A FV<sub>Leiden</sub> mutáció hatása a fibrinolízis regulációjára, az $\alpha$ -2-PI alvadékba való beépülésének mértékére**

### *4.2.2.1 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 (252). Egyénenként 18 mL vért vettünk a könyökhajlati vénából 2 mL 0,105 M-os trinátrium-citrát tartalmú csöbe. A véralvadás intrinsic útjának aktivációját 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kukorica tripszin inhibitorral (Gentaur, Brussels, Belgium) gátoltuk, melyet közvetlenül a vérvétel után adtuk hozzá a teljes vérmennyiséghez. A citráttal alvadásgátolt vérmintákból trombocita-depletált plazmát (PDP) nyertünk (a plazma felső kétharmadának kétszeri centrifugálása, 1400 g, 20 perc) és használtunk fel kísérleteinkhez.

#### 4.2.2.2 A FXIII aktivációjának és a következményes fibrin keresztkötések dinamikájának a vizsgálata különböző FVLeiden 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, American Diagnostica, Stamford, CT) 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-os végkoncentráció) előzetes kísérletek során teszteltük FV vad típusú plazmákon, melyekben az rhTM jelenléte átlagosan 45,4%-al (40-61%) csökkentette a trombingenerációt. A fibrin alvadékok 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 (Technoclone GmbH, Bécs, Ausztria) volt, melyet 7,5 nM rhTM-et tartalmazó, vagy nem tartalmazó 62,5 mM CaCl<sub>2</sub>-ban oldottunk fel. A feloldott Technothrombin TGA RC Low ~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 jódetamid, 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.

#### 4.2.2.3 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 fibrin Coomassie-kék (R250) festékekkel tettük láthatóvá. A képződött fibrin  $\gamma$ -dimerek ill.  $\alpha$ -lánc oligomerek-polimerek relatív mennyiségét GS-800 kalibrált denzitométeren (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 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 (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada), 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.

#### 4.2.2.4 *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 (American Diagnostica, Stamford, CT). A lízis vizsgálatokat elvégeztük rhTM jelenlétében is hiányában is. Egyes kísérletekben a TAFIa-t 25  $\mu$ g/mL burgonyából izolált karboxipeptidáz inhibitorral (CPI; Sigma, St. Louis, MO) gátoltuk. Amennyiben az FXIIIa aktivitást kívántuk gátolni az lízis vizsgálatok során, 2 mM jódcetamidot adtunk a rendszerünkhöz. Az eredmények kvantitatív értékeléséhez az 50%-os lízishez szükséges időt számoltuk ki.

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

#### 4.2.3.1 *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 (lásd fent) (239). 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 (lásd korábban) (251). 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 α<sub>2</sub>-PI antigén szinteket a plazma és a szérum mintákból a fent leírtak alapján határoztuk meg. Az alvadékot 3 mg/mL jóacetamidot tartalmazó PBS (pH: 7,2) pufferral alaposan mostuk CRC oszlopokban (compact reaction columns; Affymetrix, Inc. Cleveland, OH, USA). A mosott alvadékot 8 M ureát és 5% merkaptotetanolt (Bio-Rad, Hercules, CA USA) tartalmazó redukáló Laemmli 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 α<sub>2</sub>-PI ellenes antitest használatával, érzékenyített kemilumineszcenciás detektálással (Pierce ECL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), melyet Azure c300 készülékben végeztünk.

Az α<sub>2</sub>-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 α<sub>2</sub>-PI antigén szinteket. Az alvadékba beépült totál α<sub>2</sub>-PI mennyiségét a plazma és a szérum szintekből kalkuláltuk. A betegek kimenetelét a korábban leírtaknak megfelelően értékeltük és összehasonlítottuk az α<sub>2</sub>-PI fibrinbe való beépülésének mértékével.

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

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

##### *4.3.1.1 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: aszpirin/nem szteroid gyulladáscsökkentő kezelés, krónikus májbetegség, hemoglobin koncentráció <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.

##### *4.3.1.2 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 (Chrono-Log Corporation, Havertown, PA) 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 250×10<sup>9</sup>/L legyen. Az ADP-indukálta aggregációt 5 μM és 20 μM ADP-vel végeztük (Helena Laboratories, Beaumont, TX). Luciferin-luciferáz reagenst (Biothema AB, Handen, Svédország) használtunk az ATP szekréció mérésére. A kapott görbéken feljegyeztük a maximális aggregáció mértékét (maximális Δtranszmisszió%) és az ATP felszabadulás mértékét (μmol ATP/10<sup>11</sup> vérlemezke).



#### 4.3.1.3 *A VerifyNow P2Y12 teszt*

A VerifyNow P2Y12 teszt (Accumetrics, San Diego, CA) egy teljes vért használó, betegágy melletti 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. A méréseket a gyártó utasításainak megfelelően hajtottuk végre.

#### 4.3.1.4 *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 vérlemezkék clopidogrel általi gátlásával. Röviden: a citráttal antikoagulált vérmintákat PGE1-el vagy PGE1+ADP-vel inkubáltuk és paraformaldehiddel fixáltuk. A vérlemezkeket ezután permeabilizáltuk, és CD61 fikoeritrinnel jelölt trombocita-ellenes antitesttel és egy FITC-jelölt foszforilált VASP-specifikus egér monoklonális antitesttel vagy negatív izotípus kontroll antitesttel jelöltük. A mintákat FacsCalibur áramlási citométerrel elemeztük (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). A VASP foszforilációjának mértékét az átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékekből számított vérlemezke reaktivitási index (PRI) formájában fejeztük ki a gyártó utasításai szerint.

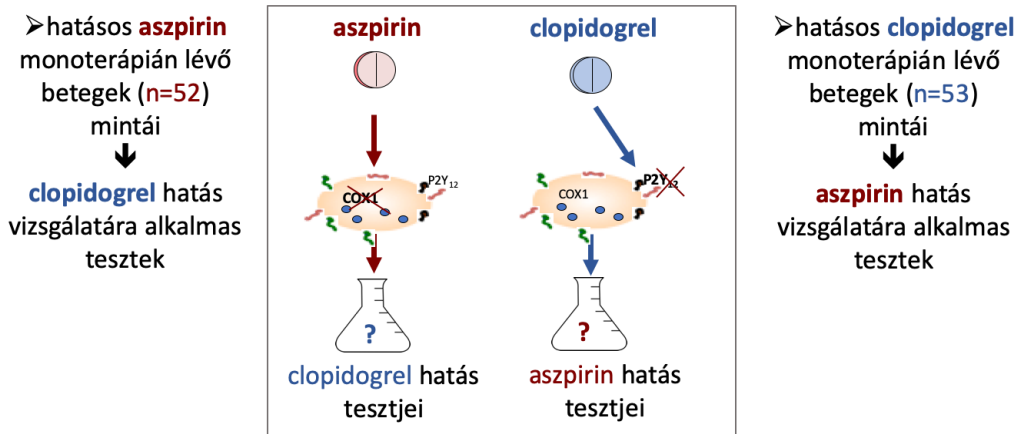
#### 4.3.1.5 *Új módszer kidolgozása: P2Y12 specifikus trombocita aggregáció (ADP[PGE1])*

A hagyományos ADP-indukálta trombocita aggregációt módosítottuk annak érdekében, hogy P2Y12 receptor specifikus vérlemezke aggregációt kapjunk. A PRP-t 3 percig 37 °C-on előinkubáltuk 0,31 µM PGE1-el (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) 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; Sigma-Aldrich) hatásával. Előkísérleteink során 20 µM, 40 µM és 60 µM ADP-t használtunk, optimális aggregációt 40 µM és 60 µM ADP használata esetén tapasztaltunk, ezért a teszt végleges formájában 40 µM ADP-t alkalmaztunk.

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

### 4.3.2.1 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 (21. ábra). 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, hemoglobin 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 terápiában részesültek. Kizárásra került 48 beteg a vizsgálati csoportból, mert esetükben P2Y12 receptor specifikus módszerrel nem lehetett clopidogrel hatást igazolni. A P2Y12 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.



**21. ábra. A vizsgálat koncepciója.** Célunk volt hatásos aszpirin monoterápián és hatásos clopidogrel monoterápián lévő betegek kiválasztása, és a betegek vérmintáin a nem szedett vérlemezkegátló hatásosságának vizsgálatára alkalmas tesztek elvégzése. COX-1: ciklo-oxigenáz 1

#### 4.3.2.2 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, P2Y12 specifikus aggregációs teszt (ADP [PGE1] teszt) (lásd korábban).

#### 4.3.2.3 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 TXB2 képződés PRP-ből és a VerifyNow Aspirin teszt. A trombocita aggregáció és szekréció során 500 µg/mL (1,53 mM) AA agonistát használtunk (Helena, Gateshead, UK). Az eredményeket a maximális aggregáció és ATP szekréció mértékével fejeztük ki a fent leírtaknak megfelelően. Az AA-indukálta TXB2 képződés mértékét PRP-ből határoztuk meg. Az AA-stimulus hatására képződött TXB2-t szolid fázisú extrakcióval távolítottuk el, az extrahált TXB2 mennyiségét az Assay Designs kompetitív ELISA módszerével határoztuk meg (Ann Arbor, MI). Az eredményeket pg TXB2/10<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.

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

### **4.4.1 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 fülcsei) vérmintáinak összehasonlításával olyan hemosztázis és fibrinolízis eltérések azonosítása, amelyek magyarázzák a lokálisan fokozott tromboembóliás rizikót. A második vizsgálat esetén a pitvarfibrilláció transzkatóéteres 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 katéterrel elvégzett pulmonális véna izoláció 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 egyike: bal pitvari tachycardia, paroxysmalis supraventricularis tachycardia (orthodrom vagy antidrom) vagy bal oldali járulékos köteg miatt kialakuló FBI (gyors, széles, irreguláris) tachycardia, tünetmentes egyén 12 elvezetéses EKG-ján látható praexcitatio, ha az elektrofiziológiai vizsgálat olyan bal oldali járulékos köteget mutat ki, mely a vezetési tulajdonságai alapján potenciálisan szignifikáns arrhythmiaát eredményezhet, írásos beleegyező nyilatkozat aláírása. A beteg- és kontroll csoport kizárási kritériumai az alábbiak voltak: korábbi szívsebészeti beavatkozás, szívbillentyű betegség, bal kamrai ejectiós frakció (LVEF)  $\leq 30\%$ , NYHA (New York Heart

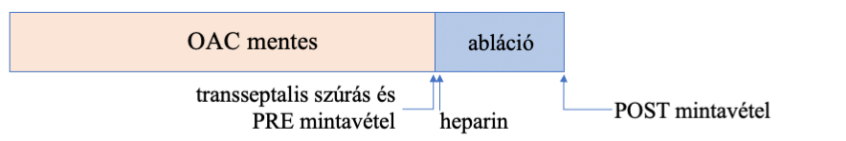
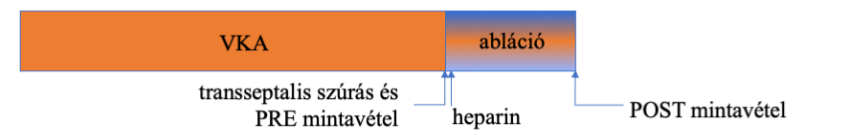
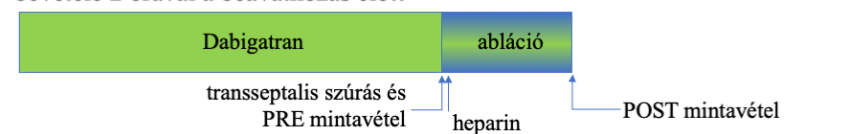
Association) szerinti III-as vagy IV-es fokú szívelégtelenség, dokumentált szignifikáns carotis stenosis, az utóbbi 3 hónapban sebészeti beavatkozás, AIS vagy TIA, nem stabil angina vagy myocardialis ischaemia, továbbá súlyos krónikus obstruktív pulmonális elégtelenség, ismert vérzések vagy trombotikus betegség, akut gyulladás, orális antikoagulánsok vagy diffúzió súlyozott mágneses rezonancia képalkotás (DW MRI) kontraindikációja, terhesség. A betegcsoport további kizárási kritériumai voltak: hosszan tartó persistens pitvarfibrilláció, reverzibilis ok miatt kialakuló pitvarfibrilláció (pl. elektrolitháztartás zavara, tireotoxikózis, láz, droghasználat, alkohol intoxikáció, stb.), pitvari trombus jelenléte.

A vizsgált populáció beválogatása előtt minden esetben felmérésre kerültek a stroke rizikófaktorai (hipertónia, diabetes mellitus, hiperlipidémia, BMI, hormonális fogamzásgátló vagy egyéb hormonterápia, dohányzás, alkoholfogyasztás, korábbi stroke/TIA, korábbi myocardialis infarctus, krónikus szívelégtelenség, ismert perifériás érbetegség) 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 (204).

#### 4.4.2 Elektrofiziológiai beavatkozás és mintagyűjtés

Az első obszervációs vizsgálat esetén minden, a koagulációra vagy a trombocita aktivitásra potenciálisan befolyással bíró gyógyszer megszakításra került minimum három féléletidővel korábban vagy a hatásuk teljes csökkenéséhez szükséges időtartammal korábban a beavatkozást megelőzően. A második obszervációs vizsgálatban, amelynek során a különböző perioperatív antikoagulálási eljárások hatását vizsgáltuk, a betegek az alábbi 3 preprocedurális antikoagulálási stratégia valamelyikében részesültek (22. ábra):

- 1/ Az orális antikoaguláns nélküli (*OAC mentes*) csoportban a betegek nem szedtek véralvadásgátlót.
- 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.

**1. csoport (OAC mentes):** nem antikoagulált betegek**2. csoport (VKA):** folyamatos VKA terápia, beavatkozás reggeli INR: 2-3**3. csoport (Dabigatran):** folyamatos dabigatran terápia, utolsó tableta bevétele 2 órával a beavatkozás előtt

**22. ábra. Antikoagulációs stratégiák és mintavétel a különböző csoportokban.** INR: nemzetközi normalizált ráta, OAC: orális antikoaguláns, PRE: cryoabláció előtti mintavétel a bal pitvarból, POST: cryoabláció utáni mintavétel a bal pitvarból, VKA: K vitamin antagonistá

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 (INNOVANCE DTI, Siemens Healthcare, Marburg, Németország; saját referencia tartomány: 64-443 µg/mL).

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 szűrést 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 transseptalis szűrés az ICE-katéter segítségével ultrahang vezérelten történt Mullins-transseptalis katéterrel és Brockenborough-tűvel (Medtronic, Kirkland, QC, Kanada) 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 (Medtronic, Kirklandm QC, Kanada) használatával jutott az operátor a bal fülcsébe (45 ml vérminta, az első 5 ml eldobásával). A bal fülcsei 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 (22. ábra), 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 transeptális 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 operatőr 45 ml vérmintát vett minden esetben, amelyekből az első 5 ml vér nem került felhasználásra, hogy kizárjuk a sheath-en belüli esetleges véralvadást. A vérmintákat vakuténeres csövekbe gyűjtöttük: 0,109 M nátrium-citrátot, ill. CTAD-t tartalmazó csövekbe. Az antikoagulált vérmintákat kétszer 1500 g-vel centrifugáltuk szobahőmérsékleten 20 percig. Az így nyert plazma mintákat -80 °C-on tároltuk alikvotokban a további vizsgálatokig.

#### **4.5 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 egészséges önkéntesek megfelelő tájékoztatásban részesültek és önkéntes, írásos beleegyező nyilatkozatot adtak a tanulmányban való részvételről.

#### **4.6 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 teszttel, 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-teszttel, valamint Dunn-Bonferroni post hoc teszttel 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 teszttel 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 teszttel hasonlítottuk össze. Backward bináris logisztikus regressziós modelleket használtunk a vizsgált kimenetek független prediktorainak meghatározására. A regressziós modellek azokat a változókat tartalmazták, 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.



## 5 EREDMÉNYEK

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

#### 5.1.1 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. A két kohorsz alapadatait és a vizsgált kimeneteleket a 7. ill. 8. táblázat mutatja. 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 (8. táblázat). 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.

**7. táblázat. Klinikai alapadatok és a trombolízis kimenetele a vizsgált kohorszban\***

Betegek száma	132
Férfi, n (%)	77 (58,3)
Kor, év	69,0±12,2
<b>Cerebrovaszkuláris rizikó faktorok, n (%)</b>	
Artériás hipertónia	101 (76,5)
Pitvarfibrilláció	35 (26,5)
Hiperlipidemia	82 (62,1)
Diabetes mellitus	40 (30,3)
Korábbi stroke, TIA	42 (31,8)
Dohányzás	32 (24,2)
<b>Stroke súlyossága, n (%)</b>	
NIHSS 0-5	37 (28,0)
NIHSS 6-10	48 (36,4)
NIHSS 11-15	21 (15,9)
NIHSS >15	23 (17,4)
<b>Stroke etiológia (TOAST), n (%)</b>	
Kisérbetegség	14 (10,6)
Nagyér ateroszklerózis	49 (37,1)
Kardioembólia	27 (20,5)
Egyéb/ nem meghatározott	42 (31,8)
<b>Trombolízis terápia</b>	
Tünetek kezdetétől a terápiáig eltelt idő, perc	160±46
rt-PA dózisa, mg	
Intravénás rt-PA (n=125)	68,2 ± 14,9
Intravénás és intraartériális rt-PA (n=7)	61,6 ± 14,7
<b>Képpalkotó eljárások adatai</b>	
ASPECTS felvételnél	10 (7-10)
ASPECTS 24 órával a trombolízis követően	9 (0-10)
<b>Kimenetek, n (%)</b>	
<b>Rövidtávú funkcionális kimenet (<math>\Delta</math> NIHSS 7. nap)</b>	
Kedvező (legalább -4 pont vagy 0 érték)	53 (40,2)
Nincs állapotváltozás ( $\pm 3$ pont)	47 (36,6)
Kedvezőtlen (legalább +4 pont)	21 (15,9)
Halál	5 (3,8)
Nem meghatározott	6 (4,5)
<b>Hosszútávú kimenet (mRS 90. nap)</b>	
mRS 0-1	46 (34,8)
mRS 2-5	34 (25,8)
mRS 6 (halál)	29 (22,0)
Nem meghatározott	23 (17,4)
<b>Intracerebrális vérzés (ECASS II)</b>	
aSICH	7 (5,3)
SICH	6 (4,5)

\*Beválogatás: 2011 március- 2013 január. A folytonos változók értékeit átlag  $\pm$  standard deviáció vagy medián (IQR)-ként tüntettük fel. A kategorikus változókat az elemszám (százalék) mutatja. aSICH: tünetmentes intrakraniális vérzés, ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT Score, ECASS II: European Cooperative Acute Stroke Study II, IQR: interkvartilis tartomány, mRS: módosított Rankin Skála, n: esetszám, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale, rt-PA: rekombináns szöveti plazminogén aktivátor, SICH: szimptomás intrakraniális vérzés, TIA: tranziens ischaemiás attack, TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

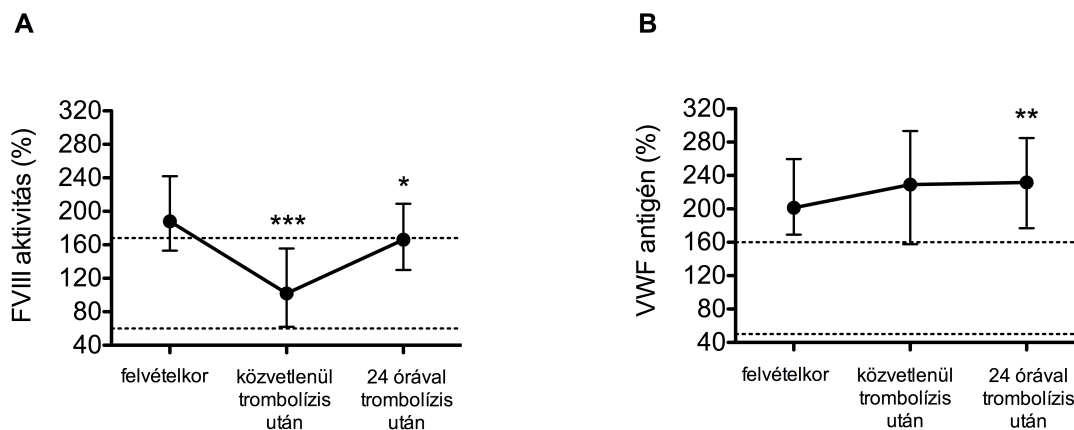
**8. táblázat. Klinikai alapadatok és a trombolízis kimenetele a vizsgált kohorszban\***

Betegek száma	421
Kor, év	68 (60-77)
Férfi, n (%)	241 (57,2)
Stroke súlyossága, NIHSS	7 (4-11)
<b>Cerebrovaszkuláris rizikó faktorok, n (%)</b>	
Artériás hipertónia	346 (82,2)
Pitvarfibrilláció	86 (20,4)
Diabetes mellitus	118 (28,0)
Hiperlipidémia	267 (63,4)
Dohányzás	128 (30,4)
Előző stroke, TIA	114 (27,1)
<b>Laboratóriumi paraméterek felvételkor</b>	
INR	0,98 (0,93-1,02)
APTI, sec	27,8 (25,9-30,7)
Fehérvérsejtszám, G/L	7,9 (6,3-9,7)
Trombocitaszám, G/L	217 (180-262)
Szérum glükóz, mmol/L	6,5 (5,6-8,1)
hsCRP, mg/L	2,9 (1,6-6,0)
Kreatinin, $\mu$ mol/L	75 (64-90)
D-dimer, mg FEU/L	0,75 (0,46-1,34)
Plazminogén aktivitás, %	108 (92-128)
Fibrinogén, g/L	3,9 (3,3-4,6)
$\alpha$ 2-plazmin inhibitor aktivitás, %	102 (93-111)
$\alpha$ 2-plazmin inhibitor antigén, mg/L	60 (54-67)
<b>Stroke etiológia (TOAST), n (%)</b>	
Nagyér ateroszklerózis	146 (34,8)
Kisérbetegség	76 (18,0)
Kardioembólia	54 (12,8)
Egyéb/nem meghatározott	145 (33,4)
<b>Képpalkotó eljárások, n (%)</b>	
ASPECTS felvételkor	
0-7	6 (1,4)
8-10	268 (63,7)
ASPECTS 24 órával trombolízis után	
0-7	50 (11,9)
8-10	225 (53,4)
<b>Trombolízis terápia (intravénás rt-PA)</b>	
Tünetek jelentkezésétől a terápiáig eltelt idő, perc	150 (115-185)
rt-PA dózis, mg	68,0 (58,0-81,0)
<b>Kimenetek, n (%)</b>	
Rövid távú kimenet ( $\Delta$ NIHSS 7. nap) **	
Kedvező (legalább -4 pont vagy 0 érték)	175 (43,7)
Nincs állapotváltozás ( $\pm$ 3 pont)	159 (37,8)
Kedvezőtlen (legalább +4 pont vagy halál)	46 (10,9)
Nem meghatározott	7 (1,7)
Hosszú távú kimenet (mRS 90. nap) **	
mRS 0-1	188 (44,7)
mRS 2-6	157 (37,3)
Nem meghatározott	42 (10,0)
Intrakraniális vérzés, ICH (ECASS II, 24h)	
Nincs vérzés	387 (91,9)
aSICH	20 (4,8)
SICH	14 (3,3)

\*Beválogatás: 2011 március- 2013 január és 2016 szeptember- 2019 április. A folytonos változók értékeit átlag  $\pm$  standard deviáció vagy medián (IQR)-ként tüntettük fel. A kategorikus változókat az elemszám (százalék) mutatja. aSICH: tünetmentes intrakraniális vérzés, APTI: aktivált parciális tromboplasztin idő, ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT Score, BMI: body mass index, ECASS II: European Cooperative Acute Stroke Study II, hsCRP: nagy érzékenységű C reaktív protein meghatározás, ICH: intrakraniális vérzés, INR: nemzetközi normalizált ráta, IQR: interkvartilis tartomány, mRS: módosított Rankin Skála, n: esetszám, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale, rt-PA: rekombináns szöveti plazminogén aktivátor, SICH: szimptomás intrakraniális vérzés, TIA: tranziens ischaemiás attack, TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. \*\*kivéve a lízist követően vérzést szenvedett betegeket (n=34)

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

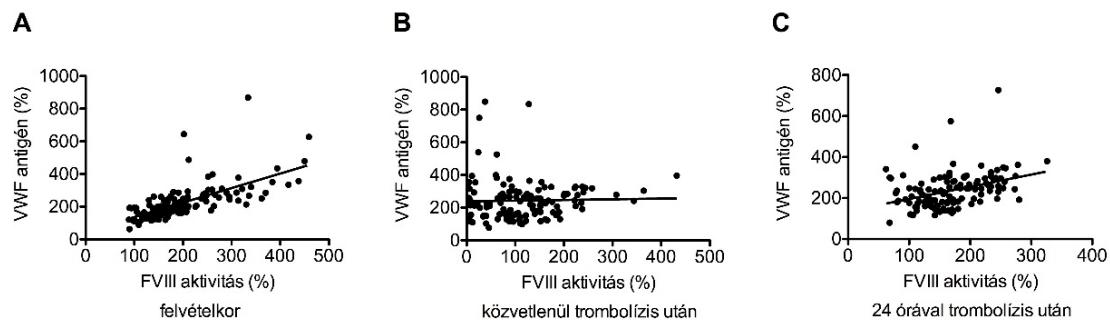
A trombolízis előtti mintákban a FVIII aktivitás és VWF antigén szintek medián értéke a referencia tartomány felett volt (FVIII aktivitás medián: 188,0; IQR: 153,0-242,0%, VWF antigén: 201,3; IQR: 169,1-259,6%) (23. ábra). Közvetlenül a trombolízis után a FVIII aktivitás nagymértékű, szignifikáns csökkenést 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.



**23. ábra. Az intravénás trombolízis hatása a VIII-as faktor (FVIII) aktivitás (A) és von Willebrand faktor (VWF) antigén szintekre (B).** A felvételtkor, közvetlenül trombolízis után és 24 órával trombolízis után mért faktorok medián értékei teli körrel, az interkvartilis tartományok bajusszal (whiskers) vannak ábrázolva. Szaggatott vonal jelzi a FVIII aktivitás és VWF antigén referencia tartományainak alsó és felső határértékeit. Statisztika: Friedman kétmintás ANOVA-teszt és Dunn-Bonferroni post hoc teszt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  a kórházi felvételtkor gyűjtött mintákhoz hasonlítva

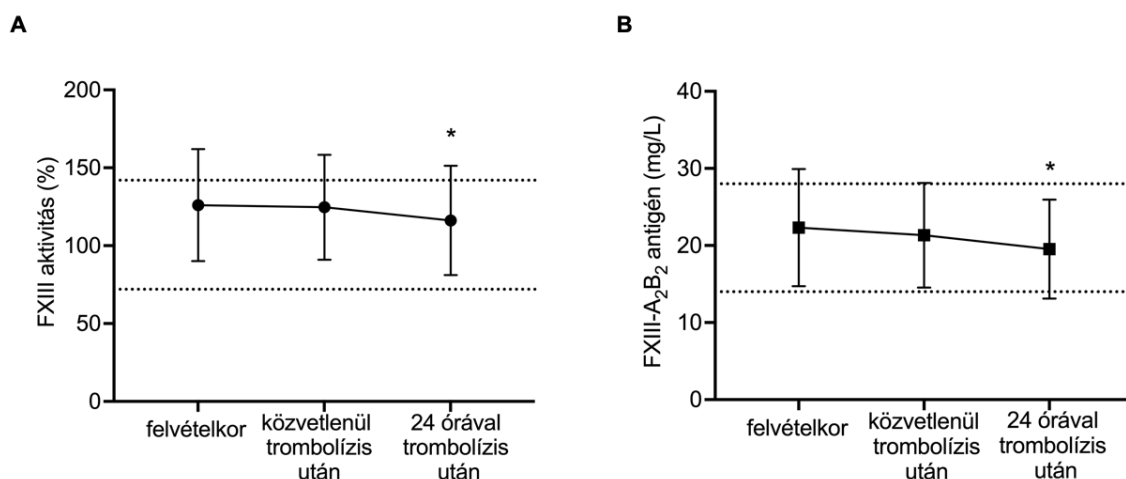
A FVIII aktivitás és VWF antigén értékek a trombolízis előtti mintákban jó korrelációt mutattak (Spearman  $r = 0,748$ ,  $p < 0,001$ ), azonban közvetlenül a trombolízis után nem mutattak

szignifikáns korrelációt ( $r=0,093$ ,  $p=0,299$ ), melynek háttérében feltehetőleg plazmin mediált FVIII degradáció állhat (24. ábra). Közepes mértékű korreláció volt megfigyelhető 24 órával a trombolízist követően ( $r=0,420$ ,  $p<0,001$ ).



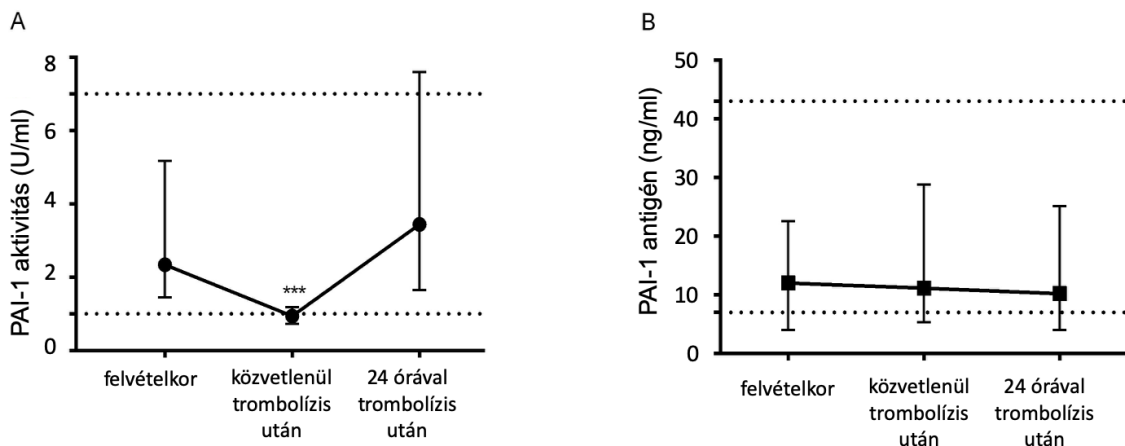
**24. ábra. A VIII-as faktor (FVIII) aktivitás és a von Willebrand faktor (VWF) antigén szintek korrelációja kórházi felvételtkor (A), közvetlenül trombolízis után (B), 24 órával trombolízis után (C) a vizsgált kohorszban.**

A trombolízis előtti FXIII aktivitás és antigénszintek a betegek egy részében ( $n=39$ ) szintén emelkedettek voltak (25. ábra). 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 kivétellel 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  $r=0,917$ ,  $p<0,001$ ).



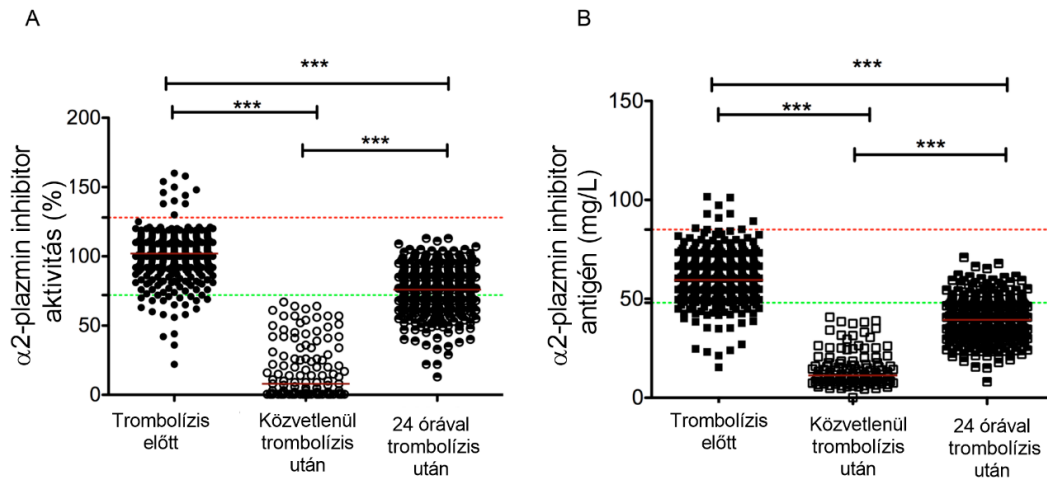
**25. ábra. Az intravénás trombolízis hatása a XIII-as faktor (FXIII) aktivitás (A) és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szintekre (B).** A felvételtkor, közvetlenül trombolízis után és 24 órával trombolízis után mért FXIII aktivitás átlag értékek teli körrel, FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szintek teli négyzettel, az interkvartilis tartományok bajusszal vannak ábrázolva. Szaggatott vonal jelzi a FXIII aktivitás és FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> antigén szintek referencia tartományainak alsó és felső határértékeit. Statisztika: Friedman kétmintás ANOVA-teszt és Dunn-Bonferroni post hoc teszt. \* $p<0,05$ , a kórházi felvételtkor gyűjtött mintákhoz hasonlítva

A PAI-1 aktivitás trombolízis előtt valamennyi beteg esetén a referencia tartományban volt, de a trombolízis hatására egyöntetűen minden betegen, szignifikáns mértékben, a detektálhatóság alsó határára csökkent (medián: 0,94; IQR: 0,73-1,18 U/mL) (26. ábra). 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  $r=0,752$ ,  $p<0,001$ ).



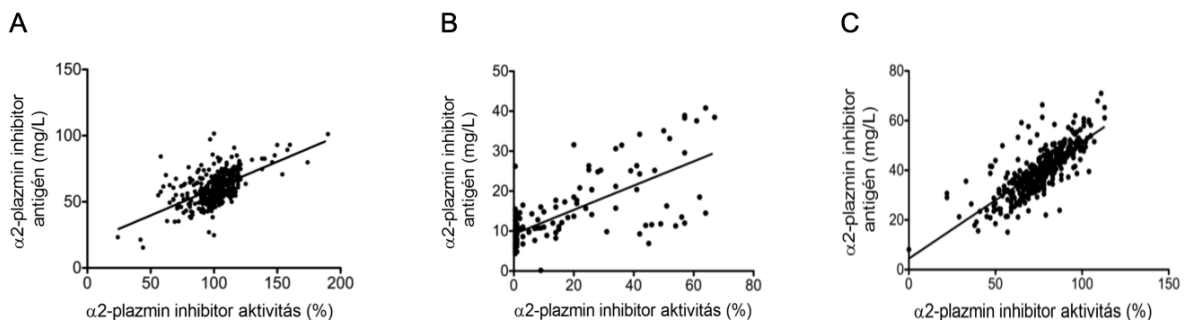
**26. ábra. A plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) aktivitás (A) és a PAI-1 antigén (B) szintek felvételtkor, közvetlenül a trombolízis után, és 24 órával a trombolízis után a vizsgált kohorszban.** A körök a PAI-1 aktivitás medián értékeit, a négyzetek a PAI-1 antigén szintek mediánjait mutatják különböző időpontokban, a bajuszok az interkvartilis tartományokat jelölik mindkét panelen. A referencia intervallumok felső és alsó határát szaggatott vonalak jelzik. Statisztika: Friedman kétmintás ANOVA-teszt és Dunn-Bonferroni post hoc teszt. \*\*\* $p<0,0001$

Az  $\alpha 2$ -PI aktivitás és antigénszintek a második vizsgált kohorszban a trombolízis előtt, közvetlenül lízis után és 24 órával a lízist követően a 27. ábrán láthatók. A felvételtkori  $\alpha 2$ -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. Amint az a 27. ábrán látható, 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).



**27. ábra.  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor ( $\alpha$ 2-PI) aktivitás (A) és antigén szintek (B) AIS betegekben a trombolízis során.** Az  $\alpha$ 2-PI aktivitás (kör) és antigén (négyzet) szinteket felvételtkor (fekete alakzatok), közvetlenül trombolízis után (fehér alakzatok) és 24 órával a trombolízist követően (fekete-fehér alakzatok) határoztuk meg. A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. Sztatistika: Friedman kétmintás ANOVA-teszt és Dunn-Bonferroni post hoc teszt. \*\*\* $p < 0,001$

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 (28. C ábra). Érdekes módon ebben a kohorszban a felvételtkori 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;  $p < 0,001$ ) (28. A és B ábra).



**28. ábra.  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor ( $\alpha$ 2-PI) aktivitás és antigén szintek közötti korreláció a vizsgált kohorszban trombolízis előtt (A), közvetlenül a trombolízis után (B) és 24 órával a trombolízist követően (C).**

### 5.1.3 A vizsgált hemosztázis tényezők összefüggése a stroke súlyosságával és etiológiájával

Súlyosabb AIS esetén (NIHSS 6-16 és NIHSS >16) a felvételnél mért VWF antigén szintek szignifikánsan magasabb értéket mutattak az enyhébb esetekhez (NIHSS 0-5) képest (9. táblázat). A VWF szintek a súlyosabb stroke csoportok esetén további, szignifikáns emelkedést mutattak a trombolízis 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 korrigálást követően is (aktív dohányzás, CRP, kor).

**9. táblázat. FVIII aktivitás és VWF antigén szintek a felvételnél meghatározott stroke súlyosság szerint csoportosítva**

Stroke súlyossága felvételnél	NIHSS 0-5 n=36	NIHSS 6-16 n=75	NIHSS >16 n=17	p	p*
<b>FVIII aktivitás (%)</b>					
felvételnél	175,5 (145,0-209,3)	186,0 (155,0-238,0)	212,0 (165,5-352,0)	0,162	<b>0,046</b>
közvetlenül trombolízis után	108,0 (47,0-148,0)	92,0 (70,0-152,0)	114,0 (51,5-201,0)	0,571	0,400
24 órával trombolízis után	159,0 (115,5-188,5)	162,0 (134,0-208,0)	172,0 (134,0-234,0)	0,292	0,163
<b>VWF antigén (%)</b>					
felvételnél	189,6 (151,9-233,2)	199,6 (176,4-250,8)	247,8 (199,9-353,8)	<b>0,013</b>	<b>0,013</b>
közvetlenül trombolízis után	172,2 (141,2-257,0)	229,2 (166,6-293,6)	276,8 (219,1-375,5)	<b>0,008</b>	<b>0,011</b>
24 órával trombolízis után	181,4 (156,9-246,8)	235,9 (188,3-292,7)	261,7 (192,4-366,8)	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>

Az adatok medián értékei és interkvartilis tartományai vannak feltüntetve. A stroke súlyosságának kategóriáit korábbi szakirodalmi adatok szerint határoztuk meg (253, 254). FVIII: VIII-as faktor, NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale, VWF: von Willebrand faktor. p: statisztikai szignifikancia Kruskal-Wallis-teszt alapján. p\*: kovariáns tényezőkre (aktív dohányzás, CRP, kor) való adjusztálás után meghatározott statisztikai szignifikancia (ANCOVA a változók logaritmikus transzformálását követően)

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 (10. táblázat). 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.

**10. táblázat. A trombolízis folyamán meghatározott FVIII aktivitás és VWF antigén szintek, valamint a trombolízis után 24 órával meghatározott ASPECTS kapcsolata**

<b>ASPECTS 24 órával trombolízis után</b>				
	<b>ASPECTS 10-8 n=55</b>	<b>ASPECTS 7-0 n=38</b>	<b>p</b>	<b>p*</b>
<b>FVIII aktivitás (%)</b>				
felvételnél	171,0 (135,0-192,0)	194,0 (168,0-299,5)	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>
közvetlenül trombolízis után	92,0 (55,5-147,5)	114,0 (66,0-177,0)	0,141	0,256
24 órával trombolízis után	156,0 (121,0-182,0)	198,0 (158,0-246,0)	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>VWF antigén (%)</b>				
felvételnél	191,5 (161,6-231,7)	223,2 (175,1-268,6)	<b>0,012</b>	<b>0,018</b>
közvetlenül trombolízis után	199,2 (146,3-261,8)	255,2 (200,6-326,3)	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>
24 órával trombolízis után	197,8 (174,2-259,6)	257,4 (205,1-320,1)	<b>0,003</b>	<b>0,017</b>

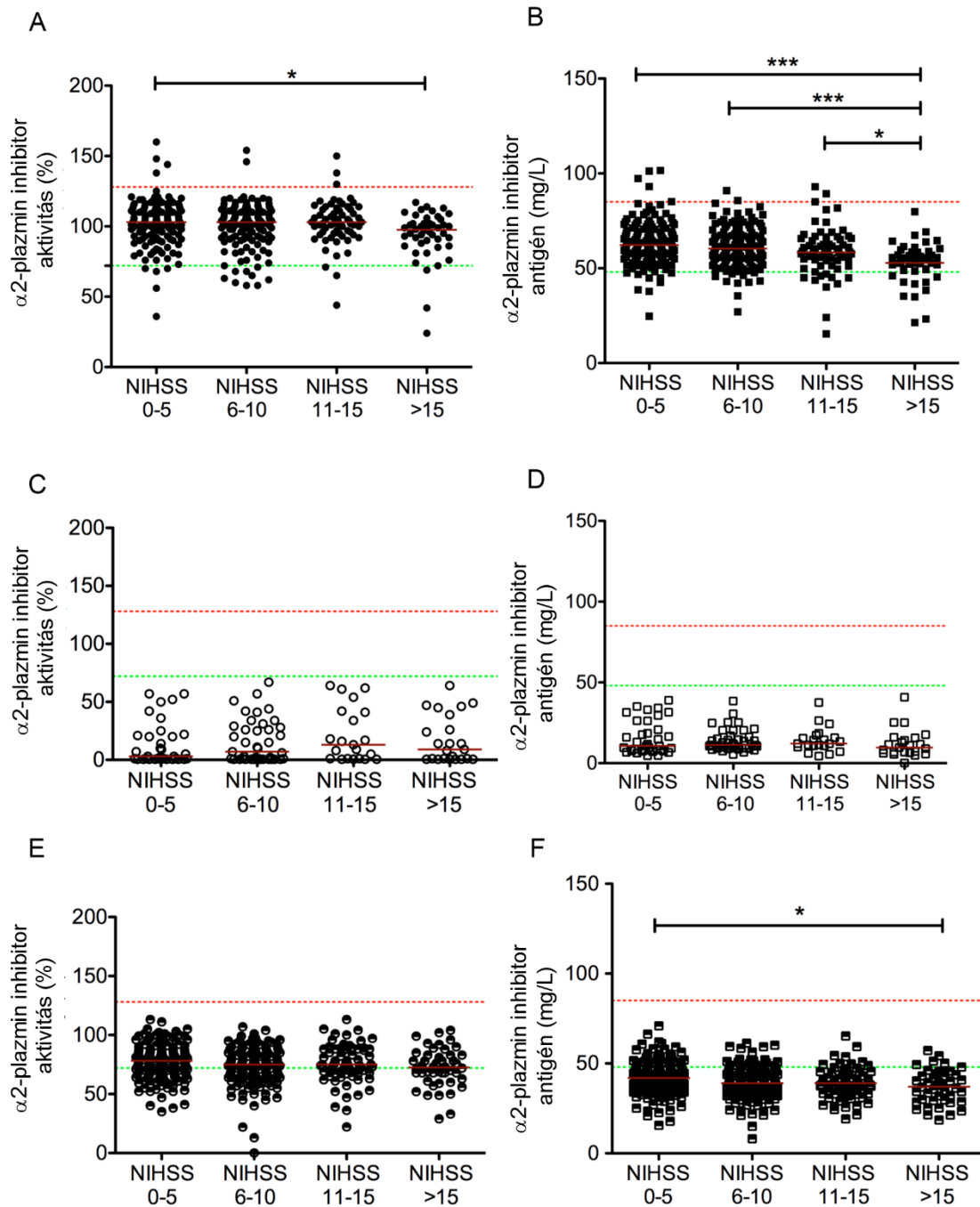
Az adatok medián értékei és interkvartilis tartományai vannak feltüntetve. A 24 órával a trombolízis után meghatározott adatokat aszerint dichotomizáltuk, hogy nincsenek/enyhe ischaemiás jelek vannak (ASPECTS 10-8) vagy közepesen súlyos/súlyos ischaemiás jelek vannak (ASPECTS 7-0), korábbi irodalom alapján (255, 256). ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT Score, FVIII: VIII-as faktor, VWF: von Willebrand faktor. p: a statisztikai szignifikancia Mann-Whitney U teszttel, p\*: kovariáns tényezőkre (aktív dohányzás, CRP, kor) való adjusztálás után meghatározott statisztikai szignifikancia (ANCOVA használata a változók logaritmikus transzformálását követően)

A TOAST kritériumok által meghatározott etiológiai altípusok és a FVIII aktivitás, ill. a VWF antigén szintek között nem találtunk szignifikáns kapcsolatot (ennek eredményei nem kerülnek bemutatásra).

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 felvételtkor  $\alpha 2$ -PI szintek szignifikáns összefüggést mutattak a stroke súlyosságával (29. ábra).

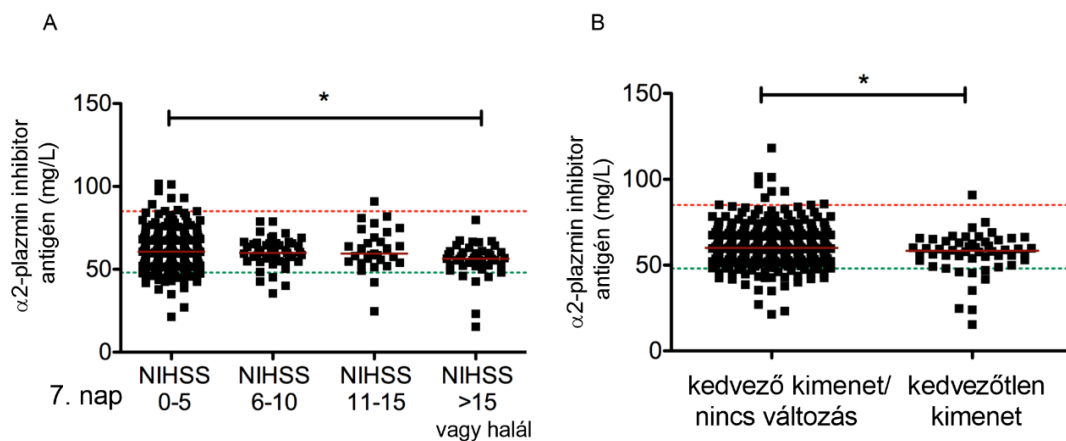


**29. ábra.** A trombolízis során különböző időpontokban mért  $\alpha 2$ -plazmin inhibitor ( $\alpha 2$ -PI) aktivitás és antigén szintek és a stroke súlyosságának kapcsolata AIS betegekben. Az  $\alpha 2$ -PI aktivitás szinteket a stroke súlyossága szerinti csoportokba sorolva trombolízis előtt fekete körök (A), közvetlenül trombolízis után fehér körök (C), 24 órával a trombolízist követően fekete-fehér körök (E) mutatják. Az  $\alpha 2$ -PI antigén szinteket a stroke felvételtkor súlyossága szerint csoportosítva a trombolízis előtt fekete négyzetek (B), közvetlenül trombolízis után fehér négyzetek (D), 24 órával a trombolízist követően fekete-fehér négyzetek (F) mutatják. A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale. Statisztika: Kruskal-Wallis és Dunn's post hoc teszt. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$

Azok a betegek, akik a felvételi NIHSS értékük alapján súlyosabb stroke-ban szenvedtek, szignifikánsan alacsonyabb  $\alpha$ 2-PI szinttel rendelkeztek (29. A és B ábra). Fordított, lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető a stroke súlyossága és a felvételi  $\alpha$ 2-PI antigénszintek között (29. B ábra), hasonló, de gyengébb összefüggést találtunk a lízis után 24 órával vett minták esetén (29. F ábra). A trombolízis után közvetlenül meghatározott  $\alpha$ 2-PI szintek nem mutattak szignifikáns összefüggést a stroke súlyosságával (29. C és D ábra). 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;  $p=0,024$ ).

#### 5.1.4 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 (30. ábra).



**30. ábra. A trombolízis előtti  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor ( $\alpha$ 2-PI) antigén szintek és a trombolízis rövid távú kimenetelének kapcsolata.** Az  $\alpha$ 2-PI antigén szinteket a 7. napon meghatározott stroke súlyosság (NIHSS) szerint (A) vagy az NIHSS 7. napig bekövetkező változása szerint (B) kategorizáltuk. 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. A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale. Statisztika: Kruskal-Wallis és Dunn's post hoc teszt. \* $p<0,05$

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).

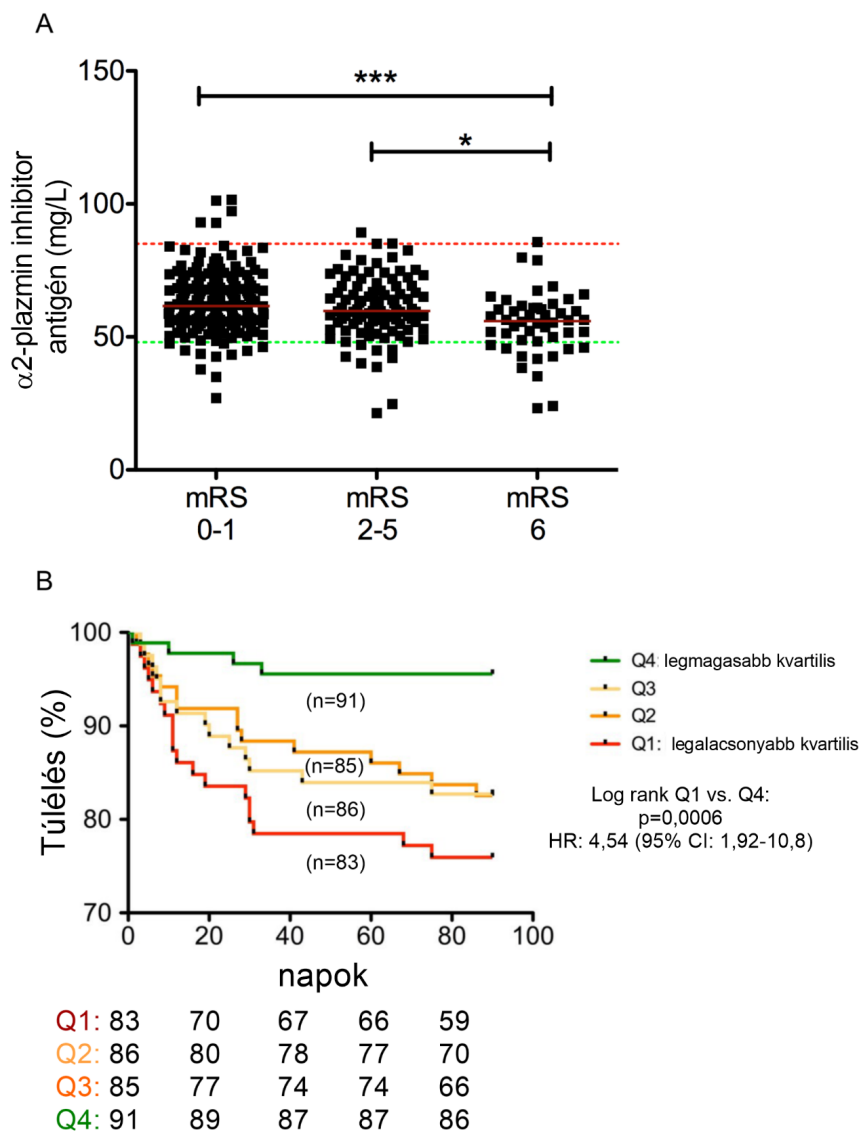
Bináris backward logisztikus modellünk eredményei szerint az első vizsgált kohorszban a közvetlenül a trombolízis után ill. a 24 órával a trombolízis után vizsgált, referencia tartomány fölötti FVIII aktivitás és VWF antigén szignifikánsan és függetlenül jelezte a kedvezőtlen hosszú távú funkcionális kimenetel nagyobb esélyét (11. táblázat). 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 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) (257).

**11. táblázat. FVIII aktivitás és VWF antigén szintek kapcsolata a 90. napon meghatározott kedvezőtlen kimenetellel (mRS  $\geq 3$ )**

	OR	95% CI	p
<b>FVIII aktivitás &gt;168%*</b>			
felvételnél	2,24	0,81-6,21	0,122
közvetlenül trombolízis után	7,10	1,77-28,38	<b>0,006</b>
24 órával trombolízis után	4,67	1,42-15,38	<b>0,011</b>
<b>VWF antigén &gt;160%*</b>			
felvételnél	2,52	0,65-9,73	0,180
közvetlenül trombolízis után	6,31	1,83-21,73	<b>0,003</b>
24 órával trombolízis után	19,02	1,94-186,99	<b>0,012</b>

CI: konfidencia intervallum, FVIII: VIII-as faktor, mRS: módosított Rankin Skála, OR: esély hányados VWF: von Willebrand faktor. A backward többszörös logisztikus regressziós modell a következőket tartalmazta: kor >75 év, nem, CRP >5.2 mg/L, aktív dohányzás, diabetes mellitus, NIHSS >5 felvételnél. \*referencia tartomány felső határa

Az egyéb vizsgált hemosztázis paraméterek közül kizárólag a felvételnél  $\alpha 2$ -PI szintek mutattak összefüggést az előre meghatározott kedvezőtlen funkcionális kimenetellel (31. A ábra). Azok a betegek, akik elhunytak (mRS 6) vagy kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel rendelkeztek (mRS 2-5), szignifikánsan alacsonyabb  $\alpha 2$ -PI-antigénszinttel rendelkeztek felvételnél azon betegekhez 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;  $p < 0,001$ ) (31. B ábra).



**31. ábra. A trombolízis előtti  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor ( $\alpha$ 2-PI) antigén szintek és a trombolízis hosszú távú kimenetelének kapcsolata (A). Kaplan Meier túlélési görbék a trombolízis előtti  $\alpha$ 2-PI antigén szintek kvartilisei szerint (B). Az AIS betegek felvételekor mért  $\alpha$ 2-PI antigén szinteket a 3. hónap végén meghatározott módosított Rankin Skála (mRS) szerint kategorizáltuk (A). Az mRS 0-1 értékeket tekintettük kedvező kimenetelnek, az mRS 6 a mortalitást jelöli. A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. Statisztika: Kruskal-Wallis és Dunn's post hoc teszt. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . A Kaplan-Meier túlélési görbéket a trombolízis előtti  $\alpha$ 2-PI antigén szintek kvartilisei szerint (Q1-Q4) képeztük (B). A rizikónak kitett esetszámok (number at risk) az ábra alatti táblázatban láthatóak az egyes kvartiliseknek megfelelően. A felső kvartilisbe (Q4, zöld vonal), középső kvartilisekbe (Q3 és Q2, világos ill. sötét narancs vonalak), és a legalsó kvartilisbe (Q1, piros vonal) tartozó eredményeket a következő határértékek szerint csoportosítottuk: 67,4 mg/L, 60 mg/L, és 54,1 mg/L  $\alpha$ 2-PI antigén szint. HR: hazard ratio**

Backward bináris logisztikus regressziós modellt használva (1. modell: hiperlipidémia, BMI, diabetes mellitus, nem és CRP) kimutattuk, hogy a felvételkor 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

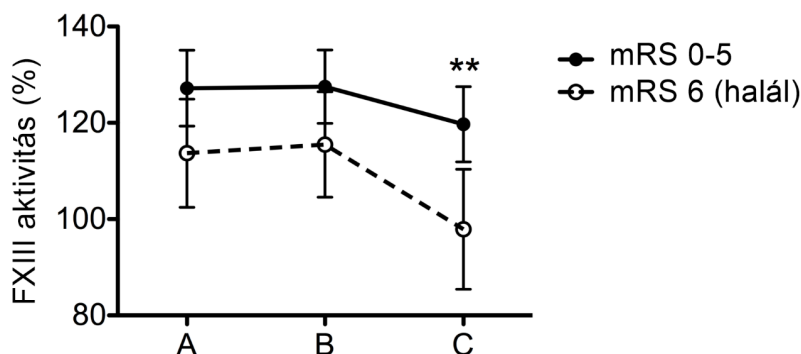
trombolízis után (OR: 2,22; 95% CI: 1,15-4,31; p=0,018) (12. táblázat). Amikor azonban az életkort és az NIHSS-t is bevettük a modellekbe (12. táblázat, 2. és 3. modell), az  $\alpha$ 2-PI antigénszint hatása már nem bizonyult szignifikánsnak, és csak az életkor és az NIHSS maradt a modellben mindkét kimenetel független prediktoraként.

**12. táblázat. A kedvezőtlen hosszú távú kimenet és a 3. hónap végéig bekövetkező halálozás független prediktorai a vizsgált kohorszban**

	Kedvezőtlen kimenet (mRS 0-1 vs. mRS 2-6)			Halál a stroke-ot követő 90. napig (mRS 0-5 vs. mRS 6)		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
<b>Modell 1<sup>§</sup></b>						
$\alpha$ 2-plazmin inhibitor antigén alsó kvartilis	2,10	1,21-3,66	<b>0,008</b>	2,22	1,15-4,31	<b>0,018</b>
Diabetes mellitus	2,18	1,29-3,68	<b>0,004</b>			
CRP				1,02	0,99-1,04	0,099
<b>Modell 2<sup>#</sup></b>						
Diabetes mellitus	2,10	1,22-3,62	<b>0,008</b>			
Kor	1,05	1,03-1,07	<b>&lt;0,001</b>	1,11	1,07-1,15	<b>&lt;0,001</b>
CRP				1,03	1,00-1,05	<b>0,028</b>
<b>Modell 3<sup>†</sup></b>						
Kor	1,04	1,02-1,06	<b>&lt;0,001</b>	1,08	1,04-1,27	<b>&lt;0,001</b>
NIHSS	1,17	1,10-1,24	<b>&lt;0,001</b>	1,17	1,09-1,25	<b>&lt;0,001</b>
Diabetes mellitus	2,05	1,16-3,62	<b>0,014</b>			

A táblázat a backward többszörös regressziós modell utolsó lépéseit mutatja. A nem dichotom változók esetén az eredmények a következő egységekre értendők: CRP: 1 mg/L emelkedésre vonatkoztatva, kor: 1 évvel való emelkedésre vonatkoztatva, NIHSS: 1 ponttal való emelkedésre vonatkoztatva. A modellek kiindulási elemei: Modell 1<sup>§</sup>: nem, hiperlipidémia, BMI, diabetes mellitus, C reaktív protein szint és  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor antigén a legalsó kvartilisban (határérték: <54.1 mg/L). Modell 2<sup>#</sup>: Modell 1 és kor. Modell 3<sup>†</sup>: Modell 2 és NIHSS. 95% CI: 95%-os konfidencia intervallum, CRP: C reaktív protein, mRS: módosított Rankin Skála, NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale, OR: odds ratio

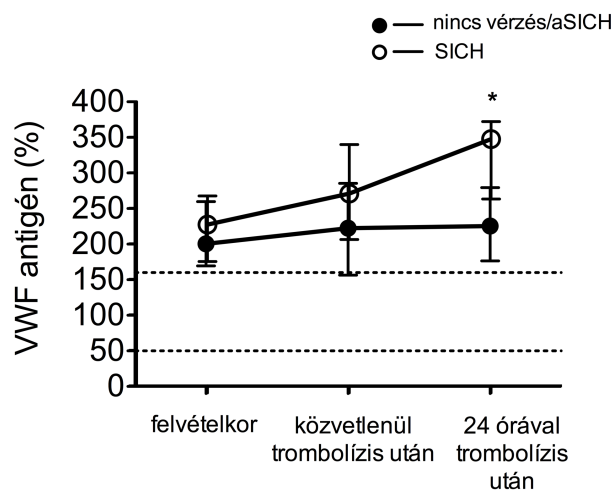
Bár többszörös logisztikus regressziós analízis szerint a FXIII szintek egyik vizsgált időpontban sem bizonyultak a hosszú távú kimenetel független előrejelzőjének, megjegyzendő, hogy a FXIII szintek a lízis után 24 órával szignifikánsan alacsonyabbak voltak azoknál a betegeknél, akik az eseményt követő 3. hónap végéig elhunytak (32. ábra).



**32. ábra. A FXIII szintek változása a trombolízis során a különböző hosszú távú kimenetelű betegek esetén. A FXIII aktivitás értékek átlag (kör) és 95%-os konfidencia intervallum (bajusz)**

formájában vannak feltüntetve trombolízis előtt (A), közvetlenül a trombolízis után (B), és 24 órával a trombolízist követően (C) a különböző hosszú távú kimenetelű betegek esetén. A fekete körök reprezentálják a harmadik hónap végén mRS 0-5 értékekkel rendelkező betegeket (n=80), a fehér körök a harmadik hónap végére elhunyt betegek (mRS 6, n=29) értékeit mutatják. mRS: módosított Rankin Skála. Statisztika: Student's t teszt. \*\*p<0,01, mRS 0-5 vs. mRS 6

*Intrakraniális hemorrhagia kialakulása.* A trombolízissel kapcsolatba hozható vérzéses szövödményekkel a vizsgált hemosztázis paraméterek közül csak a trombolízist követően emelkedett VWF antigén szintek és a felvételtkor 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) (33. ábra).

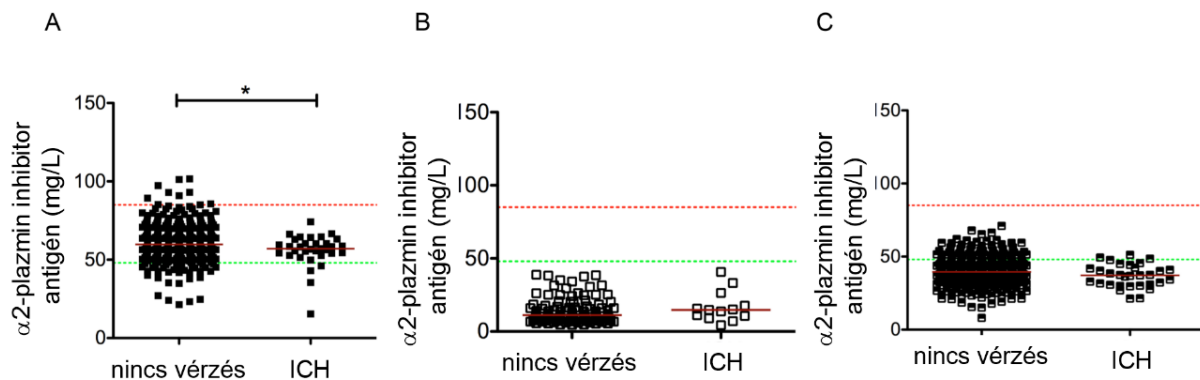


**33. ábra.** A von Willebrand faktor (VWF) antigén szintjének változása a trombolízis során, intrakraniális vérzés (SICH) esetén, valamint intrakraniális vérzéses komplikációk nélküli vagy tünettel nem járó intrakraniális vérzés (aSICH) esetén. A kórházi felvételtkor, közvetlenül trombolízis után és a 24 órával trombolízis után gyűjtött mintákból származó eredmények medián értékei körrel, az interkvartilis tartományok bajusszal vannak ábrázolva. Üres körrel vannak feltüntetve a SICH, teli körrel pedig a vérzéssel nem járó és aSICH esetek. Szaggatott vonalak jelölik a VWF referencia tartományának (50-160%) alsó és felső határait. Statisztika: Mann-Whitney U teszt. \*p<0,05 a SICH és nincs vérzés/aSICH csoport összehasonlításakor

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 szövödmény (34. A ábra). Ez az összefüggés nem volt megfigyelhető a betegek lízis utáni mintáiban (34. B és C ábra) ill. az  $\alpha$ 2-PI aktivitás esetén egyik mért időpontban sem. A felvételtkori medián  $\alpha$ 2-PI antigénszintek közötti különbség, bár szignifikáns, de csekély mértékű volt a lízist követően agyvérzett ill. a szövödménymentes 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 felvételtől  $\alpha$ 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;  $p<0,001$ ).



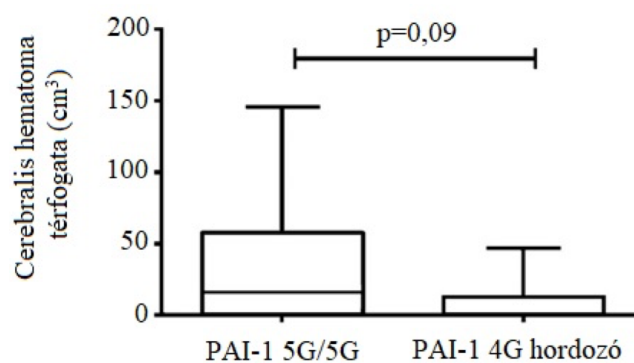
**34. ábra. A trombolízis előtti (A) közvetlenül lízis utáni (B) ill. 24 órával a lízis utáni (C)  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor ( $\alpha$ 2-PI) antigén szintek és a trombolízist követő hemorrhagiás transzformáció (ICH) kialakulásának kapcsolata.** A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. ICH: intracerebrális hemorrhagia. Statisztika: Mann-Whitney U teszt. \* $p<0,05$

### 5.1.5 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 (258). A korábbi irodalmi adatokkal összehangban (53) 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 hordozókhoz 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 (adatok

nincsenek bemutatva). 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 kimenettel 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 (az adatok nincsenek bemutatva).

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 (elemei: 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 hordozókhoz 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  $\text{cm}^3$ ;  $p=0,09$ ) (35. ábra).



**35. ábra. A trombolízis utáni vérzéses transzformáció becsült térfogata, PAI-1 4G/5G genotípustól függően.** A PAI-1 5G/5G genotípusú betegeknél a lízis utáni intrakraniális vérzés térfogatának mediánja tendenciában nagyobb volt a PAI-1 4G hordozókhoz képest, de a különbség nem érte el a szignifikancia mértékét. A doboz-bajusz ábrák a mediánt, az interkvartilis tartományt és a teljes tartományt mutatják. Mindkét csoport hat beteget tartalmazott. Egy beteg esetében a hematoma térfogatát nem számoltuk, mivel subarachnoideal is vérzést szenvedett.

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

### 5.1.6.1 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 (13. táblázat). 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 (259).

A FXIII-A Leu34 allélje 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).

**13. táblázat. A harmadik vizsgált kohorsz (eset-kontroll tanulmány) klinikai alapadatai a clot burden score (CBS) alapján**

	CBS 0-9	CBS 10	p
Betegek száma	100	100	
Kor (év), medián (IQR)	71 (62-79)	69 (62-76)	0,156
Férfi nem, n (%)	51 (51)	51 (51)	0,671
<b>Stroke rizikófaktorkok, n (%)</b>			
Hipertónia	85 (85)	86 (86)	0,841
Pitvarfibrilláció	26 (26)	16 (16)	0,083
Előző stroke	20 (20)	28 (28)	0,185
Hiperlipidémia	56 (56)	66 (66)	0,147
Diabetes mellitus	25 (25)	28 (28)	0,631
BMI, átlag (SD)	28,12 (5,19)	27,87 (6,49)	0,766
Dohányzás, n (%)			
Nem dohányzó	59 (59)	71 (71)	
Korábbi dohányos	16 (16)	2 (2)	<b>0,002</b>
Jelenleg dohányos	19 (19)	26 (26)	
Nem ismert	6 (6)	1 (1)	
<b>Trombolízis terápia (intravénás rt-PA)</b>			
Tünetek kezdetétől a kezelésig eltelt idő (perc), átlag (SD)	144 (115-176)	145 (109-183)	0,523
rt-PA dózis (mg), medián (IQR)	67 (57-81)	68 (58-80)	0,988
NIHSS, medián (IQR)	11 (8-16)	7 (4-10)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Laboratóriumi vizsgálatok, medián (IQR)</b>			
Felvételi INR	0,96 (0,94-1,04)	0,97 (0,93-1,03)	0,613
Felvételi APTI (sec)	27,7 (25,9-31,2)	27,6 (25,6-30,0)	0,583
Felvételi WBC (G/L)	7,84 (6,44-9,40)	8,02 (6,52-9,54)	0,530
Felvételi trombocitaszám (G/L)	215 (177-266)	212 (179-254)	0,438
Felvételi glükóz (mmol/L)	6,7 (5,8-8,1)	6,4 (5,6-7,9)	0,439
Felvételi hsCRP (mg/L)	4,3 (2,1-8,6)	2,6 (1,4-6,0)	<b>0,017</b>
Felvételi kreatinin (µmol/L)	78 (66-96)	79 (68-90)	0,870
Felvételi plazminogén aktivitás (%)	112 (92-133)	97 (88-118)	<b>0,032</b>
24 órás plazminogén aktivitás (%)	91 (78-105)	89 (81-101)	0,728
Felvételi α2-PI aktivitás (%)	101 (94-110)	101 (89-109)	0,494
24 órás α2-PI aktivitás (%)	74 (67-86)	76 (67-86)	0,305
Felvételi D-dimer szint (mg FEU/L)	0,82 (0,53-1,46)	0,70 (0,50-1,60)	0,431
24 órás D-dimer szint (mg FEU/L)	2,69 (1,37-4,92)	1,85 (1,03-5,17)	0,101
Felvételi fibrinogén szint (g/L)	3,88 (3,47-4,62)	3,91 (3,20-4,55)	0,468
24 órás fibrinogén szint (g/L)	3,73 (2,99-4,31)	3,76 (3,18-4,31)	0,848
Felvételi FXIII aktivitás (%) átlag (SD)	120 (34)	129 (52)	0,137
24 órás FXIII aktivitás (%)	114 (86-133)	104 (81-130)	0,168
Faktor XIII-A Leu34 hordozó n (%)	36 (36)	52 (52)	<b>0,023</b>
<b>Stroke etiológia (TOAST), n (%)</b>			
Nagyér ateroszklerózis	72 (72)	22 (22)	
Kisérbetegség	0 (0)	18 (18)	<b>&lt;0,001</b>
Kardioembóliás	16 (16)	16 (16)	
Egyéb/Nem ismert	12 (12)	44 (44)	

**Folytatás a következő oldalon**

**13. táblázat. A harmadik vizsgált kohorsz (eset-kontroll tanulmány) klinikai alapadatai a clot burden score (CBS) alapján (folytatás)**

Képző adatok, n (%)			
Felvételi ASPECTS			
0-7	4 (4)	0 (0)	0,059
8-10	93 (96)	98 (100)	
24 órás ASPECTS			
0-7	51 (53)	8 (8)	<0,001
8-10	46 (47)	90 (92)	
Kimenetek, n (%)			
Rövid távú kimenetel ( $\Delta$ NIHSS, 7 nap)			
Kedvező (legalább -4 pont vagy 0)	39 (39)	53 (53)	0,001
Változatlan státusz ( $\pm$ 3 pont)	33 (33)	35 (35)	
Kedvezőtlen kimenetel (legalább +4 pont vagy halál)	28 (28)	8 (8)	
Nem ismert	0 (0)	4 (4)	
Hosszú távú kimenetel (mRS, 90 nap)			
Kedvező (mRS 0-2)	34 (34)	67 (67)	<0,001
Kedvezőtlen (mRS 3-6)	61 (61)	31 (31)	
Nem ismert	5 (5)	2 (2)	
Intrakraniális vérzés (ECASS II)			
Nincs vérzés	89 (89)	93 (93)	0,226
aSICH	4 (4)	5 (5)	
SICH	7 (7)	2 (2)	

Az adatok medián (IQR) vagy esetszám (százalék) értékek formájában vannak feltüntetve.  $\alpha$ 2-PI:  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor, APTI: aktivált parciális tromboplasztin idő, aSICH: aszimptomatikus intrakraniális vérzés, ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT Score, CBS: clot burden score, ECASS II: European Co-operative Acute Stroke Study II, hsCRP: nagy érzékenységű C reaktív protein vizsgálat, INR: nemzetközi normalizált ráta, IQR: interkvartilis tartomány, mRS: módosított Rankin Skála, NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale, rt-PA: rekombináns szöveti plazminogén aktivátor, SD: standard deviáció, SICH: szimptomás intrakraniális vérzés, TOAST: Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment, WBC: fehérvérsejtszám

*5.1.6.2 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 (az adatok nincsenek táblázatban bemutatva). A FXIII-A Leu34 allél szignifikánsan gyakoribb volt a CBS 10-es betegcsoportban, a polimorfizmus ugyanakkor nem mutatott összefüggést a rövid távú kimenetekkel. 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 (14. táblázat).

**14. táblázat. A trombolízis kedvezőtlen rövid távú kimenetelének független prediktorai a vizsgált kohorszban**

	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>p</b>
Kor	1,03	1,00-1,05	<b>0,049</b>
Felvételi NIHSS	0,93	0,86-0,97	<b>0,005</b>
CBS (0-9 vs. 10)	2,78	1,44-5,36	<b>0,002</b>

A kedvezőtlen rövid távú kimenetelt az NIHSS legalább 4 pontos csökkenése vagy növekedése, ill. a halálozás alapján definiáltuk a trombolízist követő 7. napon. A backward, többszörös regressziós modell tartalmazta az életkort, a nemet, a korábbi stroke-ot, a felvételi plazminogén aktivitást, a CBS pontszámot (CBS 0-9 vs. CBS 10). A nem dichotom változók esetén az eredmények a következő egységekre értendők: kor: 1 évvel való emelkedésre vonatkoztatva, NIHSS: 1 ponttal való emelkedésre vonatkoztatva. CBS: clot burden score, CI: konfidencia intervallum, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale, OR: esélyhányados

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 (adatok nincsenek táblázatban bemutatva). A rövid távú kimenetel esetén megfigyeltekhez hasonlóan a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus nem mutatott összefüggést a hosszú távú kimenetekkel 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 (15. táblázat).

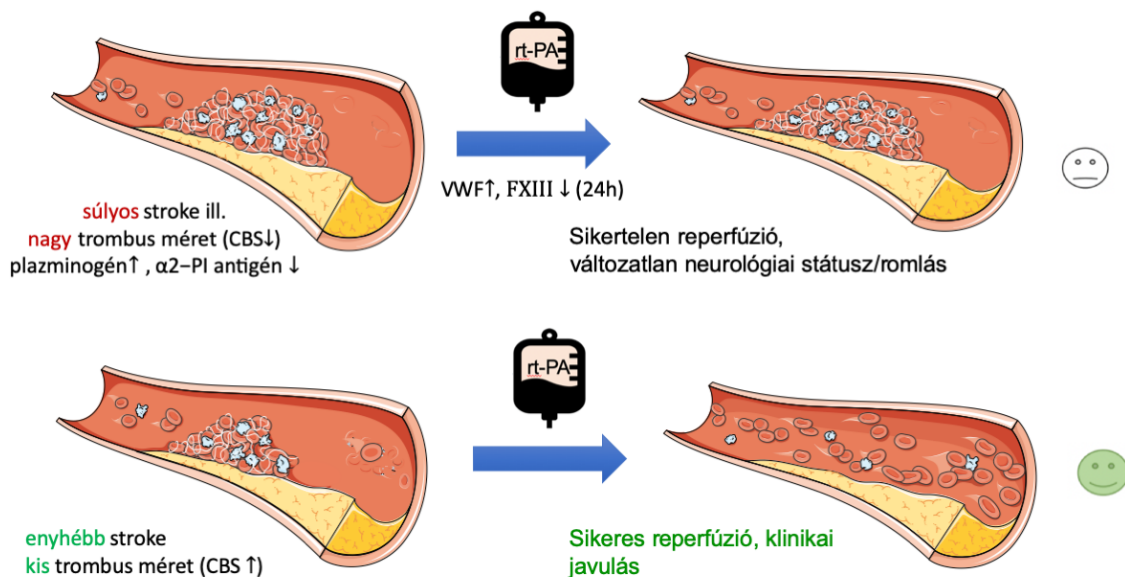
**15. táblázat. A trombolízis kedvezőtlen hosszú távú kimenetelének független prediktorai a vizsgált kohorszban**

	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>	<b>p</b>
Felvételi kreatinin szint	1,02	1,00-1,04	<b>0,043</b>
Felvételi NIHSS	1,12	1,04-1,21	<b>0,003</b>
Életkor	1,03	1,00-1,07	<b>0,048</b>
CBS (0-9 vs. 10)	2,50	1,18-5,31	<b>0,017</b>

A kedvezőtlen hosszú távú kimenetelt az mRS érték alapján definiáltuk 90 nappal a stroke a kialakulása után. Kedvezőtlennek tekintettük a hosszú távú kimenetelt, ha az mRS 3 és 6 pont közötti volt. A backward, többszörös regressziós modell tartalmazta az életkort, a nemet, a korábbi stroke-ot, a diabetes mellitust, a felvételi NIHSS értéket, a felvételi szérum glükóz koncentrációt, a felvételi CRP értéket, a felvételi kreatinin értéket, a felvételi D-dimer értéket, a felvételi fibrinogén szintet, a 24 órás FXIII aktivitást, a CBS pontszámot (CBS 0-9 vs. CBS 10). A nem dichotom változók esetén az eredmények a következő egységekre értendők: kreatinin: 1  $\mu$ mol/L emelkedésre vonatkoztatva, NIHSS: 1 ponttal való emelkedésre vonatkoztatva, életkor: 1 évvel való emelkedésre vonatkoztatva, CRP: 1 mg/L emelkedésre vonatkoztatva. CBS: clot burden score, CI: konfidencia intervallum, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale, OR: esélyhányados

### A részeredmények rövid összefoglalása:

Bár az általunk vizsgált fibrinolízis markerek szintjében megfigyelhetők szignifikáns eltérések az egyváltozós analízisek esetén a kedvezőtlen trombolízis kimenetellel társultan (pl. felvételtkor alacsony  $\alpha$ 2-PI antigén, alacsony FXIII szintek a lízis után 24 órával), a többváltozós analízisek eredménye alapján a trombolízis sikerének lényegesebb meghatározó tényezői a stroke súlyossága ill. maga a trombus mérete (36. ábra). A trombolízist követően közvetlenül a FVIII aktivitás, a PAI-1 aktivitás és  $\alpha$ 2-PI aktivitás nagymértékű, szignifikáns csökkenést mutattak, majd 24 órával később szintjük újra a kiindulási értékekhez közelített, melynek háttérében 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. Egyes megfigyelt hemosztázis eltérések eredményeink alapján feltehetőleg a trombus kialakulásának jelei ill. a protrombotikus állapothoz társuló konzumpció jeleként értékelhetők, de nem meghatározó tényezői a lízis kimenetelének. Kivételt képeznek a trombolízis után emelkedett VWF és FVIII szintek, melyek feltehetőleg a stroke következtében fellépő endothel károsodás mértékére utalnak és független előrejelzői a kedvezőtlen kimenetelnek.



**36. ábra. A trombolízis sikerének meghatározó tényezője a trombus mérete (sematikus összefoglaló ábra).**  $\alpha$ 2-PI:  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor, CBS: clot burden score, FXIII: faktor XIII, rt-PA: rekombináns szöveti típusú plazminogén aktivátor, VWF: von Willebrand faktor

### A részeredményeket megalapozó 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. 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)
3. 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)
4. **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)
5. 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)
6. 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)

### 5.1.7 Experimentális vizsgálatok a fibrinolízis regulációjának jobb megértése érdekében

#### 5.1.7.1 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 (62), 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 trombocitaszegény plazmát. A donorok demográfiai és klinikai jellemzőit genotípus szerint a 16. táblázat mutatja be. 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.

**16. táblázat. Az in vitro rekonstitúciós vérrög modellekben használt plazma minták donorainak alapvető demográfiai és hemosztázis laboratóriumi jellemzői**

	Összesített	FXIII <sup>Val/Val</sup>	FXIII <sup>Val/Leu</sup>	FXIII <sup>Leu/Leu</sup>	p
Esetszám (n)	86	40	28	18	
Nem (nő/férfi)	71/15	33/7	24/4	14/4	0,7868
Kor (év)	26,0 (23,0-38,8)	25,0 (21,0-36,8)	28,5 (23,8-38,3)	28,0 (23,8-46,3)	0,4053
FXIII aktivitás (%)	114 ± 20	114 ± 18	115 ± 26	110 ± 15	0,7127
Fibrinogén (g/L)	3,3 (2,9-4,2)	3,0 (2,7-3,7)	4,0 (2,9-4,5)	3,2 (2,9-4,5)	<b>0,0432</b> <b>0,0401*</b> <b>0,0443<sup>§</sup></b>
APTI (sec)	29,7 ± 2,9	29,7 ± 3,2	29,6 ± 2,6	29,8 ± 2,7	0,9546
PI (sec)	8,2 (7,8-8,6)	8,3 (7,9-8,6)	7,9 (7,6-8,8)	8,2 (8,1-8,4)	0,3436
<b>Trombin generációs paraméterek</b>					
Lag time (perc)	2,3 (2,0-2,7)	2,3 (2,0-2,7)	2,3 (2,0-2,8)	2,3 (2,0-2,3)	0,5985
Time to peak (perc)	4,7 (4,0-5,5)	4,7 (4,0-5,5)	4,7 (4,1-5,4)	4,8 (4,2-5,5)	0,9720
Peak thrombin (nM)	318 ± 93	317 ± 80	345 ± 107	283 ± 83	<b>0,0470</b> <b>0,0420<sup>#</sup></b>
ETP (nM*perc)	1393 (1211-1581)	1382 (1223-1581)	1498 (1368-1797)	1206 (1148-1363)	<b>0,0002</b> <b>0,0179*</b> <b>0,0001<sup>#</sup></b> <b>0,0085<sup>§</sup></b>

A folyamatos változók átlag± SD vagy medián (interkvartilis tartomány) formájában vannak feltüntetve. Az egyes genotípusok közötti különbségeket ANOVA és Bonferroni post-hoc teszt vagy Kruskal-Wallis és Dunn's post-hoc teszt segítségével határoztuk meg, normalitástól függően. p: többváltozós analízis szignifikancia eredmény, \*p: FXIII<sup>Val/Val</sup> vs. FXIII<sup>Val/Leu</sup>, #p: FXIII<sup>Val/Leu</sup> vs. FXIII<sup>Leu/Leu</sup>; §p: FXIII<sup>Val/Val</sup> vs. FXIII<sup>Leu/Leu</sup> a post-hoc tesztek eredményei alapján. APTI: aktivált parciális tromboplasztin idő, ETP: endogén trombin potenciál, FXIII: faktor XIII, PI: protrombin idő

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 (37. A ábra). A vérrögök

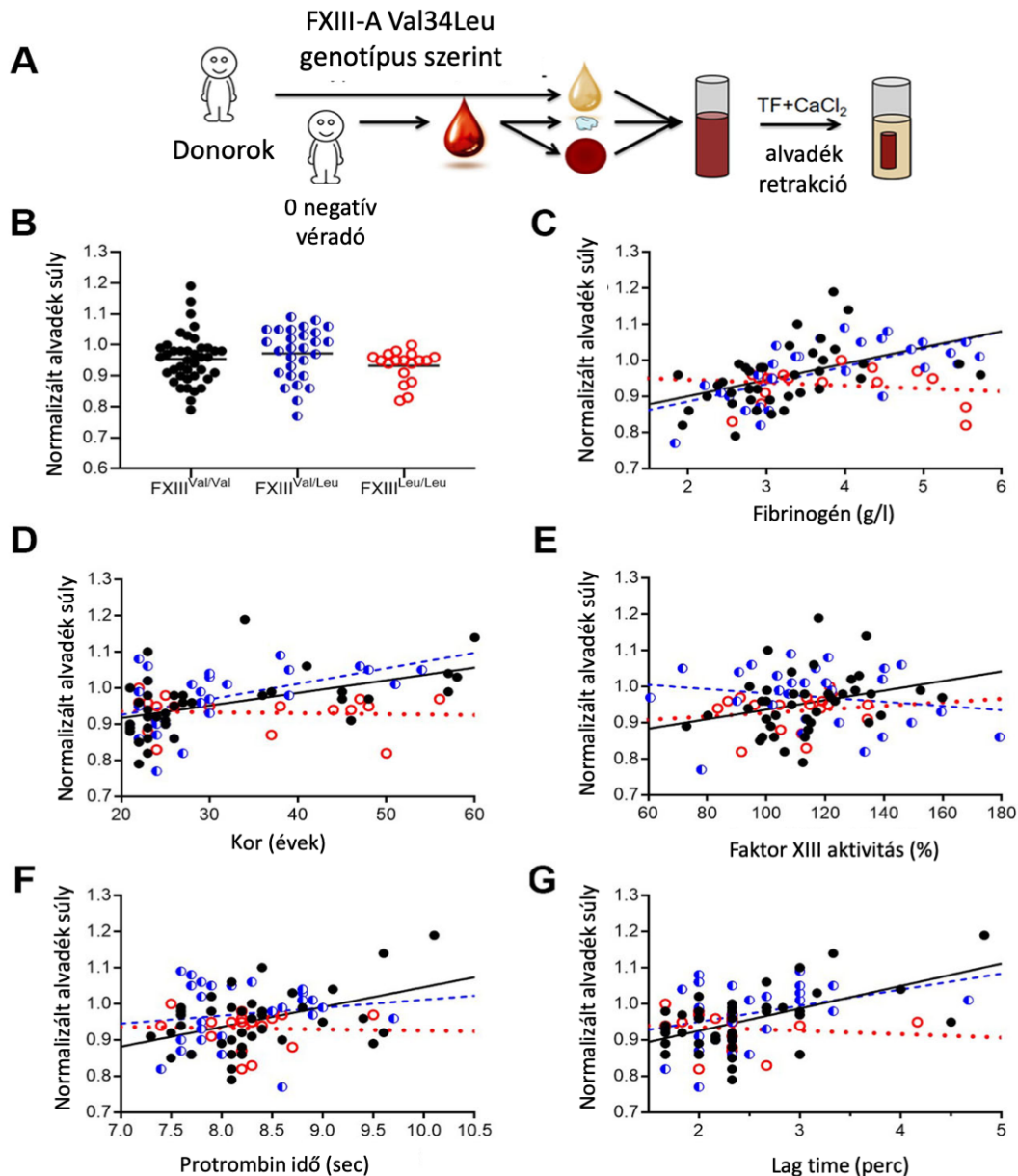
képződését és retrakcióját követően megmértük az egyes vérrögök tömegét. Az átlagos normalizált vérrög tömeg szignifikánsan korrelált az életkorral, a fibrinogénnel, a protrombin idővel és a trombin generációs paraméterek közül a lag time, time to peak és ETP paraméterekkel (17. táblázat).

**17. táblázat. A normalizált vérrög tömeg meghatározói az in vitro rekonstitúciós kísérletekben**

	Mind (n=86)		FXIII <sup>Val/Val</sup> (n=40)		FXIII <sup>Val/Leu</sup> (n=28)		FXIII <sup>Leu/Leu</sup> (n=18)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Kor (év)	0,3602	<b>0,0007</b>	0,5244	<b>0,0005</b>	0,4113	<b>0,0297</b>	-0,1488	0,5557
FXIII akt. (%)	0,1126	0,3019	0,3506	<b>0,0266</b>	-0,1700	0,3872	0,2193	0,3819
Fibrinogén (g/L)	0,5267	<b>&lt;0,0001</b>	0,5496	<b>0,0002</b>	0,6461	<b>0,0002</b>	-0,0298	0,9066
APTI (sec)	0,0573	0,6004	0,0286	0,8610	0,1230	0,5330	-0,1755	0,4862
PI (sec)	0,2248	<b>0,0374</b>	0,3127	<b>0,0495</b>	0,1017	0,6065	0,0614	0,8088
<b>Trombin generációs paraméterek</b>								
Lag time (perc)	0,3371	<b>0,0015</b>	0,4581	<b>0,0030</b>	0,2615	0,1790	-0,3436	0,1627
Time to peak (perc)	0,3036	<b>0,0045</b>	0,3159	<b>0,0471</b>	0,3595	0,0603	-0,1216	0,6306
Peak thrombin (nM)	-0,0531	0,6272	-0,0297	0,8556	-0,1061	0,5911	0,0606	0,8113
ETP (nM*perc)	0,2495	<b>0,0205</b>	0,2597	0,1056	0,0252	0,8986	0,2486	0,3199

APTI: aktivált parciális tromboplasztin idő, ETP: endogén trombin potenciál, PI: protrombin idő, r: Spearman korrelációs koefficiens

A különböző FXIII-A p.Val34Leu fenotípusú plazmákból képzett vérrögök tömegét összehasonlítva úgy találtuk, hogy az átlagos normalizált vérrögtömeg nem különbözött a csoportok között (37. B ábra). 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 (17. táblázat, 37. C ábra). 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 (17. táblázat, 37. D-G ábra).

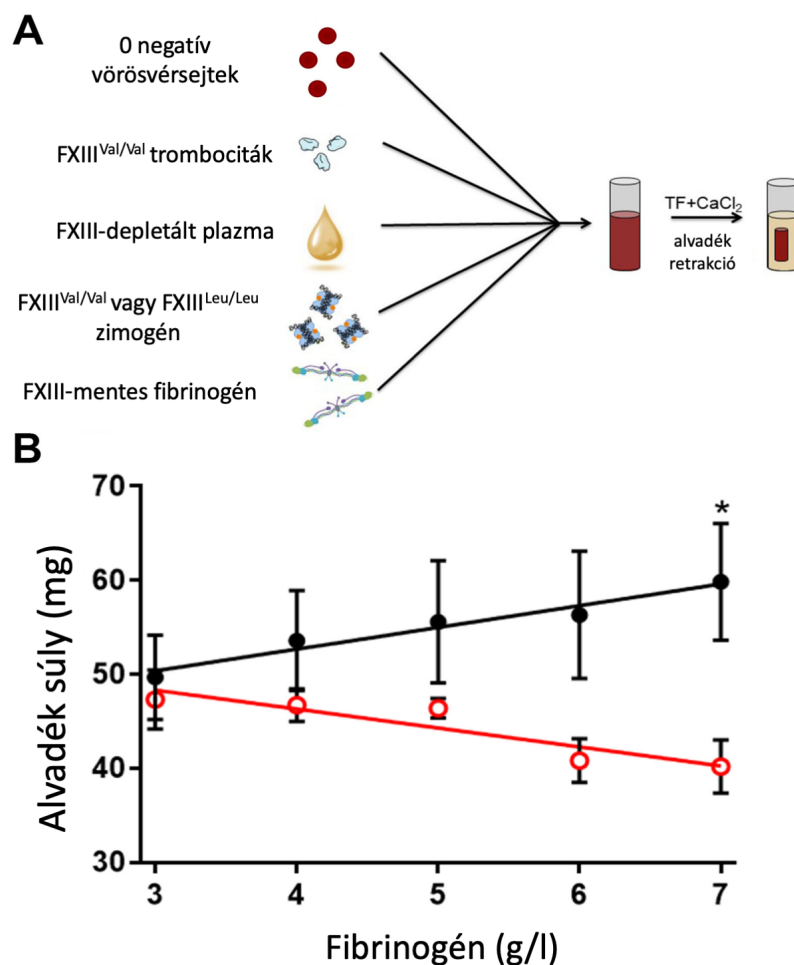


37. ábra. Különböző FXIII-A p.Val34Leu genotípusú donorok plazmaival rekonstituált teljes véralvadékok összetétele (A), az alvadékok normalizált tömege (B), és az alvadékok tömegét meghatározó tényezők a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus szerint (C-G). Nyolcvanhat egészséges donortól (40 FXIII<sup>Val/Val</sup>, 28 FXIII<sup>Val/Leu</sup>, és 18 FXIII<sup>Leu/Leu</sup>) szeparált vérlemezke szegény plazmához 0 negatív vércsoportú donortól származó vérlemezkéket és vörösvértesteket adtunk. Az alvadást szöveti faktor (TF)/foszfolipid és CaCl<sub>2</sub> hozzáadásával érték el, a kontrahált alvadékok súlyát lemértük (A). Az alvadékok súlyát a napok közötti variancia miatt normalizált súlyként tüntettük fel (B). A normalizált alvadék súlyokat a fibrinogén szint (C), kor (D), faktor XIII aktivitás (E), protrombin idő (F), és a trombin generáció lag time paramétere (G) függvényében ábrázoltuk. Jelmagyarázat: FXIII<sup>Val/Val</sup>: fekete teli körök, FXIII<sup>Val/Leu</sup>: kék félig-teli körök, FXIII<sup>Leu/Leu</sup>: piros nyitott körök ill. vonatkozó egyenesek. A fekete vízszintes vonalak a mediánt ábrázolják.

Tekintettel a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus fibrinszerkezetre gyakorolt módosító hatásaira, melyről korábban kimutatták, hogy fibrinogén koncentráció függő módon valósul meg (62, 260), 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 vörösvérttesteket, mosott vérlemezkéket (FXIII<sup>Val/Val</sup> donor) és FXIII-mentes fibrinogént használtunk, melyhez tisztított FXIII<sup>Val/Val</sup> vagy FXIII<sup>Leu/Leu</sup> zimogént adtunk (38. A ábra). 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<sup>2</sup>=0,9536, p<0,005, 38. B ábra). 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<sup>2</sup>=0,8416, p<0,03, 38. B ábra). 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.

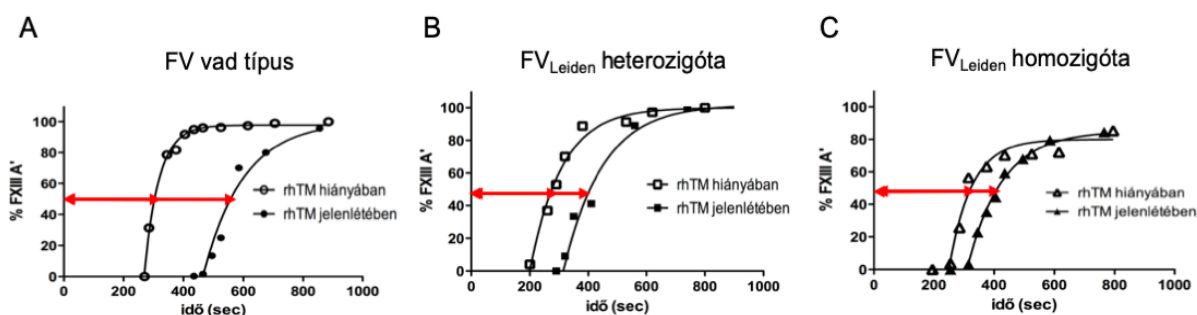


**38. ábra.** Tisztított FXIII zimogén hozzáadásával készült, *in vitro* rekonstituált teljes vérből kialakított alvadékokban a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus fibrinogén-koncentráció függő hatása az alvadékok súlyára. 0 negatív vércsoportú donor mosott vörösvértestjeit, FXIII<sup>Val/Val</sup> vérlemezkéket és FXIII-depletált plazmát kiegészítettünk tisztított FXIII<sup>Val/Val</sup> vagy FXIII<sup>Leu/Leu</sup> zimogénnel, és emelkedő koncentrációban FXIII-mentes fibrinogént adtunk a rendszerhez. Az alvadást szöveti faktor (TF)/foszfolipid és CaCl<sub>2</sub> hozzáadásával értük el, a kontrahált alvadékok súlyát lemértük (A). A FXIII<sup>Val/Val</sup> (fekete teli körök) és FXIII<sup>Leu/Leu</sup> (piros nyitott körök) felhasználásával képzett alvadékok súlyát a fibrinogén koncentráció függvényében ábrázoltuk. A körök és bajuszok három párhuzamos kísérlet átlag ± SEM értékeit mutatják. Statisztika: Student's t teszt. \*p<0,05

#### 5.1.7.2 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 α<sub>2</sub>-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 (39. ábra) (297).

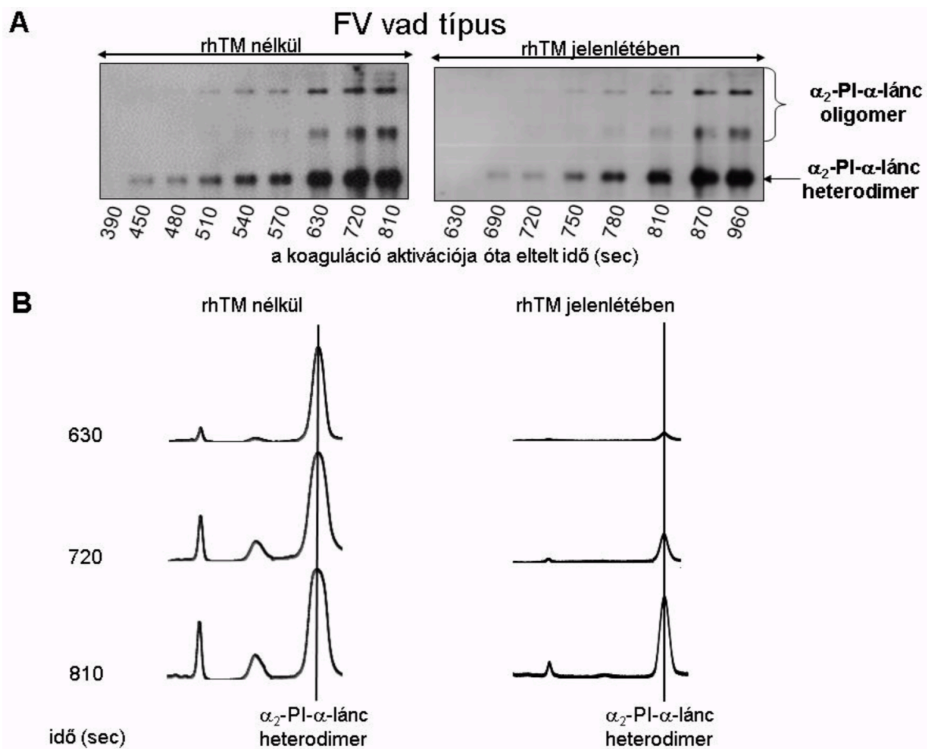


**39. ábra. A rekombináns humán trombomodulin (rhTM) hatása a FXIII aktivációjára különböző FV vad típusú (A), FV<sub>Leiden</sub> heterozigóta (B) és FV<sub>Leiden</sub> homozigóta (C) egyének plazmájában.**

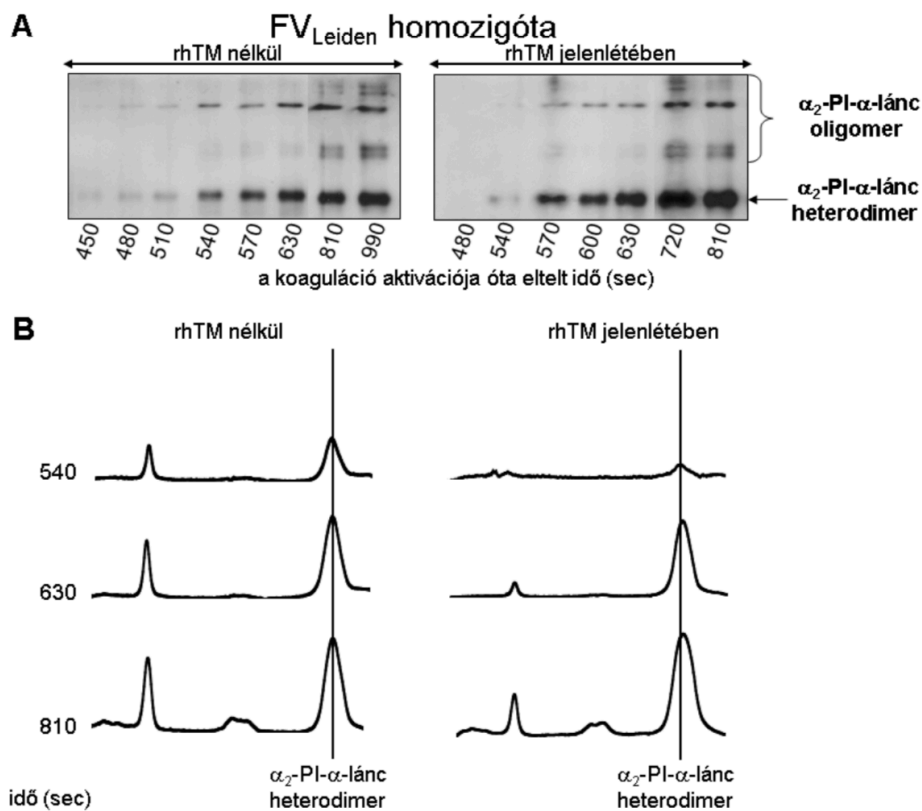
A FXIII-A trombin által hasított formáját (FXIII-A') az alvadékba inkorporálódott maximális mennyiségű FXIII-A százalékos arányában fejeztük ki (kvantitatív denzitometriás értékelés alapján). A FXIII aktiváció mértékére utaló FXIII-A' százalékos arányát az rhTM jelenlétében végzett kísérletekben teli jelekkel, rhTM hiányában végzett kísérletek esetén üres jelekkel ábrázoltuk. A piros nyilak a FXIII 50%-os aktivációjához szükséges (T<sub>1/2</sub>) időt mutatják rhTM jelenlétében és hiányában.

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 az  $\alpha$ 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 (40. ábra). Ezzel ellentétben, a FV<sub>Leiden</sub> plazma mintákban eltűnik az rhTM nélküli és az azt tartalmazó plazmaminták közti különbség (41. ábra); sőt egyetlen mutáns allél jelenléte is szignifikánsan csökkentette az rhTM hatását.



**40. ábra.** Az  $\alpha_2$ -PI fibrin  $\alpha$ -láncához történő keresztalkotése egy reprezentatív FV vad típusú egyéntől származó plazmában rhTM hiányában és jelenlétében.  $\alpha_2$ -PI Western blot (A), a kép alatt levő számsor az inkubáció időtartamát jelzi. Egyes minták Western blotjainak denzitometriás kiértékelése (B).  $\alpha_2$ -PI:  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor, rhTM: rekombináns humán trombomodulin

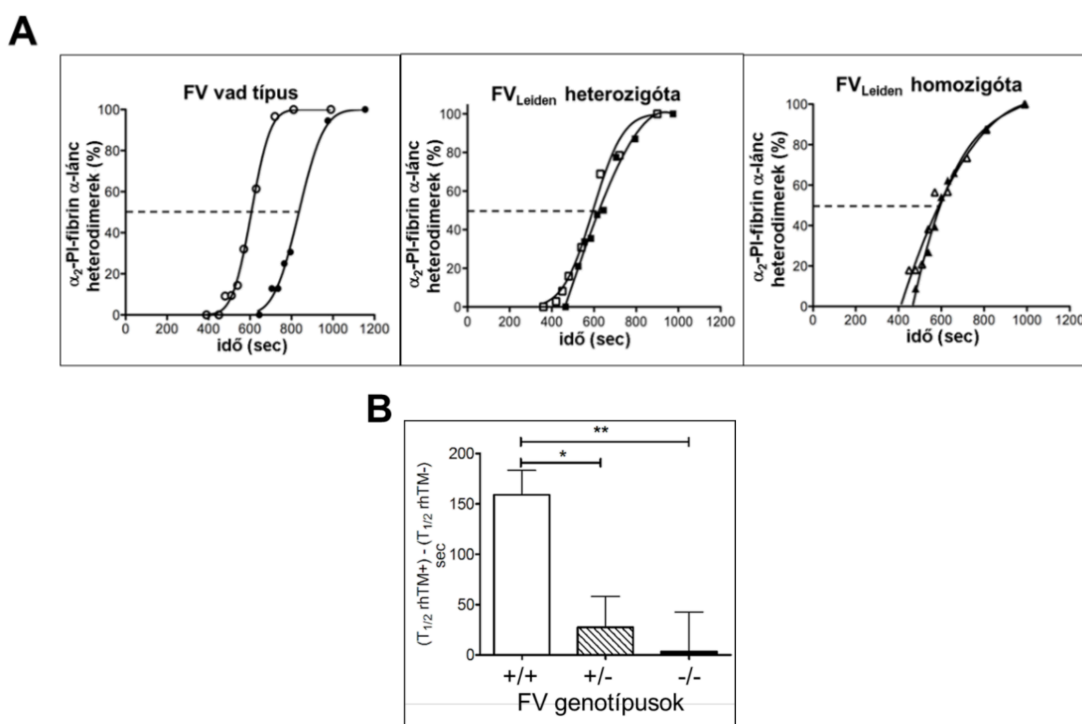


**41. ábra.** Az  $\alpha_2$ -PI fibrin  $\alpha$ -láncához való keresztalkotódése egy reprezentatív FV<sub>Leiden</sub> homozigóta egyén plazmájában rhTM hiányában és jelenlétében.  $\alpha_2$ -PI Western blot (A), a kép



alatt levő számsor az inkubáció időtartamát jelzi. Egyes minták Western blotjainak denzitometriás kiértékelése (B).  $\alpha$ 2-PI:  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor, rhTM: rekombináns humán trombomodulin

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 42. A ábra az  $\alpha$ 2-PI-fibrin  $\alpha$ -lánc közti heterodimerek kialakulásának kinetikáját ábrázolja 1-1 reprezentatív, különböző FV genotípusú egyén plazmájában. Az rhTM jelentősen csökkent hatása ill. hatástalansága egyértelmű mindkét FV<sub>Leiden</sub> hordozó csoport esetében. Az  $\alpha$ 2-PI-fibrin  $\alpha$ -lánc közti heterodimerek 50%-ának kialakulásához szükséges rhTM jelenlétében és hiányában mért  $T_{1/2}$  közti különbségeket ábrázolja a 42. B ábra. 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.



**42. ábra. Az rhTM hatása  $\alpha$ 2-PI-fibrin  $\alpha$ -lánc közti kereszt kötések kialakulására különböző FV genotípusú plazmákban.** Genotípusonként 1-1 plazmával nyert reprezentatív Western blot kép kvantitatív elemzésével kapott eredmények, melyek az  $\alpha$ 2-PI-fibrin  $\alpha$ -lánc heterodimerek képződésének kinetikáját szemléltetik (A). Az üres körök, négyzetek és háromszögek az rhTM nélkül bekövetkezett heterodimerizáció kinetikáját, míg a teltek az rhTM jelenlétében zajló heterodimer képződés kinetikáját mutatják. A vízszintes, szaggatott vonal az 50%-os heterodimerizációt jelzi. A különböző FV genotípusok hatása az 50%-os  $\alpha$ 2-PI-fibrin  $\alpha$ -lánc heterodimerizációhoz szükséges időre rhTM jelenlétében ( $T_{1/2}$ rhTM+) és annak hiányában ( $T_{1/2}$ rhTM-)(B). Mindhárom genotípus esetében 5-5 egyén plazmáját vizsgáltuk, majd a ( $T_{1/2}$ rhTM+) és ( $T_{1/2}$ rhTM-) közötti különbségek átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibákat (SEM) oszlopdiagram formájában ábrázoltuk.  $\alpha$ 2-PI:  $\alpha$ 2-plazmin



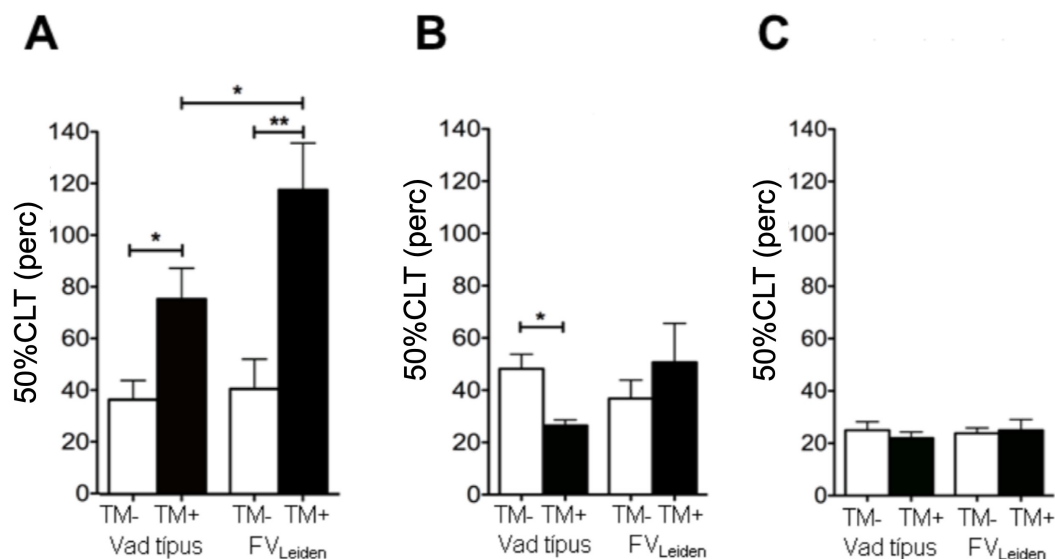
inhibitor, rhTM: rekombináns humán trombomodulin, +/+ : FV vad típus, +/-: FV<sub>Leiden</sub> heterozigóta, -/-: FV<sub>Leiden</sub> homozigóta. \*p<0,05, \*\*p<0,01

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 plazmáiból 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 (ábra nincs prezentálva).

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 plazmáiban (43. ábra). 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 (43. A ábra). rhTM hatására a FV<sub>Leiden</sub> homozigóta egyének plazmájában az 50%-os alvadék lízis szignifikánsan, mintegy 40 perccel később következett be, mint a FV vad típusú egyének plazmájában.

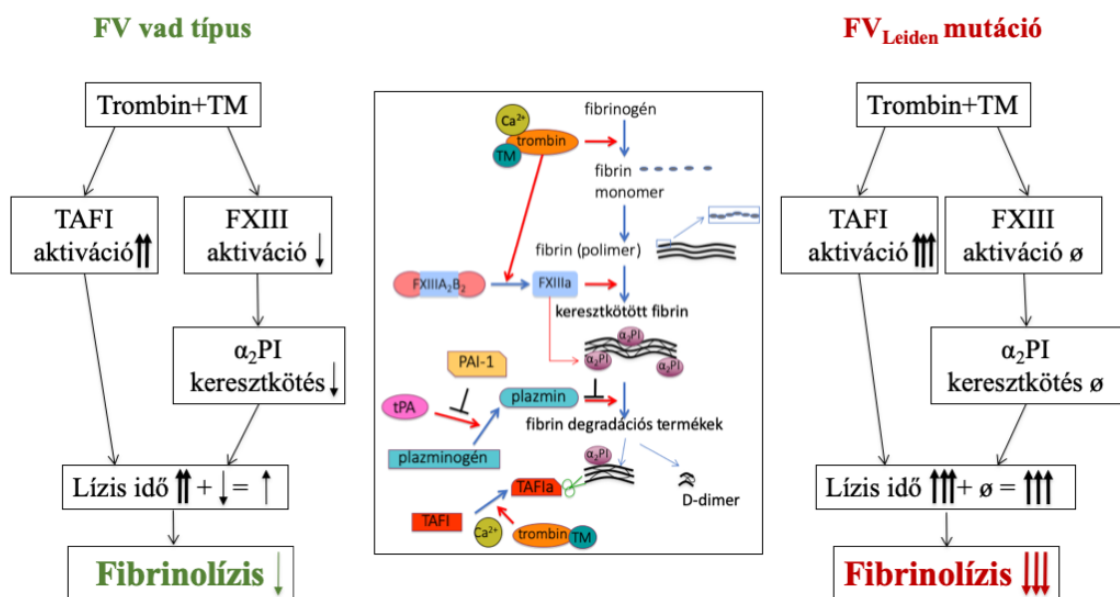
Ismert, hogy a TM TAFI aktivációra kifejtett hatásán keresztül befolyásolja a fibrinolízist. Annak bizonyítására, hogy a TM  $\alpha$ 2-PI-fibrin keresztkötésre kifejtett hatásának szintén fontos szerepe van a fibrinolízis szabályozásában, *in vitro* lízis vizsgálatokat végeztünk TAFIa inhibitor jelenlétében, 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 (43. B ábra). Ennek háttérében 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 (43. C ábra). 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.



**43. ábra.** Az rhTM hatása az alvadék t-PA indukálta *in vitro* lízisére FV vad ill. FV<sub>Leiden</sub> homozigóta egyének plazmáiban, inhibitorok nélkül (A), TAFIa inhibitor jelenlétében (B), ill. TAFIa és FXIIIa inhibitorok együttes alkalmazása esetében (C). Genotípusonként 5-5 egyén plazmájában meghatároztuk az 50%-os alvadék lízis időt (50%CLT) rhTM hiányában (TM-) és jelenlétében (TM+). Az oszlopdiagramon a kapott értékek átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibákat (SEM) tüntettük fel. Az oszlopok felett levő, csillaggal jelzett szakaszok a megfelelő csoportok között levő szignifikáns különbséget jelölik. rhTM: rekombináns humán trombomodulin. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

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. Az eredmények háttérében igazolt biokémiai mechanizmusokat a 44. ábra összegzi.



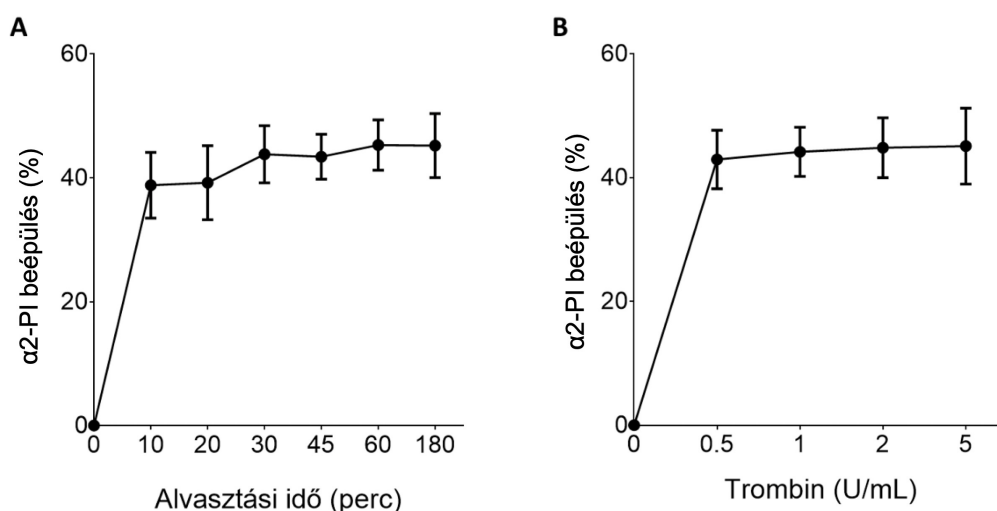
**44. ábra. A TM t-PA által indukált fibrinolízisre kifejtett hatásának feltételezett mechanizmusa FV vad típusú és FV<sub>Leiden</sub> mutáns egyének plazmájában.** Vad típusú FV esetében a TM a trombinnal komplexet képezve fokozza a TAFI aktivációját, ami a lízis idő megnyúlását, azaz a fibrinolízis csökkenését eredményezi. Ezzel ellentétesen ható mechanizmus a FXIII aktivációjának, ill. ennek következtében az  $\alpha_2$ -PI fibrinhez történő keresztkötésének a késleltetése, ami a lízis idő megrövidüléséhez, a fibrinolízis fokozódásához kellene vezessen. A két ellentétes hatás közül a TAFI-n keresztül operáló mechanizmus a hatékonyabb, ezért a lízis idő TM hatására megnyúlik, de nem annyira, mintha a FXIII-on keresztül ható mechanizmus nem lenne jelen. FV<sub>Leiden</sub> mutáció esetén a trombin generáció fokozódása miatt a TAFI aktiváció is fokozódik, s ugyanakkor a FXIII aktiváció késleltetése elmarad. Ennek következtében a lízis idő rhTM hatására FV<sub>Leiden</sub> jelenlétében még inkább megnyúlik, mint vad típusú FV esetén, tehát a fibrinolízis mértéke jelentősen csökken.  $\alpha_2$ -PI:  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor, FXIII: XIII-as faktor, PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor, TAFI: trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor, TM: trombomodulin, t-PA: szöveti plazminogén aktivátor

*5.1.7.3 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 alvadésgátolt 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. A 45. ábrán látható, hogy az  $\alpha$ 2-PI maximális beépülése az alvadékba megközelítőleg 45%, mely összhangban van az ismert irodalmi adatokkal (261). Az  $\alpha$ 2-PI beépülése a fibrin alvadékba viszonylag gyorsan megtörténik 2 U/mL trombin koncentráció mellett (45. A ábra). A maximális beépülés szintjét már relatíve alacsony trombin koncentráció mellett el tudjuk érni (0,5-2 U/mL), magasabb trombin koncentrációnak már nincs további hatása (45. B ábra).



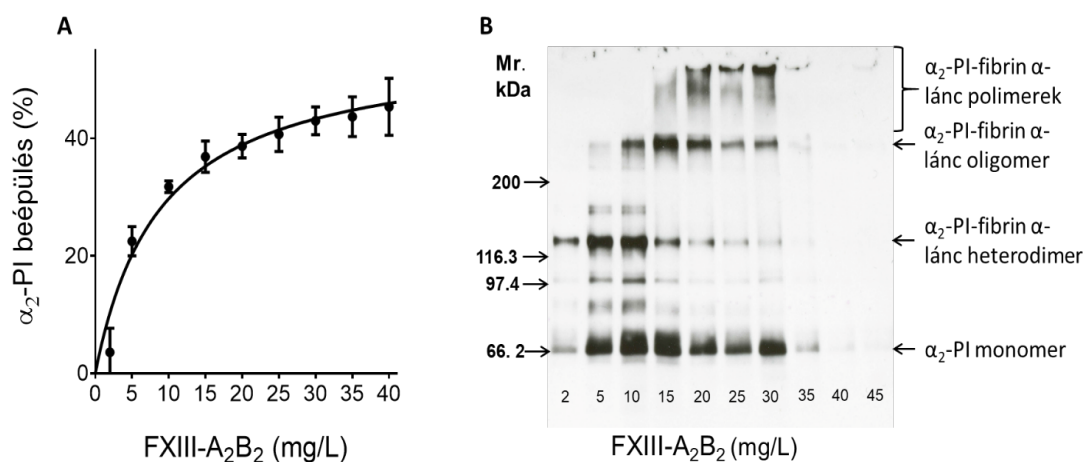
**45. ábra.** Az  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való beépülésének időfüggése (A). A trombin koncentráció hatása az  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való beépülésére (B). Az ábrák 10 referencia egyén plazma mintájának alvasztása során kapott eredmények átlagát és szórását mutatják.  $\alpha$ 2-PI:  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor

A további kísérletekhez ezért 2 U/mL trombin koncentrációt és a 30 perces alvasztási 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 (46. ábra). 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 (46. A ábra). 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. A 46. B ábrán látható, hogy 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 alvadékot 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 (262).



**46. ábra. A plazma FXIII szint hatása az  $\alpha_2$ -PI fibrin alvadékba való beépülésének mértékére.** A FXIII deficiens plazmát ( $\alpha_2$ -PI = 62 mg/L) különböző koncentrációjú tisztított FXIII-mal egészítettük ki, majd trombinnal és kalciummal megalvasztottuk. A beépült  $\alpha_2$ -PI mennyiségét a kiegészített plazma és a keletkezett szérumok  $\alpha_2$ -PI koncentrációja alapján kalkuláltuk és az ábrán az alvadékba beépült  $\alpha_2$ -PI százalékos aránya látható (A). A mosott és feloldott alvadékok Western blot analízise (az  $\alpha_2$ -PI detektálására HRPO jelzett poliklonális anti- $\alpha_2$ -PI antitestet használtunk) (B).  $\alpha_2$ -PI:  $\alpha_2$ -plazmin inhibitor, Mr: molekulásúly marker

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 vizsgált csoportok egyes klinikai alapadatait és a vizsgálat szempontjából lényeges hemosztázis jellemzőit a 18. táblázat mutatja be.

**18. táblázat. A vizsgált kohorsz alapvető klinikai jellemzői és hemosztázis értékei**

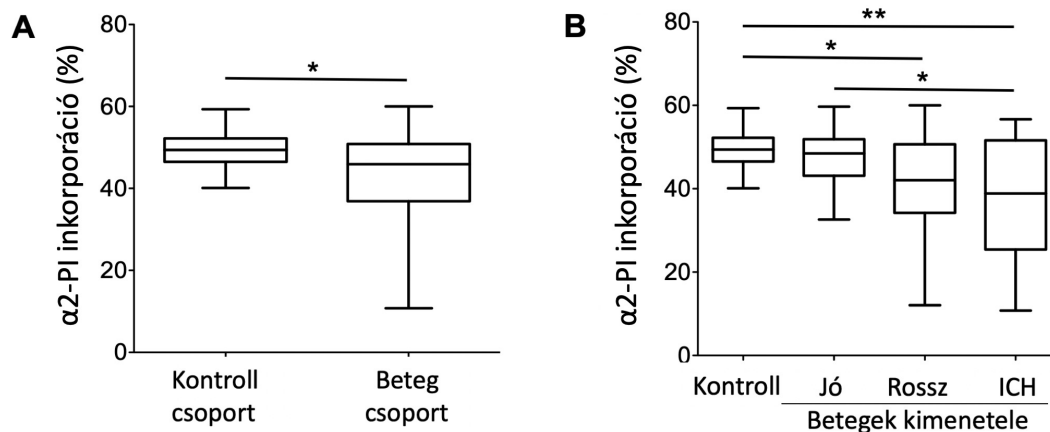
	Kontroll (n=26)	Jó kimenetel (n=25)	Stagnáló/ rossz kimenetel (n=20)	Hemorrhagiás transzformáció (n=12)
Kor (év)	66,4±5,6	61,4±13,6	67,5±12,6	72,2±10,0 <sup>§§</sup>
Nem (nő/férfi)	12/14	12/13	8/12	7/5
Hipertónia (nem/igen)	13/13	5/16	2/15*	4/6
Dohányzás (nem/igen)	21/5	16/5	12/5	7/3
BMI	27,1±4,2	28,4±4,8	27,6±4,1	26,4±4,9
Felvételi NIHSS	-	4 (3-7)	9 (5-12)	10 (5-16) <sup>§</sup>
NIHSS a 7. napon	-	1 (0-2)	11 (7-16) <sup>§§§</sup>	10 (7-11) <sup>§§§</sup>
hsCRP (mg/L)	1,7 (0,8-3,4)	2,9 (1,4-5,1)	4,9 (2,8-7,1)**	5,3 (2,5-11,9)**
Fibrinogén (g/L)	3,6±0,5	3,9±1,3	4,3±1,5*	4,2±2,0
FXIII-A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> (mg/L)	28,2±4,3	23,4±5,5*	22,9±7,6*	21,3±6,7**
Plazma $\alpha$ 2-PI (mg/L)	66,9±8,7	64,9±10,8	56,8±12,8	52,8±19,7* <sup>§</sup>
Szérum $\alpha$ 2-PI (mg/L)	33,9±4,2	34,1±6,1	32,2±5,9	32,2±13,3
$\alpha$ 2-PI p.Arg6Trp (Vad/Hordozó)	15/5	17/8	13/7	6/6

A folyamatos változók értékeit  $\text{átlag} \pm \text{SD}$  ill. nem normál eloszlás esetén medián (IQR) formában tüntettük fel. Az NIHSS érték 7. napra történő változásának mértéke szerint osztályoztuk a kimeneteket: az NIHSS legalább 4 ponttal való csökkenését vagy 0-ra történő csökkenését értékeltük kedvező kimenetelként (neurológiai javulás), míg az NIHSS pontszám legalább 4 ponttal történő növekedését rossz kimenetelnek tekintettük (232, 233).  $\alpha$ 2-PI:  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor, BMI: testtömeg index, hsCRP: nagy érzékenyséű C reaktív protein vizsgálat, NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale, \* $p < 0,05$  beteg vs. kontroll, \*\* $p < 0,01$  beteg vs. kontroll, <sup>§</sup> $p < 0,05$  beteg vs. jó kimenetel, <sup>§§</sup> $p < 0,01$  beteg vs. jó kimenetel, <sup>§§§</sup> $p < 0,01$  beteg vs. jó kimenetel

A csoportok egyes klinikai alapadatai ill. hemosztázis tényezői szignifikánsan eltértek. A trombolízist követően hemorrhagiás transzformációt szenvedett betegek szignifikánsan idősebbek voltak és szignifikánsan súlyosabb stroke-ot szenvedtek el a felvételi 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 felvételtkor CRP szint szignifikánsan emelkedett volt azoknál a betegeknél, akik stagnáló/rossz kimenetellel rendelkeztek, ill. akik hemorrhagiás transzformációt szenvedtek, az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A lízis után intrakraniális vérzést szenvedett betegek csoportjában a plazma  $\alpha$ 2-PI szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollokhoz képest.

Az  $\alpha$ 2-PI inkorporációjának mértéke a fibrin alvadékba szignifikánsan alacsonyabb volt a betegeknél a kontrollokhoz képest (47. A ábra). 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 ( $41,5 \pm 11,8\%$  és  $37,3 \pm 14,0\%$ ) összehasonlítva az egészséges kontrollokkal ( $49,4 \pm 4,6\%$ ) (47. B ábra). Az  $\alpha$ 2-PI alvadékba való beépülésének mértéke a jó kimenetellel rendelkező betegeknél ( $47,4 \pm 6,7\%$ ) nem különbözött szignifikánsan az egészségesektől. Figyelemreméltó, hogy az  $\alpha$ 2-PI beépülése lényegesen alacsonyabb volt azokban a betegeknél, akik hemorrhagiás transzformációt szenvedtek, nem csak a kontrollokhoz képest, hanem a jó kimenetellel rendelkező betegekhez képest is (47. B ábra). Ugyanakkor megemlítendő, hogy az alvadék lízis vizsgálatok eredményei nem különböztek az egyes csoportok között.



**47. ábra. Az  $\alpha$ 2-PI beépülés mértéke a fibrin alvadékba.** A plazma minták alvasztása trombinnal és  $\text{Ca}^{2+}$ -mal történt, a plazma és a szérum  $\alpha$ 2-PI antigén szintek közötti különbséget kiszámoltuk és a plazma értékekhez viszonyítva %-ban adtuk meg a kontroll és a teljes betegcsoportban (A), ill. a kontroll és a különböző kimenetellel rendelkező betegcsoportokban (B). A doboz-bajusz ábrázolás a mediánt, az interkvartilis tartományt és a teljes tartományt mutatja.  $\alpha$ 2-PI:  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor, ICH: intrakraniális hemorrhagia. Statisztika: Kruskal-Wallis, Dunn's post-hoc teszt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az  $\alpha$ 2-PI beépülés mértéke a fibrin alvadékba milyen korrelációt mutat egyes alapvető klinikai ill. hemosztázis paraméterekkel (19. táblázat). 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* fogyás 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 ( $r = -0,627$ ,  $p = 0,039$ ).

**19. táblázat. Egyes klinikai és hemosztázis paraméterek korrelációja az  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba történő beépülésének mértékével**

	Kontroll csoport (n=26)		Beteg csoport (n=57)		Mind (n=83)	
	r	p	r	p	r	p
Kor (év)	-0,051	0,803	-0,224	0,093	-0,200	0,070
Fibrinogén (g/L)	0,453	<b>0,039</b>	0,224	0,098	0,171	0,137
FXIII-A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> (mg/L)	0,101	0,622	0,303	<b>0,022</b>	0,357	<b>0,001</b>
Plazma $\alpha$ 2-PI (mg/L)	0,284	0,160	0,544	<b>&lt;0,001</b>	0,540	<b>&lt;0,001</b>
Felvételi NIHSS	-	-	-0,449	<b>0,001</b>	-	-

Az adatok a Pearson korrelációs együtthatót (r) és a statisztikai szignifikanciát (p) mutatják.  $\alpha$ 2-PI:  $\alpha$ 2-plazmin inhibitor, NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale

#### A részeredmények rövid összefoglalása:

Az *in vitro* vizsgálatok eredményeit összefoglalva több fontos következtetésre juthatunk. A celluláris elemeket is tartalmazó vérrögök súlyának legfontosabb meghatározó tényezői *in vitro* körülmények között a vizsgált paraméterek közül a kor és a fibrinogén koncentráció voltak, ugyanakkor a FXIII-A Leu34 allél jelenléte jelentősen mérsékelte a megemelkedett fibrinogén szint protrombotikus hatását a vérrög tömegére vonatkozóan. Vizsgálatainkban igazoltuk FV<sub>Leiden</sub> mutáció antifibrinolitikus hatását, melynek háttérében az aktivált TAFI hatásán kívül a FXIII aktiváció eltérő kinetikája és az  $\alpha$ 2-PI-fibrin keresztkötések kialakulásának eltérő kinetikája volt azonosítható. Az  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való inkorporációjának mértékét egy új módszerrel mutattuk ki. A módszert egészséges kontrollok és trombolízis kezelésben részesülő AIS betegek plazmamintáin tesztelve úgy találtuk, hogy  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való beépülésének mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt a stagnáló/rossz kimenetellel



rendelkező és a lízis után intrakraniális vérzést szenvedett betegek esetén, míg a jó kimenettel rendelkező betegek esetén  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való beépülése nem különbözött szignifikánsan az egészséges kontrollokétól. Az  $\alpha$ 2-PI fibrin alvadékba való beépülésének mértéke összefüggést mutatott a stroke súlyosságával és lényegesen alacsonyabb volt azokban a betegekben, akik hemorrhagiás transzformációt szenvedtek, nem csak a kontrollokhoz képest, hanem a jó kimenettel rendelkező betegekhez képest is.

#### A részeredményeket megalapozó közlemények:

1. 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)
2. **Bagoly, Z.**, Koncz, Z., Hársfalvi, J., Muszbek, L.: Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb. Res.* 129 (3), 382-387, 2012. IF: 3,133 (Q2)
3. 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)
4. Koncz, Z., **Bagoly, Z.**, Haramura, G., Mezei, Z., Muszbek, L.: Thrombomodulin-dependent effect of factor V Leiden mutation on the cross-linking of alfa2-plasmin inhibitor to fibrin and its consequences on fibrinolysis. *Thromb. Res.* 130 (3), 528-534, 2012. IF: 3,133 (Q2)
5. **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)
6. **Bagoly, Z.**, Katona, É., Muszbek, L.: Factor XIII and inflammatory cells. *Thromb. Res.* 129 (Suppl.2), S77-S81, 2012. IF: 3,133 (Q2)

#### 5.1.8 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 (263). 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).

### 5.1.8.1 *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 (23). Kolev és munkacsoportja a CLA módszert az *in vivo* trombusokban fellelhető NET-ek imitálása érdekében cfDNA és hiszton hozzáadásával módosította (28, 31). 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 (28, 31). 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 hisztont 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 kimenetelek 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 (264). 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) percnak 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 (2,6%) tünetképző, 12 esetben (5,2%) pedig nem tünetképző komplikáció volt.

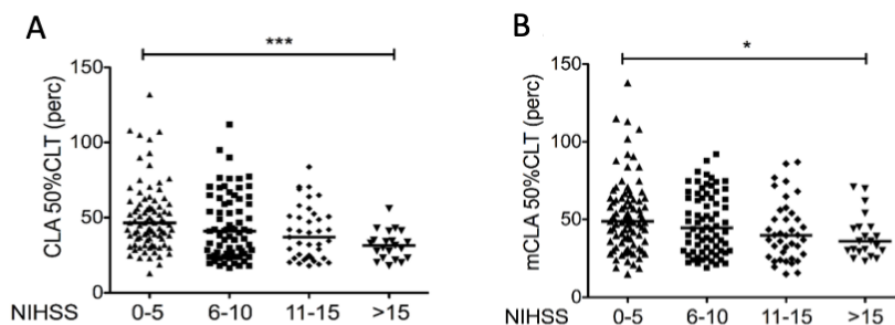
Ahogy az korábbi irodalmi adatok alapján várható volt, a kísérleti rendszerhez hozzáadott cfDNA és hiszton szignifikánsan befolyásolta az alvadék képződést, és elnyújtott alvadék lízist eredményezett (20. táblázat).

**20. táblázat. A vizsgált kohorsz trombolízis előtti alvadék lízis teszt (CLA) ill. módosított alvadék lízis teszt (mCLA) paraméterei**

	CLA	mCLA	p
maximális abszorbancia (OD)	1,39 ±0,20	1,42 ±0,19	<0,001
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	11,0 (8,3-15,0)	11,3 (9,0-18,0)	0,002
10%CLT (perc)	30,0 (19,5-40,5)	32,3 (22,0-49,0)	<0,001
50%CLT (perc)	41,0 (29,0-57,0)	45,0 (30,0-64,0)	<0,001
90%CLT (perc)	76,0 (57,0-108,0)	83,0 (65,0-108,0)	<0,001
CLA AUC (OD*perc)	26,1 (21,7-32,1)	27,8 (22,8-33,7)	<0,001

Az adatok átlag±SD vagy medián (interkvartilis tartomány) értékeként vannak feltüntetve. Az mCLA módszert sejtmentes szabad DNS (cfDNA) és hiszton jelenlétében végeztük. 10%CLT: 10% alvadék lízis idő, 50%CLT: 50% alvadék lízis idő, 90%CLT: 90% alvadék lízis idő, CLA: alvadék lízis teszt, CLA AUC: alvadék lízis teszt görbe alatti területe, mCLA: módosított alvadék lízis teszt

A vizsgált betegcsoportban mind a CLA, mind az mCLA módszer esetén az 50%-os lízis idő (50%CLT) paraméter és a stroke kórházi felvételkor meghatározott NIHSS szerinti súlyossága között lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető (48. ábra). Azok a betegek, akik felvételkor súlyosabb stroke tüneteit mutatták, szignifikánsan alacsonyabb 50%CLT értékekkel rendelkeztek a kisebb NIHSS értékkel rendelkező betegekhez képest.



**48. ábra. Az akut ischaemiás stroke súlyossága és az alvadék lízis (CLA) ill. módosított alvadék lízis teszt (mCLA) közötti összefüggés.** A stroke felvételi súlyosságát az NIHSS értékek szerint kategorizáltuk, és a CLA (A) ill. mCLA (B) vizsgálatok 50%-os lízis idő (50%CLT) paramétereivel vetettük össze. NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale. Statisztika: Kruskal-Wallis teszt. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001

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 (21. táblázat).

Az egyéb vizsgált hemosztázis ill. fibrinolízis fehérjék közül a D-dimer és a plazminogén aktivitás mutatott összefüggést a lízist követően kialakuló intrakraniális vérzés kialakulásával.

**21. táblázat. A hemorrhagiás transzformáció és az alvadék lízis teszt paraméterek ill. egyes hemosztázis tényezők közötti összefüggések vizsgálata**

	Nincs vérzés (n=213)	Hemorrhagiás transzformáció (n=18)	p
<b>CLA</b>			
maximális abszorbancia (OD)	1,4±0,2	1,4±0,2	0,361
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	10,5 (8,8-15,0)	12,3 (7,5-16,7)	0,866
10%CLT (perc)	30,0 (19,5-40,0)	25,3 (19,1-42,9)	0,524
50%CLT (perc)	41,0 (28,9-57,5)	35,0 (26,6-53,3)	0,396
90%CLT (perc)	77,6 (57,9-108,0)	81,8 (53,0-108,0)	0,496
CLA AUC (OD*perc)	26,3 (22,1-32,4)	23,8 (18,3-27,3)	<b>0,028</b>
<b>Módosított CLA (cfDNA és hiszton jelenlétében)</b>			
maximális abszorbancia (OD)	1,4±0,2	1,4±0,2	0,149
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	11,3 (9,0-18,0)	12,4 (6,9-19,0)	0,892
10%CLT (perc)	33,0 (23,0-49,0)	24,3 (18,6-41,6)	0,111
50%CLT (perc)	45,0 (30,9-64,0)	32,5 (25,9-50,6)	<b>0,034</b>
90%CLT (perc)	84,0 (65,0-108,0)	81,8 (53,0-108,0)	0,512
mCLA AUC (OD*perc)	28,3 (23,2-34,3)	24,1 (20,2-31,7)	<b>0,005</b>
<b>Specifikus hemosztázis/fibrinolízis fehérjék</b>			
fibrinogén (g/L)	4,1 (3,5-4,7)	4,5 (3,8-5,1)	0,167
D-dimer (mg FEU/L)	0,8 (0,5-1,4)	1,5 (0,6-2,4)	<b>0,029</b>
plazminogén aktivitás (%)	97,0 (88,0-110,0)	89,0 (81,0-99,0)	<b>0,023</b>
α2-PI aktivitás (%)	102,0 (92,0-110,0)	105,0 (96,0-108,0)	0,979

Az adatok átlag±SD vagy medián (interkvartilis tartomány) értékeként vannak feltüntetve. α2-PI: α2-plazmin inhibitor, 10%CLT: 10% alvadék lízis idő, 50%CLT: 50% alvadék lízis idő, 90%CLT: 90% alvadék lízis idő, cfDNA: szabad DNS, CLA: alvadék lízis teszt, CLA AUC: alvadék lízis teszt görbe alatti területe

A módosított CLA 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, felvételtkor 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 felvételtkor 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. A betegek alapadatait, képalkotó eljárások eredményeit és a stroke kimeneteleit a 22. táblázat tartalmazza. Az ICH betegek átlag életkora  $68 \pm 11,6$  év volt, a betegek 64%-a férfi volt. A felvételtkor NIHSS mediánja 14 (IQR: 8-20), a medián ICH score 1 (IQR: 1-3) volt. A cerebrovaszkuláris rizikótényezők 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 felvételtkor 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.

**22. táblázat. Nem traumás intracerebrális vérzést elszenvedett betegek klinikai alapadatai, és kimenetelei**

Betegszám, n	89
Kor, év	68 ±11,6
Férfi, n (%)	57 (64,0)
Stroke súlyossága felvételkor, NIHSS	14 (8-20)
ICH score	1 (1-3)
Glasgow Coma Skála	13 (9-14)
<b>Cerebrovaszkuláris rizikó faktorok, n (%)</b>	
Artériás hipertónia	86 (96,6)
Pitvarfibrilláció	11 (12,4)
Diabetes mellitus	39 (43,8)
Hiperlipidémia	48 (53,9)
Dohányzás	15 (16,9)
BMI, kg/m <sup>2</sup>	27,0 (24,1-31,9)
<b>Felvételkori laboratóriumi paraméterek</b>	
INR	0,97 (0,93-1,05)
APTI, sec	27,7 (25,4-31,2)
Fehérvérsejtszám, G/L	8,6 (6,7-11,5)
Trombocitaszám, G/L	226 (170-265)
Szérum glükóz, mmol/L	7,6 (6,0-10,4)
hsCRP, mg/L	2,7 (1,2-6,5)
Kreatinin, µmol/L	69 (61-85)
Fibrinogén, g/L	3,8 (3,1-4,4)
Plazminogén aktivitás %	110 (100-122)
α2-plazmin inhibitor aktivitás %	107 (98-113)
FXIII aktivitás %	166 (139-176)
<b>Képpalkotó eljárások adatai, n (%)</b>	
ICH féltekei lokalizációja felvételkor	
Bal félteke	44 (49,4)
Jobb félteke	41 (46,1)
Bilaterális	4 (4,5)
Intraventriculáris vérzés jelenléte felvételkor	
Nincs	43 (48,3)
Subarachnoideális	11 (12,4)
Oldalsó kamrák	8 (9,0)
III. kamra	1 (1,1)
IV. kamra	1 (1,1)
Kombinált	25 (28,1)
Infratentoriális eredet	
Igen	4 (4,5)
Nem	85 (95,5)
Becsült vérzésvolumen érték, cm <sup>3</sup>	
Felvételkor	20,0 (3,7-48,0)
14. napon	10,0 (2,8-27,0)
90. napon	0 (0-2,4)
<b>Kimenetelek, n (%)</b>	
Halál a 14. napig	26 (29,0)
Hosszú távú kimenetel (mRS, 90. napig)	
Kedvező (mRS 0-1)	15 (16,9)
Kedvezőtlen (mRS 2-5)	32 (36,0)
Halál (mRS 6)	39 (43,8)
Nem meghatározott	3 (3,3)

A folytonos változók értékeit átlag  $\pm$  standard deviáció vagy medián (IQR)-ként tüntettük fel. A kategorikus változókat az elemszám (százalék) mutatja. APTI: aktivált parciális tromboplasztin idő, BMI: testtömeg index, FXIII: XIII-as faktor, hsCRP: nagy érzékenységű C reaktív protein vizsgálat, ICH: intrakraniális vérzés, INR: nemzetközi normalizált ráta, IQR: interkvartilis tartomány, i.v.: intravénás, mRS: módosított Rankin Skála, NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale

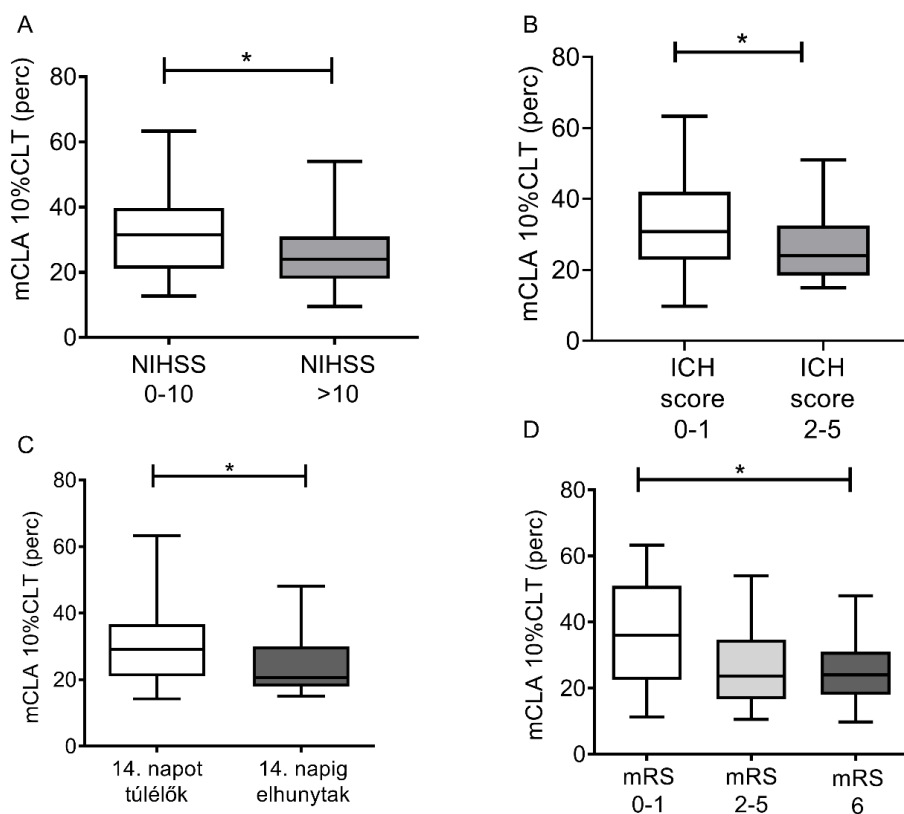
Összehasonlítottuk az ICH betegek felvételi plazmamintáiból meghatározott CLA ill. mCLA paramétereket egészséges önkéntesek plazmamintáiból meghatározott lízis idő paraméterekkel (23. táblázat). A vártnak megfelelően az ICH betegek szignifikánsan rövidebb lízis idővel rendelkeztek az önkéntesek alvadék 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.

**23. táblázat. Az egészséges önkéntesek és a nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot (ICH) elszenvedett betegek alapadatainak, és alvadék lízis (CLA, mCLA) paramétereinek összehasonlítása**

	Egészséges önkéntesek	ICH betegek	p
Betegszám, n	29	89	
Kor, év	44 $\pm$ 11,7	68 $\pm$ 11,6	<0,001
Férfi, n (%)	8 (27,6)	57 (64,0)	0,017
<b>CLA</b>			
maximális abszorbancia (OD)	1,3 (1,2-1,4)	1,4 (1,3-1,6)	0,006
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	18,5 (13,0-29,0)	10,5 (9,0-14,0)	<0,001
10%CLT (perc)	49,0 (14,5-60,0)	23,5 (15,5-33,0)	0,006
50%CLT (perc)	73,6 (59,5-102,0)	34,5 (24,5-44,0)	<0,001
90%CLT (perc)	106,0 (85,0-136,5)	76,0 (66,0-87,0)	<0,001
CLA AUC (OD*perc)	41,0 (34,5-47,0)	24,2 (18,4-28,3)	<0,001
<b>mCLA (cfDNA és hiszton jelenlétében)</b>			
maximális abszorbancia (OD)	1,32 $\pm$ 0,15	1,4 (1,3-1,6)	0,002
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	24,0 (16,0-34,5)	11,5 (8,0-15,0)	<0,001
10%CLT (perc)	57,0 (21,5-71,5)	25,5 (18,5-35,0)	0,001
50%CLT (perc)	89,0 (70,0-111,5)	35,5 (28,0-49,5)	<0,001
90%CLT (perc)	119,0 (100,0-145,5)	75,0 (68,0-87,0)	<0,001
CLA AUC (OD*perc)	43,0 (37,9-51,4)	25,2 (19,6-30,0)	<0,001

Az adatok átlag $\pm$ SD vagy medián (interkvartilis tartomány) értékeként vannak feltüntetve. 10%CLT: 10% alvadék lízis idő, 50%CLT: 50% alvadék lízis idő, 90%CLT: 90% alvadék lízis idő, cfDNA: szabad DNS, CLA: alvadék lízis teszt, CLA AUC: alvadék lízis teszt görbe alatti területe, ICH: intracerebrális vérzéses stroke, mCLA: módosított alvadék lízis teszt

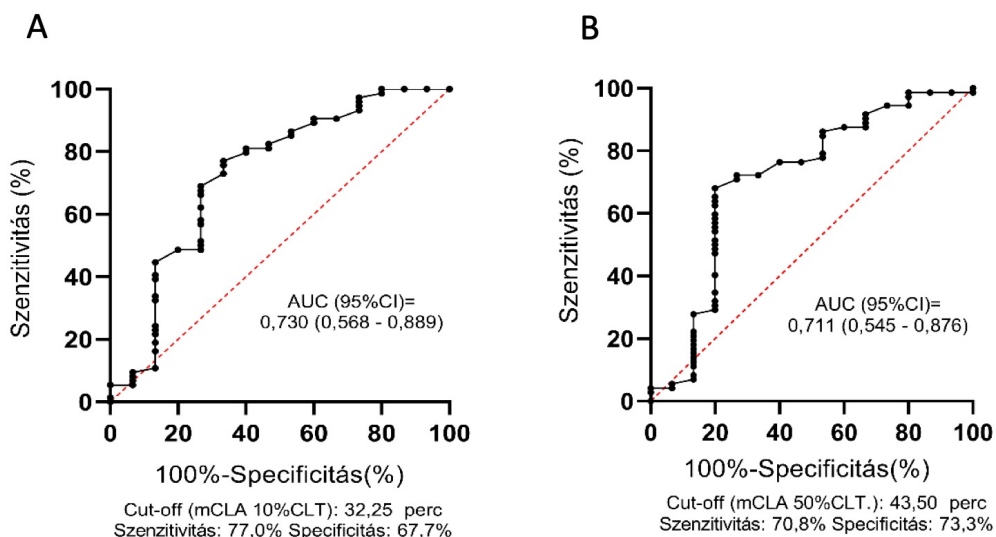
A konvencionális CLA paraméterek nem mutattak összefüggést a stroke súlyosságával és a kimenetekkel a vizsgált betegpopulációban. Az mCLA mérés során ezzel ellentétben szignifikánsan rövidebb 10%CLT értékeket detektáltunk a súlyosabb stroke-ot (NIHSS>10) elszenvedő betegek esetén, az enyhébb stroke-kal (NIHSS 0-10) felvételre kerülő betegekhez képest (49. A ábra). Az mCLA 10%CLT paraméter szignifikáns összefüggést mutatott az ICH score értékekkel, a 14. napig bekövetkező mortalitással és a kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel is (49. B, C és D ábrák).



**49. ábra. A módosított alvadék lízis vizsgálat (mCLA) és a nem traumás intracerebrális stroke (ICH) súlyossága és kimenetelei közötti összefüggés.** Az mCLA mérés során a 10%CLT értékek alakulása az ICH felvételi súlyossága (A), a betegek ICH score értéke (B), a rövid távú halálozási adatok (C) és a hosszú távú funkcionális kimenetel (D) szerint. 10%CLT: 10% alvadék lízis idő, mRS: módosított Rankin Skála, NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale. \* $p < 0,05$

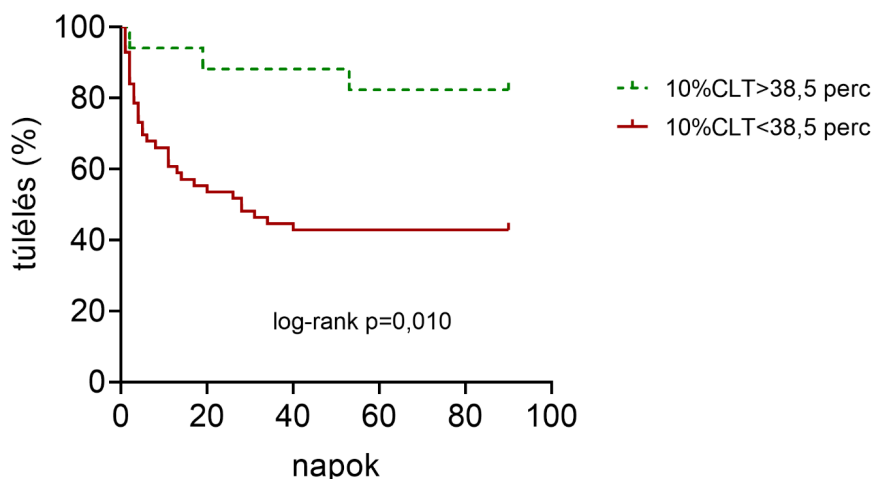
Az mCLA paraméterek diagnosztikai hatékonyságának vizsgálata érdekében ROC analízist végeztünk (50. ábra). A legjobb diagnosztikai hatékonyságot a 10%CLT paraméter esetén figyeltük meg a kedvező hosszú távú kimenetel (mRS 0-1 vs. 2-6) előrejelzésére (ROC AUC 0,73; 95%CI: 0,57-0,89). A Youden index által 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 (50. A ábra).





**50. ábra. A módosított alvadék lízis (mCLA) paraméterek ROC analízise a nem traumás vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek (ICH) hosszú távú funkcionális kimenetelének (mRS 0-1 vs. 2-6) előrejelzésére. Az ábrákon a ROC görbékhez tartozó AUC értékeket és a Youden index által meghatározott legjobb küszöbértékhez tartozó szenzitívitas ill. specifititás értékeket tüntettük fel a 10%CLT (A) és az 50%CLT (B) paraméterek esetén. 10%CLT: 10% alvadék lízis idő, 50%CLT: 50% alvadék lízis idő, AUC: area under curve**

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 ( $p=0,010$ ) (51. ábra).



**51. ábra. A nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek eredményeinek Kaplan-Meier túlélési görbéi. 10%CLT: 10% alvadék lízis idő**

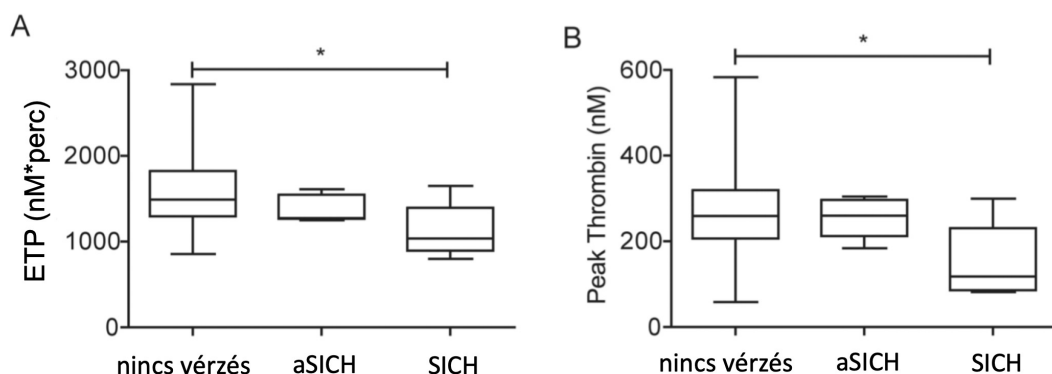
Eredményeink alapján a mCLA mérés cfDNA és hiszton jelenlétében ígéretes módszertani alapot jelenthet a jövőben a trombolízissal kezelt AIS betegek terápia asszociált vérzéses szövődményeknek előrejelzésére, valamint az ICH betegek hosszú távú funkcionális

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).

#### 5.1.8.2 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 a 7. táblázatban bemutatott intravénás trombolízissel kezelt AIS betegek csoportjával, de az antikoaguláns terápián lévő betegek (n=12) kizárásra kerültek. Hemorrhagiás transzformáció 13 beteg esetén (9,8%) volt megfigyelhető, mely 6 esetben (4,5%) 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 csoporthoz képest (52. ábra).



**52. ábra.** Az AIS betegek trombolízis előtt meghatározott endogén trombin potenciál (ETP) (A) és a peak thrombin (B) paramétereinek összefüggése a trombolízist követően kialakult szimptomás agyvérzés (SICH) és tünetmentes intracerebralis hemorrhagia (aSICH) előfordulásával. A doboz-bajusz ábrázolás a mediánt, interkvartilis tartományt és teljes tartományt jelzi. Statisztika: Kruskal-Wallis és Dunn's post-hoc teszt. \* $p < 0,05$

Többszörös logisztikus regressziós analízis eredményei (elemei: 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, 22. táblázatban bemutatott 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: sebészeti beavatkozás 3 hónapon belül, trombotikus esemény 3 hónapon belül, ismert hemorrhagiás diathesis, autoimmun kórkép, hospitalizációt igénylő malignus vagy krónikus betegség, antikoaguláns terápia, anaemia vagy thrombocytopenia, vese- vagy májbetegség).

A 24. táblázatban az ICH betegek és a kontrollok trombin generációs paraméterei láthatók. A peak thrombin paraméter szignifikánsan magasabb volt az ICH betegekben a kontrollokhoz képest ( $397,2 \pm 93,9$  vs.  $306,3 \pm 85,3$  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 VTE rizikó igen magas (265). A lag time, peak thrombin és ETP paraméterek szignifikáns korrelációt mutattak a CRP paraméterrel mindkét csoportban (adatok nincsenek táblázatban feltüntetve). 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.

## 24. táblázat. Nem-traumás intracerebrális vérzést (ICH) szenvedett betegek és egészséges kontrollok trombin generációs paramétereinek összehasonlítása

	ICH betegek n=87	Kontrollok n=164	p
Lag time (perc)	3,3 (3,0-3,6)	3,3 (2,7-4,1)	0,4090
ETP (nM*perc)	1776 (1491-2099)	1707 (1472-1973)	0,2374
Peak thrombin (nM)	397,2 ± 93,9	306,3 ± 85,3	<0,0001
Time to peak (perc)	5,5 (5,0-6,0)	6,5 (5,6-7,8)	<0,0001

Az adatok átlag ± SD vagy medián (interkvartilis tartomány) formájában láthatók. ETP: endogén trombin potenciál, n: esetszám

### A részeredmények rövid összefoglalása:

Összefoglalva részeredményeinket úgy gondoljuk, hogy mind a módosított alvadék lízis vizsgálatok, mind a trombin generáció ígéretes módszertani alapot jelenthet a jövőben olyan POC tesztek kidolgozására, melyek alkalmasak lehetnek AIS betegekben az egyénre szabott stroke terápia alapjainak lefektetésére, és a trombolízist követően kialakuló ICH előrejelzésére. Az mCLA vizsgálatot magas negatív prediktív értéke miatt a lízist követő ICH kizárására lehetne potenciálisan használni, mely klinikailag hasznos információ lehet. Vizsgálataink felhívták a figyelmet az ICH betegekben fellelhető fokozott trombin generációra (protrombotikus állapotra), ami feltehetőleg több cerebrovaszkuláris rizikófaktor együttes jelenlétével ill. a betegekben látott magasabb mértékű gyulladással paraméterekkel magyarázható.

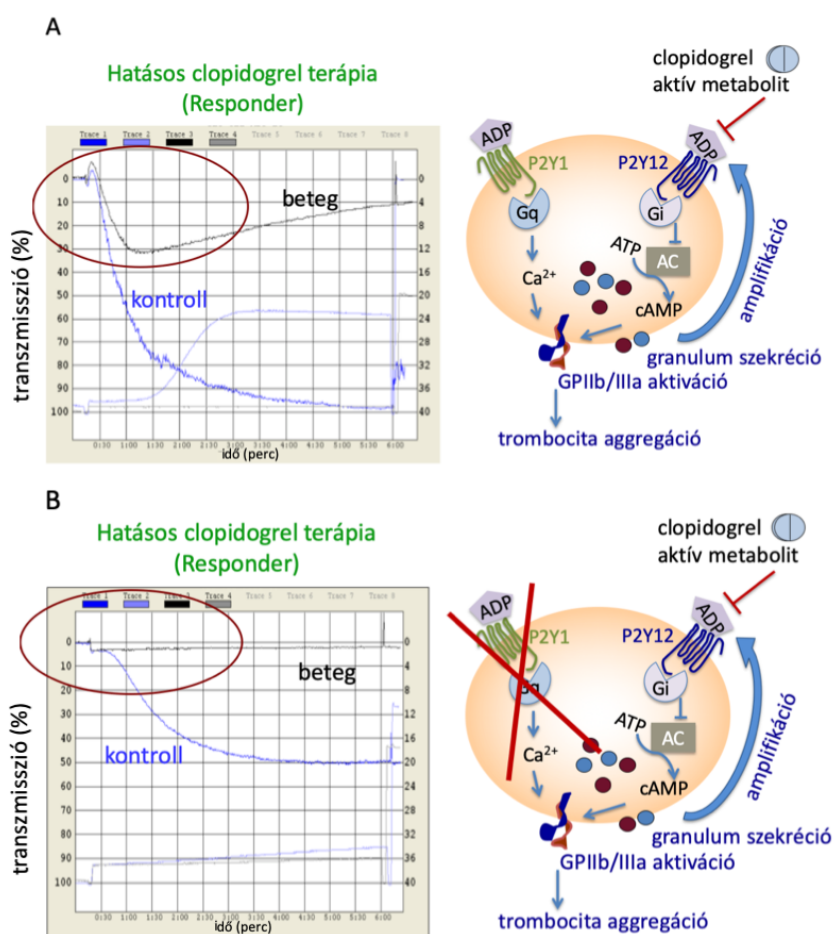
### A részeredményeket megalapozó közlemények:

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)

## 5.2 Hemosztázis vizsgálatok a vérlemezkegátló terápiák hatástalanságának felismerésére

### 5.2.1 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 ellenőrzésére. 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 (53. A ábra).

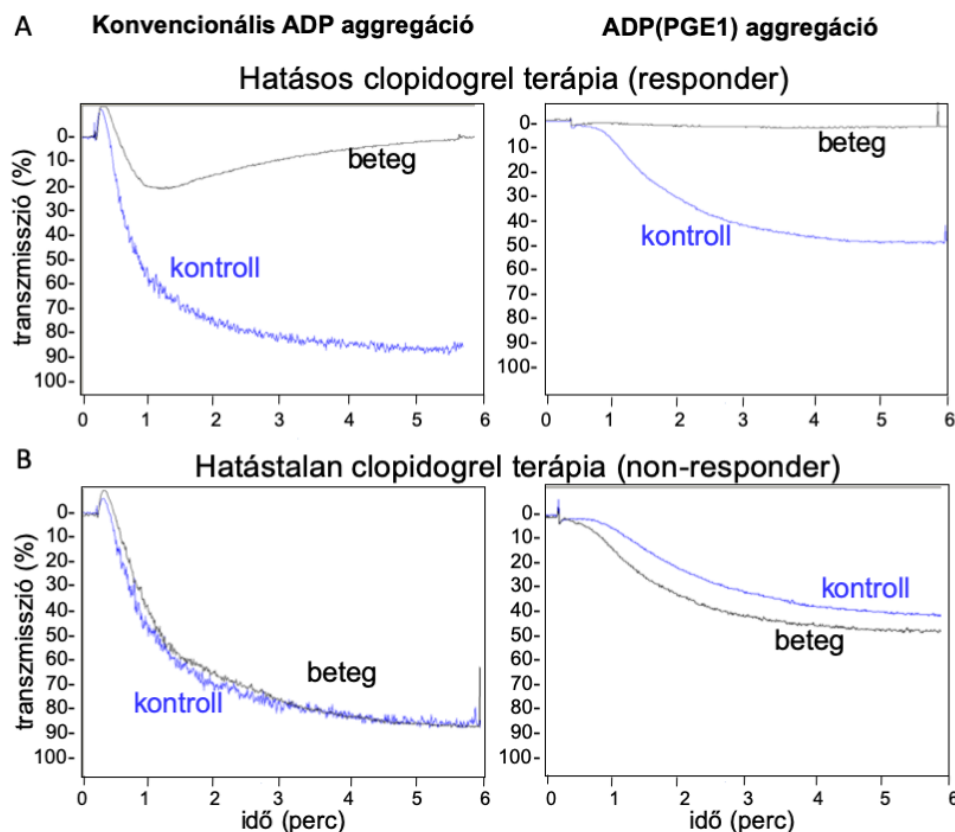


53. ábra. Reprezentatív trombotocita aggregációs és szekréción görbék egy hatásos clopidogrel terápian lévő beteg (fekete görbék) ill. clopidogrelt nem szedő kontroll (kék görbék) esetén. A bal

oldali panelek a hagyományos ADP-indukálta trombocita aggregációs módszer (A) ill. az általunk kidolgozott ADP(PGE1) aggregációs teszt (B) eredményét mutatják. Piros körök hívják fel a figyelmet a P2Y1 receptor által közvetített hatásra. Az aggregációs panelek mellett a vérelemzke ADP receptorokat és intracelluláris útvonalait sematikusán bemutató ábrán jelöltük a két különböző trombocita aggregációs teszt során érvényesülő biokémiai útvonalakat. PGE1 jelenlétében a P2Y1 receptor által közvetített hatás nem érvényesül, így a teszt specifikussá válik a clopidogrel aktív metabolitja által kifejtett vérelemzke gátlás mértékére.

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 (53. B és 54. A ábra).

Clopidogrel terápiára hatástalan válasz esetén a trombocita aggregáció a kontrollnak megfelelő volt (54. B ábra). 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 trombocitákhoz megszüntette a jelátvitelt a P2Y1 receptoron keresztül (ábra nincs feltüntetve).



**54. ábra. Reprezentatív ADP-indukálta ill. ADP(PGE1) trombocita aggregációs görbék hatásos (A) ill. hatástalan (B) clopidogrel terápián lévő betegek esetén.** A betegek trombocita aggregációs görbéi feketével, a clopidogrelt nem szedő kontrollok görbéi kékkel vannak jelölve. A bal oldali panelek a hagyományos ADP-indukálta trombocita aggregációt, a jobb oldali panelek az általunk kidolgozott, ADP(PGE1) aggregációs teszt eredményét mutatják. Az ADP(PGE1) teszt esetén hatásos clopidogrel terápia mellett nem jön létre aggregáció, a teszt specifikus a clopidogrel hatására. ADP: adenzin-5'-difoszfát, ADP(PGE1): prosztaglandin E1 jelenlétében elvégzett, ADP-indukálta trombocita aggregációs vizsgálat

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

A clopidogrel terápia monitorozására alkalmas módszereket (ADP-indukálta trombocita aggregáció, VerifyNow P2Y12 teszt, VASP foszforilációs vizsgálat, ADP(PGE1) trombocita aggregáció) 111, AIS szekunder prevenciójaként clopidogrel monoterápián lévő betegen és 140 egészséges, gyógyszer nem szedő kontrollon teszteltük. A gyógyszer nem szedő kontrollok vizsgálatának célja a referencia határértékek meghatározása volt. A vizsgált betegek és kontrollok legfontosabb klinikai paramétereit a 25. táblázat mutatja.

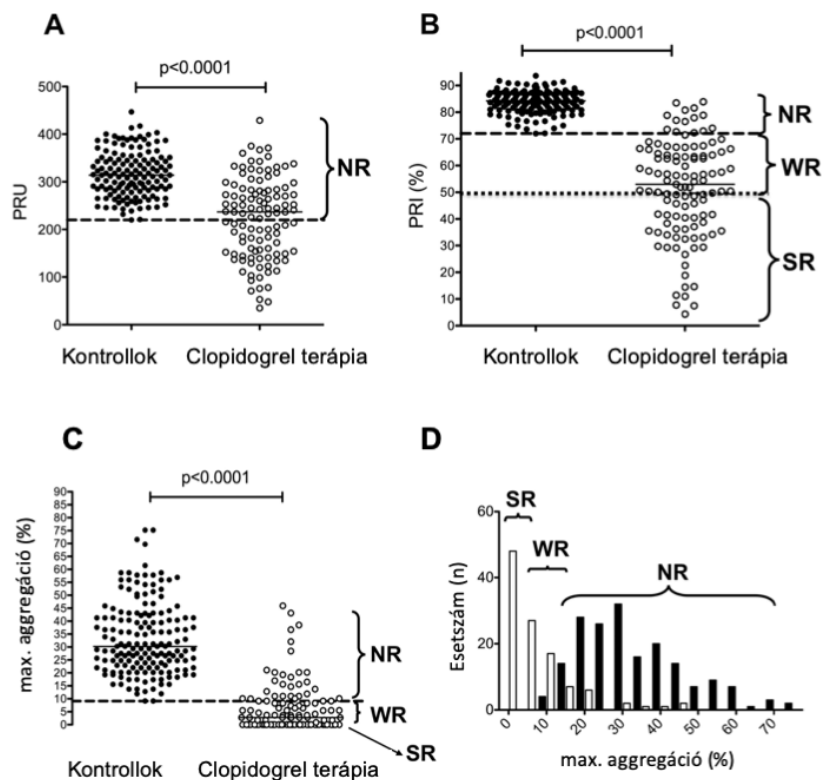
**25. táblázat. Clopidogrel monoterápián lévő betegek és kontrollok alapvető klinikai adatai**

	Clopidogrel monoterápia	Kontrollok	p
Esetszám	111	140	
Férfi	53 (47,7)	68 (48,5)	0,89
Kor, évek	61,6±10,4	43,3±18,0	<0,001
BMI (kg m <sup>-2</sup> )	25,9±7,9	24,0±3,8	<0,001
Diabetes mellitus	22 (20)	-	
Hipertenzió	80 (72)	10 (7,1)	<0,001
Dyslipidemia	73 (65,7)	2 (1,4)	<0,001
Dohányzás	24 (21,6)	34 (2,2)	0,64
Korábbi MI	24 (21,6)	-	
Többszöri stroke/TIA	83 (74,7)	-	
PPI terápia	11 (9,9)	-	
Statin terápia	67 (60)	-	
Clopidogrel terápia időtartama, hónapok	12 (1-119)	-	

A folytonos változók értékei átlag ± SD formában vannak feltüntetve. A kategorikus változókat az elemszám (százalék) mutatja. A clopidogrel terápia időtartama esetén a mediánt és zárójelben a teljes tartományt tüntettük fel. BMI: body mass index, MI: myocardialis infarctus, PPI: proton pumpa gátló, TIA: tranziens ischaemiás attack. Statisztika: Student's t teszt és  $\chi^2$  ill. Fisher's egzakt teszt

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 reagálók aránya módszertől függően 12-54% között változott. A hagyományos ADP-indukálta trombocita aggregációs módszerrel a betegek körülbelül fele bizonyult non-respondernek (50,5% és 51,4%, 5  $\mu$ M és 20  $\mu$ M ADP esetén) (adatok nincsenek ábrán bemutatva). A P2Y12-specifikus VerifyNow teszttel diagnosztizált non-responder aránya hasonló volt a hagyományos ADP-aggregációs módszerrel kapott eredményhez (54%) (55. A ábra). A másik P2Y12-specifikus módszer, a VASP foszforilációs teszt alkalmazásával kissé eltérő eredményeket kaptunk (55. B ábra). 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 (266-268). Ezt a küszöbértéket a betegpopulációkra 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 (55. C és D ábra). 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).



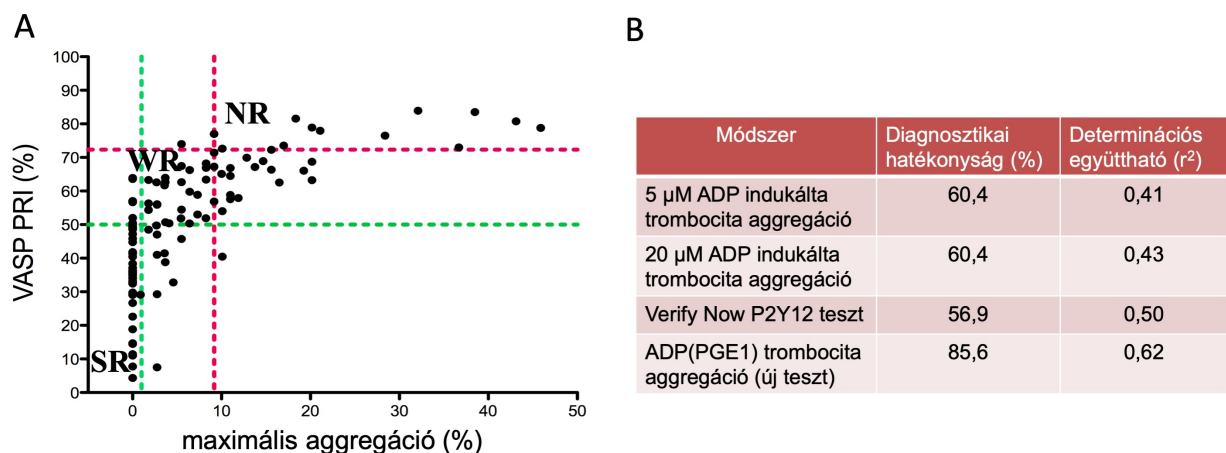
**55. ábra. Clopidogrel terápián lévő betegek és gyógyszer nem szedő kontrollok eredményei a clopidogrel hatásra specifikus laboratóriumi vizsgálatokkal.** A pontdiagramok a VerifyNow P2Y12 teszttel (A), a VASP foszforilációs teszttel (B) ill. az általunk kifejlesztett ADP(PGE1) trombo-cita aggregációs teszttel (C) kapott eredményeket mutatják. Az általunk kifejlesztett ADP(PGE1) trombo-cita aggregációs teszt eredményeit hisztogram formájában is ábrázoltuk (D). A fekete körök ill. oszlopok a gyógyszer nem szedő kontrollokat, az üres körök ill. oszlopok a clopidogrel terápián lévő betegeket



reprezentálják. A vízszintes vonalak a mediánt jelölik, a szaggatott vonalak a referencia határértékeket. A B panel esetén feltüntetett pontozott vonal a VASP foszforilációs vizsgálat klinikai vizsgálatokban megállapított clopidogrel rezisztencia határértékét mutatja (50% PRI) (266-268). max. aggregáció: maximális aggregáció, NR: non-responder, PRI: platelet reactivity index, PRU: P2Y12 reaction units, SR: strong responder (erős válaszadó), VASP: vazodilátor stimulált foszfoprotein, WR: weak-responder (gyenge válaszadó)

### 5.2.1.2 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 (56. ábra). Valamennyi vizsgált módszer közül a legjobb korrelációt az általunk kidolgozott ADP(PGE1) aggregációs teszt és a VASP foszforilációs teszt mutatta ( $r=0,79$ ,  $p<0,0001$ ) (56. A ábra). 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 (56. B ábra). 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.

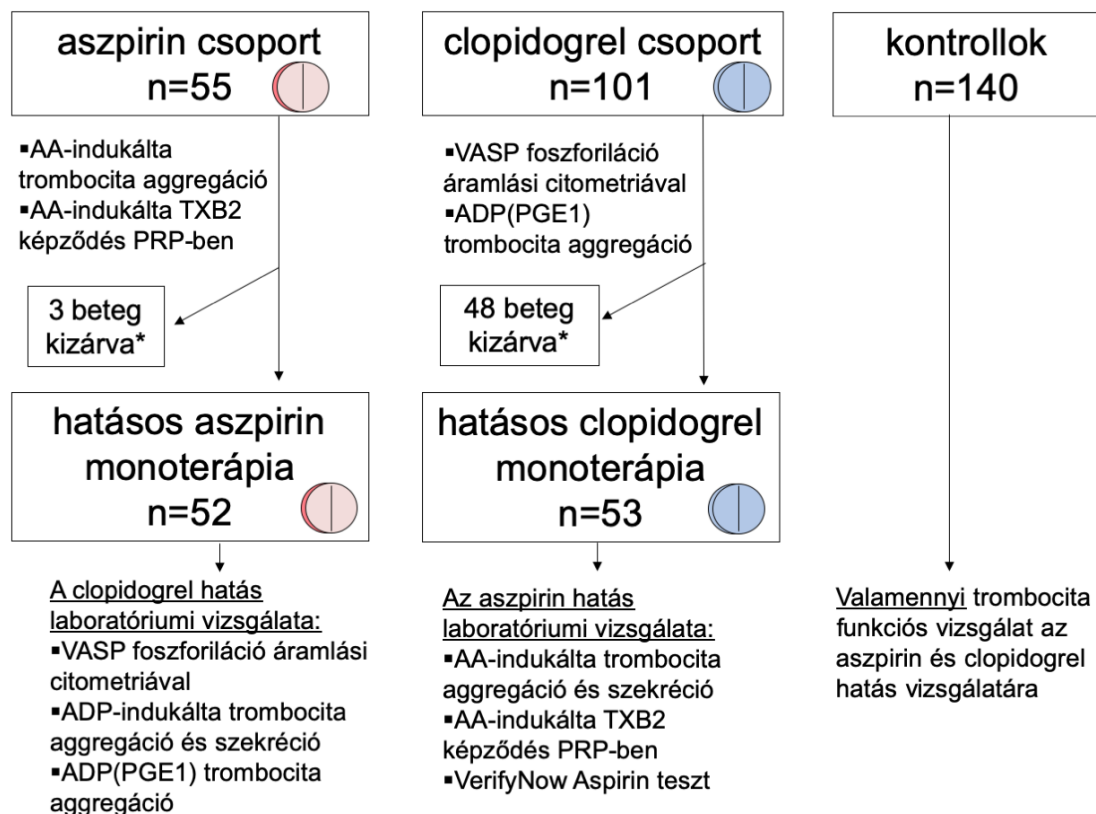


**56. ábra.** A VASP foszforilációs vizsgálat összehasonlítása a clopidogrel hatás vizsgálatára alkalmas laboratóriumi vizsgálatokkal. A VASP foszforilációs teszt és az általunk kifejlesztett ADP(PGE1) trombocita aggregációs teszt korrelációja (A). A piros szaggatott vonalak a non-responder határértékeit, a zöld szaggatott vonalak a gyenge válaszadók (weak responder) határértékeit mutatják mindkét módszer esetén. A VASP foszforiláció és az egyéb módszerek korrelációjából számított determinációs együttható és diagnosztikai hatékonyság (B). Az általunk kifejlesztett ADP(PGE1) trombocita aggregációs teszt esetén tapasztaltuk a legmagasabb diagnosztikai hatékonyság értéket. NR: non-responder, PRI: platelet reactivity index, SR: strong responder (erős válaszadó), VASP: vazodilátor stimulált foszfoprotein, WR: weak-responder (gyenge válaszadó)

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

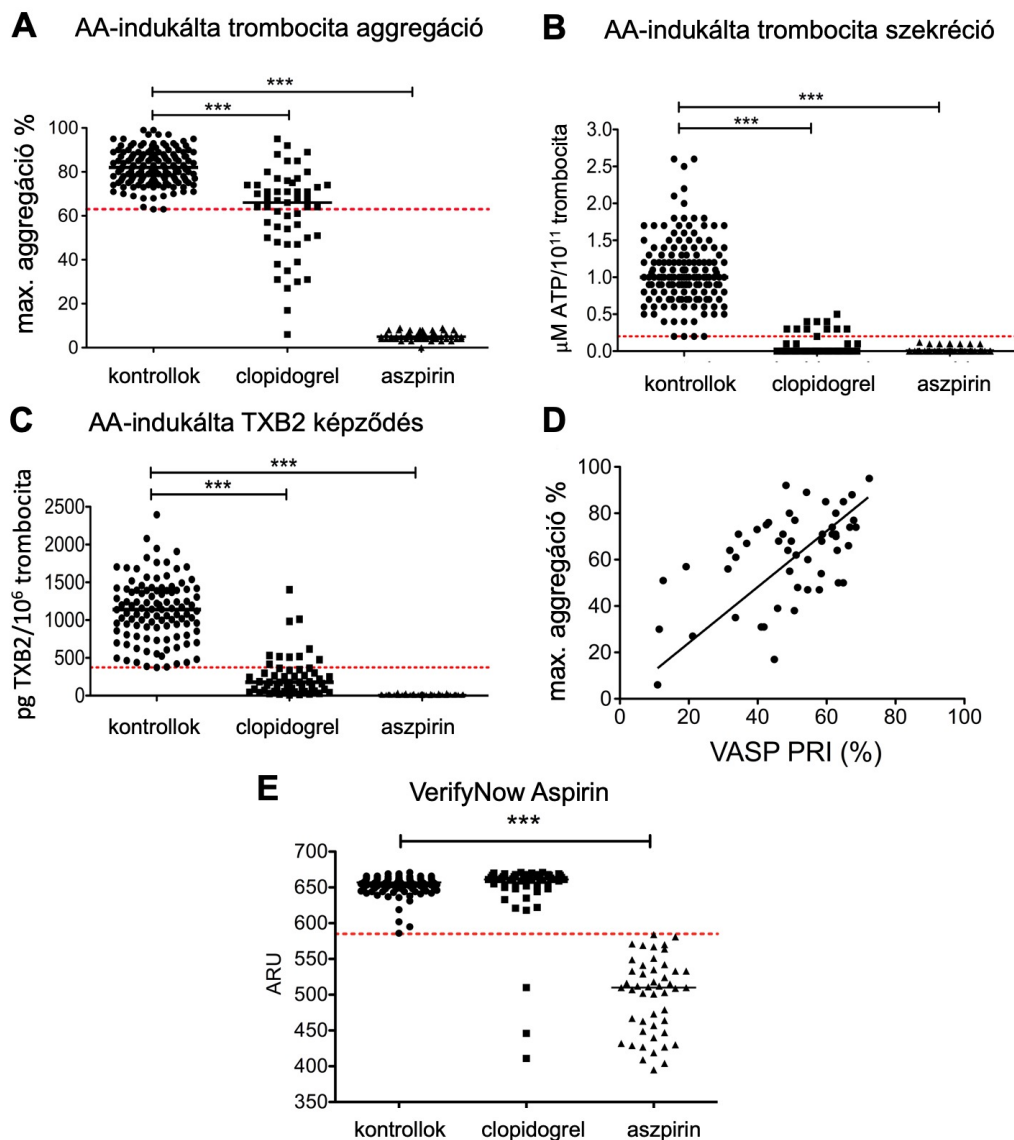
### 5.2.2.1 A clopidogrel monoterápia hatása az aszpirin hatását detektáló tesztekre

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 (lásd Módszerek fejezet, ill. 21. ábra). Valamennyi vizsgálatot elvégeztünk továbbá 140 egészséges kontroll egyén vérmintáján, melynek célja a referencia határértékek meghatározása volt. A vizsgálatok menetének egyszerűsített folyamatábráját az 57. ábra mutatja, a betegek és kontrollok klinikai alapadatait illetően terjedelmi korlátok miatt utalunk az eredeti közleményben publikált táblázatra (269).



**57. ábra. A vizsgálat menetének folyamatábrája.** Specifikus módszerek segítségével leellenőriztük, hogy az aszpirint vagy clopidogrelt monoterápia formájában szedő beteg esetén hatásos-e a terápia. \*Az aszpirin csoport esetén 3 beteget zártunk ki hatástalan terápia (bevallott non-compliance), a clopidogrel csoport esetén 48 beteget zártunk ki hatástalan terápia miatt. A fennmaradó betegek vérmintáin elvégeztük a nem használt trombocita aggregációs szer hatásának vizsgálatára alkalmas laboratóriumi vizsgálatokat, ill. 140 kontroll egyén esetén valamennyi, a tanulmányban használt trombocita funkciós vizsgálatot. AA: arachidonsav, ADP: adenzin-5'-difoszfát, ADP(PGE1): prosztaglandin E1 jelenlétében elvégzett ADP aggregációs teszt, PRP: trombocita dús plazma, TXB2: tromboxán B2, VASP: vazodilatátor stimulált foszfoprotein

Az aszpirin hatást detektáló tesztek közül a clopidogrel monoterápia szignifikánsan gátolta az AA-indukálta trombocita aggregációt és szekréciót. A kontroll csoporthoz viszonyítva a clopidogrel kezelés a betegek 41,5%-ban csökkentette az AA-indukálta trombocita aggregációt (58. A ábra).



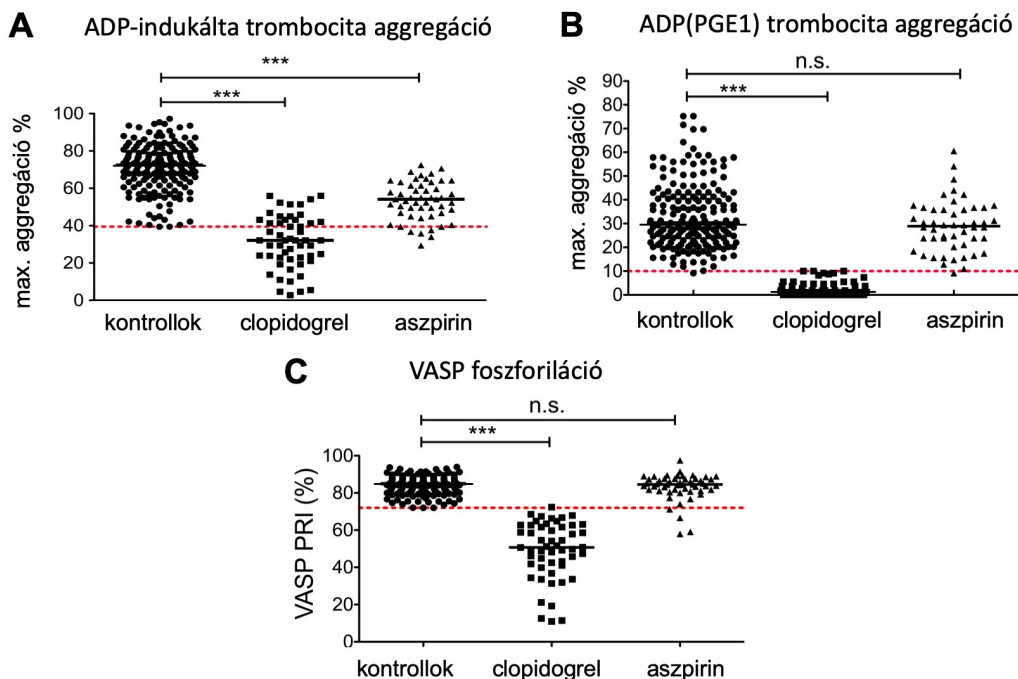
**58. ábra. A clopidogrel monoterápia hatása az arachidonsav (AA)-indukálta trombocita funkció vizsgálatokra.** AA-indukálta trombocita aggregáció (A), AA-indukálta trombocita szekréció (B) valamint AA-indukálta tromboxán B2 (TXB2) képződés mértéke trombocita dús plazmában (C) gyógyszer nem szedő kontrollok (teli körök), hatásos clopidogrel monoterápián lévő betegek (teli négyzetek) ill. hatásos aszpirin monoterápián lévő betegek (teli háromszögek) vérmintáiban. Az AA-indukálta trombocita aggregáció és a VASP foszforilációs teszt korrelációja clopidogrel monoterápián lévő betegek vérmintájában (D). A clopidogrel monoterápia a betegek túlnyomó többségében nincs jelentős hatással a VerifyNow Aspirin tesztre (E). A piros szaggatott vonalak az aszpirin non-responder határértékeket jelzik. A fekete vízszintes vonalak a mediánt jelzik az egyes csoportokban. ARU: Aspirin Reactivity Units, PRI: platelet reactivity index, VASP: vazodilatátor stimulált foszoprotein. \*\*\* $p < 0,001$

A clopidogrel hatására az AA-indukálta trombocita szekréció még kifejezettebb csökkenést mutatott, a betegek 79,2%-ában a szekréció mértéke a referencia tartomány alsó határa alatt

volt (58. B ábra). 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 (58. C ábra). A VASP foszforilációs teszt eredménye (azaz a clopidogrel által kiváltott P2Y12 receptor blokkolás mértéke) és az AA-indukálta trombocita aggregáció jó korrelációt mutatott a clopidogrelt szedő betegek esetében (Spearman  $r=0,49$ ,  $p<0,001$ ) (58. D ábra). 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 szekréciót, a VerifyNow Aspirin teszt (ami szintén AA indukcióra épül) eredményeit azonban gyakorlatilag nem befolyásolta a clopidogrel (58. E ábra). A teszt esetén a kontroll egyének (átlag: 657; IQR: 650-661 ARU) és a hatásos clopidogrel terápián 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.

#### *5.2.2.2 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 szekréciót (59. A ábra). 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 aggregációs teszt eredményeire (59. B ábra). A szintén P2Y12 receptor specifikus VASP foszforilációs teszt eredményeit sem befolyásolta az aszpirin monoterápia (59. C ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a clopidogrel hatást vizsgáló módszerek közül a P2Y12 receptorra specifikus tesztek nem befolyásolja az aszpirin hatása.

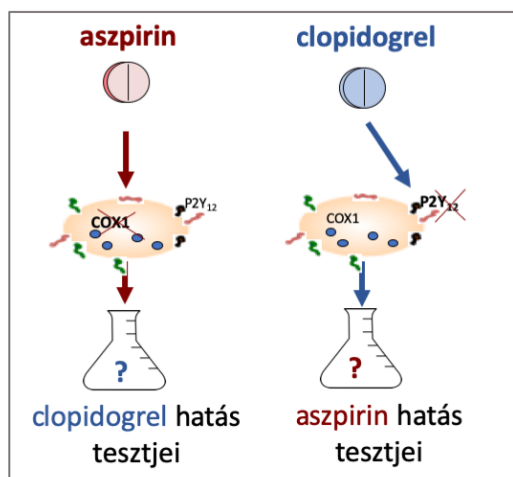


**59. ábra. Az aszpirin monoterápia nem befolyásolja a P2Y12 specifikus trombocita funkciók vizsgálatok eredményét.** ADP-indukálta trombocita aggregáció (A), ADP(PGE1) trombocita aggregációs módszer (B) valamint a VASP foszforiláció áramlási citometriás meghatározásával kapott eredmények (C) gyógyszer nem szedő kontrollok (fekete körök), hatásos clopidogrel monoterápián lévő betegek (fekete négyzetek) ill. hatásos aszpirin monoterápián lévő betegek (fekete háromszögek) vérmintáiban. A piros szaggatott vonalak az aszpirin non-responder határértékeket jelzik. A fekete vízszintes vonalak a mediánt jelzik az egyes csoportokban. ADP: adenzin-5'-difoszfát, n.s.: nem szignifikáns, PRI: platelet reactivity index, VASP: vazodilatátor stimulált foszfoprotein. \*\*\* $p < 0,001$

#### A részeredmények rövid összefoglalása:

Az általunk kidolgozott ADP(PGE1) trombocita aggregációs teszt a clopidogrel hatásra (a P2Y12 receptor gátlás mértékére) specifikus, megbízható, könnyen elvégezhető és olcsó teszt, melyet aszpirin terápia nem befolyásol. A clopidogrel hatást vizsgáló módszerek közül az általunk kidolgozott teszten kívül az egyéb, P2Y12 receptorra specifikus tesztek sem befolyásolta az aszpirin hatása (pl. VASP foszforiláció, VerifyNow P2Y12 teszt). A clopidogrel hatása azonban az AA-indukálta trombocita aggregációt, szekréción és TXB2 képződés mértékét is befolyásolta, és az általunk vizsgált tesztek közül csak a VerifyNow Aspirin teszt esetén nem volt jelentős hatás tapasztalható. Mindezek alapján kettős trombotagató terápia esetén a clopidogrel hatás monitorozására a VASP foszforiláció ill. ADP(PGE1) tesztek, aszpirin hatás monitorozására leginkább a VerifyNow Aspirin tesztet javasoljuk (60. ábra).

Aszpirin NEM befolyásolja, így kettős tromboticita gátló terápián lévő betegek esetén **clopidogrel** hatás tesztelésére ajánlható:  
 •VASP foszforiláció  
 •ADP(PGE1) teszt



Clopidogrel NEM befolyásolja, így kettős tromboticita gátló terápián lévő betegek esetén **aszpirin** hatás tesztelésére ajánlható:  
 •VerifyNow Aspirin

60. ábra. A vizsgálat eredményeinek összefoglalása. A kettős tromboticitagátló terápia esetén javasolható laboratóriumi vizsgálatok a vérlemezkegátló terápia hatékonyságának monitorozására.

A részeredményeket megalapozó közlemények:

1. **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)
2. **Bagoly, Z.**, Sarkady, F., Magyar, M., Kappelmayer, J., Pongrácz, E., Csiba, L., Muszbek, L.: Comparison of a New P2Y12 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)

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

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

##### 5.3.1.1 Vizsgálati csoportok

A pitvarfibrillációs csoport és a nem pitvarfibrilláló kontroll csoport klinikai jellemzőit a 26. táblázat mutatja be.

**26. táblázat. Pitvarfibrilláló betegek és nem pitvarfibrilláló, egyéb supraventricularis tachycardiában szenvedő kontrollok klinikai jellemzői**

Változók	PF betegek	nem PF kontrollok	p
Betegek létszáma kizárás után	24	14	
Életkor (év)	56,5 (47,4-59,8)	50,6 (32,8-56,1)	0,061
Férfi, n (%)	15 (62,5)	10 (71,4)	0,728
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29,43±5,52	26,10±4,75	0,068
<b>Cerebrovaszkuláris rizikófaktorok, n (%)</b>			
Artériás hipertónia	13 (54,2)	8 (57,1)	1,000
Hiperlipidemia	19 (79,2)	8 (57,1)	0,266
Aktív dohányzás	2 (8,3)	6 (42,9)	<b>0,013</b>
Diabetes mellitus	2 (8,3)	0	-
Korábbi myocardialis infarctus, n (%)	0	0	-
Korábbi ischaemiás stroke, n (%)	0	0	-
Szívelégtelenség, n (%)	1 (4,2)	0	-
Bal pitvar mérete (mm)	39,7±4,8	36,6±4,8	0,081
PF epizód beavatkozás során, n (%)	2 (8,3)	-	-
<b>CHADS<sub>2</sub> pontrendszer, n (%)</b>			
0	10 (41,7)	n.a.	-
1	10 (41,7)	n.a.	-
2	4 (16,7)	n.a.	-
<b>CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc pontrendszer, n (%)</b>			
0	6 (25,0)	n.a.	-
1	9 (37,5)	n.a.	-
2	5 (20,8)	n.a.	-
3	3 (12,5)	n.a.	-
4	1 (4,2)	n.a.	-
<b>EHRA pontrendszer, n (%)</b>			
1	3 (12,5)	n.a.	-
2	1 (4,2)	n.a.	-
3	16 (66,7)	n.a.	-
4	4 (16,7)	n.a.	-
<b>Gyógyszerek, n (%)</b>			
Statin	6 (25,0)	2 (14,3)	0,684
ACEi	8 (33,3)	6 (42,9)	0,729
β-blokkoló	17 (70,8)	9 (64,3)	0,728
<b>Laboratóriumi paraméterek</b>			
hsCRP (mg/L)	1,50 (0,60-2,75)	1,10 (0,13-2,05)	0,281
Összkoleszterin (mmol/L)	5,30±1,16	4,69±1,09	0,122
LDL koleszterin (mmol/L)	3,42±0,98	2,79±0,91	0,061
HDL koleszterin (mmol/L)	1,44±0,32	1,46±0,42	0,812
Triglicerid (mmol/L)	1,80 (1,23-2,18)	1,40 (0,75-1,95)	0,208
0 vércsoport, n (%)	7 (29,2)	2 (14,3)	0,446

A folytonos változók értékeit átlag ± SD vagy medián (IQR)-ként tüntettük fel. A kategorikus változókat az elemszám (százalék) mutatja. ACEi: angiotenzin konvertáló enzim inhibitor, BMI: testtömeg index, CHADS<sub>2</sub>: congestív szívelégtelenség, hipertónia, kor ≥75 év, diabetes mellitus, stroke/átmeneti agyi ischaemiás attack, CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc: congestív szívelégtelenség, hipertónia, kor ≥75 év, diabetes mellitus, stroke/átmeneti agyi ischaemiás attacki/tromboembólia, vaszkuláris lézió (korábbi myocardialis infarctus, perifériás érbetegség vagy aorta ateroszklerózis), kor (65-74 év), nem (nő), EHRA pontrendszer: European Heart Rhythm Association pontrendszere, HDL: nagy denzitású lipoprotein, hsCRP: nagy érzékenységű C reaktív protein vizsgálat, IQR: interkvartilis tartomány, LDL: alacsony denzitású lipoprotein, n: elemszám, n.a.: nem alkalmazható, PF: pitvarfibrilláció, SD: standard deviáció

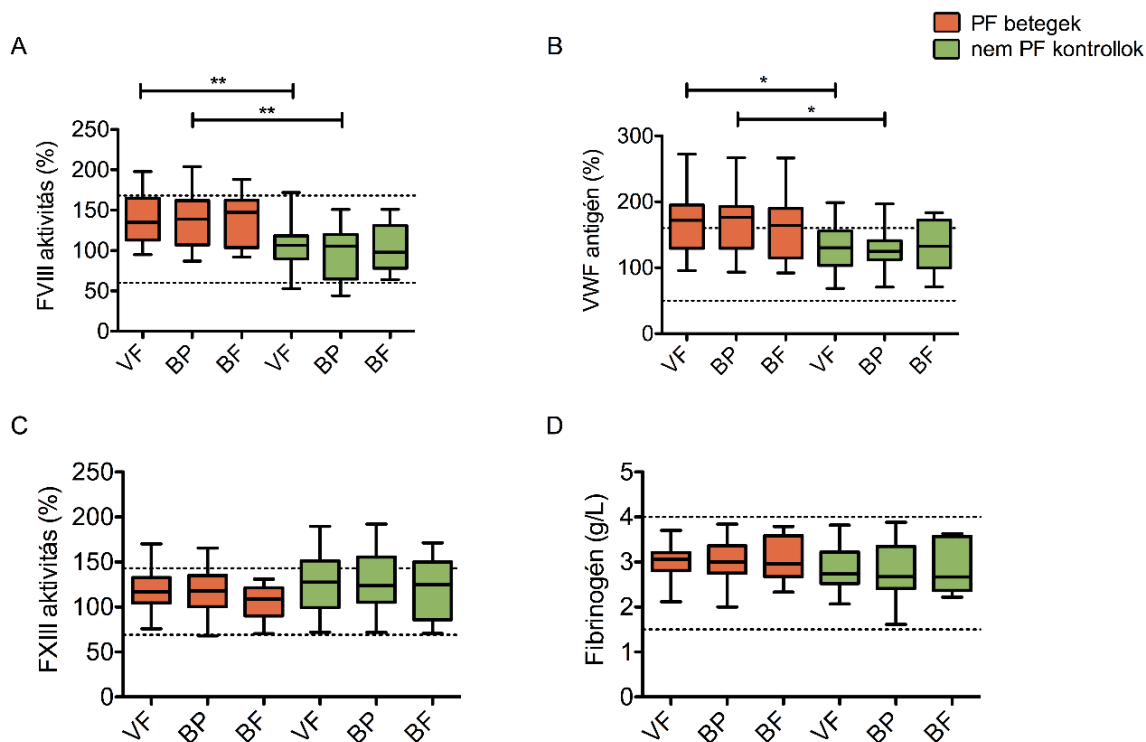


Összesen 32 pitvarfibrilláló beteg és 18 kontroll került beválogatásra. A mintavételkor felmerülő technikai problémák miatt 8 pitvarfibrilláló beteget és 4 kontrollt ki kellett zárni a vizsgálatból (vérvétel közben véralvadék kialakulása a mintában, a katéterben kialakuló alvadék miatt azonnali heparin adása, stb.). A mintavételi csoportokba ennek megfelelően 24 pitvarfibrilláló beteg és 14 kontroll került (26. táblázat). 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.

#### *5.3.1.2 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 (61. A és B ábra). 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 (az adatok nem kerülnek bemutatásra). A FXIII aktivitás és fibrinogén szintek esetén nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport, valamint a mintavételi helyek összehasonlításakor sem (61. C és D ábra).



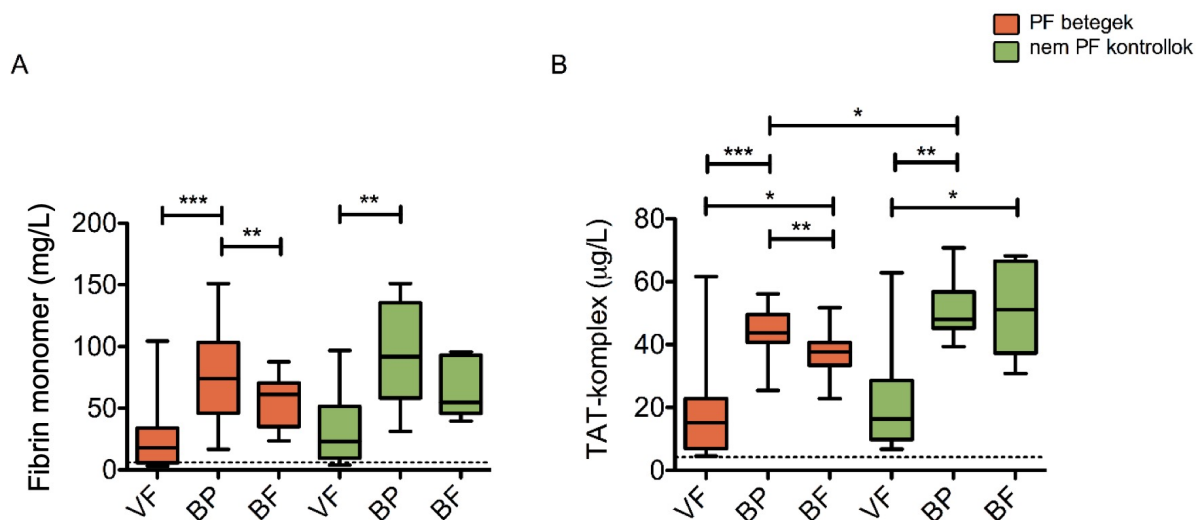


61. ábra. Egyes hemosztázis fehérjék szintje intrakardiális és perifériás vérmintákban pitvarfibrilláló betegekben és nem pitvarfibrilláló kontrollokban. A doboz-bajusz ábrákon a medián érték, az interkvartilis tartomány és a terjedelem látható a FVIII aktivitás (A), VWF antigén (B), FXIII aktivitás (C) és fibrinogén szintek (D) esetén. Szaggatott vonallal a referencia tartomány alsó és felső határértékei vannak jelölve. BF: bal fülcsé, BP: bal pitvar, FVIII: VIII-as faktor, FXIII: XIII-as faktor, PF: pitvarfibrilláló, VF: vena femoralis, VWF: von Willebrand faktor. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

### 5.3.2 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 (62. A és B ábrák). 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 (62. A ábra). 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 (62. B ábra). A vena femoralis

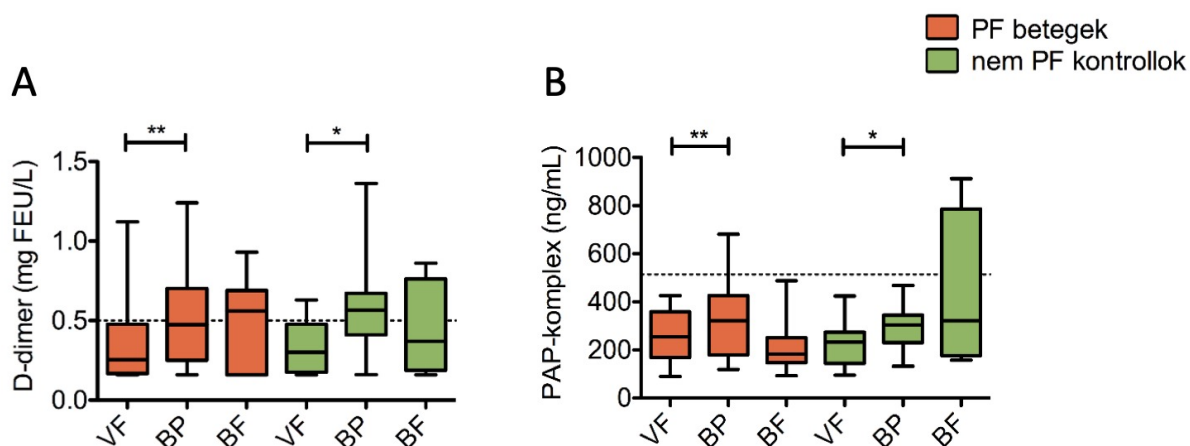
mintákhoz hasonlítva a bal fülcséből származó minták TAT-komplex szintje szignifikánsan emelkedett volt mindkét csoportban. Érdekes módon, a pitvarfibrilláló betegcsoport és a kontroll csoport összehasonlításakor, a bal pitvari minták TAT-komplex szintje kis mértékben, mégis szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoportban a pitvarfibrilláló csoporthoz képest.



**62. ábra. A kvantitatív fibrin monomer (A) és a trombin-antitrombin (TAT)-komplex (B) szintek pitvarfibrilláló betegekben és nem pitvarfibrilláló kontrollokban.** A doboz-bajusz ábrákon a medián érték, az interkvartilis tartomány és a terjedelem látható. A szaggatott vonalak a referencia határértékeket jelzik. BF: bal fülcsé, BP: bal pitvar; PF: pitvarfibrilláló, VF: vena femoralis. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

### 5.3.2.1 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 (adatok nincsenek prezentálva). 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 (63. A és B ábrák), 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 VTE 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 (63. A ábra).



**63. ábra.** D-dimer (A) és plazmin- $\alpha$ 2-plazmin inhibitor (PAP)-komplex szintek (B) intrakardiális és perifériás vérmintákból pitvarfibrilláló betegekben és nem pitvarfibrilláló kontrollokban. A doboz-bajusz ábrákon a medián érték, az interkvartilis tartomány és a terjedelem látható. A szaggatott vonalak a diagnosztikai határértéket jelzik. BF: bal fülcse, BP: bal pitvar, PF: pitvarfibrilláló, VF: vena femoralis. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

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

#### 5.3.3.1 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 (27. táblázat).

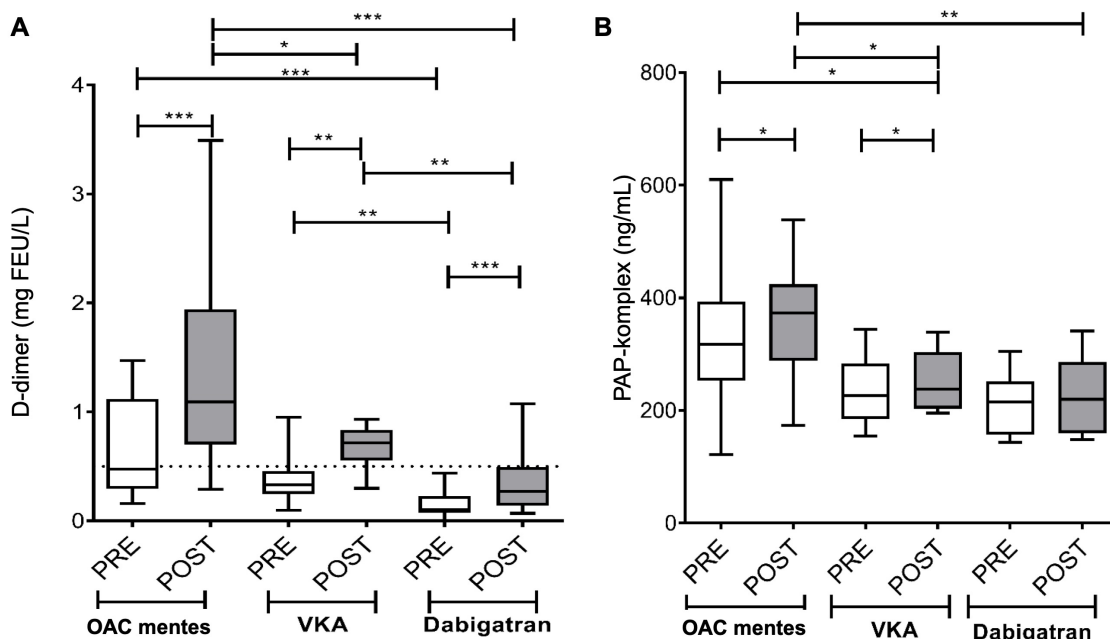
**27. táblázat. Főbb klinikai adatok és a beavatkozások adatai a különböző preprocedurális antikoagulációs stratégiák mellett végzett pulmonális véna izoláció során zajló hemosztázis változások vizsgálata során**

	OAC nélkül (n=24)	VKA (n=11)	Dabigatran (n=17)	P
Kor, év	51,2±12,6	58,3±10,8	56,3±10,2	0,240
Férfi	15 (62,5)	8 (72,7)	11 (64,7)	0,838
BMI, kg/m <sup>2</sup>	29,03 (26,68-31,49)	29,02 (28,35-31,47)	26,88 (24,89-30,93)	0,558
Hipertónia	13 (54,2)	7 (63,6)	10 (58,9)	0,489
Hiperkoleszterinémia	13 (54,2)	8 (72,7)	7 (63,6)	0,112
Dohányzás	7 (29,2)	2 (18,2)	4 (23,5)	0,479
Diabetes mellitus	1 (4,2)	2 (18,2)	1 (5,9)	0,386
Bal pitvari átmérő, *mm	40,54±5,4	42,30±3,30	41,3±3,6	0,597
Bal kamrai ejekciós frakció (%)	57,38±5,9	60,80±8,04	55,93±6,77	0,228
CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc	1 (0-2)	1 (0-3)	1 (0-2)	0,780
INR a beavatkozáskor	0,96±0,05	2,33±0,32	1,18±0,09	<b>&lt;0,001</b>
Dabigatran szint, (ng/mL)	-	-	165,6 (70,6-331,9)	-
hsCRP, mg/L	1,4 (0,5-2,5)	1,0 (0,5-2,5)	1,7 (0,8-4,6)	0,338
Procedúra idő, min	70,08±15,7	78,9±33,7	65,5±22,8	0,155

A folytonos változók értékeit átlag ± SD vagy medián (IQR)-ként tüntettük fel. A kategorikus változókat az elemszám (százalék) mutatja. A dabigatran szint vizsgálata esetén a mediánt és teljes tartományt tüntettük fel. BMI: testtömeg index, CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc: congestív szívelégtelenség, hipertónia, kor ≥75 év, diabetes mellitus, stroke/átmeneti agyi ischaemiás attack/tromboembólia, vaszkuláris lézió (korábbi myocardialis infarctus, perifériás érbetegség vagy aorta ateroszklerózis), kor (65-74 év), nem (nő), hsCRP: nagy érzékenységgű C reaktív protein meghatározás, INR: nemzetközi normalizált ráta, OAC: orális antikoaguláns, IQR: interkvartilis tartomány, SD: standard deviáció, VKA: K vitamin antagonist. \*Parasternalis hosszszegélyi metszetből mérve

### 5.3.3.2 Hemosztázis ill. fibrinolízis markerek szintjének változása cryoabláció során különböző preprocedurális antikoagulációs stratégiák esetén

Az abláció utáni D-dimer szintek jelentősen emelkedtek az abláció előtti D-dimer szintekhez képest valamennyi vizsgált antikoagulációs stratégia mellett (64. A ábra). 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 VTE diagnosztikája során használt 0,5 mg FEU/L-es referencia küszöböt (64. A ábra), tehát a koaguláció aktiváció mértéke ebben a csoportban az ablációt követően is jelentős mértékben szupresszált volt.

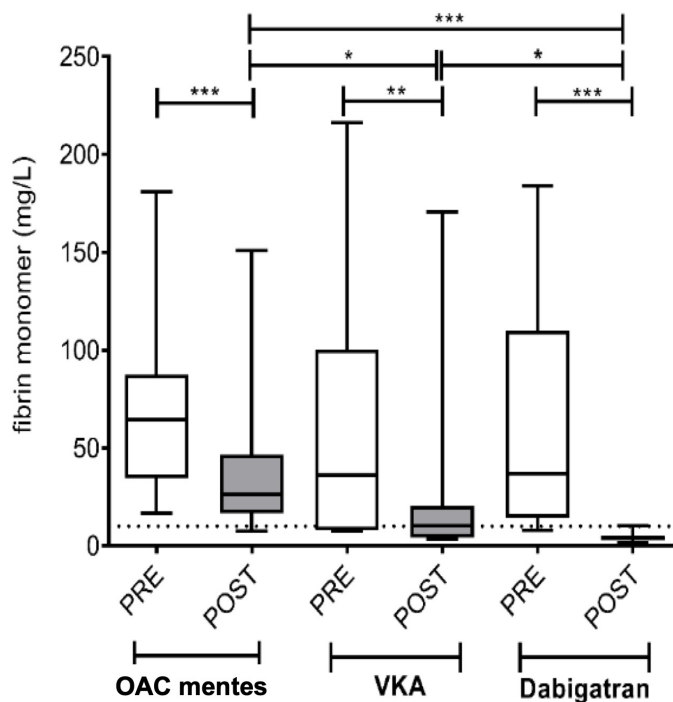


**64. ábra. A bal pitvari D-dimer (A) és plazmin- $\alpha$ 2-plazmin inhibitor (PAP)-komplex szintek (B) cryoabláció előtt (PRE) és után (POST) eltérő preprocedurális antikoagulálási stratégiák mellett.** A doboz és a bajusz ábrák a mediánt, az interkvartilis tartományt és a teljes tartományt jelzik. A D-dimer esetén szaggatott vonal jelzi a vénás tromboemboliás események diagnosztikai határértékét (0,5 mg FEU/L). OAC mentes: antikoaguláns nélkül, PRE (fehér oszlopok): abláció előtt, POST (szürke oszlopok): abláció után, VKA: K-vitamin antagonistá. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

A D-dimerhez hasonlóan az abláció után szignifikánsan emelkedett volt 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 (64. B ábra). 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 dabigatranal kezelt betegek esetén (adatok nincsenek ábrázolva). Az eddigi eredményekkel összhangban jelentős fibrinogén szint csökkenés, konzumpció szintén csak a nem antikoagulált csoportban volt kimutatható, ellentétben a véralvadásgátlóval előkezelt betegekkel (adatok nincsenek ábrázolva).

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 (65. ábra). Viszont ennek a fehérjének a rövid féleletideje ( $T_{1/2} = 2,3$  óra) miatt (270) 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,

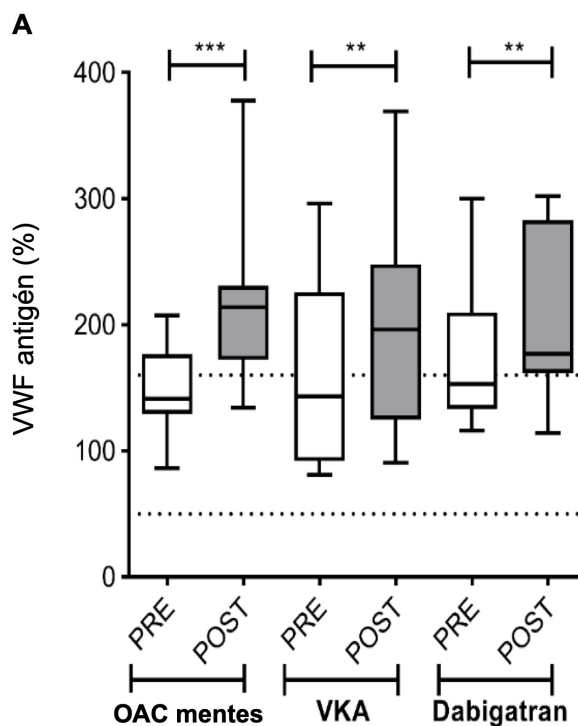
ami az ablációs eljárás során lényegesen alacsonyabb koaguláció aktivációt jelzett ebben a betegcsoportban a VKA és az OAC nélküli csoportokhoz viszonyítva. A nem antikoagulált csoportban az abláció utáni fibrin monomer szintek a betegek túlnyomó többségében továbbra is a referencia tartomány felett voltak, ami arra utal, hogy az ablációs eljárás során a koaguláció aktivációja tartósan fennállt.



**65. ábra.** A bal pitvari fibrin monomer szintek változása cryoabláció előtt és után eltérő preprocedurális antikoagulálási stratégiák mellett. A szaggatott vonal a pretrombotikus állapot határértékét jelzi (10 mg/L). A doboz-bajusz ábrák a mediánt, az interkvartilis tartományt és a teljes tartományt jelzik. OAC mentes: antikoaguláns nélkül, PRE (fehér oszlopok): abláció előtt, POST (szürke oszlopok): abláció után, VKA: K-vitamin antagonistá. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

### 5.3.3.3 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 vártak megfelelően a beavatkozás kapcsán hasonló mértékű endothel károsodás valószínűsíthető mindhárom vizsgált csoportban, függetlenül az alkalmazott antikoagulációs stratégiától (66. ábra). Várakozásainknak megfelelően a FVIII aktivitás szintek a VWF antigén szintekkel párhuzamosan változtak a különböző abláció előtti antikoagulálási stratégiáktól függetlenül (eredmények nincsenek ábrázolva).



**66. ábra. A bal pitvari von Willebrand faktor (VWF) antigén szintek változása cryoabláció előtt és után eltérő preprocedurális antikoagulálási stratégiák mellett.** A szaggatott vonalak a referencia tartomány alsó és felső határát jelzik (50-160%). A doboz-bajusz ábrák a mediánt, az interkvartilis tartományt és a teljes tartományt jelzik. OAC mentes: antikoaguláns nélkül, PRE (fehér oszlopok): abláció előtt, POST (szürke oszlopok): abláció után, VKA: K-vitamin antagonistá. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

#### A részeredmények rövid összefoglalása:

Kutatásaink során elsőként elemeztünk komplex hemosztázis és fibrinolízis változásokat bal pitvari vérmintákból pitvarfibrilláló betegekben nem pitvarfibrilláló kontrollokhoz képest, ill. vizsgáltuk az egyes hemosztázis és fibrinolízis markerek intrakardiális szintjének változásait a pitvarfibrilláció ablációja során. A pitvarfibrilláló betegekben a FVIII aktivitás és a VWF antigén szintek szignifikánsan emelkedettek voltak az intrakardiális és perifériás vérmintákban egyaránt a nem pitvarfibrilláló kontrollokhoz képest. A hemosztázis lokális, intrakardiális aktivációjára az emelkedett TAT-komplex, fibrin monomer, PAP-komplex és D-dimer szintek utaltak, azonban ezek az eltérések nem voltak specifikusak pitvarfibrillációra nézve.

A bal pitvari vérmintákban mért hemosztázis aktiváció markereinek komplex panelje segítségével kimutattuk, hogy a cryobalonnal végzett tüdővéna izoláció előtt a vizsgált preprocedurális antikoagulálási stratégiák közül a naponta kétszer 150 mg dabigatran megszakítás nélküli adása biztosította a leghatékonyabb koaguláció aktiváció gátlást az abláció előtt és alatt.

**A részeredményeket megalapozó közlemények:**

1. **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)
2. 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.* 2017 1-10, 2017. IF: 2,583 (Q1)



## 6 MEGBESZÉLÉS

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

#### 6.1.1.1 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 (243, 271-273). 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 (243). 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) (274, 275). Az elemzés tanulságaiként azonosítottak egyes módszertani nehézségeket, és olyan technikai problémákat, melyek ellentmondásos vagy félrevezető adatokat produkálhatnak. Először is, a legtöbb tanulmány viszonylag kevés beteget (<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 betegeknel 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 óraban rendelkezésre álló személyi és technikai háttér szükségese). 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, mely közlésre került az irodalomban. 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-ot szenvedett betegekben már a kórházi felvételkor is meghaladta a referencia tartomány felső határát, majd a trombolízis folyamán kismértékű, szignifikáns emelkedést mutatott, melynek hátterében leginkább endothel károsodás valószínűsíthető. A FXIII aktivitás és antigénszint pedig kismértékű, szignifikáns csökkenést mutatott a trombolízis után a lízis előtti szintekhez képest, melynek legvalószínűbb oka konzumpció lehet.

*6.1.1.2 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 (276, 277). 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 (278). Ez a jelenség magyarázhatja azt, hogy az  $\alpha$ 2-PI antigén teszt vizsgálatainkban szorosabb összefüggést mutatott a stroke súlyosságával és

a kimenetekkel 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 (279). 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 (280, 281), azok a betegek, akik hemorrhagiás 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 kimenetekkel 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 betegeknek, 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 kimeneteket 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 kimenetek 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 (279).

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 inaktiválja az FXIIIa-t, de a FXIII zimogén formáját nem (282). 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 véráramlási 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 (283). 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 betegeknél, akik a stroke utáni első héten meghaltak, szokatlanul alacsony volt a FXIII szint a trombolízist követő napon; elmondható, hogy ezeknél a betegeknél 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 hátterében 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 betegekben, 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 (41).

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 kohorszban 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 (41, 284). 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 (41, 285, 286). Hasonlóképpen, a FXIII,  $\alpha 2$ -PI és PAI-1 inhibitorok létjogosultsága is felmerült kiegészítő terápiaként (41, 284). 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.

*6.1.1.3 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 (41, 287). A CBS a trombus méretét és hosszát

pontosan osztályozza, és korábbi vizsgálatokban már igazolták hasznosságát az intravénás trombolízisre potenciálisan kedvezőtlenül reagálók azonosításában (138, 288). 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 elsőként vizsgáltuk kulcsfontosságú fibrinolízis paraméterek trombusmérettel való összefüggéseit AIS betegekben. Az irodalomban csak egy olyan közlés található, amelyben a hemosztázis fehérjék kapcsolatát vizsgálták a CBS-sel (289). Ebben a vizsgálatban kizárólag a fibrinogént mérték AIS betegek egy kisebb csoportjában, és azt állapították meg, hogy a magasabb fibrinogén szint kisebb trombus mérettel 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 vörösvértestszámot 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 vörösvértestek száma, sem a vérlemezkeshám nem volt összefüggésben a kimenetellel ebben a kohorszban.

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 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 (62, 290). 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 VTE kialakulásával szemben, de ischaemiás stroke esetén egyelőre még nincs ezzel kapcsolatos evidencia (62). 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 (259, 291). *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 allélhoz képest (62). 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 (290). 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 rétegezését is magába foglaló, komplex statisztikai elemzése során nem tudtuk ebben a kohorszban az allél fibrinogén szint függő hatását kimutatni, melynek hátterében 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 (292). *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 trombus mérettel) rendelkező betegek nagyobb valószínűséggel profitálnak az endovaszkuláris kezeléssel, mint önmagában az intravénás trombolízisből (293, 294). 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 (295, 296). Tanulmányunkban igazoltuk, hogy a trombus mérete valóban az egyik legfontosabb, a trombolízist befolyásoló tényezők közé tartozik, és a kulcsfontosságú fibrinolitikus faktorok plazmából meghatározott szintjei kevésbé voltak meghatározóak 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 kimenettel, 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 kimenetét befolyásoló tényezők egyike lehet elméletileg a hiperkoagulabilitás, melynek hátterében 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 (297). 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 FV<sub>Leiden</sub> hetero- és homozigóták között, de ez statisztikailag nem bizonyult szignifikáns eltérésnek. Ez részben a vizsgálati alanyok kis számával magyarázható. A FV<sub>Leiden</sub> 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 FV<sub>Leiden</sub> 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 FV<sub>Leiden</sub> mutáció jelenléte, akár heterozigóta formában rontja-e a trombolízis kimenetelét AIS betegekben. Az irodalomban esettanulmányok alapján feltételezhető a FV<sub>Leiden</sub> mutáció ilyen jellegű hatása (298), azonban a relatíve ritkább allélfrekvencia miatt a vizsgálat kivitelezéséhez nagy létszámú AIS kohorszra lenne szükség. Munkacsoportunk jövőbeli tervei között szerepel a FV<sub>Leiden</sub> mutáció és egyéb protrombotikus ill. antifibrinolitikus hatású polimorfizmusok vizsgálata a trombolízis kimenetelére vonatkozóan nagylétszámú (n >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.

#### *6.1.1.4 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 (299). 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 (243).

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 inaktiválja a FVIII-at (300), 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 (301). 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 korábbról ismert *in vitro* kísérletekből (302, 303). Az általunk használt diagnosztikai teszt poliklonális antitestek alkalmazásával határozza meg a VWF antigén szintjét, ebből fakadóan, a teszt által mért megemelkedett szintek hátterében a fehérje degradációja is állhat. Egy korábbi tanulmányban, mely rt-PA trombolízisben részesült akut myocardialis infarctusban szenvedő kis létszámú betegcsoportban (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 hátterében a VWF multimerek degradációja állhatott (303). Saját tanulmányunk eredményei szerint 24 órával a trombolízis utáni minták VWF antigén szintjei szignifikánsan magasabbak SICH esetén (n=6), a vizsgált kohorsz 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 hátterében másrésről az ischaemiás károsodás következtében kialakuló endothel károsodás 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 (304). Vizsgálataink szerint a VWF antigén szintjei azon betegeknél 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 endothel károsodás állhat. Nem kizárható azonban, hogy a VWF szintek trombolízis során megfigyelt emelkedésének háttérében a vérlemezkékből felszabaduló VWF is állhat, 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 (305, 306).

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 betegeknél 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 polimorfizmusa nem volt hatással a plazma PAI-1 szintjére, ami összhangban van korábbi vizsgálatok eredményeivel (307-309). 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 (310), 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 után ICH-t szenvedett betegeknél 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 asztrocitákból felszabaduló PAI-1 lokális, a vér-agy gát károsodását csökkentő hatásával magyarázható, mely elmélet igazolására további tanulmányok szükségesek (311-315).

*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 (241). 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 (242). 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 (35). Vizsgálatunk alapján elmondhatjuk, hogy a cfDNA és hiszton hozzáadása az *in vitro* CLA keverékhez, a vártak megfelelően, szignifikánsan megnyúlt alvadék képződést és lízist eredményezett (28, 31, 316). 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 granulumok fehérjéinek (pl. humán neutrofil elasztáz, mieloperoxidáz) felszabadulását is magába foglalja, ami komplex interakciók sokféleségéhez vezet a trombuson belül (317). Bár a cfDNA és hiszton hatása korántsem azonos az intakt NET-ek hatásával, kimutatták, hogy a DNS-nek és a hisztonnak fontos alvadék-stabilizáló és antifibrinolitikus szerepe van (316, 318). 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 (28, 31, 316, 319, 320). 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 (30, 31). 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 (320). A tanulmányunk során alkalmazott mCLA mérések során a cfDNA és hiszton optimális koncentrációját korábbi *in vitro* tanulmányok eredményei alapján választottuk (31).

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 (141). E megközelítés biztonságosságának javítása érdekében az új módszerek, mint például az mCLA, hasznosnak bizonyulhatnak a jövőben (253, 321-325). 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 betegcsoportban. 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 (326-328). A CLA korábban már potenciálisan hasznosnak bizonyult egyes kimenetek előrejelzésében számos olyan kórkép esetén, ahol a fibrinolitikus rendszer egyensúlyának zavara alakult ki (30, 33, 35, 316, 329). 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 (330). 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 VTE rizikója igen magas (265). 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 (331, 332). 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 (333). 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 (333, 334). 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 kohorszban történő validálást követően megteremhetnék a personalizált VTE profilaxis alapjait agyvérzett betegekben.

#### *6.1.1.5 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 csoportjában 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 aránya 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.

## **6.2 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 tromboцитa gátlás mértéke nagyfokú egyéni változatosságot mutat (335). 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 hátterében elsősorban metabolikus okok állnak (leggyakrabban CYP2C19 \*2 ill. \*3 funkcióvesztő allélek jelenléte), a clopidogrelt szedő betegeknél 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 (168). A laboratórium szerepe azonban továbbra is fontos lehet, egyéni esetekben a clopidogrel hatástalanságának megítélése szempontjából (168, 336). 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 (337, 338). 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 tesztek nem befolyásolja az aszpirin hatása. Ennek megfelelően kettős trombotocita 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 vérlemezkék gátlásán keresztül, hanem a CYP2C19 funkcióvesztő allélek tesztelésével váltanak ki azt, még a terápia megkezdése előtt (339). 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 trombotocitagátló terápia (340). 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 trombotocitagátlás 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 (165). Fontos megjegyezni, hogy az „aszpirin rezisztencia” fogalmát többféleképpen definiálhatjuk. Kémiai rezisztencia esetén a trombotocita 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 (169). Non-szteroid gyulladáscsökkentők (ibuprofen) interferálhatnak az aszpirin hatásával, így az adekvát laboratóriumi teszttel észlelt elégtelen aszpirin hatás ilyen gyógyszerinterakcióra is irányíthatja a figyelmet (165). 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. P2Y12 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 TXB2 termelődést a trombocitákban. A VerifyNow Aspirin teszt eredményeit nem befolyásolta a clopidogrel, így az javasolható kettős trombocita gátló terápián lévő betegek vizsgálatára.

#### *6.2.1.1 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.

### **6.3 Intrakardiális hemosztázis és fibrinolízis markerek vizsgálata pitvarfibrilláló betegekben**

#### *6.3.1.1 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 (199). Ugyanakkor, jelen tanulmányunk eredményei szerint ezen paraméterek változásai nem specifikusak a pitvarfibrillációra, hanem a megfigyelt változások valószínűleg az elektrofiziológiai beavatkozás invazivitásának köszönhetőek, beleértve a transeptális 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 (194, 303, 341-343).

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 (344), a párhuzamosan emelkedett FVIII és VWF szintek endothel károsodásra 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 fülcsé mintáiban 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.

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

Eredményeink igazolták, hogy a cryobalonnal végzett pulmonális véna izoláció előtti OAC kezelés jelentősen gátolja a hemosztázis aktiválódását, valamint a dabigatran hatásosabb gátlást biztosít az intrakardiális hemosztázis aktivációja és következményes fibrinolízissel szemben, mint a VKA terápia. Kimutattuk, hogy a dabigatrannal kezelt betegeknél 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 dabigatrannal kezelt betegek esetén, azonban VKA terápian, és a nem antikoagulált betegek esetén emelkedett volt. Hasonló eredményeket kaptunk a hemosztázis aktiváció és a fibrinolízis heparin-érzékeny markereinek komplex értékelésekor. A fibrin monomerek szintje, amely a pretrombotikus állapotok igen érzékeny markere, lényegesen alacsonyabb volt a dabigatrannal kezelt betegeknél az abláció után a másik két vizsgált csoporthoz képest. Markáns koaguláció aktivációt figyelhattunk meg azoknál a

betegknél, akik nem részesültek preoperatív antikoaguláns terápiában, ami a tromboembóliás szövődmények potenciális kockázatát hordozza ebben a betegcsoportban.

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 (222, 345).

Kutatásunk során azt tapasztaltuk, hogy a cryoballon abláció az alkalmazott preoperatív antikoagulálási 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.

### *6.3.1.3 Limitációk*

Tanulmányaink eredményeit 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 betegek száma jóval nagyobb volt a hasonló mintagyűjtési technikát alkalmazó, korábban publikált tanulmányok átlagos esetszámához viszonyítva, továbbá korábbi publikációkkal ellentétben vizsgálatainkba nem pitvarfibrillációban szenvedő kontroll csoportot is bevontunk. A bal fülcséből történő vérmintagyűjtés 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 betegcsoporthoz hasonlóan többnyire fiatalabb, általában paroxysmalis pitvarfibrillációban szenvedő, strukturálisan normális szívű, jelentős komorbiditások nélküli betegek körében alkalmazza a katéterablációs terápiát (346), 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.

## 7 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 beérkezéskor 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, melynek hátterében nagyobb mértékű konzumpció állhat.

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 felvételnél 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 felvételnél 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 trombotagátló terápián lévő betegek vizsgálatára is.

10. Kimutattuk, hogy az aszpirin hatást detektáló tesztek közül a clopidogrel monoterápia szignifikánsan gátolta az AA-indukálta trombotocita aggregációt és szekréciót, valamint az AA-indukálta TXB2 termelődést a trombotocitákban. A VerifyNow Aspirin teszt eredményeit nem befolyásolta a clopidogrel, így az javasolható kettős trombotocita gátló 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 trombotocita gátló 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 háttérében endothel károsodás 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 cryoballoon 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.

## 8 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.

## 9 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., Urbansek, 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., Lánctzi, 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., Lánctzi, 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 P2Y12 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 alfa2-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)

## 10 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. Natorka, J., Corral, J., de la Morena-Barrio, M.E., Bravo-Pérez, C., **Bagoly, Z.**, Bereczky, Z., Trelínski, 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., Trinchero, 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. Lóczi, 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., Natorska, 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., Csósz, 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.

## 11 IRODALOMJEGYZÉK

1. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(8):1687-93.
2. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature.* 1964;202:498-9.
3. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science.* 1964;145(3638):1310-2.
4. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85(6):958-65.
5. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):41-8.
6. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996;7(4):459-64.
7. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327-58.
8. Hoffman M, Monroe DM, 3rd, Roberts HR. Activated factor VII activates factors IX and X on the surface of activated platelets: thoughts on the mechanism of action of high-dose activated factor VII. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998;9 Suppl 1:S61-5.
9. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* 2003;17 Suppl 1:S1-5.
10. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(9):1381-9.
11. Baglia FA, Walsh PN. Prothrombin is a cofactor for the binding of factor XI to the platelet surface and for platelet-mediated factor XI activation by thrombin. *Biochemistry.* 1998;37(8):2271-81.
12. Oliver JA, Monroe DM, Church FC, Roberts HR, Hoffman M. Activated protein C cleaves factor Va more efficiently on endothelium than on platelet surfaces. *Blood.* 2002;100(2):539-46.
13. Fullard JF. The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Curr Pharm Des.* 2004;10(14):1567-76.
14. Collier BS, Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood.* 2008;112(8):3011-25.
15. Cattaneo M. P2Y<sub>12</sub> receptors: structure and function. *J Thromb Haemost.* 2015;13 Suppl 1:S10-6.
16. Bagoly Z. Testing for Non-responders of Antiplatelet Therapy (accredited webcast). *Pearls of Laboratory Medicine, AACC Clinical Chemistry Training Council, Association for Diagnostics and Laboratory Medicine.* aacc.org. 2014.
17. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol.* 2005;130(5):653-61.
18. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res.* 2011;127 Suppl 3:S21-5.
19. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet.* 1993;342(8886-8887):1503-6.
20. Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *Am J Hematol.* 2016;91(1):46-9.
21. Zoller B, Dahlback B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet.* 1994;343(8912):1536-8.
22. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369(6475):64-7.
23. Kattula S, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(3):e13-e21.
24. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
25. Borissoff JI, ten Cate H. From neutrophil extracellular traps release to thrombosis: an overshooting host-defense mechanism? *J Thromb Haemost.* 2011;9(9):1791-4.
26. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion

- homeostasis, and cell death. *Sci STKE*. 2007;2007(379):pe11.
27. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-41.
  28. Varju I, Longstaff C, Szabo L, Farkas AZ, Varga-Szabo VJ, Tanka-Salamon A, et al. DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment. *Thromb Haemost*. 2015;113(6):1289-98.
  29. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 2012;198(5):773-83.
  30. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15880-5.
  31. Longstaff C, Varju I, Sotonyi P, Szabo L, Krumrey M, Hoell A, et al. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem*. 2013;288(10):6946-56.
  32. Mangold A, Alias S, Scherz T, Hofbauer M, Jakowitsch J, Panzenbock A, et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res*. 2015;116(7):1182-92.
  33. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, Delbosc S, Boisseau W, Deschildre C, et al. Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2018;49(3):754-7.
  34. Behzadifard M, Soleimani M. NETosis and SARS-COV-2 infection related thrombosis: a narrative review. *Thromb J*. 2022;20(1):13.
  35. Laridan E, Denorme F, Desender L, Francois O, Andersson T, Deckmyn H, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Ann Neurol*. 2017;82(2):223-32.
  36. Farkas AZ, Farkas VJ, Gubucz I, Szabo L, Balint K, Tenekedjiev K, et al. Neutrophil extracellular traps in thrombi retrieved during interventional treatment of ischemic arterial diseases. *Thromb Res*. 2019;175:46-52.
  37. Zhao Z, Pan Z, Zhang S, Ma G, Zhang W, Song J, et al. Neutrophil extracellular traps: A novel target for the treatment of stroke. *Pharmacol Ther*. 2023;241:108328.
  38. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. 2005;129(3):307-21.
  39. Keragala CB, Medcalf RL. Plasminogen: an enigmatic zymogen. *Blood*. 2021;137(21):2881-9.
  40. Collen D, Lijnen HR. The tissue-type plasminogen activator story. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(8):1151-5.
  41. Ho-Tin-Noe B, Desilles JP, Mazighi M. Thrombus composition and thrombolysis resistance in stroke. *Res Pract Thromb Haemost*. 2023;7(4):100178.
  42. Undas A, Ariens RA. Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(12):e88-99.
  43. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2015;13 Suppl 1:S98-105.
  44. Yaron JR, Zhang LQ, Guo QY, Haydel SE, Lucas AR. Fibrinolytic Serine Proteases, Therapeutic Serpins and Inflammation: Fire Dancers and Firestorms. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:1.
  45. Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:655-709.
  46. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood*. 1987;69(2):381-7.
  47. Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood*. 1995;86(11):4007-24.
  48. Schneider M, Nesheim M. A study of the protection of plasmin from antiplasmin inhibition within an intact fibrin clot during the course of clot lysis. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13333-9.
  49. Sillen M, Declercq PJ. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI): An Updated Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):1.
  50. Foley JH, Cook PF, Nesheim ME. Kinetics of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa)-catalyzed cleavage of C-terminal lysine residues of fibrin degradation products and removal of plasminogen-binding sites. *J Biol Chem*. 2011;286(22):19280-6.
  51. Fickenscher K, Aab A, Stuber W. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost*. 1991;65(5):535-40.
  52. Greenberg CS, Shuman MA. The zymogen forms of blood coagulation factor XIII bind specifically

- to fibrinogen. *J Biol Chem.* 1982;257(11):6096-101.
53. Muszbek L, Berezky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev.* 2011;91(3):931-72.
  54. Katona EE, Ajzner E, Toth K, Karpati L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods.* 2001;258(1-2):127-35.
  55. Byrnes JR, Wilson C, Boutelle AM, Brandner CB, Flick MJ, Philippou H, et al. The interaction between fibrinogen and zymogen FXIII-A2B2 is mediated by fibrinogen residues gamma390-396 and the FXIII-B subunits. *Blood.* 2016;128(15):1969-78.
  56. Komaromi I, Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost.* 2011;9(1):9-20.
  57. Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: What does it look like? *J Thromb Haemost.* 2019;17(5):714-6.
  58. Schroeder V, Vuissoz JM, Caflisch A, Kohler HP. Factor XIII activation peptide is released into plasma upon cleavage by thrombin and shows a different structure compared to its bound form. *Thromb Haemost.* 2007;97(6):890-8.
  59. Hornyak TJ, Shafer JA. Role of calcium ion in the generation of factor XIII activity. *Biochemistry.* 1991;30(25):6175-82.
  60. Hornyak TJ, Shafer JA. Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry.* 1992;31(2):423-9.
  61. Muszbek L, Polgar J, Boda Z. Platelet factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation. *Thromb Haemost.* 1993;69(3):282-5.
  62. Bagoly Z, Koncz Z, Harsfalvi J, Muszbek L. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res.* 2012;129(3):382-7.
  63. Fraser SR, Booth NA, Mutch NJ. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through alpha(2)-antiplasmin cross-linking. *Blood.* 2011;117(23):6371-4.
  64. Sakata Y, Mimuro J, Aoki N. Differential binding of plasminogen to crosslinked and noncrosslinked fibrins: its significance in hemostatic defect in factor XIII deficiency. *Blood.* 1984;63(6):1393-401.
  65. Board PG, Webb GC, McKee J, Ichinose A. Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24---p25. *Cytogenet Cell Genet.* 1988;48(1):25-7.
  66. Ichinose A, McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. Amino acid sequence of the b subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments. *Biochemistry.* 1986;25(16):4633-8.
  67. Mikkola H, Syrjala M, Rasi V, Vahtera E, Hamalainen E, Peltonen L, et al. Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood.* 1994;84(2):517-25.
  68. Balogh I, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, et al. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood.* 2000;96(7):2479-86.
  69. Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood.* 2000;96(3):988-95.
  70. Margaglione M, Bossone A, Brancaccio V, Ciampa A, Di Minno G. Factor XIII Val34Leu polymorphism and risk of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 2000;84(6):1118-9.
  71. Voko Z, Berezky Z, Katona E, Adany R, Muszbek L. Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. A meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2007;97(3):458-63.
  72. Muszbek L, Berezky Z, Bagoly Z, Shemirani AH, Katona E. Factor XIII and atherothrombotic diseases. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(1):18-33.
  73. Gallivan L, Markham AF, Anwar R. The Leu564 factor XIII A variant results in significantly lower plasma factor XIII levels than the Pro564 variant. *Thromb Haemost.* 1999;82(4):1368-70.
  74. Reiner AP, Schwartz SM, Frank MB, Longstreth WT, Jr., Hindorff LA, Teramura G, et al. Polymorphisms of coagulation factor XIII subunit A and risk of nonfatal hemorrhagic stroke in young white women. *Stroke.* 2001;32(11):2580-6.
  75. Pruissen DM, Slooter AJ, Rosendaal FR, van der Graaf Y, Algra A. Coagulation factor XIII gene variation, oral contraceptives, and risk of ischemic stroke. *Blood.* 2008;111(3):1282-6.
  76. Komanasin N, Catto AJ, Futers TS, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Ariens RA. A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and

- venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005;3(11):2487-96.
77. Iwata H, Kitano T, Umetsu K, Yuasa I, Yamazaki K, Kemkes-Matthes B, et al. Distinct C-terminus of the B subunit of factor XIII in a population-associated major phenotype: the first case of complete allele-specific alternative splicing products in the coagulation and fibrinolytic systems. *J Thromb Haemost.* 2009;7(7):1084-91.
  78. Mullertz S, Clemmensen I. The primary inhibitor of plasmin in human plasma. *Biochem J.* 1976;159(3):545-53.
  79. Moroi M, Aoki N. Isolation and characterization of alpha2-plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *J Biol Chem.* 1976;251(19):5956-65.
  80. Collen D. Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur J Biochem.* 1976;69(1):209-16.
  81. Bangert K, Johnsen AH, Christensen U, Thorsen S. Different N-terminal forms of alpha 2-plasmin inhibitor in human plasma. *Biochem J.* 1993;291 ( Pt 2):623-5.
  82. Law RH, Sofian T, Kan WT, Horvath AJ, Hitchen CR, Langendorf CG, et al. X-ray crystal structure of the fibrinolysis inhibitor alpha2-antiplasmin. *Blood.* 2008;111(4):2049-52.
  83. Abdul S, Leebeek FW, Rijken DC, Uitte de Willige S. Natural heterogeneity of alpha2-antiplasmin: functional and clinical consequences. *Blood.* 2016;127(5):538-45.
  84. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Chung KH, McKee PA. A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood.* 2004;103(10):3783-8.
  85. Wiman B, Lijnen HR, Collen D. On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in alpha2-antiplasmin and in fibrinogen. *Biochim Biophys Acta.* 1979;579(1):142-54.
  86. Wiman B. Affinity-chromatographic purification of human alpha 2-antiplasmin. *Biochem J.* 1980;191(1):229-32.
  87. Kluff C, Los P, Jie AF. The molecular form of alpha 2-antiplasmin with affinity for plasminogen is selectively bound to fibrin by factor XIII. *Thromb Res.* 1984;33(4):419-25.
  88. Lind B, Thorsen S. A novel missense mutation in the human plasmin inhibitor (alpha2-antiplasmin) gene associated with a bleeding tendency. *Br J Haematol.* 1999;107(2):317-22.
  89. Christiansen VJ, Jackson KW, Lee KN, McKee PA. The effect of a single nucleotide polymorphism on human alpha 2-antiplasmin activity. *Blood.* 2007;109(12):5286-92.
  90. Barath B, Bogati R, Miklos T, Kallai J, Mezei ZA, Bereczky Z, et al. Effect of alpha2-plasmin inhibitor heterogeneity on the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2021;203:110-6.
  91. Bridge KI, Macrae F, Bailey MA, Johnson A, Philippou H, Scott DJ, et al. The alpha-2-antiplasmin Arg407Lys polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm. *Thromb Res.* 2014;134(3):723-8.
  92. Gils A, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor-1. *Curr Med Chem.* 2004;11(17):2323-34.
  93. Uchiyama T, Kurabayashi M, Ohyama Y, Utsugi T, Akuzawa N, Sato M, et al. Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(4):1155-61.
  94. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;342(24):1792-801.
  95. Chen R, Yan J, Liu P, Wang Z, Wang C. Plasminogen activator inhibitor links obesity and thrombotic cerebrovascular diseases: The roles of PAI-1 and obesity on stroke. *Metab Brain Dis.* 2017;32(3):667-73.
  96. Scheer FA, Shea SA. Human circadian system causes a morning peak in prothrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of the sleep/wake cycle. *Blood.* 2014;123(4):590-3.
  97. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation.* 1998;98(21):2241-7.
  98. Iacoviello L, Agnoli C, De Curtis A, di Castelnuovo A, Giurdanella MC, Krogh V, et al. Type 1 plasminogen activator inhibitor as a common risk factor for cancer and ischaemic vascular disease: the EPICOR study. *BMJ Open.* 2013;3(11):e003725.



99. Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arveiler D, et al. Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene: lack of association between genotypes, PAI activity, and triglyceride levels in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(5):851-8.
100. Riccio A, Lund LR, Sartorio R, Lania A, Andreassen PA, Dano K, et al. The regulatory region of the human plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(7):2805-24.
101. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1993;268(15):10739-45.
102. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther.* 2010;28(5):e72-91.
103. Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(6):1851-5.
104. Bang CO, Park HK, Ahn MY, Shin HK, Hwang KY, Hong SY. 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and insertion/deletion polymorphism of the tissue-type plasminogen activator gene in atherothrombotic stroke. *Cerebrovascular diseases.* 2001;11(4):294-9.
105. Liu Y, Cheng J, Guo X, Mo J, Gao B, Zhou H, et al. The roles of PAI-1 gene polymorphisms in atherosclerotic diseases: A systematic review and meta-analysis involving 149,908 subjects. *Gene.* 2018;673:167-73.
106. Zhang Q, Jin Y, Li X, Peng X, Peng N, Song J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism - a meta-analysis and systematic review. *Vasa.* 2020;49(2):141-6.
107. Longstaff C. Measuring fibrinolysis: from research to routine diagnostic assays. *J Thromb Haemost.* 2018;16(4):652-62.
108. Kolev K, Longstaff C. Bleeding related to disturbed fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2016;175(1):12-23.
109. Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood.* 2005;105(3):1102-5.
110. Walsh M, Moore EE, Moore H, Thomas S, Lune SV, Zimmer D, et al. Use of Viscoelastography in Malignancy-Associated Coagulopathy and Thrombosis: A Review. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45(4):354-72.
111. Ilich A, Bokarev I, Key NS. Global assays of fibrinolysis. *Int J Lab Hematol.* 2017;39(5):441-7.
112. Katan M, Luft A. Global Burden of Stroke. *Semin Neurol.* 2018;38(2):208-11.
113. Szocs I, Bereczki D, Belicza E. [Results of stroke care in Hungary in the frame of international comparison]. *Orv Hetil.* 2016;157(41):1635-41.
114. Davis SM, Donnan GA. Clinical practice. Secondary prevention after ischemic stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med.* 2012;366(20):1914-22.
115. Rajashekar D, Liang JW. Intracerebral Hemorrhage. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2021.
116. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993;24(1):35-41.
117. Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke.* 2009;40(6):2276-93.
118. Fonseca AC, Merwick A, Dennis M, Ferrari J, Ferro JM, Kelly P, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on management of transient ischaemic attack. *Eur Stroke J.* 2021;6(2):V.
119. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Executive

- summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(1):188-97.
120. Kapral MK, Fang J, Hill MD, Silver F, Richards J, Jaigobin C, et al. Sex differences in stroke care and outcomes: results from the Registry of the Canadian Stroke Network. *Stroke*. 2005;36(4):809-14.
  121. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Prospective Studies C. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360(9349):1903-13.
  122. Banerjee C, Moon YP, Paik MC, Rundek T, Mora-McLaughlin C, Vieira JR, et al. Duration of diabetes and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke*. 2012;43(5):1212-7.
  123. Sacco RL, Benson RT, Kargman DE, Boden-Albala B, Tuck C, Lin IF, et al. High-density lipoprotein cholesterol and ischemic stroke in the elderly: the Northern Manhattan Stroke Study. *Jama*. 2001;285(21):2729-35.
  124. Lindstrom E, Boysen G, Nyboe J. Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City Heart Study. *BMJ*. 1994;309(6946):11-5.
  125. Yin GS, Howard DP, Paul NL, Li L, Luengo-Fernandez R, Bull LM, et al. Age-specific incidence, outcome, cost, and projected future burden of atrial fibrillation-related embolic vascular events: a population-based study. *Circulation*. 2014;130(15):1236-44.
  126. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, et al. A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch Intern Med*. 1991;151(6):1141-7.
  127. Suk SH, Sacco RL, Boden-Albala B, Cheun JF, Pittman JG, Elkind MS, et al. Abdominal obesity and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke*. 2003;34(7):1586-92.
  128. Arenillas JF, Moro MA, Davalos A. The metabolic syndrome and stroke: potential treatment approaches. *Stroke*. 2007;38(7):2196-203.
  129. Wolf PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study. *Stroke*. 1991;22(3):312-8.
  130. Hankey GJ. *Stroke*. *Lancet*. 2017;389(10069):641-54.
  131. Csiba L. Fejezetek a neurológiából. Debreceni Egyetemi Kiadó; 2016. 294 p.
  132. Yew KS, Cheng EM. Diagnosis of acute stroke. *Am Fam Physician*. 2015;91(8):528-36.
  133. Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*. 1989;20(7):864-70.
  134. Hosseini-zhad M, Sohrabnejad R. Stroke mimics in patients with clinical signs of stroke. *Caspian journal of internal medicine*. 2017;8(3):213-6.
  135. Broderick J, Connolly S, Feldmann E, Hanley D, Kase C, Krieger D, et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage in adults: 2007 update: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, High Blood Pressure Research Council, and the Quality of Care and Outcomes in Research Interdisciplinary Working Group. *Stroke*. 2007;38(6):2001-23.
  136. Aviv RI, Mandelcorn J, Chakraborty S, Gladstone D, Malham S, Tomlinson G, et al. Alberta Stroke Program Early CT Scoring of CT perfusion in early stroke visualization and assessment. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28(10):1975-80.
  137. Alwalid AAO. ASPECTS. Radiopaedia.org, rID: 72706.
  138. Puetz V, Dzialowski I, Hill MD, Subramaniam S, Sylaja PN, Krol A, et al. Intracranial thrombus extent predicts clinical outcome, final infarct size and hemorrhagic transformation in ischemic stroke: the clot burden score. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2008;3(4):230-6.
  139. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee, ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis*. 2008;25(5):457-507.
  140. Menon BK, Al-Ajlan FS, Najm M, Puig J, Castellanos M, Dowlathshahi D, et al. Association of Clinical, Imaging, and Thrombus Characteristics With Recanalization of Visible Intracranial Occlusion in Patients With Acute Ischemic Stroke. *JAMA*. 2018;320(10):1017-26.
  141. Berge E, Whiteley W, Audebert H, De Marchis GM, Fonseca AC, Padiglioni C, et al. European

- Stroke Organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Eur Stroke J.* 2021;6(1):I-LXII.
142. del Zoppo GJ, Poeck K, Pessin MS, Wolpert SM, Furlan AJ, Ferbert A, et al. Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol.* 1992;32(1):78-86.
  143. Alexandrov AV, Grotta JC. Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology.* 2002;59(6):862-7.
  144. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, Ford GA, Grond M, Hacke W, et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet.* 2007;369(9558):275-82.
  145. Miller DJ, Simpson JR, Silver B. Safety of thrombolysis in acute ischemic stroke: a review of complications, risk factors, and newer technologies. *Neurohospitalist.* 2011;1(3):138-47.
  146. Gadhia J, Starkman S, Ovbiagele B, Ali L, Liebeskind D, Saver JL. Assessment and improvement of figures to visually convey benefit and risk of stroke thrombolysis. *Stroke.* 2010;41(2):300-6.
  147. Bang OY, Saver JL, Kim SJ, Kim GM, Chung CS, Ovbiagele B, et al. Collateral flow averts hemorrhagic transformation after endovascular therapy for acute ischemic stroke. *Stroke.* 2011;42(8):2235-9.
  148. Jaillard A, Cornu C, Durieux A, Moulin T, Boutitie F, Lees KR, et al. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. The MAST-E study. MAST-E Group. *Stroke.* 1999;30(7):1326-32.
  149. Evans MRB, White P, Cowley P, Werring DJ. Revolution in acute ischaemic stroke care: a practical guide to mechanical thrombectomy. *Pract Neurol.* 2017;17(4):252-65.
  150. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2018;49(3):e46-e110.
  151. Wollenweber FA, Tiedt S, Alegiani A, Alber B, Bangard C, Berrouschot J, et al. Functional Outcome Following Stroke Thrombectomy in Clinical Practice. *Stroke.* 2019;50(9):2500-6.
  152. Turc G, Tsivgoulis G, Audebert HJ, Boogaarts H, Bhogal P, De Marchis GM, et al. European Stroke Organisation - European Society for Minimally Invasive Neurological Therapy expedited recommendation on indication for intravenous thrombolysis before mechanical thrombectomy in patients with acute ischaemic stroke and anterior circulation large vessel occlusion. *Eur Stroke J.* 2022;7(1):I-XXVI.
  153. Kelly-Hayes M, Beiser A, Kase CS, Scaramucci A, D'Agostino RB, Wolf PA. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2003;12(3):119-26.
  154. van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke.* 1988;19(5):604-7.
  155. Petty GW, Brown RD, Jr., Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Survival and recurrence after first cerebral infarction: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1975 through 1989. *Neurology.* 1998;50(1):208-16.
  156. Mohan KM, Wolfe CD, Rudd AG, Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL, Grieve AP. Risk and cumulative risk of stroke recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Stroke.* 2011;42(5):1489-94.
  157. Winstein CJ, Stein J, Arena R, Bates B, Cherney LR, Cramer SC, et al. Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2016;47(6):e98-e169.
  158. Virk HUH, Escobar J, Rodriguez M, Bates ER, Khalid U, Jneid H, et al. Dual Antiplatelet Therapy: A Concise Review for Clinicians. *Life (Basel).* 2023;13(7).
  159. Dawson J, Bejot Y, Christensen LM, De Marchis GM, Dichgans M, Hagberg G, et al. European Stroke Organisation (ESO) guideline on pharmacological interventions for long-term secondary prevention after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Eur Stroke J.* 2022;7(3):I-II.
  160. Bhatia K, Jain V, Aggarwal D, Vaduganathan M, Arora S, Hussain Z, et al. Dual Antiplatelet Therapy Versus Aspirin in Patients With Stroke or Transient Ischemic Attack: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Stroke.* 2021;52(6):e217-e23.
  161. Wang Y, Pan Y, Zhao X, Li H, Wang D, Johnston SC, et al. Clopidogrel With Aspirin in Acute Minor Stroke or Transient Ischemic Attack (CHANCE) Trial: One-Year Outcomes. *Circulation.*

- 2015;132(1):40-6.
162. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res.* 2003;110(5-6):255-8.
  163. Laine M, Paganelli F, Bonello L. P2Y12-ADP receptor antagonists: Days of future and past. *World J Cardiol.* 2016;8(5):327-32.
  164. Pare G, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, Hirsh J, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med.* 2010;363(18):1704-14.
  165. Homorodi N, Kovacs EG, Lee S, Katona E, Shemirani AH, Haramura G, et al. The lack of aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *J Transl Med.* 2016;14:74.
  166. Kovacs EG, Katona E, Bereczky Z, Homorodi N, Balogh L, Toth E, et al. New direct and indirect methods for the detection of cyclooxygenase 1 acetylation by aspirin; the lack of aspirin resistance among healthy individuals. *Thromb Res.* 2013;131(4):320-4.
  167. Cattaneo M. Diagnosis and management of high platelet reactivity on treatment with clopidogrel. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(7):645-51.
  168. Michelson AD, Bhatt DL. How I use laboratory monitoring of antiplatelet therapy. *Blood.* 2017;130(6):713-21.
  169. Kovacs EG, Katona E, Bereczky Z, Homorodi N, Balogh L, Toth E, et al. Evaluation of laboratory methods routinely used to detect the effect of aspirin against new reference methods. *Thromb Res.* 2014;133(5):811-6.
  170. Patrono C, Rocca B. Measurement of Thromboxane Biosynthesis in Health and Disease. *Front Pharmacol.* 2019;10:1244.
  171. Székely Á, Duray G. A szív ritmus- és ingerületvezetési zavarai. In: Tulassay Z, editor. *A belgyógyászat alapjai.* Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2011. p. 497-500.
  172. Fazekas T, Czuriga I. Pitvarfibrilláció. In: Préda I, Czuriga I, Édes I, Merkely B, editors. *Kardiológia Alapok és irányelvek.* Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2010. p. 493-528.
  173. Erdmann E. Szívritmuszavarok. In: Herold G, editor. *Belgyógyászat.* Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2009. p. 393-9.
  174. Iwasaki YK, Nishida K, Kato T, Nattel S. Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management. *Circulation.* 2011;124(20):2264-74.
  175. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008;1(1):62-73.
  176. Kumar DR, Hanlin E, Glurich I, Mazza JJ, Yale SH. Virchow's contribution to the understanding of thrombosis and cellular biology. *Clin Med Res.* 2010;8(3-4):168-72.
  177. Guazzi M, Arena R. Endothelial dysfunction and pathophysiological correlates in atrial fibrillation. *Heart.* 2009;95(2):102-6.
  178. Freestone B, Chong AY, Nuttall S, Lip GY. Impaired flow mediated dilatation as evidence of endothelial dysfunction in chronic atrial fibrillation: relationship to plasma von Willebrand factor and soluble E-selectin levels. *Thromb Res.* 2008;122(1):85-90.
  179. Watson T, Shantsila E, Lip GY. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet.* 2009;373(9658):155-66.
  180. Delgado V, Di Biase L, Leung M, Romero J, Tops LF, Casadei B, et al. Structure and Function of the Left Atrium and Left Atrial Appendage: AF and Stroke Implications. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(25):3157-72.
  181. Hijazi Z, Oldgren J, Siegbahn A, Granger CB, Wallentin L. Biomarkers in atrial fibrillation: a clinical review. *Eur Heart J.* 2013;34(20):1475-80.
  182. Wu N, Tong S, Xiang Y, Wu L, Xu B, Zhang Y, et al. Association of hemostatic markers with atrial fibrillation: a meta-analysis and meta-regression. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124716.
  183. Danese E, Montagnana M, Cervellin G, Lippi G. Hypercoagulability, D-dimer and atrial fibrillation: an overview of biological and clinical evidence. *Ann Med.* 2014;46(6):364-71.
  184. Asakura H, Hifumi S, Jokaji H, Saito M, Kumabashiri I, Uotani C, 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.
  185. Mondillo S, Sabatini L, Agricola E, Ammaturo T, Guerrini F, Barbati R, et al. Correlation between left atrial size, prothrombotic state and markers of endothelial dysfunction in patients with lone chronic nonrheumatic atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2000;75(2-3):227-32.
  186. Hatzinikolaou-Kotsakou E, Kartasis Z, Tziakas D, Hotidis A, Stakos D, Tsatalas K, et al. Atrial

- fibrillation and hypercoagulability: dependent on clinical factors or/and on genetic alterations? *J Thromb Thrombolysis*. 2003;16(3):155-61.
187. Kahn SR, Solymoss S, Flegel KM. Nonvalvular atrial fibrillation: evidence for a prothrombotic state. *CMAJ*. 1997;157(6):673-81.
  188. Roldan V, Marin F, Muina B, Torregrosa JM, Hernandez-Romero D, Valdes M, et al. Plasma von Willebrand factor levels are an independent risk factor for adverse events including mortality and major bleeding in anticoagulated atrial fibrillation patients. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(25):2496-504.
  189. Wan H, Wu S, Yang Y, Zhu J, Zhang A, Liang Y. Plasma fibrin D-dimer and the risk of left atrial thrombus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172272.
  190. Marin F, Roldan V, Lip GY. Fibrinolytic function and atrial fibrillation. *Thromb Res*. 2003;109(5-6):233-40.
  191. Drabik L, Wolkow P, Undas A. Denser plasma clot formation and impaired fibrinolysis in paroxysmal and persistent atrial fibrillation while on sinus rhythm: association with thrombin generation, endothelial injury and platelet activation. *Thromb Res*. 2015;136(2):408-14.
  192. Feinberg WM, Macy E, Cornell ES, Nightingale SD, Pearce LA, Tracy RP, et al. Plasmin-alpha2-antiplasmin complex in patients with atrial fibrillation. *Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators*. *Thromb Haemost*. 1999;82(1):100-3.
  193. Kahn SR, Solymoss S, Flegel KM. Increased tissue plasminogen activator levels in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *CMAJ*. 1997;157(6):685-9.
  194. Wang TD, Chen WJ, Su SS, Su TC, Chen MF, Liao CS, et al. Increased levels of tissue plasminogen activator antigen and factor VIII activity in nonvalvular atrial fibrillation: relation to predictors of thromboembolism. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001;12(8):877-84.
  195. Roldan V, Marin F, Marco P, Martinez JG, Calatayud R, Sogorb F. Hypofibrinolysis in atrial fibrillation. *Am Heart J*. 1998;136(6):956-60.
  196. Akar JG, Jeske W, Wilber DJ. Acute onset human atrial fibrillation is associated with local cardiac platelet activation and endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(18):1790-3.
  197. Willoughby SR, Roberts-Thomson RL, Lim HS, Schultz C, Prabhu A, De Sciscio P, et al. Atrial platelet reactivity in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2010;7(9):1178-83.
  198. Kornej J, Dinov B, Blann AD, Rolf S, Arya A, Schmidl J, et al. Effects of radiofrequency catheter ablation of atrial fibrillation on soluble P-selectin, von Willebrand factor and IL-6 in the peripheral and cardiac circulation. *PLoS One*. 2014;9(11):e111760.
  199. Motoki H, Tomita T, Aizawa K, Kasai H, Izawa A, Kumazaki S, et al. Coagulation activity is increased in the left atria of patients with paroxysmal atrial fibrillation during the non-paroxysmal period. Comparison with chronic atrial fibrillation. *Circ J*. 2009;73(8):1403-7.
  200. Schultz CD, Rangneker G, Lim HS, Fraudeau A, Young G, Roberts-Thomson K, et al. Characterization of thrombogenic, endothelial and inflammatory markers in supraventricular tachycardia: a study in patients with structurally normal hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014;41(8):551-7.
  201. Luo ZQ, Hao XH, Li JH, Dai J, Liu KY, Lai YQ. Left atrial endocardial dysfunction and platelet activation in patients with atrial fibrillation and mitral stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;148(5):1970-6.
  202. Patti G, Pengo V, Marcucci R, Cirillo P, Renda G, Santilli F, et al. The left atrial appendage: from embryology to prevention of thromboembolism. *Eur Heart J*. 2017;38(12):877-87.
  203. Lip GY, Fauchier L, Freedman SB, Van Gelder I, Natale A, Gianni C, et al. Atrial fibrillation. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16016.
  204. Siddiqi TJ, Usman MS, Shahid I, Ahmed J, Khan SU, Ya'qoub L, et al. Utility of the CHA2DS2-VASc score for predicting ischaemic stroke in patients with or without atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol*. 2022;29(4):625-31.
  205. January CT, Wann LS, Calkins H, Chen LY, Cigarroa JE, Cleveland JC, Jr., et al. 2019 AHA/ACC/HRS Focused Update of the 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(1):104-32.
  206. Stafford RS, Singer DE. Recent national patterns of warfarin use in atrial fibrillation. *Circulation*.

- 1998;97(13):1231-3.
207. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, Hoffman EB, Deenadayalu N, Ezekowitz MD, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2014;383(9921):955-62.
  208. Heidbuchel H, Verhamme P, Alings M, Antz M, Diener HC, Hacke W, et al. Updated European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist anticoagulants in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Europace*. 2015;17(10):1467-507.
  209. Pisters R, Lane DA, Nieuwlaat R, de Vos CB, Crijns HJ, Lip GY. A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess 1-year risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation: the Euro Heart Survey. *Chest*. 2010;138(5):1093-100.
  210. Luca F, La Meir M, Rao CM, Parise O, Vasquez L, Carella R, et al. Pharmacological management of atrial fibrillation: one, none, one hundred thousand. *Cardiol Res Pract*. 2011;2011:874802.
  211. Merchant FM, Delurgio DB. Catheter ablation of atrial fibrillation and risk of asymptomatic cerebral embolism. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2014;37(3):389-97.
  212. Georgiopoulos G, Tsiachris D, Manolis AS. Cryoballoon ablation of atrial fibrillation: a practical and effective approach. *Clin Cardiol*. 2017;40(5):333-42.
  213. Wazni OM, Dandamudi G, Sood N, Hoyt R, Tyler J, Durrani S, et al. Cryoballoon Ablation as Initial Therapy for Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*. 2021;384(4):316-24.
  214. Kuck KH, Brugada J, Furnkranz A, Metzner A, Ouyang F, Chun KR, et al. Cryoballoon or Radiofrequency Ablation for Paroxysmal Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2235-45.
  215. Csanadi Z, Nagy-Balo E, Danik S, Barrett C, Burkhardt JD, Sanchez J, et al. Cerebrovascular Complications Related to Atrial Fibrillation Ablation and Strategies for Periprocedural Stroke Prevention. *Card Electrophysiol Clin*. 2014;6(1):111-23.
  216. Noseworthy PA, Kapa S, Deshmukh AJ, Madhavan M, Van Houten H, Haas LR, et al. Risk of stroke after catheter ablation versus cardioversion for atrial fibrillation: A propensity-matched study of 24,244 patients. *Heart Rhythm*. 2015;12(6):1154-61.
  217. Oral H, Chugh A, Ozaydin M, Good E, Fortino J, Sankaran S, et al. Risk of thromboembolic events after percutaneous left atrial radiofrequency ablation of atrial fibrillation. *Circulation*. 2006;114(8):759-65.
  218. Schwarz N, Kuniss M, Nedelmann M, Kaps M, Bachmann G, Neumann T, et al. Neuropsychological decline after catheter ablation of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2010;7(12):1761-7.
  219. Gaita F, Leclercq JF, Schumacher B, Scaglione M, Toso E, Halimi F, et al. Incidence of silent cerebral thromboembolic lesions after atrial fibrillation ablation may change according to technology used: comparison of irrigated radiofrequency, multipolar nonirrigated catheter and cryoballoon. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2011;22(9):961-8.
  220. Neumann T, Kuniss M, Conradi G, Janin S, Berkowitsch A, Wojcik M, et al. MEDAFI-Trial (Micro-embolization during ablation of atrial fibrillation): comparison of pulmonary vein isolation using cryoballoon technique vs. radiofrequency energy. *Europace*. 2011;13(1):37-44.
  221. Herrera Siklody C, Deneke T, Hocini M, Lehrmann H, Shin DI, Miyazaki S, et al. Incidence of asymptomatic intracranial embolic events after pulmonary vein isolation: comparison of different atrial fibrillation ablation technologies in a multicenter study. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(7):681-8.
  222. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomstrom-Lundqvist C, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2021;42(5):373-498.
  223. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace*. 2010;12(10):1360-420.
  224. Wazni OM, Beheiry S, Fahmy T, Barrett C, Hao S, Patel D, et al. Atrial fibrillation ablation in patients with therapeutic international normalized ratio: comparison of strategies of anticoagulation management in the periprocedural period. *Circulation*. 2007;116(22):2531-4.

225. Di Biase L, Burkhardt JD, Santangeli P, Mohanty P, Sanchez JE, Horton R, et al. Periprocedural stroke and bleeding complications in patients undergoing catheter ablation of atrial fibrillation with different anticoagulation management: results from the Role of Coumadin in Preventing Thromboembolism in Atrial Fibrillation (AF) Patients Undergoing Catheter Ablation (COMPARE) randomized trial. *Circulation*. 2014;129(25):2638-44.
226. Calkins H, Willems S, Gerstenfeld EP, Verma A, Schilling R, Hohnloser SH, et al. Uninterrupted Dabigatran versus Warfarin for Ablation in Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*. 2017;376(17):1627-36.
227. Nogami A, Harada T, Sekiguchi Y, Otani R, Yoshida Y, Yoshida K, et al. Safety and Efficacy of Minimally Interrupted Dabigatran vs Uninterrupted Warfarin Therapy in Adults Undergoing Atrial Fibrillation Catheter Ablation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 2019;2(4):e191994.
228. Lakkireddy D, Reddy YM, Di Biase L, Vanga SR, Santangeli P, Swarup V, et al. Feasibility and safety of dabigatran versus warfarin for periprocedural anticoagulation in patients undergoing radiofrequency ablation for atrial fibrillation: results from a multicenter prospective registry. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(13):1168-74.
229. Cardoso R, Knijnik L, Bhonsale A, Miller J, Nasi G, Rivera M, et al. An updated meta-analysis of novel oral anticoagulants versus vitamin K antagonists for uninterrupted anticoagulation in atrial fibrillation catheter ablation. *Heart Rhythm*. 2018;15(1):107-15.
230. van Vugt SPG, Westra SW, Volleberg R, Hannink G, Nakamura R, de Asmundis C, et al. Meta-analysis of controlled studies on minimally interrupted vs. continuous use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in catheter ablation for atrial fibrillation. *Europace*. 2021;23(12):1961-9.
231. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995;274(13):1017-25.
232. Simonsen CZ, Schmitz ML, Madsen MH, Mikkelsen IK, Chandra RV, Leslie-Mazwi T, et al. Early neurological deterioration after thrombolysis: Clinical and imaging predictors. *Int J Stroke*. 2016;11(7):776-82.
233. National Institute of Neurological D, Stroke rt PASSG. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333(24):1581-7.
234. Weisscher N, Vermeulen M, Roos YB, de Haan RJ. What should be defined as good outcome in stroke trials; a modified Rankin score of 0-1 or 0-2? *J Neurol*. 2008;255(6):867-74.
235. Karpati L, Penke B, Katona E, Balogh I, Vamosi G, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem*. 2000;46(12):1946-55.
236. Katona E, Haramura G, Karpati L, Facht J, Muszbek L. A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2). *Thromb Haemost*. 2000;83(2):268-73.
237. Shemirani AH, Muszbek L. Rapid detection of the factor XIII Val34Leu (163 G-->T) polymorphism by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer detection and melting curve analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(8):877-9.
238. Mezei ZA, Katona E, Kallai J, Bereczky Z, Molnar E, Kovacs B, et al. 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*. 2016;148:101-6.
239. Teraz-Orosz A, Csapo A, Bagoly Z, Szekely EG, Toth E, Kovacs B, et al. A new ELISA method for the measurement of total alpha2-plasmin inhibitor level in human body fluids. *J Immunol Methods*. 2019;471:27-33.
240. Bagoly Z, Barath B, Orban-Kalmandi R, Szegedi I, Bogati R, Sarkady F, et al. Incorporation of alpha2-Plasmin Inhibitor into Fibrin Clots and Its Association with the Clinical Outcome of Acute Ischemic Stroke Patients. *Biomolecules*. 2021;11(3).
241. Talens S, Malfliet JJ, Rudez G, Spronk HM, Janssen NA, Meijer P, et al. Biological variation in tPA-induced plasma clot lysis time. *Thromb Haemost*. 2012;108(4):640-6.
242. Pieters M, Philippou H, Undas A, de Lange Z, Rijken DC, Mutch NJ, et al. An international study on the feasibility of a standardized combined plasma clot turbidity and lysis assay: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2018;16(5):1007-12.

243. Donkel SJ, Benaddi B, Dippel DWJ, Ten Cate H, de Maat MPM. Prognostic Hemostasis Biomarkers in Acute Ischemic Stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(3):360-72.
244. Gitto S, Romanelli RG, Cellai AP, Lami D, Vizzutti F, Abbate R, et al. Altered clot formation and lysis are associated with increased fibrinolytic activity in ascites in patients with advanced cirrhosis. *Intern Emerg Med.* 2021;16(2):339-47.
245. Longstaff C, subcommittee on f. Development of Shiny app tools to simplify and standardize the analysis of hemostasis assay data: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2017;15(5):1044-6.
246. Chesher D. Evaluating assay precision. *Clin Biochem Rev.* 2008;29 Suppl 1:S23-6.
247. Arokszallasi T, Heja M, Bagoly Z, Kovacs KB, Orban-Kalmandi R, Sarkady F, et al. Prognostic Value of Various Hemostasis Parameters and Neurophysiological Examinations in Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: The IRONHEART Study Protocol. *Front Neurol.* 2021;12:615177.
248. Kothari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, Zuccarello M, et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke.* 1996;27(8):1304-5.
249. Hemphill JC, 3rd, Bonovich DC, Besmertis L, Manley GT, Johnston SC. The ICH score: a simple, reliable grading scale for intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2001;32(4):891-7.
250. Banks JL, Marotta CA. Outcomes validity and reliability of the modified Rankin scale: implications for stroke clinical trials: a literature review and synthesis. *Stroke.* 2007;38(3):1091-6.
251. Lorand L, Credo RB, Janus TJ. Factor XIII (fibrin-stabilizing factor). *Methods Enzymol.* 1981;80 Pt C:333-41.
252. Dahlback B. Human coagulation factor V purification and thrombin-catalyzed activation. *J Clin Invest.* 1980;66(3):583-91.
253. Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A, et al. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(24):2296-306.
254. Logallo N, Kvistad CE, Naess H, Waje-Andreassen U, Thomassen L. Mild stroke: safety and outcome in patients receiving thrombolysis. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2014(198):37-40.
255. Schroder J, Thomalla G. A Critical Review of Alberta Stroke Program Early CT Score for Evaluation of Acute Stroke Imaging. *Front Neurol.* 2016;7:245.
256. Weir NU, Pexman JH, Hill MD, Buchan AM, investigators C. How well does ASPECTS predict the outcome of acute stroke treated with IV tPA? *Neurology.* 2006;67(3):516-8.
257. Ranganathan P, Aggarwal R, Pramesh CS. Common pitfalls in statistical analysis: Odds versus risk. *Perspect Clin Res.* 2015;6(4):222-4.
258. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.
259. Bereczky Z, Balogh E, Katona E, Pocsai Z, Czuriga I, Szeles G, et al. Modulation of the risk of coronary sclerosis/myocardial infarction by the interaction between factor XIII subunit A Val34Leu polymorphism and fibrinogen concentration in the high risk Hungarian population. *Thromb Res.* 2007;120(4):567-73.
260. Lim BC, Ariens RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet.* 2003;361(9367):1424-31.
261. Tamaki T, Aoki N. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Biochim Biophys Acta.* 1981;661(2):280-6.
262. Bagoly Z, Katona E, Muszbek L. Factor XIII and inflammatory cells. *Thromb Res.* 2012;129 Suppl 2:S77-81.
263. Wardlaw JM, Murray V, Berge E, Del Zoppo GJ. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009(4):CD000213.
264. Orban-Kalmandi R, Szegedi I, Sarkady F, Fekete I, Fekete K, Vasas N, et al. A modified in vitro clot lysis assay predicts outcomes and safety in acute ischemic stroke patients undergoing intravenous thrombolysis. *Sci Rep.* 2021;11(1):12713.
265. van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol.* 2008;142(6):889-903.
266. Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel response variability and the advent of personalised antiplatelet therapy. A bench to bedside journey. *Thromb Haemost.* 2011;106(2):265-71.
267. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al. Consensus and future



- directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(12):919-33.
268. Mallouk N, Labruyere C, Reny JL, Chapelle C, Piot M, Fontana P, et al. Prevalence of poor biological response to clopidogrel: a systematic review. *Thromb Haemost.* 2012;107(3):494-506.
269. Bagoly Z, Homorodi N, Kovacs EG, Sarkady F, Csiba L, Edes I, et al. How to test the effect of aspirin and clopidogrel in patients on dual antiplatelet therapy? *Platelets.* 2016;27(1):59-65.
270. Shainoff JR, DiBello PM. The circulatory half-lives of alpha-profibrin and alpha-fibrin monomer, and comparisons with other fibrin(ogen) derivatives. *Thromb Haemost.* 2003;89(1):48-52.
271. Ariens RA, Hunt BJ, Agbani EO, Ahnstrom J, Ahrends R, Alikhan R, et al. Illustrated State-of-the-Art Capsules of the ISTH 2022 Congress. *Res Pract Thromb Haemost.* 2022;6(5):e12747.
272. Bagoly Z, Szegei I, Kalmandi R, Toth NK, Csiba L. Markers of Coagulation and Fibrinolysis Predicting the Outcome of Acute Ischemic Stroke Thrombolysis Treatment: A Review of the Literature. *Front Neurol.* 2019;10:513.
273. Barakzie A, Jansen AJG, Ten Cate H, de Maat MPM. Coagulation biomarkers for ischemic stroke. *Res Pract Thromb Haemost.* 2023;7(4):100160.
274. Toth NK, Szekely EG, Czuriga-Kovacs KR, Sarkady F, Nagy O, Lanczi LI, et al. Elevated Factor VIII and von Willebrand Factor Levels Predict Unfavorable Outcome in Stroke Patients Treated with Intravenous Thrombolysis. *Front Neurol.* 2017;8:721.
275. Hudak R, Szekely EG, Kovacs KR, Nagy A, Hofgart G, Berenyi E, et al. Low thrombin generation predicts poor prognosis in ischemic stroke patients after thrombolysis. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180477.
276. Clemmensen I, Thorsen S, Mullertz S, Petersen LC. Properties of three different molecular forms of the alpha 2 plasmin inhibitor. *Eur J Biochem.* 1981;120(1):105-12.
277. Uitte de Willige S, Miedzak M, Carter AM, Lisman T, Rosendaal FR, Grant PJ, et al. Proteolytic and genetic variation of the alpha-2-antiplasmin C-terminus in myocardial infarction. *Blood.* 2011;117(24):6694-701.
278. Teraz-Orosz A, Csapo A, Bagoly Z, Szekely EG, Toth E, Kovacs B, et al. A new ELISA method for the measurement of total alpha(2)-plasmin inhibitor level in human body fluids. *J Immunol Methods.* 2019;471:27-33.
279. Jensen M, Schlemm E, Cheng B, Lettow I, Quandt F, Boutitie F, et al. Clinical Characteristics and Outcome of Patients With Hemorrhagic Transformation After Intravenous Thrombolysis in the WAKE-UP Trial. *Front Neurol.* 2020;11:957.
280. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke.* 1997;28(11):2109-18.
281. Whiteley WN, Emberson J, Lees KR, Blackwell L, Albers G, Bluhmki E, et al. Risk of intracerebral haemorrhage with alteplase after acute ischaemic stroke: a secondary analysis of an individual patient data meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2016;15(9):925-33.
282. Hur WS, Mazinani N, Lu XJ, Britton HM, Byrnes JR, Wolberg AS, et al. Coagulation factor XIIIa is inactivated by plasmin. *Blood.* 2015;126(20):2329-37.
283. Schroeder V, Ortner E, Mono ML, Galimanis A, Meier N, Findling O, et al. Coagulation factor XIII activation peptide and subunit levels in patients with acute ischaemic stroke: a pilot study. *Thromb Res.* 2010;126(2):e122-7.
284. Henderson SJ, Weitz JI, Kim PY. Fibrinolysis: strategies to enhance the treatment of acute ischemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2018;16(10):1932-40.
285. De Meyer SF, Stoll G, Wagner DD, Kleinschnitz C. von Willebrand factor: an emerging target in stroke therapy. *Stroke.* 2012;43(2):599-606.
286. Denorme F, De Meyer SF. The VWF-GPIb axis in ischaemic stroke: lessons from animal models. *Thromb Haemost.* 2016;116(4):597-604.
287. Seker F, Pfaff J, Wolf M, Schonenberger S, Nagel S, Herweh C, et al. Impact of thrombus length on recanalization and clinical outcome following mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke. *J Neurointerv Surg.* 2017;9(10):937-9.
288. Treurniet KM, Yoo AJ, Berkhemer OA, Lingsma HF, Boers AM, Franssen PS, et al. Clot Burden Score on Baseline Computerized Tomographic Angiography and Intra-Arterial Treatment Effect in Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 2016;47(12):2972-8.
289. Pikija S, Trkulja V, Mutzenbach JS, McCoy MR, Ganger P, Sellner J. Fibrinogen consumption is

- related to intracranial clot burden in acute ischemic stroke: a retrospective hyperdense artery study. *J Transl Med.* 2016;14(1):250.
290. Kattula S, Bagoly Z, Toth NK, Muszbek L, Wolberg AS. The factor XIII-A Val34Leu polymorphism decreases whole blood clot mass at high fibrinogen concentrations. *J Thromb Haemost.* 2020;18(4):885-94.
  291. Boekholdt SM, Sandhu MS, Wareham NJ, Luben R, Reitsma PH, Khaw KT. Fibrinogen plasma levels modify the association between the factor XIII Val34Leu variant and risk of coronary artery disease: the EPIC-Norfolk prospective population study. *J Thromb Haemost.* 2006;4(10):2204-9.
  292. Szekely EG, Czuriga-Kovacs KR, Bereczky Z, Katona E, Mezei ZA, Nagy A, et al. Low factor XIII levels after intravenous thrombolysis predict short-term mortality in ischemic stroke patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):7662.
  293. Coutinho JM, Liebeskind DS, Slater LA, Nogueira RG, Clark W, Davalos A, et al. Combined Intravenous Thrombolysis and Thrombectomy vs Thrombectomy Alone for Acute Ischemic Stroke: A Pooled Analysis of the SWIFT and STAR Studies. *JAMA Neurol.* 2017;74(3):268-74.
  294. Choi JH, Im SH, Lee KJ, Koo JS, Kim BS, Shin YS. Comparison of Outcomes After Mechanical Thrombectomy Alone or Combined with Intravenous Thrombolysis and Mechanical Thrombectomy for Patients with Acute Ischemic Stroke due to Large Vessel Occlusion. *World Neurosurg.* 2018;114:e165-e72.
  295. Bembenek JP, Niewada M, Siudut J, Plens K, Czlonkowska A, Undas A. Fibrin clot characteristics in acute ischaemic stroke patients treated with thrombolysis: the impact on clinical outcome. *Thrombosis and haemostasis.* 2017;117(7):1440-7.
  296. Staessens S, Denorme F, Francois O, Desender L, Dewaele T, Vanacker P, et al. Structural analysis of ischemic stroke thrombi: histological indications for therapy resistance. *Haematologica.* 2020;105(2):498-507.
  297. Koncz Z, Bagoly Z, Haramura G, Mezei ZA, Muszbek L. Thrombomodulin-dependent effect of factor VLeiden mutation on factor XIII activation. *Thromb Res.* 2012;129(4):508-13.
  298. Kuruvilla A, Norris GM, Manjila S, Xavier AR, Chaturvedi S. Factor v leiden mutation in reocclusion after intra-arterial thrombolysis. *Stroke.* 2009;40(2):660-2.
  299. Echouffo-Tcheugui JB, Woodward M, Kengne AP. Predicting a post-thrombolysis intracerebral hemorrhage: a systematic review. *J Thromb Haemost.* 2013;11(5):862-71.
  300. Atichartakarn V, Marder VJ, Kirby EP, Budzynski AZ. Effects of enzymatic degradation on the subunit composition and biologic properties of human factor VIII. *Blood.* 1978;51(2):281-97.
  301. Stewart D, Kong M, Novokhatny V, Jesmok G, Marder VJ. Distinct dose-dependent effects of plasmin and TPA on coagulation and hemorrhage. *Blood.* 2003;101(8):3002-7.
  302. Hamilton KK, Fretto LJ, Grierson DS, McKee PA. Effects of plasmin on von Willebrand factor multimers. Degradation in vitro and stimulation of release in vivo. *J Clin Invest.* 1985;76(1):261-70.
  303. Federici AB, Berkowitz SD, Zimmerman TS, Mannucci PM. Proteolysis of von Willebrand factor after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. *Blood.* 1992;79(1):38-44.
  304. Lip GY, Lydakakis C, Nuttall SL, Landray MJ, Watson RD, Blann AD. A pilot study of streptokinase-induced endothelial injury and platelet activation following acute myocardial infarction. *J Intern Med.* 2000;248(4):316-8.
  305. Sun X, Berthiller J, Trouillas P, Derex L, Diallo L, Hanss M. Early fibrinogen degradation coagulopathy: a predictive factor of parenchymal hematomas in cerebral rt-PA thrombolysis. *J Neurol Sci.* 2015;351(1-2):109-14.
  306. Cocho D, Borrell M, Marti-Fabregas J, Montaner J, Castellanos M, Bravo Y, et al. Pretreatment hemostatic markers of symptomatic intracerebral hemorrhage in patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2006;37(4):996-9.
  307. Jeng JR. Association of PAI-1 gene promoter 4g/5g polymorphism with plasma PAI-1 activity in Chinese patients with and without hypertension. *Am J Hypertens.* 2003;16(4):290-6.
  308. Zietz B, Buechler C, Drobnik W, Herfarth H, Scholmerich J, Schaffler A. Allelic frequency of the PAI-1 4G/5G promoter polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and lack of association with PAI-1 plasma levels. *Endocr Res.* 2004;30(3):443-53.
  309. Iacoviello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, Zito F, Marchioli R, Donati MB. The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis.

- Thromb Haemost. 1998;80(6):1029-30.
310. Griemert EV, Recarte Pelz K, Engelhard K, Schafer MK, Thal SC. PAI-1 but Not PAI-2 Gene Deficiency Attenuates Ischemic Brain Injury After Experimental Stroke. *Transl Stroke Res.* 2019;10(4):372-80.
  311. Tjarnlund-Wolf A, Brogren H, Lo EH, Wang X. Plasminogen activator inhibitor-1 and thrombotic cerebrovascular diseases. *Stroke.* 2012;43(10):2833-9.
  312. Buisson A, Nicole O, Docagne F, Sartelet H, Mackenzie ET, Vivien D. Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB J.* 1998;12(15):1683-91.
  313. Soeda S, Imatoh T, Ochiai T, Koyanagi S, Shimeno H. Plasminogen activator inhibitor-1 aids survival of neurites on neurons derived from pheochromocytoma (PC-12) cells. *Neuroreport.* 2004;15(5):855-8.
  314. Kose N, Asashima T, Muta M, Iizasa H, Sai Y, Terasaki T, et al. Altered expression of basement membrane-related molecules in rat brain pericyte, endothelial, and astrocyte cell lines after transforming growth factor-beta1 treatment. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22(4):255-66.
  315. Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, Oda M, Harada E, Watanabe T, et al. Autocrine and paracrine up-regulation of blood-brain barrier function by plasminogen activator inhibitor-1. *Microvasc Res.* 2011;81(1):103-7.
  316. Varju I, Kolev K. Networks that stop the flow: A fresh look at fibrin and neutrophil extracellular traps. *Thromb Res.* 2019;182:1-11.
  317. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev Cell.* 2018;44(5):542-53.
  318. Noubouossie DF, Whelihan MF, Yu YB, Sparkenbaugh E, Pawlinski R, Monroe DM, et al. In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood.* 2017;129(8):1021-9.
  319. Komissarov AA, Florova G, Idell S. Effects of extracellular DNA on plasminogen activation and fibrinolysis. *J Biol Chem.* 2011;286(49):41949-62.
  320. Gould TJ, Vu TT, Stafford AR, Dwivedi DJ, Kim PY, Fox-Robichaud AE, et al. Cell-Free DNA Modulates Clot Structure and Impairs Fibrinolysis in Sepsis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(12):2544-53.
  321. Jolugbo P, Ariens RAS. Thrombus Composition and Efficacy of Thrombolysis and Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 2021;52(3):1131-42.
  322. Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med.* 2015;372(11):1009-18.
  323. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(11):1019-30.
  324. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(1):11-20.
  325. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, et al. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(24):2285-95.
  326. Chiu CC, Li YN, Lin LJ, Hsiao CT, Hsiao KY, Chen IC. Serum D-dimer as a predictor of mortality in patients with acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Clin Neurosci.* 2012;19(6):810-3.
  327. Hu X, Fang Y, Ye F, Lin S, Li H, You C, et al. Effects of plasma D-dimer levels on early mortality and long-term functional outcome after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Clin Neurosci.* 2014;21(8):1364-7.
  328. Delgado P, Alvarez-Sabin J, Abilleira S, Santamarina E, Purroy F, Arenillas JF, et al. Plasma d-dimer predicts poor outcome after acute intracerebral hemorrhage. *Neurology.* 2006;67(1):94-8.
  329. Geddings JE, Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2014;111(4):570-4.
  330. Tripodi A. Thrombin generation: a global coagulation procedure to investigate hypo- and hypercoagulability. *Haematologica.* 2020;105(9):2196-9.
  331. Pinho J, Costa AS, Araujo JM, Amorim JM, Ferreira C. Intracerebral hemorrhage outcome: A

- comprehensive update. *J Neurol Sci.* 2019;398:54-66.
332. Prabhakaran S, Herbers P, Khoury J, Adeoye O, Khatri P, Ferioli S, et al. Is prophylactic anticoagulation for deep venous thrombosis common practice after intracerebral hemorrhage? *Stroke.* 2015;46(2):369-75.
  333. Greenberg SM, Ziai WC, Cordonnier C, Dowlatshahi D, Francis B, Goldstein JN, et al. 2022 Guideline for the Management of Patients With Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2022;53(7):e282-e361.
  334. Cai Q, Zhang X, Chen H. Patients with venous thromboembolism after spontaneous intracerebral hemorrhage: a review. *Thromb J.* 2021;19(1):93.
  335. Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance? *Thromb Res.* 2007;120(3):311-21.
  336. Sambu N, Curzen N. Monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy: opportunities and limitations. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(4):683-96.
  337. Aradi D, Magyarlaki T, Tokes-Fuzesi M, Rideg O, Vorobcsuk A, Komocsi A. Comparison of conventional aggregometry with VASP for monitoring P2Y12-specific platelet inhibition. *Platelets.* 2010;21(7):563-70.
  338. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Comparison of methods to evaluate clopidogrel-mediated platelet inhibition after percutaneous intervention with stent implantation. *Thromb Haemost.* 2009;101(2):333-9.
  339. Klein MD, Williams AK, Lee CR, Stouffer GA. Clinical Utility of CYP2C19 Genotyping to Guide Antiplatelet Therapy in Patients With an Acute Coronary Syndrome or Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(4):647-52.
  340. Baudhuin LM, Train LJ, Goodman SG, Lane GE, Lennon RJ, Mathew V, et al. Point of care CYP2C19 genotyping after percutaneous coronary intervention. *Pharmacogenomics J.* 2022;22(5-6):303-7.
  341. Alonso A, Tang W, Agarwal SK, Soliman EZ, Chamberlain AM, Folsom AR. Hemostatic markers are associated with the risk and prognosis of atrial fibrillation: the ARIC study. *Int J Cardiol.* 2012;155(2):217-22.
  342. Conway DS, Pearce LA, Chin BS, Hart RG, Lip GY. Plasma von Willebrand factor and soluble p-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 1321 patients with nonvalvular atrial fibrillation: relationship to stroke risk factors. *Circulation.* 2002;106(15):1962-7.
  343. Conway DS, Pearce LA, Chin BS, Hart RG, Lip GY. Prognostic value of plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation.* 2003;107(25):3141-5.
  344. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2011;117(19):5033-43.
  345. Ottoffy M, Matrai P, Farkas N, Hegyi P, Czopf L, Marta K, et al. Uninterrupted or Minimally Interrupted Direct Oral Anticoagulant Therapy is a Safe Alternative to Vitamin K Antagonists in Patients Undergoing Catheter Ablation for Atrial Fibrillation: An Updated Meta-Analysis. *J Clin Med.* 2020;9(10).
  346. Yamada T, Kay GN. Catheter ablation of atrial fibrillation in the elderly. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2009;32(8):1085-91.

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 folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is		2	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		3	12	14
Óltalmak (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