

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

***In vitro* alvadék lízis vizsgálatok az akut iszkémiás és a
vérzéses stroke kimenetelének megítélésére**

Orbán-Kálmándi Rita Angéla

Témavezető: Dr. Bagoly Zsuzsa



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

GYAKORI RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	4
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
Hemosztázis rendszer	6
Neutrofil extracelluláris csapda (NET)	8
Fibrinolízis	11
Fibrinolízis globális tesztjei	14
In vitro alvadék lízis vizsgálat (CLA)	15
Stroke	17
Akut iszkémiás stroke	18
Nem traumás intracerebrális vérzéses stroke	22
CÉLKITŰZÉS.....	25
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	26
Intravénás trombolízis előtt álló akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek vizsgálata	26
Nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek vizsgálata.....	27
Etikai engedély	28
Mintavétel és laboratóriumi mérések	28
Sejten kívüli szabad DNS (cfDNA) meghatározása.....	29
In vitro alvadék lízis (CLA) mérések	29
Speciális hemosztázis vizsgálatok.....	31
Statisztikai analízis	31
EREDMÉNYEK	33
Intravénás trombolízis előtt álló akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek in vitro alvadék lízis vizsgálatának eredményei	33
Vizsgálati populáció	33
Sejten kívüli szabad DNS (cfDNA) szintek, az AIS súlyossága és kimenetelei.....	35
A CLA paraméterek összefüggése a cfDNA szintekkel, az AIS súlyosságával és kimeneteleivel	36
A módosított alvadék lízis módszer (módosított CLA) paraméterei, az AIS súlyossága és kimenetelei közötti összefüggések	39
A módosított CLA módszer diagnosztikai hatékonysága	42
Nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek in vitro alvadék lízis vizsgálatának eredményei	46

Vizsgálati populáció	46
In vitro CLA és módosított CLA vizsgálat ICH betegekben	48
Módosított CLA paraméterek összefüggése az ICH kimeneteleivel	50
MEGBESZÉLÉS.....	60
Limitációk	65
ÖSSZEFOGLALÁS.....	67
SUMMARY	69
IRODALOMJEGYZÉK.....	70
TÁRGYSZAVAK.....	78
KEY WORDS	79
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	80
FÜGGELÉK.....	81

GYAKORI RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

10%CLT	10% alvadék lízis idő
50%CLT	50% alvadék lízis idő
90%CLT	90% alvadék lízis idő
95%CI	95%-os konfidencia intervallum
α 2-PI	α 2-plazmin inhibitor
AIS	akut iszkémiás stroke
APTI	aktivált parciális tromboplasztin idő
aSICH	aszimptomatikus intrakraniális vérzés
ASPECTS	Alberta Stroke Program Early CT Score
AUC	görbe alatti terület
CLA	alvadék lízis teszt
CLA AUC	alvadék lízis teszt görbe alatti területe
FXIII	XIII-as véralvadási faktor
GCS	Glasgow Kóma Skála
hsCRP	nagy szenzitivitású C-reaktív protein meghatározása
ICH	intracerebrális vérzés
INR	nemzetközi normalizált ráta
mCLA	módosított alvadék lízis teszt
mRS	modifikált Rankin Skála
NET	neutrofil extracelluláris csapda
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
NPV	negatív prediktív érték
OR	esélyhányados
PPV	pozitív prediktív érték
rt-PA	rekombináns szöveti típusú plazminogén aktivátor
SICH	szimptomatikus intrakraniális vérzés
cfDNA	szabad sejten kívüli DNS
TOAST	Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment
t-PA	szöveti típusú plazminogén aktivátor

BEVEZETÉS

A cerebrovaszkuláris megbetegedések a fejlett országokban a vezető halálokok közé sorolhatóak (1, 2). A kialakult stroke esetek kb. 80%-át iszkémiás stroke (AIS), kb 15-18%-át intracerebrális vérzéses (ICH), és mintegy 3-5%-át subarachnoideális vérzés teszi ki. A stroke kialakulásának oka gyakran ismeretlen, és a prognózis nehezen becsülhető (3). Az AIS kezelésére jelenleg az egyetlen valóban hatékony Magyarországon is törzskönyvezett gyógyszer a rekombináns szöveti típusú plazminogén aktivátor (rt-PA). Bár ez a kezelés a klinikai tanulmányok és a metaanalízisek alapján bizonyítottan hatékony, a betegek csak mintegy 30-35%-nál jön létre javulás, míg a betegek 6-8%-a esetén a terápia következményeként intrakraniális vérzéses szövődmény alakul ki (4). Mind az AIS, mind az ICH mortalitása magas, azonban az agyvérzést szenvedettek halálozási aránya jóval magasabb. Az ICH mortalitása az első hónapban 40%, az első évben pedig 54%-ra tehető (5). A stroke típusától függetlenül, az irodalomban megtalálható tanulmányok többsége elsősorban a stroke kialakulásának rizikóját próbálja megbecsülni speciális hemosztázis tesztek vagy markerek révén, jóval kevesebb közlemény vizsgál a stroke kimenetelét potenciálisan előrejelző markereket. (6). Számos klinikai tényezőről tudunk, mely potenciálisan növeli a stroke kedvezőtlen kimenetelének kockázatát (pl. előrehaladott életkor, férfi nem, stroke felvételtkor súlyossága, diabetes mellitus, artériás magasvérnyomás, stb.) azonban a klinikai kimenetel pontos előrejelzése a betegek felvételekor jelenleg még nem lehetséges, mivel az elérhető klinikai/radiológiai kockázati skálarendszerek többsége nem specifikus és gyenge prediktív értékkel bír (3, 6). Mivel a véralvadási és fibrinolitikus rendszer fontos szerepet játszik mind az iszkémiás, mind a hemorrhágiás stroke patogenezisében, a megfelelő speciális hemosztázis laboratóriumi markerek ill. tesztek felkutatása elméletileg lehetőséget teremthet arra, hogy megjósoljuk a stroke kimenetelét (6, 7). A stroke prognózisának és a potenciális szövődményeknek a korai előrejelzése segíthet a megfelelő terápia (szisztémás trombolitikus, antitrombotikus és/vagy intraarteriális beavatkozások, intenzív monitorozás stb.) kiválasztásában, már a betegség akut szakaszában, javítva a betegek esélyeit a túlélésre és a minél kisebb mértékű neurológiai deficit kialakulására. A nemzetközi irodalomban fellelhető tanulmányok száma, melyek a különböző hemosztázis tesztek ill. markerek szerepét kutatják a stroke rövid-illetve hosszútávú kimenetelére igen limitáltak. További fontos probléma, hogy logisztikai okok miatt ezen vizsgálatok többsége nem a betegek felvételekor vett vérmintákból határoz meg biomarkereket, hanem az eseményt követő néhány nap során vett vérmintákból. Ebben az időszakban azonban jelentős változások léphetnek fel, melyek a hemosztázis

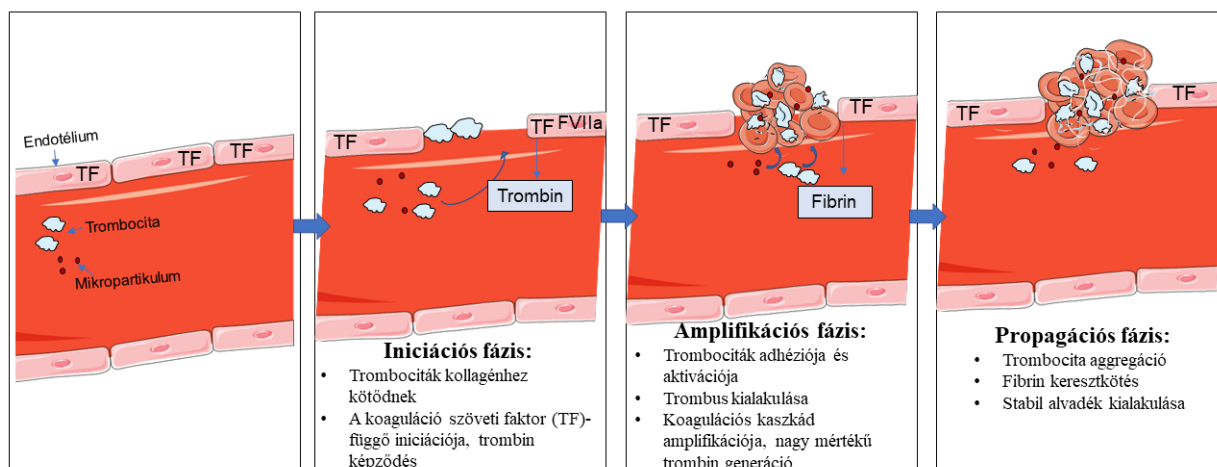
egyensúlyát befolyásolják és az elkezdett kezelések is módosíthatják a mért eredményeket. Továbbra is gyerekcipőben jár a fibrinolízis egyes markereit ill. a fibrinolízis globális vizsgálatára alkalmas módszereket vizsgáló közlemények száma az irodalomban, holott nyilvánvalónak tűnhet, hogy a fibrinolízis vizsgálatára alkalmas módszerek között lehet olyan, amely megfelelő prediktív értékekkel bírhat a cerebrovaszkuláris kórképek kimenetelének előrejelzésében.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Hemosztázis rendszer

A hemosztázis az érrendszeri sérülésekre adott fiziológias védekező mechanizmus (8). A véralvadás létrejöttéhez a vérlemezkékre és a koagulációs rendszerre egyaránt szükség van, annak érdekében, hogy az ér sérülésének helyén a vérzés minimálisra csökkenjen, és a trombocitákból és fibrinből álló hemosztatikus dugó létrejöhesse (8).

A véralvadás kaszkádra vagy vízesésre emlékeztető aktiválódási rendszerét 1964-ben MacFarlane és munkatársai írták le először (9). 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 (9). Napjainkban a MacFarlane és kutatócsoportja által leírt kaszkárendszer felváltotta a hemosztázis sejt alapú modellje, melyet Hoffman és Monroe 2001-ben definiált (10). Az általuk leírt rendszer a hemosztázist három egymással átfedő részre bontja: az iniciációs, az amplifikációs és a propagációs fázisra (1. ábra) (10, 11).



1. ábra. A hemosztázis sejt alapú modellje.

TF; szöveti faktor, FVIIa; aktivált VII-es faktor (8) forrás alapján szerkesztve

Az iniciációs lépés a szöveti faktort expresszáló sejtekre (endotél, szubendotéliális struktúrák) lokalizálódik (12). 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 azáltal 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 (9, 10).

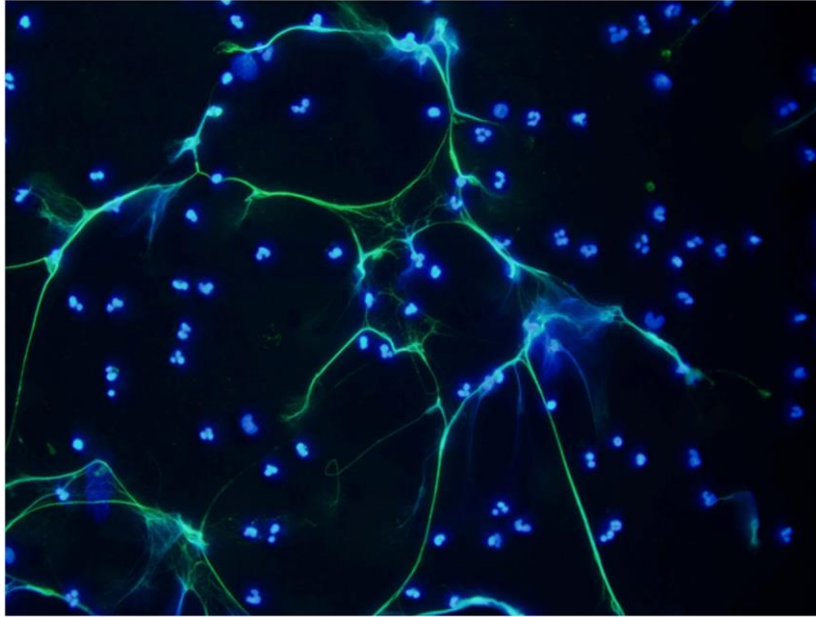
Az amplifikációs lépés során a vérlemezkék és kofaktorainak aktiválódása történik meg a szöveti faktor hordozó sejteken képződő kis mennyiségű trombin által. Mivel a trombociták már a sérülés helyén kitapadnak és részben aktiválódnak, a trombin jelenléte magasabb prokoaguláns aktivitást indukálhat, mint az adhéziós kölcsönhatások önmagukban. 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 (13, 14). A trombociták mindeközben a trombin és egyéb aktivátorok hatására szekretálják a granulumaik tartalmát. A denz granulumból felszabaduló adenzin-difoszfát (ADP) tovább erősíti a trombociták aktivációját és aggregációját. Az amplifikációs fázis végére fokozott trombin generáció jön létre (10).

A propagációs fázis az aktivált vérlemezkék felszínén történik, kialakulásában számos koagulációs fehérje játszik szerepet (11). 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 FIXa egyesülve kofaktorával, a FVa-val ezt követően nagy mennyiségben kialakítja a protrombináz komplexet. A protrombináz ebben a fázisban már nagy mennyiségű protrombint alakít át trombinná. A propagációs fázis során tehát a prokoaguláns komplexek aktivitása robbanásszerű trombin képződést eredményez, mely fibrinogénből fibrint hoz létre a fibrinopeptidek kihalásának révén. A képződő trombin hatására a XIII-as faktor (FXIII) is aktiválódik a véralvadás utolsó lépésében. Az aktivált FXIII (FXIIIa) a fibrin láncokat keresztköti, továbbá a fibrinolízis egyik legfőbb inhibitorát, az α 2-plazmin inhibitorát (α 2-PI, antiplazmin) a kialakult alvadékhoz köti, így stabilizálva az alvadékot (10). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a véralvadás során kialakult alvadék minőségét nagymértékben befolyásolják a sérülés helyén lévő vérsejtek, celluláris elemek és sejtből 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 (15). Ezen munkák eredményei a jövőben fontosak lehetnek a véralvadási rendellenességek, különösen a trombotikus események megértése szempontjából.

Neutrofil extracelluláris csapda (NET)

A neutrofil extracelluláris csapdát vagy más néven NET-et 2004-ben Brinkmann és kutatócsoportja írta le először, mint gyulladásozó stimulus hatására az aktivált neutrofilekből felszabaduló, főként DNS-ből, hisztonból és granuláris fehérjékből álló extracelluláris hálózatot (2. ábra) (16). Nagy felbontású pásztázó elektronmikroszkóppal készült felvételek azt mutatták, hogy a NET-ek membrán nélküli, 15-17 nm átmérőjű nyúlványos szakaszokat és 25 nm körüli gömb alakú doméneket tartalmaztak, melyek nagyobb, legfeljebb 50 nm átmérőjű szálakká egyesültek. Ezt követően Brinkmann és munkacsoportja immunfluoreszcens módszerrel elemezték a NET-ek összetételét. Eredményeik azt mutatták, hogy a NET-ek az azurofil (primer) granulomok egyes fehérjéit tartalmazták, úgymint a neutrofil elasztáz, katepszin G-t és a mieloperoxidáz, valamint a specifikus (szekunder) és terciér granulomokból származó fehérjék is jelen voltak, például a laktoferrin és a zselatináz. DNS-be interkalálódó festési eljárások eredményei alapján azt is leírták, hogy a DNS a NET-ek egyik fő szerkezeti eleme, melyet az a tény is megerősített, hogy már rövid ideig alkalmazott dezoxiribonukleázzal (DNáz) végzett kezelés is a NET-ek szétesését eredményezte. A NET-ek globuláris doménjein végzett kettős immunfestés megerősítette a neutrofil elasztáz, és a hisztonok kolokalizációját (16, 17). Vizsgálatuk alapján elmondható, hogy a neutrofilek már 10 perccel a megfelelő aktiválás után felszabadítják a NET-eket, azonban a NET képződés mértéke az aktivátor dózistól függ. Brinkmann munkacsoportjának korai megfigyelései szerint a NET-ek kialakulása az emberi szervezetbe bekerült baktériumok elleni immunválasz része, vagyis a NET képződés a korai neutrofil sejthalál egy újonnan leírt formája (16).

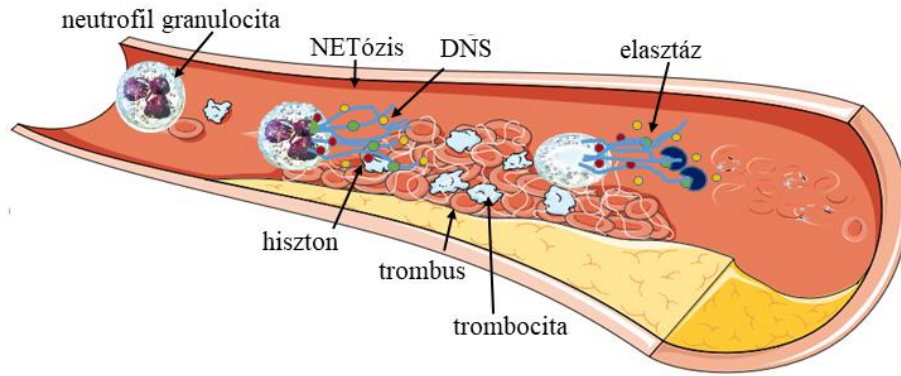


2. ábra. Neutrofil extracelluláris csapda (NET) reprezentatív ábrája. A NETózis során felszabadult DNS komplexet alkot a hisztonnal (kék) és a neutrofil elasztázzal (zöld) (18).

További tanulmányok eredményei is azt bizonyították be, hogy a NET-ek a sejthalál egy egyedülálló formájának eredményei, melyet morfológiailag az intracelluláris membránok elvesztése jellemez, még azelőtt, hogy a plazmamembrán integritása veszélybe kerülne (17). Steinberg és Grinstein 2007-ben megjelent tanulmányukban megalkották a NET-ek kialakulásához vezető NETózis fogalmát (19). 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 négy mag hiszton közül három citrullinálódik. Később a sejtburkok 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 (20). Összegzésként tehát elmondható, hogy a NETózis morfológiailag meglehetősen különbözik az apoptózistól és a sejthalál egyéb formáitól (17). Brinkman és Zychlinsky 2012-ben megjelent összefoglaló tanulmányukban leírják, hogy a NET-ek helytől, időtől, és az aktivátor dózisától függően képesek harcolni a különböző kórokozók ill. az általuk okozott betegségekkel, azonban hozzájárulhatnak betegségek patomechanizmusához is, például krónikus inflammatorikus kórképek ill. trombotikus kórképek esetén (17). Manzenreiter és munkatársai 2012-ben cisztás fibrózisban szenvedő betegek tüdő váladékában mutatták ki a NET-ek jelenlétét, mely hozzájárult a viszkozitás

növekedéséhez. A cisztás fibrózisban szenvedő betegek terápiájának része a DNáz kezelés (dornáz alfa, Pulmozyme), mely segít a váladék cseppfolyósításában, és kiürülésében (21). Korábban megjelent tanulmányok kimutatták a NET-ek jelenlétét preeclampsziában szenvedő várandósok placentájában is, és összefüggésbe hozták a kórkép patomechanizmusával (22). További vizsgálatok kimutatták a NET-ek jelenlétét autoimmun betegségekben, például szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő betegek plazmamintáiban. Eredményeik rávilágítottak, hogy SLE-ben szenvedő betegek, főleg a nők gyakran termelnek antitesteket DNS, hiszton és neutrofil fehérjék, vagyis a NET komponensei ellen. A tanulmányok eredményei rámutattak arra, hogy az SLE-s betegekből izolált neutrofilek hajlamosabbak NET képződésre, különösen az antitest komplexekre adott válaszként (23, 24).

Az egyik legfontosabb hatása a NET-eknek feltehetően a koagulációra van (25). A NET-ek véralvadásban betöltött szerepe jó példa arra, hogy a képződött NET mennyisége hogyan modulálja egy adott kórkép patofiziológiáját (17). A NET-ek kis mennyiségben fiziológiásan is részt vesznek az alvadékképződésben, azonban, ha túl sok a NET képződés, akkor masszív koaguláció, trombotikus komplikációk alakulhatnak ki, iszkémiát okozva. A NET-ek trombózisban betöltött szerepéről először Fuchs és munkatársai számoltak be. Tanulmányuk kimutatta, hogy a NET-ek hozzákapcsolódnak a vérlemezkékhez, elősegítve azok aktiválódását és aggregációját. Eredményeikben arról is beszámoltak, hogy a NET-ek elősegítik a trombin képződését azáltal, hogy megfelelő vázat biztosítanak a vörösvértesteknek, véralvadási faktoroknak, prokoaguláns molekuláknak (például a von Willebrand faktornak, fibrinogénnek, FXII-nek, szöveti faktornak). Feltételezéseik szerint a NET-ek DNS-hiszton komplexből álló gerince stabilizálja a fibrint, valamint rámutattak arra is, hogy a DNS-hiszton komplex jelenlétében kialakult alvadék egy vékonyabb fibrinrostokból álló, sűrűbb hálózat, mely fokozottan ellenáll a fibrinolízisnek (3. ábra) (26, 27).



3. ábra. NETózis szerepe a trombus képződésben. A neutrofil granulociták gyulladásos stimulus hatására főként DNS-ből, hisztonból és granuláris fehérjékből álló neutrofil extracelluláris csapdát (NET-et) hoznak létre, ami fibrinnel interkalálódva sűrű hálózatot hoz létre, mely ellenáll a fibrinolízisnek.

A NET-ek jelenlétét trombusokban mind artériás (miokardiális infarktus, stroke), mind vénás (mélyvénás trombózis, tüdő embólia) trombotikus események során kimutatták (28, 29). Több tanulmány beszámolt akut iszkémiás stroke-ot (AIS) elszenvedett betegek katéteres eljárással eltávolított trombusaiban a NET-ek jelenlétéről (30, 31). Egyes vizsgálatok kis betegszámú populáción kimutatták a NET-ek mennyiségének összefüggését a trombektómián átesett AIS betegek kedvezőtlen kimenetelével (29).

Fibrinolízis

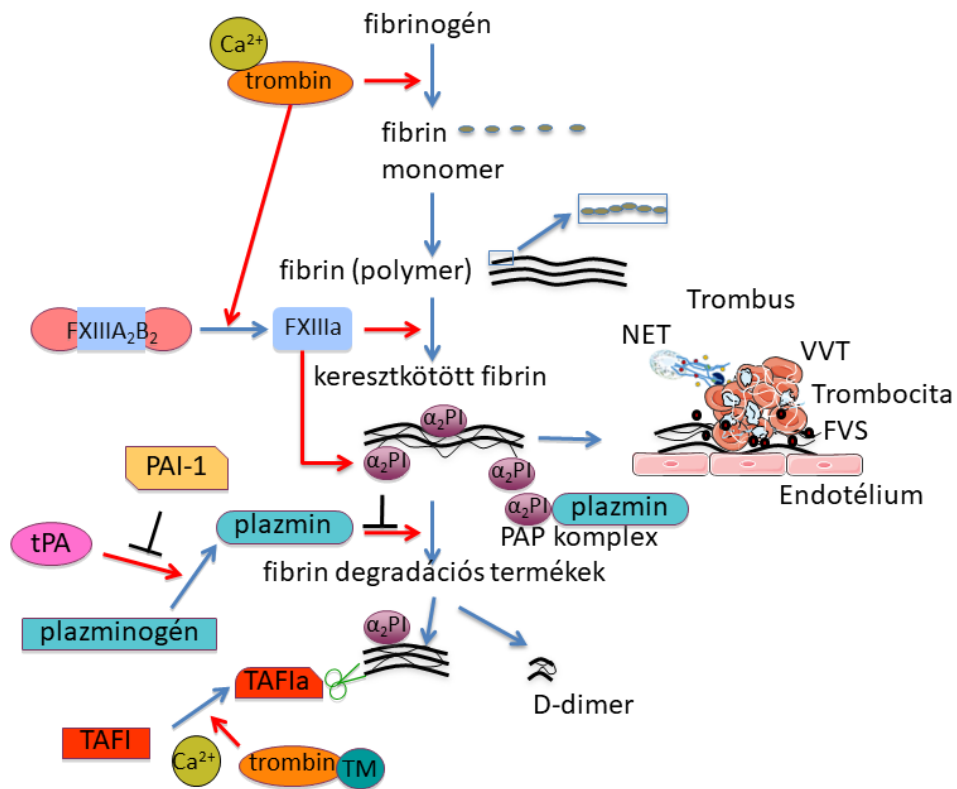
A fibrinolitikus rendszer egy számos élettani funkcióval rendelkező proteolitikus enzimrendszer, melynek a legismertebb és legfontosabb szerepe a túlzott mértékű koaguláció során létrejött fibrinalvadék lebontása. A fibrinolitikus rendszerben bekövetkező funkcionális zavarok a rendszer túlzott aktiválódásának (vérzési hajlam) vagy károsodott aktivációjának (trombotikus szövődmények, fibrinlerakódás) következményei lehetnek (32).

A fibrinolitikus rendszer egy inaktív proenzimet, a plazminogént, valamint annak aktivátorait és inhibitorait tartalmazza, melyeknek egymással történő specifikus kölcsönhatásai biztosítják az alvadék hatékony oldódását a fibrinolízis során (4. ábra) (33, 34).

A plazminogénből a plazminogén aktivátorok hoznak létre plazmint, mely a fibrinolitikus rendszer központi proteáza. Két fiziológiás plazminogén aktivátort ismerünk; ezek közül a legfontosabb a szöveti típusú plazminogén aktivátor (t-PA), a másik az urokináz típusú plazminogén aktivátor (u-PA). A t-PA hatékonyan alakítja át a plazminogént plazminná a fibrin

felszínén, így a t-PA által közvetített plazminogén aktiváció elsősorban az érrendszerben lévő fibrin oldásában vesz részt. Az u-PA egy specifikus u-PA receptorhoz (u-PAR) kötődik, ami a sejtekhez kötött plazminogén fokozott aktiválódását eredményezi, ezáltal az u-PA működéséhez nincs szükség a fibrin felszínre. A plazmin képes mind a t-PA-t, mind az u-PA-t hasítani, aminek következtében az egyláncú polipeptidekből aktívabb kétláncú polipeptidekké alakítja őket. A fibrin jelenléte akár három nagyságrenddel megnövelheti a plazminogén t-PA általi lassú aktiválódását, és megvédi a plazmint a specifikus inhibitoroktól (32, 35, 36).

A fibrinolízis igen szigorúan szabályozott folyamat, mely több szinten is szabályozódik hatékony inhibitorok révén. A fibrinolízis gátlása megvalósulhat a plazmin aktivitásának direkt gátlásával, a plazmin aktivációjának gátlásával a plazminogén aktivátorok direkt gátlása révén ill. a plazminogén és a t-PA fibrinhez történő kötődésének megakadályozása révén. A plazmin aktivitásának direkt gátlása az egyik legfőbb és leghatékonyabb szabályozási mechanizmus. A plazmin legfontosabb fiziológiás inhibitora az α_2 -PI, melyet a FXIIIa a fibrin α -láncjaihoz köt, és ezáltal hatékonyan védi a kialakuló alvadékot a fibrinolízissel szemben. A fibrinhez nem kötött, szabad α_2 -PI rendkívül gyorsan inaktiválja a szabad plazmint, plazmin-antiplazmin (PAP) komplexet létrehozva, ezáltal megakadályozva a fibrinolízis szisztémás terjedését. A fibrinolízis gátlásának további fontos szintje a plazminogén-plazmin átalakulás megakadályozása a plazminogén aktivátorok gátlása révén. A legfontosabb plazminogén aktivátor inhibitor a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1). A PAI-1 egy szerin proteáz inhibitor, mely a keringésben található t-PA-t és u-PA-t hatékonyan inaktiválja. A PAI-1 koncentrációja a keringésben mindig túlsúlyban van a plazminogén aktivátorokéval szemben, ezért a t-PA javarészt t-PA-PAI-1 komplexben van jelen a keringésben. A fibrinolízis szabályozásának további fontos szintje a plazminogén és a t-PA fibrinhez történő kötődésének megakadályozása. A trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor (TAFI) aktivációját követően eltávolítja a fibrinről a C-terminális lizin kötőhelyeket, ezáltal csökkenti a fibrin affinitását a plazminogén és a t-PA iránt. A folyamat révén csökken a plazminogén aktivációjának mértéke és ezáltal a TAFI hatékony védelmet nyújt a fibrinolízissel szemben (32, 34).



4. ábra. A fibrinolízis egyszerűsített folyamatábrája.

FVS; fehérvérsejt, FXIIIa; aktivált XIII-as faktor, FXIII A₂B₂; XIII-as faktor komplex (tetramer) formája, NET; neutrofil extracelluláris csapda, PAP komplex; plazmin- antiplazmin komplex, t-PA; szöveti típusú plazminogén aktivátor, TAFI: trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor, TAFIa: aktivált TAFI, TM: trombomodulin, PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor-1, α₂-PI: α₂ plazmin inhibitor, VVT; vörösvértest

Fibrinolízis globális tesztjei

A fibrinolízis szerepét a véralvadás 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, mint a kutató laboratóriumi gyakorlatban kevés módszer áll rendelkezésünkre a fibrinolízis folyamatának komplex vizsgálatára a koaguláció vizsgálatához képest. Ennek hátterében főleg 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. 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 vagy egyéb kórképek esetén (pl. habituális vetélés, sebgyógyulási zavarok) még gyerekcipőben jár (37).

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, α 2-PI) deficienciája miatt ritka, de ezen kórképekben akár súlyos vérzékenység is előfordulhat, és a PAI-1 deficiencia nőkben habituális vetélést is okoz (37). A szerzett hiperfibrinolízis jó néhány kórképben előfordulhat; például sokk, trauma, műtétek, májcirrózis, veseelégtelenség, szülési komplikációk, hemofília esetén. Ezen kórképek esetén a fibrinolízis vizsgálata mellett szól, hogy az időben diagnosztizált hiperfibrinolízis jól kezelhető fibrinolízis gátlószerekkel (ϵ -aminokapronsavval, tranexámsavval, vagy aprotininnel) (38). 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 lignózus conjunctivitist, elzáródásos hydrocephalust, nőgyógyászati, gasztrointesztinális tüneteket és sebgyógyulási zavart. A hipofibrinolízist néhány közleményben összefüggésbe hozták trombotikus

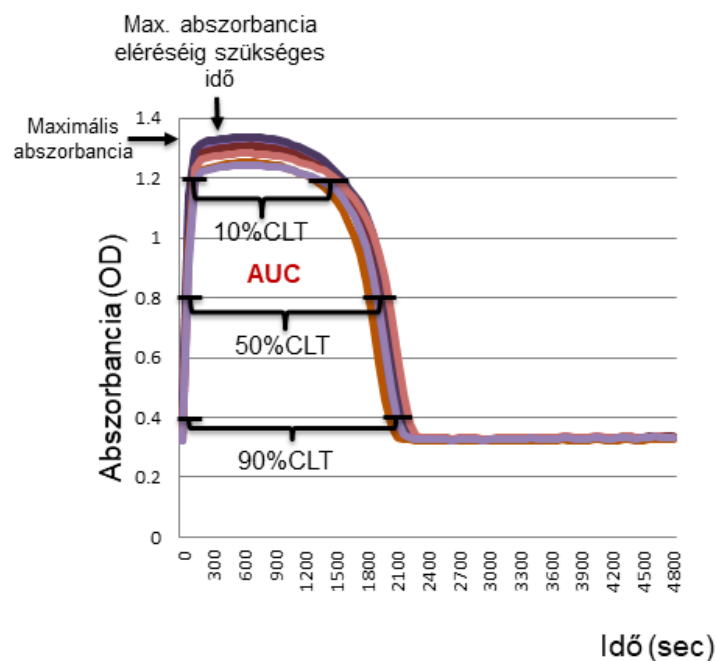
események kialakulásával is, különösen a vénás tromboembóliák rizikójának emelkedésével (39).

A fibrinolízis vizsgálatára alkalmazhatunk egyedi vagy individuális tesztek (pl. a plazminogén, plazminogén aktivátorok, plazminogén aktivátor inhibitorok, és plazmin inhibitorok szintjének meghatározása, ill. a fibrinolízis aktivációját jelző egyes markerek szintjének meghatározása), valamint globális tesztek (37). A fibrinolízis globális tesztjeinek vizsgálata történhet teljes vérből, például viszkoelasztikus módszerek révén, mint a tromboelasztográfia (TEG) és rotációs tromboelasztometria (ROTEM) (40, 41). 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 (37, 41, 42).

***In vitro* alvadék lízis vizsgálat (CLA)**

Az *in vitro* alvadék lízis vizsgálat (CLA) a fibrinolízis vizsgálatára alkalmas globális teszt. A vizsgálat során plazma mintákból rekombináns szöveti faktor és foszfolipidek vagy trombin hozzáadásával alvadékot képezünk, majd rt-PA hozzáadásával lízist indukálunk, melyet valós időben turbidimetriás módszerrel monitorozunk (37, 42). Az eljárás azonban igen idő- és munkaigényes, ezért jelenleg nem tartozik a rutin laboratóriumi vizsgálatok közé. Bár az elmúlt években elindult a módszer standardizációjának nemzetközi folyamata, a CLA kivitelezésének körülményei laboratóriumonként eltérnek (43). A módszerek eltéréseit az alkalmazott pufferek különböző összetétele, eltérő mértékű plazmahígítások, a rendszerhez adott reagensek, oldatok (t-PA, trombin, kalcium-klorid, szöveti faktor-foszfolipid) változó koncentrációi adják, valamint az, hogy míg egyes kutatócsoportok rekombináns szöveti faktor hozzáadásával indítják meg az alvadék kialakulását, addig mások trombinnal teszik ugyanezt (44-46). Minden eljárásnál elmondható azonban, hogy a módszer elvi lényege megegyezik, vagyis, hogy a fibrinogén-fibrin átalakulás hatására fibrin alvadék keletkezik, a kialakult fibrinhálón áthaladó fény szóródik, és az így létrejött turbiditás arányos lesz a fibrin keletkezésének mértékével. A folyamat során megfigyelhető abszorbancia változása a fibrin szerkezetéről is adhat információkat. Az alkalmazott turbidimetriás módszer során az alvadék kialakulása az

abszorbancia növekedésével, míg az alvadék lízise az abszorbancia csökkenésével jár (42, 43, 47). A CLA során kapott turbidimetriás görbék kiértékelésének módszere kutatócsoportonként eltérhet, azonban általánosságban elmondható, hogy az alkalmazott paraméterek a következők; maximális abszorbancia, a maximális abszorbancia eléréséig szükséges idő, az alvadék lízisének 10-, 50- és 90%-os ideje (10%CLT, 50%CLT, 90%CLT), valamint a görbe alatti terület (AUC) (5. ábra) (48). A görbék kiértékelésére és a fent leírt paraméterek meghatározására 2017-ben kifejlesztésre került egy Shiny Apps ClotlysisCL elnevezésű, online ingyenesen elérhető szoftver. A nemzetközi irodalomban a fibrinolízis mértékének jellemzésére a leggyakrabban az 50%CLT paramétert alkalmazzák (43).



5. ábra Az *in vitro* alvadék lízis módszer során detektált, reprezentatív turbidimetriás görbék és a görbe legfontosabb paramétereit. AUC; görbe alatti terület, 10%CLT; 10% alvadék lízis idő, 50%CLT; 50% alvadék lízis idő, 90%CLT; 90% alvadék lízis idő. A különböző színekkel jelölt görbék négy párhuzamos mérés eredményét mutatják.

Ahhoz, hogy a CLA módszer jobban tükrözze a valóságot, az egyes kutatócsoportok különböző sejtes elemeket, aktivátorokat, inhibitorokat adnak a rendszerhez a vizsgálat során (15). Kolev és munkacsoportja a CLA módszert az *in vivo* trombusban lévő NET-ek imitálása érdekében szabad sejten kívüli DNS (cfDNA) és hiszton hozzáadásával módosította. Kutatási

eredményeik azt mutatták, hogy a cfDNA ill. hiszton hozzáadásával képzett tisztított fibrin ill. plazma alvadékok rigiditása, viszkoelasztikus paramétere, és lízise jelentősen módosult. Az *in vivo* körülményeket imitáló koncentrációban hozzáadott cfDNA és hiszton együttes hatásaként elnyújtott alvadék-lízist tapasztaltak. Eredményeik alapján felvetették, hogy a NET-ek anti-fibrinolitikus hatásának tanulmányozása számos klinikai kórkép esetén jelentőséggel bírhat, különösen a trombolitikus terápia vonatkozásában lenne érdemes további tanulmányokat folytatni. (27, 42).

Stroke

A stroke az iszkémiás szívbetegség után a második vezető halálok, és a leggyakoribb rokkantságot okozó betegség világszerte (2). Az elmúlt években a stroke incidenciája jelentősen emelkedett, ennek ellenére a halálozási ráta csökkent, melynek hátterében minden bizonnyal a stroke kezelésének javulása állhat, különösen a világ fejlett országaiban. Ennek ellenére a stroke-kal összefüggő halálozások száma globálisan kb. 30%-kal nőtt, mely valószínűleg a népességnövekedés, a várható élettartam növekedés és a legtöbb populáció korstruktúrájában megfigyelhető, idősök arányának növekedéséből adódó változások hatását tükrözi (3). A kialakult stroke esetek kb. 80%-a iszkémiás, mintegy 15-18%-a nem traumás intracerebrális vérzés, a fennmaradó 3-5% subarachnoidális vérzés. A stroke etiológiai altípusainak aránya változó a különböző korú ill. etnikai hátterű populációk esetén (49).

A stroke rizikófaktorait befolyásolható és nem befolyásolható rizikófaktorokra oszthatjuk, a stroke hátterében többségében befolyásolható rizikófaktorok állnak. A stroke rizikótényezői jelentős átfedést mutatnak a jól ismert kardiovaszkuláris rizikótényezőkkel, bár relatív fontosságuk eltérhet. Klinikai tanulmányok eredményei alapján az iszkémiás és a hemorrhágiás stroke legfontosabb rizikótényezője a magas vérnyomás, a legfontosabb nem-befolyásolható rizikótényező pedig az előrehaladott életkor. A további, jól ismert rizikófaktorok közé soroljuk a hiperkoleszterinémiát, a pitvarfibrillációt, a dohányzást, a túlzott alkoholfogyasztást, diabetes mellitust, illetve a helytelen étrend, elhízás, fizikai aktivitás hiánya, alvászavar, krónikus gyulladás, krónikus vesebetegség, hormonális terápia, stressz és a depresszió által okozott kockázatot (3).

A WHO definíciója alapján a stroke „az agyműködés vérellátási zavara által okozott globális vagy fokális neurológiai diszfunkcióval járó, gyorsan kialakuló tünetegyüttes, mely több mint 24 órán keresztül fennáll, és amelynek bizonyíthatóan nincs más oka, mint az agy

érrendszerében kialakult változás”. A stroke-tól megkülönböztetjük az átmeneti iszkémiás rohamot, melyről abban az esetben beszélünk az aktuális definíció alapján, ha a tünetek jelentkezése során nem alakul ki képalkotó vizsgálattal detektálható akut infarktus (1). A stroke tipikus tünetei közé tartozik a hirtelen fellépő egyoldalú gyengeség, zsibbadás, látászavar, megváltozott beszédképesség, ataxia, és szédülés, társuló tünetként felléphet többek között fejfájás, amnézia, szédülés- vagy bizonytalanságérzés, a stroke típusától és lokalizációjától függően. Felismerésében segít a Face Arm and Speech Test (F.A.S.T.) vizsgálat, amellyel a stroke-ra leginkább jellemző tüneteket laikusok is felismerhetik (50). A stroke diagnózisának felállítása a kezdeti órákban a legnehezebb, különösen, ha a tünetek kezdete bizonytalan, vagy a tünetek atipikusak, esetleg változnak (51). A stroke diagnosztizálásához nélkülözhetetlen a megfelelő anamnézis felvétele, a klinikai neurológiai vizsgálatok elvégzése és az agyi képalkotó vizsgálatok elvégzése, mindezeket kiegészítik a laboratóriumi vizsgálatok. Az anamnézis felvételekor pontosan tisztázni kell a tünetek kialakulásának hátterét, az alapbetegségeket és a beteg által szedett gyógyszereket. Iszkémiás stroke fennállásának lehetősége esetén kiemelten fontos megtudni a tünetek kezdetének idejét, mert hatékony kezelés csak adott időablakon belül történhet (Isd. később). A részletes neurológiai vizsgálat alapvetően kétféle tünettani csoportot tárhat fel: carotis (anterior), illetve vertebrobasilaris (posterior) keringési zavart. A képalkotó eljárások közül a koponya CT vizsgálat, illetve koponya MRI vizsgálat játszik elsődleges szerepet a diagnosztikában. A koponya CT vizsgálat magas érzékenységet mutat a friss koponyaűri vérzés kimutatására. A képalkotó vizsgálatok célja a vérzés kimutatásán túl a kialakult károsodás kiterjedésének megítélése. Iszkémiás stroke esetén a diagnosztika fontos eleme az angiográfiás vizsgálatok elvégzése, mellyel a nagyérelzáródás fennállását lehet megítélni.

Akut iszkémiás stroke

A kialakult stroke esetek kb. 80%-a iszkémiás eredetű, melynek hátterében egy agyi ér elzáródása áll, az ér ellátási területéhez tartozó agyállomány károsodását és neurológiai funkcióvesztést okozva. Az iszkémiás stroke kezelése során a cél véráramlás gyors helyreállítása a kialakult testi- és szellemi fogyatékoság limitálása érdekében (52).

Az akut iszkémiás stroke (AIS) két fő altípusra oszlik, a trombotikus és embolikus eredetűre. A trombotikus stroke, amely az összes iszkémiás stroke kb. 45%-át teszi ki, előfordulhat az agy nagy és kis ereiben. A nagy agyi erekben a trombotikus stroke általában akkor fordul elő, amikor egy ateroszklerotikus plakk ruptúrál és felszínén trombus alakul ki. A kis ereket érintő

vagy lacunaris infarktusok akkor alakulnak ki, mikor az agyban található vékony erek elzáródnak, keringésük romlik, gyakran magasvérnyomás-betegség következtében. Az emboliás stroke az összes iszkémiás stroke kb. 20%-át teszi ki. Ebben az esetben a trombus nem az agyban keletkezik, hanem a véráramláson keresztül jut el egy agyi artériába. A szív a leggyakoribb ilyen trombusforrás, különösen pitvarfibrillációban szenvedő betegeknél. Az AIS fennmaradó hányadában a háttérben ún. kriptogén stroke áll. A kriptogén stroke olyan iszkémiás stroke, ahol a kialakulás oka bizonytalan, vagy ismeretlen (3, 52). Az iszkémiás stroke etiológiai altípusait a TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment; nagy artéria ateroszklerózis, kardioembólia, kísér okklúzió, egyéb ismert vagy ismeretlen etiológia) kritérium rendszer alapján osztályozzuk (49).

A stroke klinikai súlyosságának megállapítására a neurológusok a National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) skálarendszert alkalmazzák. Az NIHSS egy 11 tételből álló skála, amely kvantitatív mérőszámot nyújt a standard neurológiai vizsgálatok kulcsfontosságú elemeiről. A skálarendszer értékeli az éberségi állapotot, az extraokuláris mozgásokat, az arcizmok működését, a végtagok erejét, az érzékszervi funkciókat, a koordinációt és a beszédképességet. A maximálisan adható pontszám 42, minél jobban teljesít a beteg, vagyis minél enyhébb a kialakult stroke, annál kevesebb pont adható. A kapott NIHSS pontszám összefüggésben áll a kimenetellel, magasabb pontszám esetén rosszabb funkcionális kimenetelre lehet számítani (53, 54).

A stroke radiológiai súlyosságának megállapítására a nemzetközi gyakorlatban leginkább az ASPECTS (Alberta Stroke Program Early CT Score) pontrendszer használata terjedt el. Az ASPECTS az artéria cerebri media területen bekövetkezett korai iszkémiás elváltozások súlyosságának megítélésére alkalmas. Az ASPECTS egy 10 pontos skála, ahol a maximális 10 pont a normál fiziológiás állapotot jelenti. A pontrendszer az artéria cerebri média területét 10 részre osztja fel, minden egyes terület iszkémiája esetén 1 pont levonásra kerül. Minél kiterjedtebb a sérülés, annál több pont kerül levonásra, a vizsgálat során kapott 7 vagy annál alacsonyabb pontszám a stroke kedvezőtlen funkcionális kimenetelének előrejelzője (55).

Az AIS hosszútávú funkcionális kimenetelének megítélésére leggyakrabban a modifikált Rankin Skálát (mRS) alkalmazzák. Az mRS egy 0-6-ig terjedő pontrendszer, amely az eseményt követő mobilitás felmérését teszi lehetővé. Az mRS segítségével meghatározható a rokkantság vagy az önellátásra való képesség mértéke. A mRS=0 a teljes önellátást, míg a 6 pontérték a halált jelenti (1. táblázat) (56, 57).

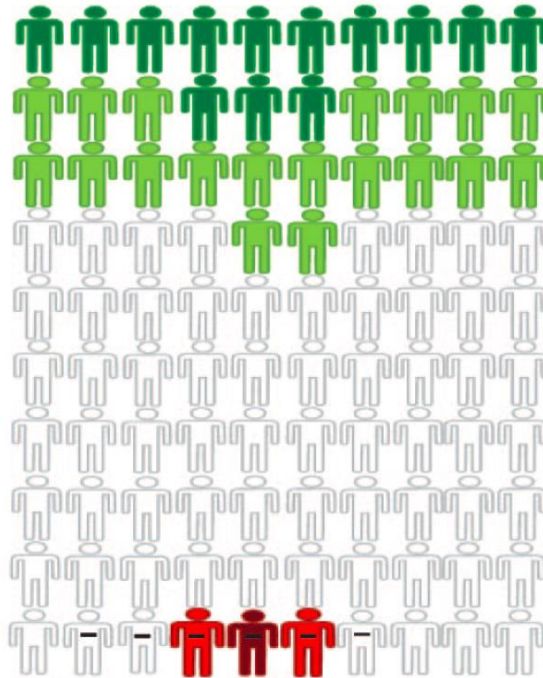
Pontszám	Leírás
0	Egyáltalán nincs tünete/tünetmentes.
1	Tünetei ellenére nincs érdemi rokkantság, minden szokásos feladatot és cselekvést képes kivitelezni.
2	Enyhe rokkantság, nem képes korábbi mindennapos feladatai mindegyikét elvégezni, de saját maga ellátására segítség nélkül képes.
3	Mérsékelt 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, incontinens, állandó ellátást és felügyeletet igényel.
6	Elhunyt

1. táblázat. A modifikált Rankin Skála pontrendszer a stroke-ot követő mobilitás felmérésére.

Az mRS 0-1 kedvező funkcionális kimenetelt jelent, míg az mRS=6 az eseményt követő elhalálozást definiálja (56) forrás alapján szerkesztve.

Az AIS hatékony, célzott kezelésére jelenleg Magyarországon az egyetlen törzskönyvezett gyógyszer az intravénás trombolízis rt-PA-val. A kezelés limitációját adja, hogy szűk terápiás ablakkal rendelkezik, vagyis a tünetek jelentkezését követő 3-4,5 órán belül kell megkezdeni a terápia adását. Az intravénás rt-PA dózisa 0,9 mg/kg, mely nem haladhatja meg a maximum 90 mg-ot. A dózis első 10%-át bolusként adják az AIS betegek számára, majd a maradék 90%-ot intravénás infúzióként 60 percen keresztül adagolják (4, 58). Klinikai vizsgálatok alapján az rt-PA-val történő trombolízis szignifikánsan csökkentette a rossz hosszútávú kimenetel arányát a placebo-val kezelt csoporthoz képest. A terápia azonban csak az esetek 30-40%-ban okoz klinikai javulást, az esetek többségében a remélt jobb kimenetel elmarad. Fontos szövődmény az iszkémiás stroke hemorrhágiás transzformációja, ami vérrögoldó kezelés nélkül, spontán is kialakulhat, elsősorban emboliás infarktusból és magasabb vércukor mellett. A kizárólag CT-n leírt gyakoriság 13-43%, a tüneteket is okozó gyakoriság 0.6-20% közötti, irodalmi adatok alapján (6. ábra) (59, 60). A terápia asszociált vérzés klasszifikációja az ECASS II (European Co-operative Acute Stroke Study-II) kritériumok alapján történt, mely szerint megkülönböztetünk szimptomatikus vagy tünettel járó (SICH) és aszimptomatikus vagy tünettel nem járó (aSICH) intrakraniális vérzést. Tünettel járó vérzéses transzformáció alatt azt értettük, ha a neurológiai tünetek ≥ 4 ponttal romlanak a NIHSS pontrendszer szerint, és a tünetek hátterében a haemorrhágiás elváltozások valószínűsíthetők (59). A trombolitikus terápia elkezdése előtt

azonban nehéz megjósolni a kimenetelt (a kezelés sikertelenségét és a vérzéses komplikációkat egyaránt), mely annak tulajdonítható, hogy a jelenleg elérhető rizikóbecslő skálák nem specifikusak, prediktív értékük alacsony (60, 61). Feltételezhetjük, hogy a véralvadás ill. fibrinolízis egyensúlyának individuális eltérései, melyek az alvadék szerkezetét és oldékonyságát meghatározzák, kulcsszerepet játszhatnak a rekanalizáció elmaradásában ill. a vérzéses komplikációk kialakulásában. Ennek ellenére jelenleg nincs olyan ismert hemosztázis ill. fibrinolízis biomarker, amely igazoltan hasznos információt nyújthat a betegek felvételekor a terápia kimenetelére vonatkozóan. Mivel a hemosztázis ill. fibrinolízis egyensúlyát befolyásoló tényezők számosak lehetnek, feltételezhetjük, hogy a klinikai gyakorlatban elsősorban a globális tesztek használata lehet célszerű a kimenetel gyors megítélésére és a klinikai döntéshozatal segítésére.



6. ábra Az intravénás trombolízis hatékonysága akut iszkémiás stroke során. Sötétzöld jelölés: jelentős javulás, a kimenetel a trombolízist követően a korábbi életkörülményeknek megfelelő (13%); világos zöld: a terápia következtében javulás mutatkozott (19%); fehér: a kezelést követően nem történt javulás (62%); áthúzott alak: terápia asszociált vérzéses komplikáció (6%); piros: kedvezőtlen kimenetel, romlás vérzés következtében (3%); vörös jelölés: igen súlyos fogyatékoság/halál vérzés miatt (1%). Forrás: (60)

Napjainkban a katéteres vérrögeltávolítás (mechanikus trombektómia) egy másik fontos lehetőség AIS esetén a keringés gyors helyreállítására, melyre kizárólag nagyér okklúzió esetén

van lehetőség. Az utóbbi évek nemzetközi tanulmányainak eredményei rávilágítottak arra, hogy a CT és MRI vizsgálatokkal igazolt nagyér okklúzió miatt AIS-ban szenvedő betegekben mechanikus trombektómiát követően a reperfüzió mértéke szignifikánsan magasabb volt a kizárólag intravénás trombolízisben részesülő betegekhez képest. Ez az eredmény a felhasznált eszközök és technikák fejlődésének ill. a szigorú kritériumok szerint kiválasztott betegpopulációnak köszönhető. A mechanikus trombektómia leginkább olyan betegeknél alkalmazható sikerrel, akiknél jó a kollaterális keringés, anterior keringés (az arteria cerebri media vagy az arteria carotis interna ellátási területe) érintett, súlyos a neurológiai deficit, ugyanakkor nincsenek kiterjedt korai iszkémiás jelek, a betegnek nincsenek súlyos társbetegségei, és a stroke előtti funkcionális állapot megfelelő. Nemzetközi tanulmányok alapján a trombektómia után megfigyelhető kedvező hosszútávú kimenetel aránya hasonló az intravénás trombolízis esetén tapasztalt kb. 30-40%-hoz, vagy némileg magasabb. A mechanikus trombektómia terápiás ablaka 6 óra, vagyis sikertelen trombolízist követően is alkalmazható. A trombektómia veszélyét a beavatkozást követő vérzéses komplikációk adják, csakúgy, mint a rt-PA-val történő trombolízis esetében. A jelenlegi nemzetközi ajánlások alapján elmondható, hogy a mechanikus trombektómia hatékonyságát növeli, ha a beavatkozás megkezdése előtt trombolízist is végeznek az erre alkalmas AIS betegekben (3, 52, 62).

Nem traumás vérzéses stroke

Az intracerebrális vérzés stroke (ICH) az összes stroke eset kb. 15-18%-át teszi ki, halálozási aránya azonban jóval magasabb (63). A betegség mortalitása az első hónapban kb. 40%, az első évben pedig 54%-ra tehető. Az ICH globális incidenciája az elmúlt évtizedekben emelkedett, melynek hátterében elsősorban az alacsony és közepes jövedelmű országokban való előfordulásának 22%-os növekedése áll, míg a fejlett országokban enyhe csökkenés volt megfigyelhető 1990 és 2010 között (5). A vérzéses stroke-ot anatómiai helye vagy a feltételezett etiológiája szerint osztályozzák. Az ICH 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. Az ICH kialakulásának leggyakoribb okai: a magasvérnyomás (30-60%), az agyi amyloid angiopathia ill. arteritis (10-30%), antikoaguláció ill. véralvadási zavar (1-20%), érabnormalitások, pl. aneurysma, angioma, arterio-venosus malformatio (3-8%), valamint az esetek mintegy 5-20%-ában a kiváltó ok meghatározhatatlan (3). Kockázati tényezőként tartjuk számon a diabetes mellitust, dohányzást, alkoholfogyasztást ill. egyes

drogok használatát is (64). Agyvérzés kialakulhat meglévő cerebrális lézió talaján is, pl. központi idegrendszeri tumor, granuloma, gyulladás, pl. 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 konsziderálni a mögöttes érrendellenességek lehetőségét is (3, 64).

A krónikus magasvérnyomás az ICH kialakulásának legfontosabb kockázati tényezőjének tekinthető, azonban emellett számos más rizikó faktor is ismert, mint például az előrehaladott életkor (> 50 év), túlzott alkoholfogyasztás, magas koleszterinszint, antikoaguláns terápia, vaszkuláris malformációk. Az 50 év feletti férfiaknál az ICH kialakulásának kockázata gyakoribb (5, 65).

Az ICH-ban szenvedő betegeket ideális esetben átfogó kórházi környezetben kell kezelni, multidiszciplináris egészségügyi csapatmunka részeként, ideértve az ideggyógyászatot, idegsebészetet, neuroradiológiát, intenzív terápiát, a sürgősségi ellátást és a belgyógyászatot is. A kórházi felvételt követően fontos az anamnesztikus adatok felvétele és a részletes neurológiai és képalkotó vizsgálatok elvégzése. Fontos tisztázni, hogy emelkedett-e a beteg szisztolés vérnyomása, szed-e antikoaguláns, van-e intraventriculáris kiterjedés, mutatja-e a beteg a hydrocephalus jeleit, van-e bizonyíték makrovaszkuláris vérzési forma jelenlétére (fistula, aneurysma, agyi vénás sinus trombózis), valamint, hogy van-e kockázata a hematoma expansziójának. Mindezek az adatok kritikusak lehetnek az ICH gyors diagnózisának és kezelési protokolljának felállítása szempontjából (66). Az ICH életveszélyt jelentő orvosi vészhelyzet, amely gyors diagnózist igényel. A radiológiai képalkotás elengedhetetlen az ICH megbízható megkülönböztetéséhez az AIS-tól. A CT angiográfia, a nem kontrasztanyag CT (NCCT) vagy az MR angiográfia alkalmas lehet a vérzés forrás kimutatására is (67).

Kimutatták, hogy az intenzív, korai ellátás kórházi körülmények között közvetlen hatással van az ICH-t követő morbiditásra és mortalitásra. A vérzések nem sebészi ellátására vonatkozó javaslatok nem egységesek, és a rendelkezésre álló, kis esetszámú randomizált vizsgálatok alapján sem a sebészi, sem a gyógyszeres kezelés előnyei nem igazolódtak egyértelműen (68). A diagnózist követően az azonnali cél az újravérzés és a hematoma terjedési kockázatának minimalizálása az első 24-72 órán belül. Intenzív osztályos kezelés gyakran indokoltá válhat, mert gyakran növekszik az intrakraniális nyomás és a vérnyomás, emellett intubáció és lélegeztetés is szükséges lehet. Fontos a vérnyomás stabilizálása, bár a vérnyomás csökkentése nem ajánlott 180/105 Hgmm érték alatt. A tartósan megemelkedett vérnyomás lehetséges következménye a hematoma növekedése (3, 63). A konzervatív kezelés fontos pontja a

koagulációs rendellenesség korrigálása, beleértve az antikoagulánsok hatásának felfüggesztését.

Az ICH kimenetelét sok tényező befolyásolja, melyek közül az egyik a hematoma térfogata. Az ICH során kialakult hematoma térfogatát a CT vizsgálatok eredménye alapján leggyakrabban az ABC/2 módszer segítségével határozzák meg, ahol az A a legnagyobb átmérő a legnagyobb vérzést mutató szeleten, B az A-ra merőleges átmérő, a C pedig a vérzéses axiális szeletek hozzávetőleges száma, szorozva a szelet vastagságával (69).

Az ICH score egy 0-6-ig terjedő pontrendszer, mely a nemzetközi gyakorlatban leggyakrabban használt klinikai skálarendszer az ICH 30 napos mortalitásának előrejelzésére. Az ICH score magába foglalja az életkort, a becsült vérzésvolumen értéket, az intraventriculáris vérzés jelenlétét, az ICH lokalizációját (supra/infratentoriális eredetét), és a Glasgow Coma Skála (GCS) pontértékét. Minél magasabb a betegek számolt ICH pontszáma, annál nagyobb a valószínűsége a mortalitásnak az eseményt követő első hónapon belül. Az ICH score= 6 pontszám 100%-os halálozási aránnyal társul (70).

Az intracerebrális hematoma kiterjedésének, evolúciójának, agyi fiziológiára gyakorolt hatásainak megértése kritikus fontosságú lehet a jövőben a jobb, modernebb kezelési protokollok kidolgozása szempontjából és a betegek túlélésének javítása szempontjából (70). A jelenleg érvényben lévő kezelési irányelvek alapján egyértelműen megállapítható, hogy az akut iszkémiás stroke kezelésével szemben a hemorrhágiás stroke kezelése az elmúlt évtizedekben keveset változott. A hemosztázis illetve a fibrinolízis eltéréseivel kapcsolatos ismereteink ICH betegekben igen limitáltak. Mindössze néhány tanulmány áll rendelkezésünkre, amelyben leírják, hogy a magas D-dimer értékek előrejelezhetik a mortalitást (71, 72), ugyanakkor a fibrinolízis globális vizsgálata ICH betegkohorszban még nem történt meg.

CÉLKITŰZÉS

Munkánk során célul tűztük ki megvizsgálni, hogy egy általunk kifejlesztett új, módosított *in vitro* CLA vizsgálat (mCLA), mely a NET-ek jelenlétének imitálása érdekében cfDNA-t és hisztont is tartalmaz, képes-e megjósolni a stroke rövid- és hosszútávú funkcionális kimenetelét trombolitikus kezelésben részesülő akut iszkémiás stroke betegekben, és nem traumás vérzéses stroke-ot szenvedett betegekben.

Részleteiben, két prospektív obszervációs tanulmány révén célunk volt megvizsgálni, hogy:

1. Intravénás trombolízis terápia előtt álló akut iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegek plazmamintáiban a cfDNA szint, az *in vitro* CLA és a módosított CLA különböző paraméterei mutatnak-e összefüggést a stroke súlyosságával és az eredmények alapján megjósolható-e a terápia kimenetele és a vérzéses szövődmények kialakulása.
2. Nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek felvételi plazmamintáiban az *in vitro* CLA és a módosított CLA különböző paraméterei mutatnak-e összefüggést a stroke súlyosságával, a hematoma térfogatával, a stroke mortalitásával és a hosszútávú funkcionális kimenetelével.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Intravénás trombolízis előtt álló akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek vizsgálata

Az első, prospektív, obszervációs tanulmányban az AIS betegek beválogatása a Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Neurológia Klinikájának Stroke Centrumában történt. A betegek bevonása a tanulmányba 2016 szeptemberében kezdődött és 2019 áprilisáig tartott. A beválogatási és kizárási kritériumok megegyeztek a trombolitikus terápia 2008-as European Stroke Organisation (ESO) irányelveivel és az érvényes magyar szakmai protokollal (73). Minden iszkémiás stroke-ot elszenvedett beteg a tünetek jelentkezésétől számított 4,5 órán belül intravénás trombolízis kezelésben (rt-PA, Alteplase, Boehringer Ingelheim, Németország) részesült a standard protolloknak megfelelően (73). Azok a betegek, akiken a trombolitikus terápia mellett mechanikus trombektómiát is elvégeztek, nem kerültek be a tanulmányba. Az AIS diagnózisának felállítása CT-vel és CT angiográfiával történt. Minden esetben kontroll CT vizsgálat is történt 24 órával az eseményt követően. Az ASPECTS pontrendszert 3 független vizsgáló értékelte a felvételi és 24 órával a trombolízist követően végzett CT felvételen egyaránt (74). A kezelést végző neurológusok a kórházi felvétel során számos demográfiai és klinikai adatokat rögzítettek még a trombolízis megkezdése előtt: kor, nem, cerebrovaszkuláris rizikófaktorok (artériás magasvérnyomás, pitvarfibrilláció, korábbi stroke, TIA, diabetes mellitus, dohányzás, hiperlipidémia), gyógyszerek (antihipertenzív, antikoaguláns, antitrombotikus, antidiabetikus és lipidsökkentő terápia). A stroke súlyosságát a klinikusok az NIHSS skálarendszer alapján határozták meg felvételnél, valamint 7 nappal a terápiát követően (75). A stroke etiológiájának meghatározása a TOAST kritériumok szerint történt (76). A betegek követése és a hosszútávú funkcionális kimenetel megítélése az mRS pontrendszert alkalmazva történt 3 hónappal a terápiát követően (56, 57, 77).

A tanulmány során a következő kimeneteleket állítottuk fel:

1. Rövidtávú funkcionális kimenetel: az NIHSS változása alapján a 7. nappal. Az NIHSS minimum 4 ponttal való csökkenése vagy 0 NIHSS pontérték a kedvező rövidtávú kimenetelt, az NIHSS legalább 4 pontos emelkedése vagy a 7. nappal bekövetkező halál a kedvezőtlen hosszútávú kimenetelt jelentette (78).
2. Hosszútávú funkcionális kimenetel: az mRS érték alapján 90 nappal az eseményt követően. Kedvező hosszútávú kimenetelként értékeltük az mRS 0-1 értékeket (56).

3. Vérzéses transzformációk: a szimptomatikus (SICH) vagy aszimptomatikus intrakraniális vérzés (aSICH) jelenlétét a European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) II kritériumok alapján definiáltuk (79).

Nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek vizsgálata

A második prospektív obszervációs tanulmányba nem traumás ICH-t elszenvedett betegek kerültek beválogatásra 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 (80). 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 aneurizma, AV malformációk, epidurális hematoma, subdurális hematoma, malignus elváltozások, súlyos máj-és vesekárosodás, hemorrhágiás diathesis és a SARS-CoV2 vírusfertőzés jelenléte. Az ICH jelenlétének igazolása a klinikai tüneteken alapuló komplex neurológiai vizsgálatok mellett NCCT-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 (81). 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, felvételtől és az eseményt követő 7. napon (75). A mortalitás veszélyének becslésére a klinikusok az ICH score pontrendszert alkalmazták minden beteg esetén (70). A betegek hosszútávú funkcionális kimenetelének értékelésére az mRS pontrendszert használták (56). 2020 márciusától, vagyis a COVID-19 fertőzés magyarországi megjelenésétől számítva, minden ICH beteg esetében odafigyeltek a vírusfertőzés jelenlétére már a kórházi felvételtől egészen a 3 hónapos követési időszakig. Valamennyi beteg esetén felvételekor orr/garat váladékból származó RNS mintából reverz transzkripciós polimeráz-lánreakció (RT-PCR) vizsgálat történt a koronavírus jelenlétének kimutatására/kizárására.

A tanulmány során egészséges önkéntesek egy 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. Hosszútávú funkcionális kimenetel: az mRS érték alapján 90 nappal az eseményt követően. Kedvező hosszútávú kimenetelként értékeltük az mRS 0-1 értékeket (56).

Etikai engedély

Mindkét tanulmány tervezése a Helsinkii deklarációs egyezmény figyelembevételével történt. A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottsága, illetve 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.

Mintavétel és laboratóriumi mérések

A mérésekhez használt perifériás vérminta vétele minden betegől felvételkor történt. Az AIS betegpopuláció esetén a felvételi vérminta levételére minden esetben még az intravénás rt-PA infúzió megkezdése előtt került sor. A rutin laboratóriumi vizsgálatok (ionok, szérumban glükóz koncentráció, máj- és vesefunkció, nagy szenzitivitású C-reaktív fehérje vizsgálat, teljes vérkép) meghatározását standard laboratóriumi módszerek alapján (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország és Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Németország) a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében végezték. A hemosztázis vizsgálatokhoz és a cfDNA szintek detektálásához a 0.109 M nátrium citráttal alvadás gátló (Becton Dickinson, Franklin Lane, NJ) vérmintákból trombocita szegény plazmamintákat készítettünk (kétszeri centrifugálás, 15 percig, 1500 g, szobahőmérsékleten). A hemosztázis szűrőteszt meghatározása (protrombin idő, aktivált parciális tromboplastin idő, és trombin idő) BCS koagulométeren rutin protokollt követve történt (Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország). A speciális hemosztázis vizsgálatok végzéséhez és a cfDNA szintek meghatározásához a citráttal alvadás gátló plazmamintákat egyedi kóddal ellátva -80°C-on tároltuk.

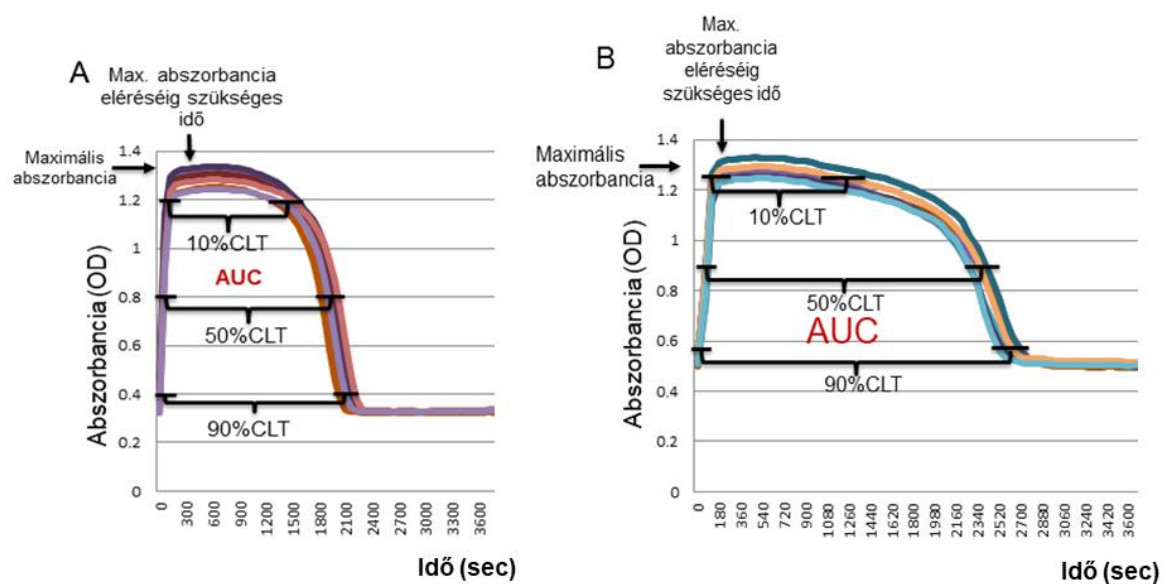
Sejten kívüli szabad DNS (cfDNA) meghatározása

A plazma cfDNA szintek meghatározása fluoreszcens nukleinsav festék felhasználásával, Quant-iT PicoGreen dsDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével történt a gyári protokoll lépéseit követve. A mérés kezdetén egy 5 pontos standard sort készítettünk a gyártó által megadott standard DNS mintából 1 µg/mL-től 1ng/mL koncentrációig hígítva. A standard és beteg mintákat (100 µL) fekete 96 lyukú mikrotiter lemezre (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) pipettáztuk, majd hozzáadtunk 100 µL munkaoldatot (Quant-iT PicoGreen reagens) minden mintához, inkubáltuk 5 percig szobahőmérsékleten fénytől védve. Végül a fluoreszcencia intenzitás detektálása 480 nm hullámhosszon TECAN Infinite p200 PRO mikrolemez olvasón (TECAN Trading AG, Männedorf, Svájc) történt. A mért értékek alapján a standard görbe segítségével határoztuk meg az egyes plazmaminták cfDNA koncentrációját.

***In vitro* alvadék lízis (CLA) mérések**

Az *in vitro* CLA vizsgálat során 96 lyukú mikrotiter lemezen a vizsgált plazma mintákból rekombináns szöveti faktorról és foszfolipiddel alvadékokat képeztünk, majd rt-PA hozzáadásával lízist indukáltunk, melyet valós időben turbidimetriás módszerrel monitoroztunk. Az általunk alkalmazott vizsgálati körülmények alapjául már megjelent publikációk metodikái szolgáltak (6, 39, 43, 44, 82). 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 100ng/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 µg/mL szabad tisztított DNS-t (borjú thymus DNS, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Németország) és 50 µg/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 µg/mL) és a különböző koncentrációjú cfDNA (50-250 µg/mL) együttes hatását vizsgálták a fibrinolízis kinetikájára, tisztított kísérleti körülmények között (27). A

plazmaminták megalvasztását mindkét kísérleti elrendezésben az automata által injektált 210 mM CaCl₂-ot tartalmazó (végkoncentráció: 21 mM) HEPES pufferrel iniciáltuk. A minták abszorbanciáját 340 nm hullámhosszon, 37⁰C-on detektáltuk TECAN Infinite m200 mikrolemez olvasó segítségével (TECAN Trading AG, Männedorf, Svájc). Az alvadék-lízis görbék analízisét a Shiny App ClotlysisCL online kiértékelő szoftver segítségével végeztük (48). 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 (10%CLT, 50%CLT és 90%CLT). Az analitikai pontosságot mindkét kísérleti elrendezés során meghatároztuk a Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI dokumentum, EPO05-A3) irányelvei alapján (83). A pontosság meghatározása egészséges önkéntesektől származó plazmamintákból 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 módosított CLA mérés során detektált reprezentatív turbidimetriás görbék és főbb paramétereik az 7. ábrán láthatóak.



7. ábra *In vitro* alvadék lízis módszer (CLA) és módosított *in vitro* alvadék lízis módszer, hozzáadott cfDNA és hiszton jelenlétével (módosított CLA). Az ábrán a CLA mérés alvadék

lízis görbéi (A) és a módosított CLA turbidimetriás görbéi (B) ill. a görbe főbb paraméterei 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.

Speciális hemosztázis vizsgálatok

A kvantitatív D-dimer szintek meghatározása immunturbidimetriás módszerrel (Innovance D-dimer) történt BCS koagulométeren a gyári protokoll leírását követve (Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország). Az α 2-PI aktivitás és a plazminogén aktivitás meghatározása kromogén tesztek segítségével, a Siemens cég kereskedelmi forgalomban kapható módszereinek gyári protokollját követve zajlott BCS koagulométeren. A plazmaminták fibrinogén szintjének meghatározása Clauss módszer szerint történt. A plazma XIII-as faktor aktivitás meghatározását ammónia felszabaduláson alapuló eljárással végeztük kereskedelmi forgalomban lévő reagens kit irányelveit követve (REA-chrom FXIII kit, Reanalker, Budapest, Magyarország).

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 tanulmány elemszámának meghatározását a Casagrande, Pike és Smith's módszer alapján végeztük. A mintaszám kalkulációk során korábbi közlemények eredményeit figyelembe véve legalább 10%-os valódi különbséget feltételeztünk a vizsgálni kívánt különböző kimenetelű alcsoportok között (84). Az α értékét (I. típusú hiba arány) 0.05-ben állapítottuk meg, 0.80 statisztikai erő mellett. A kimenetek feltételezett arányát és legfeljebb 10%-os lemorzsolódási arányt feltételezve a legkisebb szükséges csoportonkénti mintaszám 18 betegnek adódott. Az adatok normalitásának meghatározása Shapiro-Wilk teszttel történt. Folyamatos változók esetén két csoport közötti különbség elemzésére normalitástól függően Student-féle t-próbát, vagy Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk, páros adatok esetén párosított t-próbát vagy Wilcoxon párosított tesztet használtunk. Több csoport esetén folyamatos változók összehasonlítására ANOVA tesztet Bonferroni post hoc teszttel, vagy Kruskal-Wallis tesztet és a Dunn-féle post hoc tesztet használtunk. A folytonos változók közötti

korrelációk erősségének meghatározásához Pearson vagy Spearman féle korrelációs koefficiens alkalmaztunk. A kategorikus változók közötti különbségek vizsgálata χ^2 teszttel vagy Fisher-féle egzakt teszttel történt. A módszerek diagnosztikai hatékonyságának jellemzésére ROC (receiver operating characteristics) analízist végeztünk. A CLA paraméterek esetén a diagnosztikai határértékek meghatározása 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 χ^2 teszt vagy Fisher-féle egzakt tesztek alapján történt. Kaplan-Meier módszert alkalmaztunk a módosított CLA módszer paraméterei esetén megállapított diagnosztikai határértékeknek megfelelően a betegek túlélési görbéinek vizsgálatára.

Bináris logisztikus regressziót használtunk a funkcionális kimenetel, valamint a terápia asszociált intrakraniális vérzés független prediktorainak meghatározására. A regressziós modell azokat a változókat tartalmazta, melyek az egyváltozós statisztikai modellek esetén szignifikáns eltérést mutattak a különböző kimenetelű csoportok között, vagy irodalmi adatok alapján lényeges tényezőnek bizonyultak. Valamennyi változó esetén törekedtünk dichotomizált paraméterek szerepeltetésére a statisztikai modellben. A logisztikus regresszió eredményeit esélyhányadosként (OR) és a vonatkozó 95%-os konfidencia intervallum (95%CI) határértékeiként tüntettük fel. A $p < 0,05$ értékek esetén tekintettük az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Intravénás trombolízis előtt álló akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek *in vitro* alvadék lízis vizsgálatának eredményei

Vizsgálati populáció

A vizsgálatba 231 konsekutív AIS miatt intravénás trombolízisben részesülő beteg került beválogatásra. A betegek alapadatait és a stroke kimeneteleit a 2. táblázat tartalmazza. Az AIS betegek korának mediánja 67 (IQR: 50-76) év volt, 54,6%-uk férfi volt. A felvételtkor NIHSS mediánja 7 (IQR: 4-11) volt. A tünetek kialakulása és a kezelés megkezdése között idő mediánja 150 (IQR: 111-206) percnak adódott. A cerebrovaszkuláris rizikók közül az artériás hipertónia volt a legnagyobb arányban jelen. A betegek 44,1%-nál kedvező rövidtávú kimenetel volt megfigyelhető, 3 hónappal a kezelést követően pedig 45,5%-nak javult az állapota. A teljes betegpopuláció 7,8%-nál, vagyis 18 főnél volt megfigyelhető terápiával összefüggő intrakraniális vérzéses szövődmény, mely 6 esetben tünetképző, 12 esetben pedig nem tünetképző komplikáció volt.

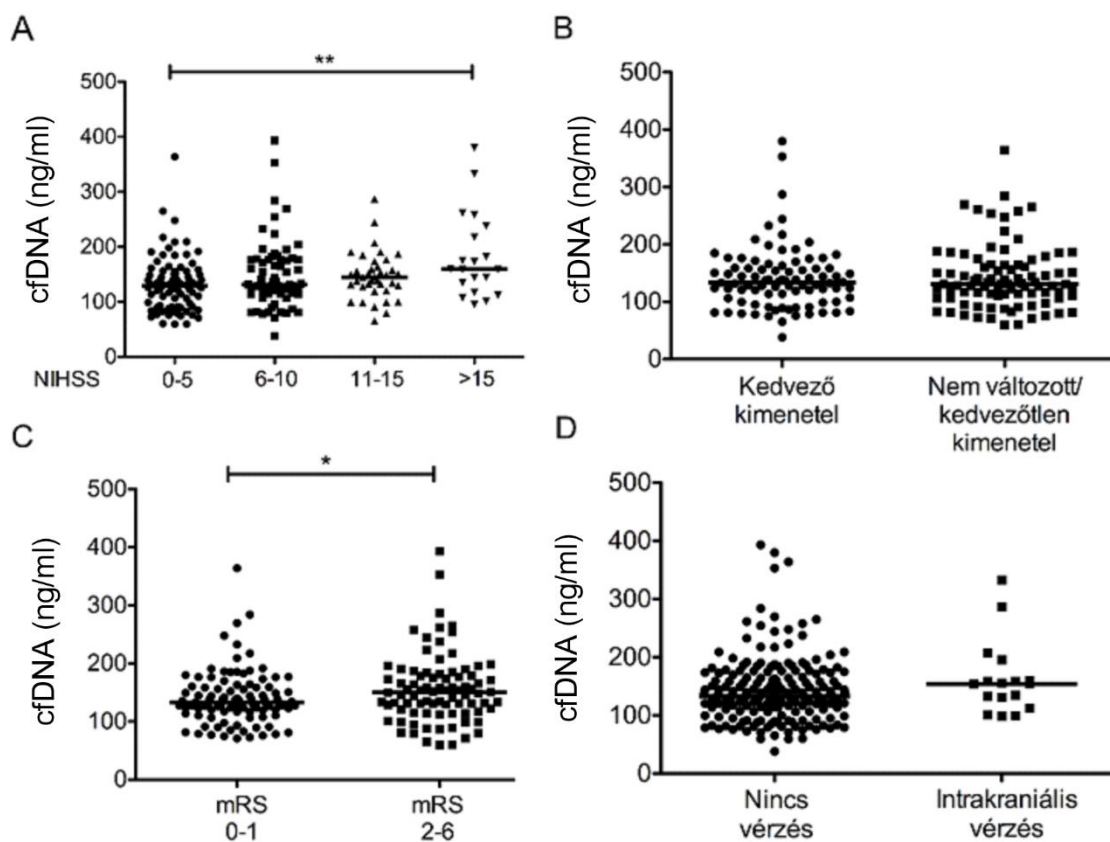
Betegszám, n	231
Kor, év	67 (50-76)
Férfi, n (%)	125 (54,6)
Stroke súlyossága felvételtkor, NIHSS	7 (4-11)
Cerebrovaszkuláris rizikó faktorok, n (%)	
Artériás hipertónia	188 (81,4)
Pitvarfibrilláció	43 (18,6)
Diabetes mellitus	61 (26,4)
Hyperlipidémia	150 (64,9)
Dohányzás	65 (28,1)
Korábbi stroke, TIA	56 (24,2)
BMI, kg/m ²	28,3 ±6,3
Gyógyszerek kórházi felvételtkor, n (%)	
Vérnyomáscsökkentő	118 (51,0)
Trombocitagátló	87 (37,7)
Antikoaguláns	15 (6,5)
Lipidcsökkentő	56 (24,2)
Antidiabetikum	36 (15,6)
Felvételtkori laboratóriumi paraméterek	
INR	0,99 (0,94-1,04)
APTI, sec	27,4 (25,6-29,9)
Fehérvérsejt szám, G/L	8,14 (6,4-10,3)
Trombocitaszám, G/L	227 (179-265)
Szérum glükóz, mmol/L	6,6 (5,8-8,2)
hsCRP, mg/L	2,9 (1,6-7,3)
Kreatinin, µmol/L	74 (63-90)

Fibrinogén, g/L	4,2 (3,5-4,8)
D-dimer, mg/L	0,79 (0,50-1,47)
Plazminogén aktivitás, %	97 (87-110)
α 2-plazmin inhibitor aktivitás %	103 (92-110)
Stroke etiológiája (TOAST), n (%)	
Nagyér atherosclerosis	90 (39,0)
Kisérbetegség	38 (16,5)
Kardioembólia	30 (13,0)
Egyéb/nem meghatározott	73 (31,5)
Képpalkotó eljárások adatai, n (%)	
ASPECTS felvételnél	
0-7	4 (2,2)
8-10	179 (97,8)
ASPECTS 24 órával a trombolízis követően	
0-7	30 (16,6)
8-10	151 (83,4)
Trombolízis kezelés (i.v. rt-PA)	
Trombolízis időtartama, perc	62 \pm 12
Tünetek kezdetétől a terápiáig eltelt idő, perc	150 (111-206)
rt-PA dózisa, mg	66,3 \pm 18,1
Kimenetelek, n (%)	
Rövidtávú kimenetel (Δ NIHSS 7. napon) *	
Kedvező (legalább -4 pont vagy NIHSS=0)	97 (41,9)
Nincs változás (\pm 3 pont)	78 (33,8)
Kedvezőtlen (legalább +4 pont vagy halál)	17 (7,4)
Nem meghatározott	21 (9,1)
Hosszútávú kimenetel (mRS, 90. napon) *	
Kedvező (mRS 0-1)	104 (45,0)
Kedvezőtlen (mRS 2-6)	89 (38,5)
Nem meghatározott	20 (8,7)
Intrakraniális vérzés, ICH (ECASS II, 24 óra)	
Nincs vérzés	213 (92,2)
aSICH	12 (5,2)
SICH	6 (2,6)

2. táblázat Akut iszkémiás stroke-ot elszenvedő betegek klinikai alapadatai, és a trombolízis kimenetele. Az adatok átlag \pm SD vagy medián (interkvartilis tartomány) értékeként vannak feltüntetve. aSICH, aszimptomatikus intrakraniális vérzés; APTI, aktivált parciális trombolízis idő; ASPECTS, Alberta Stroke Program Early CT Score; BMI, testtömeg index; ECASS II, European Co-operative Acute Stroke Study-II; hsCRP, nagy szenzitivitású C-reaktív protein vizsgálat; ICH, intrakraniális vérzés; INR, nemzetközi normalizált ráta; i.v., intravénás; mRS, módosított Rankin Skála; n, betegszám; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; rt-PA, rekombináns szöveti típusú plazminogén aktivátor; SICH, szimptomatikus intrakraniális vérzés; TIA, átmeneti agyi iszkémiás roham; TOAST, Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment, A felvételnél NIHSS nem volt elérhető két személy esetén. *kivéve terápia-asszociált vérzéses szövődményt elszenvedő betegek

Sejten kívüli szabad DNS (cfDNA) szintek, az AIS súlyossága és kimenetelei

Megvizsgáltuk a betegek lízis előtti cfDNA szintje és az AIS súlyossága és kimenetelei közötti összefüggéseket. A felvételtkor cfDNA szintek és a stroke súlyossága között lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető (8.A ábra). Azok a betegek, akik a felvételtkor súlyosabb stroke-ot szenvedtek, szignifikánsan magasabb cfDNA szintekkel rendelkeztek a kórházba kerüléskor enyhébb stroke-ot elszenvedett (NIHSS: 0-5) betegekhez képest. A stroke etiológiája és a felvételtkor cfDNA szintek között vizsgálataink során nem találtunk összefüggést. A cfDNA szintek szintén nem mutattak kapcsolatot a stroke kedvező vagy kedvezőtlen rövidtávú kimenetelével (8.B ábra). Ugyanakkor azok a betegek, akiknél kedvező hosszútávú kimenetel (mRS 0-1) volt megfigyelhető, szignifikánsan alacsonyabb cfDNA szintekkel rendelkeztek a 90 nappal az eseményt követően kedvezőtlen kimenetelű betegekhez képest (8.C ábra). A terápiával összefüggő intrakraniális vérzéses szövődményt elszenvedő betegek felvételtkor cfDNA szintjei nem tértek el szignifikánsan azon betegek eredményeitől, akiknél nem alakult ki ez a komplikáció (8.D ábra).



8. ábra Az akut iszkémiás stroke (AIS) súlyossága, kimenetelei és a felvételtől szabad DNS (cfDNA) szintjei közötti összefüggések. A stroke felvételtől súlyossága (A), rövidtávú funkcionális kimenetele (B), hosszútávú funkcionális kimenetele (C), az intrakraniális vérzéses komplikációk (D) és a felvételtől cfDNA szintek közötti összefüggések vizsgálata.

NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; cfDNA, szabad DNS

A CLA paraméterek összefüggése a cfDNA szintekkel, az AIS súlyosságával és kimeneteleivel

A vizsgált betegcsoportban az 50%CLT paraméter és a stroke felvételtől súlyossága között lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető (9.A ábra). Azok a betegek, akik felvételtől súlyosabb stroke-ban szenvedtek szignifikánsan alacsonyabb 50%CLT értékekkel rendelkeztek az enyhébb stroke-ot szenvedett betegekhez képest. Hasonló, szignifikáns kapcsolat volt megfigyelhető a 10%CLT és a CLA AUC paraméterek esetén (3. táblázat). Annak ellenére, hogy az 50%CLT és a cfDNA szintek is lépcsőzetes, azonban fordított összefüggést mutattak a stroke felvételtől súlyosságával, meglepő módon az 50%CLT és a cfDNA szintek nem mutattak szignifikáns korrelációt egymással (Spearman $r = 0,072$, 95%CI: -0,069-0,209, $p = 0,301$).

	NIHSS 0-5 (n=93)	NIHSS 6-10 (n=72)	NIHSS 11-15 (n=42)	NIHSS >15 (n=22)	p
CLA					
maximális abszorbancia (OD)	1,37 (1,26-1,51)	1,43 (1,32-1,53)	1,38 (1,23-1,53)	1,36 (1,17-1,52)	0,282
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	12 (8,5-17,0)	10,0 (9,0-15,0)	10,0 (8,0-16,0)	11,0 (6,5-14,0)	0,783
10%CLT (perc)	32,0 (23,5-43,5)	32,0 (19,0-42,5)	29,5 (19,0-40,0)	25,0 (19,0-32,0)	0,038
50%CLT (perc)	46,5 (36,0-59,0)	41,0 (26,0-62,0)	37,0 (23,5-51,0)	31,5 (23,5-38,0)	0,006 *0,009
90%CLT (perc)	81,0 (62,0-111,5)	78,5 (59,0-109,0)	70,0 (51,5-92,0)	72,0 (55,0-94,0)	0,224
CLA AUC (OD*perc)	27,41 (22,63-33,04)	27,68 (22,60-33,40)	24,70 (20,32-29,34)	24,25 (20,43-27,73)	0,024
Módosított CLA (cfDNA és hiszton jelenlétében)					
maximális abszorbancia (OD)	1,41 (1,32-1,51)	1,47 (1,35-1,57)	1,41 (1,29-1,56)	1,40 (1,19-1,55)	0,262

max. abszorbanca eléréséhez szükséges idő (perc)	11,0 (9,0-18,0)	10,0 (7,5-19,0)	11,0 (9,0-18,0)	12,0 (7,5-16,5)	0,956
10%CLT (perc)	35,0 (25,5-50,5)	38,0 (23,5-52,5)	30,5 (20,0-40,5)	27,5 (20,5-37,5)	0,042
50%CLT (perc)	49,0 (36,0-64,0)	45,5 (30,0-67,0)	40,0 (26,0-54,0)	36,0 (30,0-45,0)	0,018
90%CLT (perc)	85,0 (66,5-108,0)	84,5 (64,0-117,0)	75,5 (54,0-88,0)	81,5 (63,5-97,0)	0,167
CLA AUC (OD*perc)	28,18 (22,83-34,74)	29,91 (24,70-36,88)	26,58 (21,95-30,97)	25,84 (21,74-29,71)	0,023
Specifikus hemosztázis/fibrinolízis fehérjék					
fibrinogén (g/L)	4,0 (3,3-4,7)	4,3 (3,7-4,9)	4,2 (3,6-4,7)	4,1 (3,5-4,6)	0,101
D-dimer (mg/L)	0,7 (0,5-1,3)	0,8 (0,5-1,5)	0,9 (0,5-1,6)	1,3 (0,6-2,2)	0,158
plazminogén aktivitás (%)	101,0 (90,0-113,0)	98,0 (89,0-110,0)	92,0 (84,0-107,0)	87,0 (81,0-96,0)	0,011 *0,017
α 2-PI aktivitás (%)	103,0 (92,0-112,0)	104,0 (92,0-110,0)	103,0 (93,0-109,0)	98,0 (85,0-106,0)	0,254

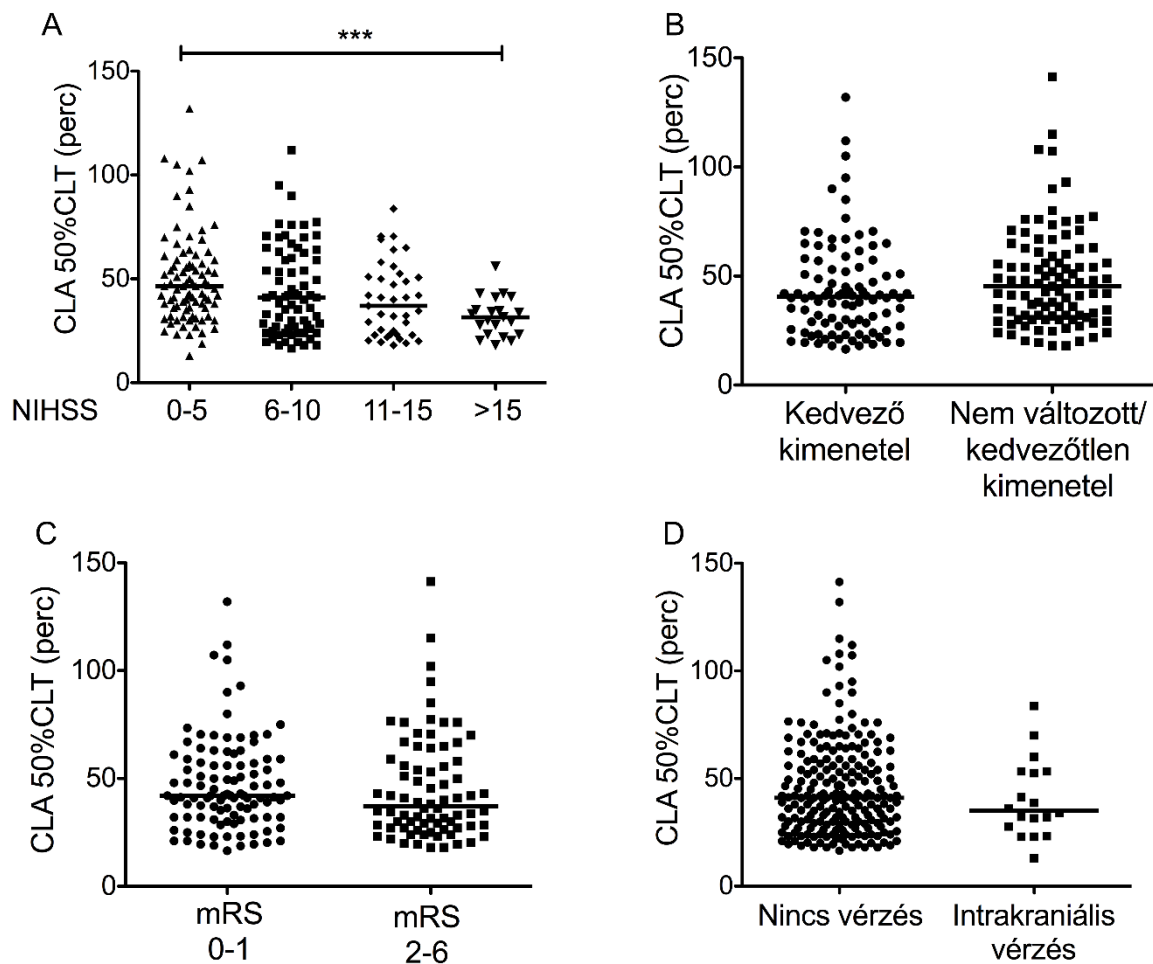
3. táblázat A stroke felvételtől súlyossága és a CLA paraméterek, valamint a specifikus fibrinolízis fehérjék közötti összefüggés. Az adatok átlag \pm SD vagy medián (interkvartilis tartomány) értékeként vannak feltüntetve. α 2-PI, α 2- plazmin inhibitor; 10%CLT, 10% alvadék lízis idő; 50%CLT, 50% alvadék lízis idő; 90%CLT, 90% alvadék lízis idő; CLA, alvadék lízis teszt; CLA AUC, alvadék lízis teszt görbe alatti területe; cfDNA, szabad DNS

***NIHSS 0-5 vs. NIHSS >15**

A vizsgálatunk során a CLA paraméterek nem mutattak összefüggést a stroke rövid-illetve hosszútávú kimeneteleivel (9. B, C ábra). Szintén nem találtunk kapcsolatot az 50%CLT és a vérzéses komplikációk kialakulása között a vizsgált betegpopulációban (9.D ábra), azonban a CLA AUC paraméter szignifikánsan alacsonyabb volt a lízist követően agyvérzett betegek körében (4. táblázat). A TOAST kritériumok alapján meghatározott stroke etiológiája és az ASPECTS értékek nem mutattak összefüggést a CLA eredményekkel (az adatokat nem tüntettük fel táblázatban).

	Nincs vérzés (n=213)	Intrakraniális vérzés (n=18)	p
CLA			
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)	0,028
Módosított CLA (cfDNA és hiszton jelenlétében)			
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)	0,034
90%CLT (perc)	84,0 (65,0-108,0)	81,8 (53,0-108,0)	0,512
CLA AUC (OD*perc)	28,3 (23,2-34,3)	24,1 (20,2-31,7)	0,005
Specifikus hemosztázis/fibrinolízis fehérjék			
fibrinogén (g/L)	4,1 (3,5-4,7)	4,5 (3,8-5,1)	0,167
D-dimer (mg/L)	0,8 (0,5-1,4)	1,5 (0,6-2,4)	0,029
plazminogén aktivitás (%)	97,0 (88,0-110,0)	89,0 (81,0-99,0)	0,023
α2-PI aktivitás (%)	102,0 (92,0-110,0)	105,0 (96,0-108,0)	0,979

4. táblázat A terápia asszociált intrakraniális vérzéses szövődmények, az alvadék lízis teszt paraméterek, és specifikus fibrinolízis fehérjék közötti összefüggések vizsgálata. 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; CLA, alvadék lízis teszt; CLA AUC, alvadék lízis teszt görbe alatti területe; cfDNA, szabad DNS



9. ábra. Alvadék lízis vizsgálat és az akut iszkémiás stroke (AIS) súlyossága, kimenetelei közötti összefüggések vizsgálata. A stroke felvételtkorai súlyossága (A), rövidtávú funkcionális kimenetele (B), hosszútávú funkcionális kimenetele (C), az intrakraniális vérzéses komplikációk (D) és a felvételtkorai 50%CLT közötti összefüggések vizsgálata.

50%CLT, 50% alvadék lízis idő; CLA, alvadék lízis vizsgálat; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modifikált Rankin Skála

A módosított alvadék lízis módszer (módosított CLA) paraméterei, az AIS súlyossága és kimenetelei közötti összefüggések

Az AIS kialakulása során az intracerebrális trombusban jelen lévő állapotok jobb imitálása érdekében, módosítottuk a CLA eljárást, úgy, hogy cfDNA-t és hisztont adtunk a mintaoldalunkhoz (módosított CLA). A vizsgálatban felhasznált cfDNA és hiszton koncentrációját korábbi irodalmi metodikai adatok szerint ill. a trombusban feltételezett

koncentrációjuk alapján választottuk ki. 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 (5. táblázat). A cfDNA és hiszton jelenlétében elvégzett módosított CLA vizsgálatok során kapott 50%CLT értékek mediánja 4 perccel hosszabbnak bizonyult a teljes kohorszban a hagyományos CLA mérések eredményeihez képest.

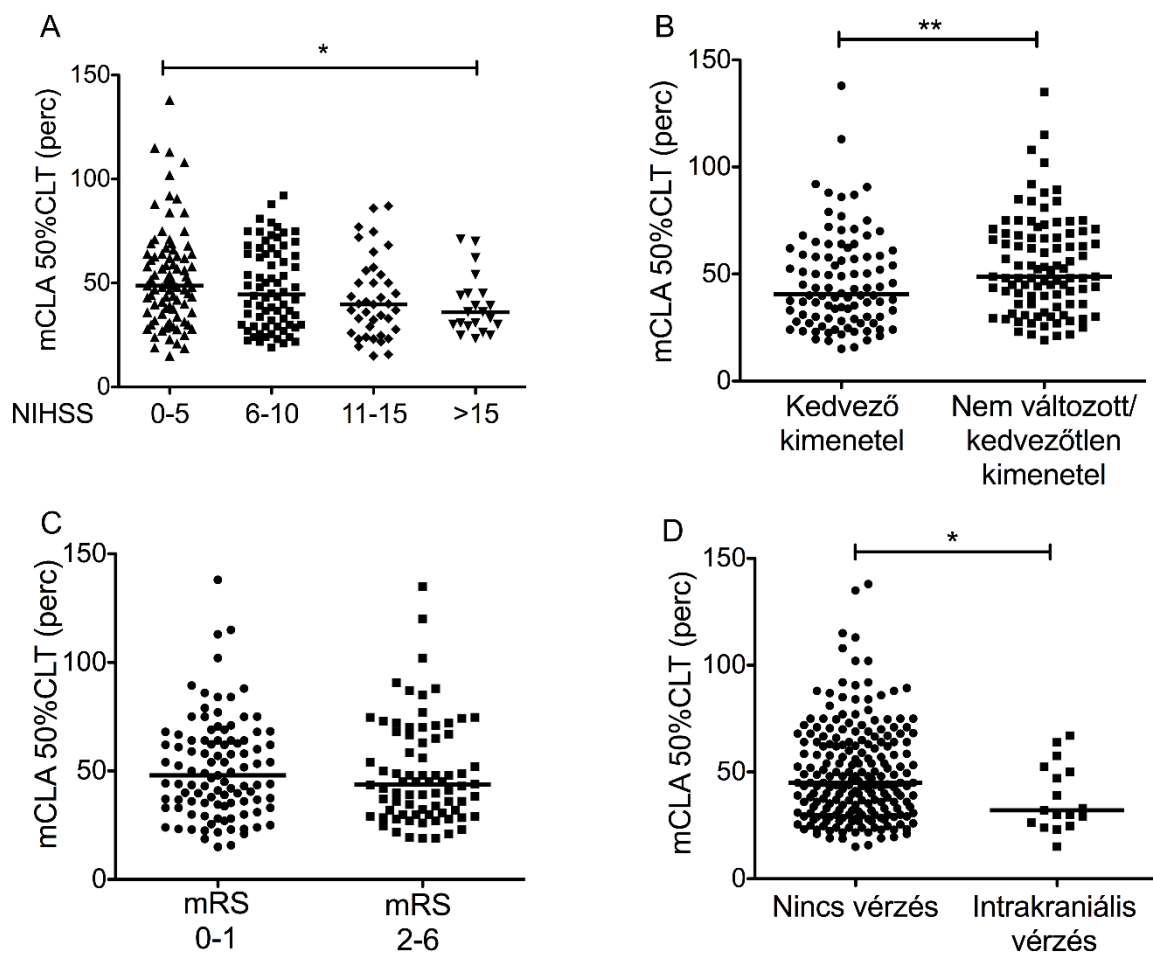
	CLA	Módosított CLA (cfDNA és hiszton jelenlétében)	P
maximális abszorbancia (OD)	1,39 ±0,20	1,42 ±0,19	<0,001
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	11,0 (8,3-15,0)	11,3 (9,0-18,0)	0,002
10%CLT (perc)	30,0 (19,5-40,5)	32,3 (22,0-49,0)	<0,001
50%CLT (perc)	41,0 (29,0-57,0)	45,0 (30,0-64,0)	<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

5. táblázat Felvételtkor alvadék lízis teszt paraméterek, szabad DNS (cfDNA) és hiszton jelenlétében (módosított CLA) és anélkül (CLA). Az adatok átlag±SD vagy medián (interkvartilis tartomány) értékeként vannak feltüntetve. cfDNA, szabad DNS; CLA, alvadék lízis teszt, 10%CLT, 10% alvadék lízis idő; 50%CLT, 50% alvadék lízis idő; 90%CLT, 90% alvadék lízis idő; CLA AUC, alvadék lízis teszt görbe alatti területe

A hagyományos CLA mérések során tapasztaltakhoz hasonlóan, a módosított CLA vizsgálatok eredményeként kapott 50%CLT paraméter és a stroke felvételtkori súlyossága között lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető (10.A ábra), továbbá szignifikáns összefüggés volt megfigyelhető 10%CLT és a CLA AUC paraméterek esetében is a módosított CLA mérések során (3. táblázat). A hagyományos CLA méréshez hasonlóan, a módosított CLA mérések esetében is a súlyosabb stroke-ban szenvedő betegeknél lényegesen rövidebb alvadék lízis volt megfigyelhető. A némileg váratlan eredmény magyarázata érdekében valamennyi mintából meghatároztuk a konzumpcióra vagy fokozott fibrinolízisre utaló specifikus hemosztázis fehérjék, markerek szintjét (3. táblázat). Míg a fibrinogén szintek nem utaltak a stroke súlyosságával összefüggésben konzumpcióra, érdekes módon a plazminogén aktivitás szignifikáns lépcsőzetes csökkenést mutatott súlyosabb stroke esetén. Ez a megállapítás azonban nem magyarázza meg a rövidebb alvadék lízist súlyosabb stroke esetén. Bár nem érte el a szignifikancia szintjét, a legsúlyosabb stroke-ok (NIHSS>15) esetén az α 2-PI aktivitás

csökkenése volt megfigyelhető, mely elméletileg befolyásolhatta az alvadék-lízis eredményeket.

Összehasonlítva azokkal, akiknél sikertelen volt a trombolízis, a kedvező rövidtávú kimenetellel rendelkező betegek szignifikánsan rövidebb 50%CLT értékeket mutattak a módosított CLA mérések során (10.B ábra). Ez a különbség nem volt szignifikáns abban az esetben, ha a mérés nem tartalmazott hozzáadott cfDNA-t és hisztont (9.B ábra). A stroke hosszútávú funkcionális kimenetele és a módosított CLA eredmények között nem találtunk szignifikáns kapcsolatot (9.C ábra).



10. ábra Az akut iszkémiás stroke (AIS) kimenetelei és a módosított alvadék lízis teszt (mCLA) közötti összefüggés. A stroke felvételtkor súlyossága (A), rövidtávú funkcionális kimenetele (B), hosszútávú funkcionális kimenetele (C) valamint az intrakraniális vérzéses komplikációk (D) és az 50% CLT közötti összefüggések a módosított CLA vizsgálat során.

50%CLT, 50% alvadék lízis idő; mCLA, módosított alvadék lízis teszt; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; mRS, modifikált Rankin Skála

A terápiával összefüggő intrakraniális vérzéses szövődmény előfordulása szignifikáns összefüggést mutatott a CLA paraméterekkel, ha a mérés tartalmazott cfDNA-t és hiszton (10.D ábra, 4. táblázat). Azok a betegek, akik a lízist követően intrakraniális vérzést szenvedtek, szignifikánsan rövidebb 50%CLT értékekkel rendelkeztek a módosított CLA vizsgálat során, azon betegekhez képest, akiknél nem alakult ki vérzéses komplikáció. A módosított CLA vizsgálat egyes paraméterei között azonban nem volt különbség a szimptomatikus ill. az aszimptomatikus vérzéses komplikációk esetén.

A módosított CLA módszer diagnosztikai hatékonysága a terápia-asszociált vérzés ill. a rövidtávú kimenetel vonatkozásában AIS betegeknél

A módosított CLA módszer diagnosztikai hatékonyságát összevetettük a hagyományos CLA módszer diagnosztikai hatékonyságával, a terápia-asszociált vérzés ill. a rövidtávú kimenetel vonatkozásában. A ROC analízis eredménye azt mutatta, hogy a cfDNA és hiszton hozzáadása a mintaoldathoz jelentősen javította a CLA diagnosztikai teljesítményét mindkét kimenetelre vonatkoztatva. A diagnosztikai teljesítmény javulása 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 a CLA AUC mutatta a legjobb diagnosztikai teljesítményt a lízist követő ICH megjósolására a módosított 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 a módosított CLA módszer AUC paramétere kiemelkedően magas negatív prediktív értéket mutatott a trombolízis után kialakuló ICH előrejelzésére (97,9%; 95%CI: 92,7-99,8%) (6. táblázat). A rövidtávú kimenetel előrejelzését illetően, a cfDNA és hiszton hozzáadása szignifikánsan javította ugyan a diagnosztikai hatékonyságot, de a vizsgálat teljesítménye szerény maradt (50%CLT paraméter cfDNA és hiszton nélkül, ROC AUC: 0,57; 95%CI: 0,49-0,65; $p=0,082$; 50%CLT paraméter cfDNA és hiszton hozzáadásával ROC AUC: 0,61; 95%CI: 0,53-0,69; $p=0,008$).

Kimenetel	Paraméter, egység	Küszöb-érték	Specificitás % (95%CI)	Szenzitivitás % (95%CI)	NPV, % (95%CI)	PPV, % (95%CI)	LR (95%CI)	P
CLA								
Kedvezőtlen rövidtávú kimenet/ nincs változás	50%CLT, perc	45,0	66,7 (56,3-76,0)	49,5 (39,1-59,9)	57,1 (47,5-66,5)	59,5 (47,9-70,4)	1,96 (1,09-3,51)	0,024
	CLA AUC, OD*perc	27,7	62,5 (52,0-72,2)	52,6 (42,1-63,0)	57,1 (47,1-66,7)	58,1 (47,0-68,7)	1,85 (1,04-3,30)	0,036
Vérzéses szövődmény	50%CLT, perc	39,0	56,8 (49,9-63,6)	61,1 (35,8-82,7)	94,5 (89,1-97,8)	10,7 (5,5-18,3)	2,07 (0,77-5,54)	0,142
	CLA AUC, OD*perc	28,3	41,8 (35,1-48,7)	88,9 (65,3-98,6)	97,8 (92,3-99,7)	11,4 (6,7-17,9)	5,74 (1,29-25,6)	0,011
Módosított CLA (cfDNA és hiszton jelenlétében)								
Kedvezőtlen rövidtávú kimenet/ nincs változás	50%CLT, perc	44,0	55,2 (44,7-65,4)	64,2 (53,7-73,8)	60,9 (49,9-71,2)	58,7 (48,6-68,2)	2,21 (1,34-3,95)	0,007
	CLA AUC, OD*perc	25,4	44,8 (34,6-55,3)	73,7 (63,7-82,2)	63,2 (50,7-74,6)	56,9 (47,7-65,8)	2,27 (1,24-4,18)	0,007
Vérzéses szövődmény	50%CLT, perc	39,0	62,0 (55,1-68,5)	66,7 (41,0-86,7)	95,7 (90,8-98,4)	12,9 (6,8-21,5)	3,26 (1,18-9,02)	0,017
	CLA AUC, OD*perc	29,9	44,1 (37,4-51,1)	88,9 (65,3-98,6)	97,9 (92,7-99,8)	11,9 (7,0-18,5)	6,32 (1,42-28,17)	0,006

6. táblázat A releváns alvadék lízis teszt paraméterek diagnosztikai teljesítménye szabad DNS (cfDNA) és hiszton jelenlétében (módosított CLA) vagy nélküle (CLA), és összefüggésük a trombolitikus terápia biztonságosságával és rövidtávú kimenetelével. A diagnosztikai teljesítményt a Youden index szerinti optimális küszöbértéket alapul véve határoztuk meg. 95%CI, 95% konfidencia intervallum; cfDNA, szabad DNS; CLA, alvadék lízis teszt; CLA AUC, alvadék lízis teszt görbe alatti területe; 50%CLT, 50% alvadék lízis idő; LR, valószínűségi hányados (likelihood ratio); NPV, negatív prediktív érték; PPV, pozitív prediktív érték, (ROC analízis, χ^2 teszt vagy Fisher-féle egzakt teszt)

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a CLA paraméterek független prediktorai-e a trombolízis kimenetelének. A backward bináris logisztikus regressziós modell, - mely tartalmazta az életkort, a nemet, emelkedett felvételtkor NIHSS értékeket, specifikus hemosztázis/fibrinolízis fehérjéket: fibrinogén, D-dimer, plazminogén aktivitás, α 2-PI aktivitás szinteket, az 50%CLT és CLA AUC paramétereket mindkét módszer esetében, feltárta, hogy a módosított CLA módszer során megfigyelt megnyúlt 50%CLT paraméter (> 44 perc) szerény, de független prediktora a rekanalizáció sikertelenségének (az NIHSS 7. napi változása alapján értékelve) (7. táblázat). Másfelől egy másik regressziós modellben, a módosított CLA mérés során kapott alacsony mCLA AUC (<29,9 OD*perc) paraméter a terápia asszociált vérzéses szövődmények szignifikáns, független prediktorának bizonyult (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 az ICH független előrejelzője (OR: 5,32; 95%CI: 1,69-16,75; p=0,004).

	OR	95%CI	p
Kedvezőtlen rövidtávú kimenetel*			
mCLA 50%CLT (cfDNA és hiszton jelenlétében) (>44,0 perc)	2,19	1,17-4,11	0,015
Terápiával összefüggő ICH jelenléte†			
NIHSS>15	5,32	1,69-16,75	0,004
Fibrinogén	1,52	1,00-2,284	0,050
mCLA AUC (cfDNA és hiszton jelenlétében) (<29,9 OD*perc)	5,85	1,24-27,70	0,026

7. táblázat A kedvezőtlen rövidtávú kimenetel és a terápiával összefüggő intrakraniális vérzés független prediktorai az akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegpopulációban.

A backward többszörös logisztikus regressziós analízis utolsó lépése alapján.

**A kedvezőtlen rövidtávú kimenetelt az NIHSS minimum 4 pontos változása alapján határoztuk meg az eseményt követő 7. napon. Az intrakraniális vérzést szenvedő betegeket az eltérő patológia miatt nem vettük figyelembe az analízis során. A backward többszörös regressziós modell a következőket tartalmazta: kor, nem, NIHSS felvételtkor, BMI, fibrinogén, D-dimer, plazminogén aktivitás, α 2-plazmin inhibitor aktivitás, 50%CLT (küszöbérték: >45 perc) 50%CLT cfDNA és hiszton jelenlétében (küszöbérték: >44 perc), CLA AUC (küszöbérték: >27,7 OD*perc), mCLA AUC cfDNA és hiszton jelenlétében (küszöbérték >25,4 OD*perc),*

*†A backward többszörös regressziós modell a következőket tartalmazta: kor, nem, NIHSS felvételtkor, BMI, artériás magasvérnyomás, hyperlipidémia, fibrinogén, D-dimer, plazminogén aktivitás, α 2-plazmin inhibitor aktivitás, 50%CLT (küszöbérték: <39 perc), 50%CLT cfDNA és hiszton jelenlétében (küszöbérték: <39 perc), CLA AUC (küszöbérték: <28,3 OD*perc), mCLA AUC cfDNA és hiszton jelenlétében (küszöbérték: <29,9 OD*perc),*

cfDNA, szabad DNS; CLA AUC, alvadék lízis teszt görbe alatti területe; 95%CI, 95% konfidencia intervallum; 50%CLT, 50% alvadék lízis idő; ICH, intrakraniális vérzés; mCLA AUC, módosított alvadék lízis teszt görbe alatti területe; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; OR, esély hányados

Nem traumás vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek *in vitro* alvadék lízis vizsgálatának eredményei

Vizsgálati populáció

Az IRONHEART tanulmányban 89 konsekutív, 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-CoV2 fertőzés jelenlétét igazolták nála. Egy másik betegnél 25 nappal az eseményt követően alakult ki koronavírus fertőzés, ezért a hosszútávú követési periódusból származó adatok feldolgozása során ezen beteg eredményét nem vettük figyelembe. A betegek alapadatait, képalkotó eljárások eredményeit és a stroke kimeneteleit a 8. táblázat tartalmazza. Az ICH betegek átlag életkora $68 (\pm 11,6)$ év volt, a betegek 64%-a férfi volt. A felvételtől NIHSS mediánja 14 (IQR: 8-20), a medián ICH score 1 (IQR: 1-3) volt. A cerebrovaszkuláris rizikó tényezők közül az artériás magasvérnyomás volt a legnagyobb arányban jelen (96,6%). A koagulációs szűrőtesztek és a fibrinogén szintek eredményei nem utaltak hemorrhágiás diathesisre egyetlen betegnél sem. A felvételtől becsült vérzésvolumen érték mediánja $20,0 \text{ cm}^3$ -nek (IQR: 3,7-48,0 cm^3) adódott, és 46 betegnél (51,7%) alakult ki intraventriculáris hemorrhágia. A betegpopuláció mortalitása az első 14 napban 29,0% volt, mely 43,8%-ra nőtt 90 nappal az eseményt követően.

Betegszám, n	89
Kor, év	$68 \pm 11,6$
Férfi, n (%)	57 (64,0)
Stroke súlyossága felvételtől, NIHSS,	14 (8-20)
Stroke súlyossága távozáskor, NIHSS,	19 (8-43)
ICH score,	1 (1-3)
Glasgow coma skála	13 (9-14)
Cerebrovaszkuláris rizikó faktorok, n (%)	
Artériás hypertonia	86 (96,6)
Pitvarfibrilláció	11 (12,4)
Diabetes mellitus	39 (43,8)
Hyperlipidémia	48 (53,9)
Dohányzás	15 (16,9)
BMI, kg/m^2	$27,0 (24,1-31,9)$
Felvételtől laboratóriumi paraméterek	
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, $\mu\text{mol/L}$	69,0 (61,0-84,5)
Fibrinogén aktivitás, g/L	3,8 (3,1-4,4)
Plazminogén aktivitás %	110 (100-122)
$\alpha 2$ -plazmin inhibitor aktivitás %	107 (98-113)
FXIII aktivitás %	166 (139-176)
Képző eljárások adatai, n (%)	
Hydrocephalus jelenléte felvételtől	
Nincs	59 (66,3)
Hydrocephalus externa	2 (2,2)
Hydrocephalus interna	21 (23,6)
Mindkettő	7 (7,9)
ICH fókuszok lokalizációja felvételtől	
Bal fókusz	44 (49,4)
Jobb fókusz	41 (46,1)
Bilaterális	4 (4,5)
Intraventriculáris vérzés jelenléte felvételtől	
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^3	
Felvételtől	20,0 (3,7-48,0)
14. napon	10,0 (2,8-27,0)
90. napon	0 (0,0-2,4)
Kimenetek, n (%)	
Halál a 14. napig	26 (29,0)
Hosszútávú 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)

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

Az adatok átlag \pm SD vagy medián (interkvartilis tartomány) értékeként vannak feltüntetve. APTI, aktivált parciális tromboplasztin idő; BMI, testtömeg index; FXIII, XIII-as faktor; hsCRP, nagy szenzitivitású C-reaktív protein vizsgálat; ICH, intrakraniális vérzés, INR, nemzetközi normalizált ráta; IQR, interkvartilis tartomány; i.v.; intravénás; mRS, modifikált Rankin Skála; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale

***In vitro* CLA és módosított CLA vizsgálat ICH betegekben**

A vártak megfelelően az alvadék lízis paraméterek (maximális abszorbancia, 10%CLT, 50%CLT, CLA AUC) szignifikáns megnyúlása volt megfigyelhető, ha a CLA rendszerhez cfDNA-t és hisztont adtunk (9.táblázat).

	CLA	Módosított CLA (cfDNA és hisztin jelenlétében)	p
maximális abszorbancia (OD)	1,41 (1,30-1,59)	1,42 (1,32-1,60)	0,001
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	10,5 (9,0-14,0)	11,5 (8,0-15,0)	0,906
10%CLT (perc)	23,5 (15,5-33,0)	25,5 (18,5-35,0)	0,023
50%CLT (perc)	34,5 (24,5-44,0)	35,5 (28,0-49,5)	0,012
90%CLT (perc)	76,0 (66,0-87,0)	75,0 (68,0-87,0)	0,254
CLA AUC (OD*perc)	24,2 (18,4-28,3)	25,2 (19,6-30,0)	0,004

9. táblázat Alvadék lízis teszt paraméterek cfDNA és hisztin jelenlétében (módosított CLA) és nélküle (CLA) a nem traumás intracerebrális vérzést elszenvedett betegek populációjában.

Az adatok 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 idő teszt; CLA AUC, alvadék lízis idő teszt görbe alatti területe

Ezt követően összehasonlítottuk az ICH betegek CLA ill. módosított CLA paramétereit egészséges önkéntesek plazmamintáiból meghatározott lízis idő paraméterekkel (10. táblázat). A vártak megfelelően az ICH betegek szignifikánsan rövidebb lízis idővel rendelkeztek az önkéntesek alvadék lízis idejéhez viszonyítva. A vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek esetén azt tapasztaltuk, hogy az alvadékképződés szignifikánsan gyorsabb volt az *in vitro* kísérletek során, valamint a kialakult alvadék rt-PA indukálta lízise is gyorsabban végbement az egészséges egyének alvadékainak líziséhez képest.

	Egészséges önkéntesek	ICH betegek	p
Betegszám, n	29	89	
Kor, év,	44 ±11,7	68 ±11,6	<0,001
Férfi, n (%)	8 (27,6)	57 (64,0)	0,017
CLA			
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
Módosított CLA (cfDNA és hiszton jelenlétében)			
maximális abszorbancia (OD)	1,32±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

10. táblázat Az egészséges önkéntesek és a nem traumás intracerebrális vérzéses stroke-ot (ICH) elszenvedő betegek alapadatainak, és alvadék lízis (CLA, mCLA) paramétereinek összehasonlítása. Az adatok átlag±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

Következő lépésként megvizsgáltuk a betegek hagyományos CLA paramétereit és a kialakult stroke súlyossága és az előzőekben meghatározott kimenetelek közötti összefüggéseket (11., 12., 13. táblázatok). A stroke súlyossága és a konvencionális CLA paraméterek között nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált betegpopulációban (11. táblázat).

	NIHSS 0-10	NIHSS >10	P
maximális abszorbanca (OD)	1,51±0,28	1,42 ±0,21	0,081
max, abszorbanca eléréséhez szükséges idő (perc)	12,0 (9,0-16,5)	10,0 (8,0-13,5)	0,101
10%CLT (perc)	27,0 (18,0-35,5)	22,0 (15,5-33,0)	0,169
50%CLT (perc)	39,0 (26,0-45,5)	31,5 (24,5-45,0)	0,430
90%CLT (perc)	77,0 (57,5-87,0)	76,0 (69,0-87,0)	0,759
CLA AUC (OD*perc)	24,4 (20,5-31,7)	24,0 (18,2-28,1)	0,284

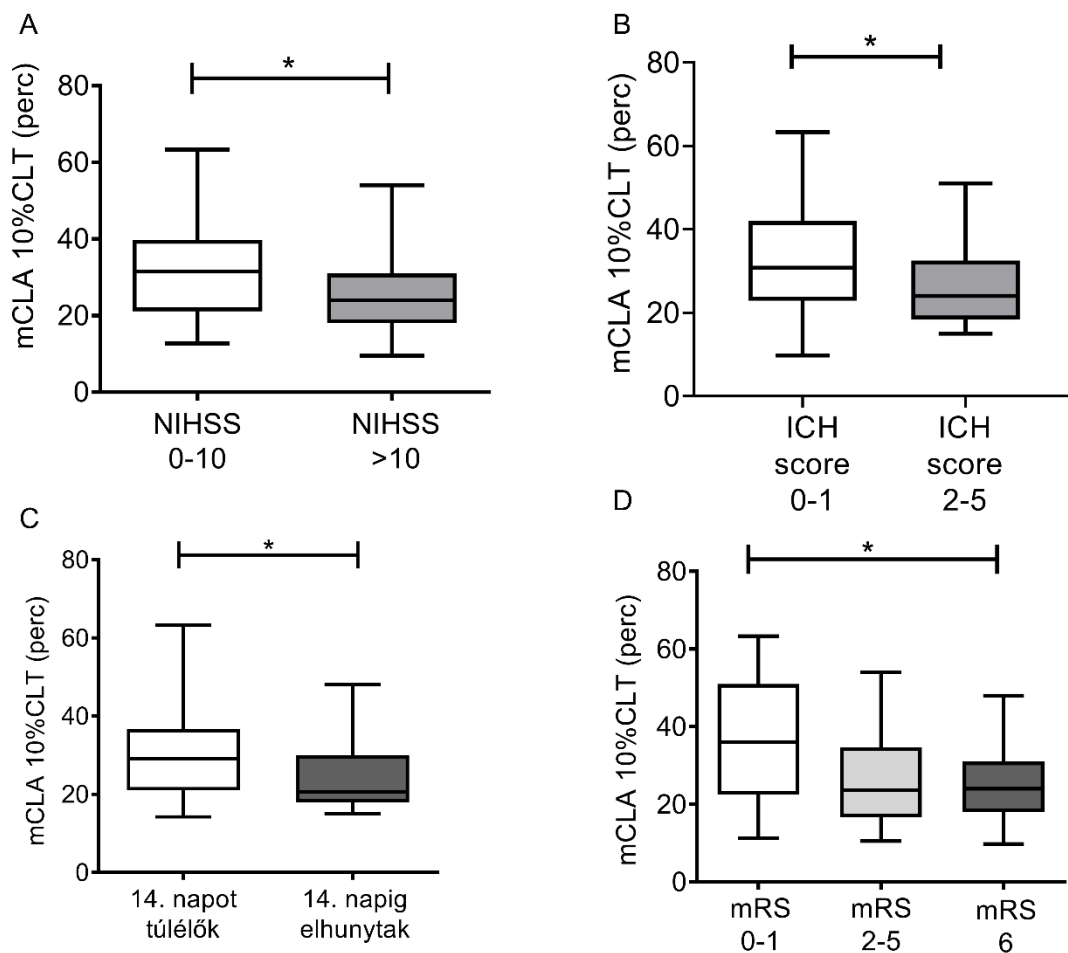
11. táblázat A stroke súlyossága és az alvadék lízis paraméterek közötti összefüggések.

Az adatok átlag ±SD és medián (interkvartilis tartomány) értékeként vannak feltüntetve. 10%CLT, 10% alvadék lízis idő; 50%CLT, 50% alvadék lízis idő; 90%CLT, 90% alvadék lízis idő; CLA, alvadék lízis idő teszt; CLA AUC, alvadék lízis idő teszt görbe alatti területe; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale

Megvizsgálva a hagyományos CLA paraméterek és a stroke 14 napos mortalitása (12. táblázat) ill. a hosszútávú funkcionális kimenetele közötti kapcsolatot (13. táblázat), nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző kimeneti csoportok között.

Módosított CLA paraméterek összefüggése az ICH kimeneteleivel

A hagyományos CLA vizsgálattal szemben a módosított CLA során szignifikánsan rövidebb 10%CLT értékeket detektáltunk a súlyosabb stroke-ot (NIHSS>10) elszenvedő betegek esetén, az enyhébb stroke-kal (NIHSS 0-10) beérkező betegekhez képest (11.A ábra).



11. ábra A módosított alvadék lízis vizsgálat (mCLA) és a nem traumás intracerebrális stroke (ICH) súlyossága és kimenetelei közötti összefüggés. Az módosított CLA mérés során a 10%CLT értékek alakulása az ICH felvételtkori súlyosságára (A), a betegek ICH score értéke (B), a rövidtávú halálozási adatok (C) és a hosszútávú funkcionális kimenetel (D) szerint. 10%CLT, 10% alvadék lízis idő; ICH, intracerebrális vérzés; mCLA, módosított alvadék lízis teszt; mRS, modifikált Rankin Skála; * $p < 0,05$

Hasonlóan, szignifikánsan rövidebb alvadék lízis volt megfigyelhető a módosított CLA mérések során a magasabb ICH pontszámú, kedvezőtlenebb prognózisú betegeknél (ICH score 2-5) (11.B ábra). A 14. napig elhunyt betegek esetén szignifikánsan rövidebb 10%CLT értékeket detektáltunk az új módszer alkalmazásakor (11.C ábra, 12. táblázat), a 10%CLT érték mediánja 9,5 perccel rövidebb volt esetükben az eseményt követő 14. napig túlélőkhöz viszonyítva ($p=0,037$). A módosított CLA paraméterek mellett a felvételtkori NIHSS, az INR,

a dohányzás, és a trombocitaszám szintén összefüggést mutatott a 14. napig bekövetkezett halálalással (12. táblázat).

	14. napot túlélők (n=63)	14. napig elhaláloztak (n=26)	p
Kor, év	67±12	71±10	0,082
Férfi, n (%)	29 (46)	10 (39)	0,474
Stroke súlyossága felvételtkor, NIHSS	11 (5-17)	19 (16-23)	<0,001
Cerebrvaszkuláris rizikó faktrok, n (%)			
Artériás hypertonia	59 (94)	26 (100)	0,552
Pitvarfibrilláció	7 (11)	3 (12)	0,999
Diabetes mellitus	24 (38)	14 (54)	0,191
Hyperlipidémia	34 (54)	14 (54)	0,932
Dohányzás	14 (22)	2 (8)	0,032
BMI, kg/m ²	27,1 (23,3-32,4)	26,9 (25,4-30,6)	0,810
Felvételtkori laboratóriumi paraméterek			
INR	0,96 (0,93-1,00)	1,02 (0,96-1,68)	0,009
APTI, sec	27,7 (25,4-30,1)	28,3 (25,1-36,5)	0,430
Fehérvérsejtszám, G/L	8,6 (6,5-11,2)	9,3 (6,9-12,0)	0,538
Trombocitaszám, G/L	238 (172-283)	203 (167-242)	0,049
Szérum glükóz, mmol/L	7,3 (5,8-9,7)	8,2 (6,5-11,4)	0,094
hsCRP, mg/L	3,2 (1,2-7,1)	2,4 (1,3-3,8)	0,373
Kreatinin, µmol/L	69 (60-82)	76 (62-95)	0,326
Fibrinogén, mg/ml	4,0 (3,2-4,6)	3,4 (2,9-4,2)	0,086
Plazminogén aktivitás %	112 (97-123)	107 (103-114)	0,212
α2-plazmin inhibitor aktivitás %	107 (99-113)	105 (94-114)	0,422
FXIII aktivitás %	167 (147-175)	161,5 (132-177)	0,414
CLA paraméterek			
maximális abszorbancia (OD)	1,40±0,25	1,41±0,21	0,318
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	10,5 (9,0-13,0)	11,0 (9,0-15,0)	0,592
10%CLT (perc)	24,0 (15,5-33,0)	22,0 (16,5-35,0)	0,874
50%CLT (perc)	35,0 (26,5-43,0)	38,0 (24,0-49,0)	0,442
90%CLT (perc)	75,0 (69,0-87,0)	78 (62,0-84,0)	0,773
CLA AUC (OD*perc)	24,1 (18,5-29,1)	24,5 (18,3-28,1)	0,987
Módosított CLA (cfDNA és hiszton jelenlétében)			
maximális abszorbancia (OD)	1,48 ± 0,25	1,41±0,21	0,374
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	11,5 (8,0-15,0)	10,0 (8,0-14,0)	0,724
10%CLT (perc)	30,0 (22,0-37,5)	20,5 (18,0-30,0)	0,037
50%CLT (perc)	39,0 (28,0-51,0)	34,0 (27,5-45,5)	0,491
90%CLT (perc)	76,5 (69,0-87,0)	74,0 (61,0-82,5)	0,179
CLA AUC (OD*perc)	25,6 (19,8-31,5)	24,1 (20,3-28,5)	0,459

12. táblázat ICH betegek felvételtkori alapadatainak, laboratóriumi paramétereinek és alvadék lízis paramétereinek összefüggése a 14. napig bekövetkező halálalással. Az adatok átlag±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; APTI,

aktivált parciális tromboplasztin idő; BMI, testtömeg index; FXIII, XIII-as faktor; hsCRP, nagy szenzitivitású C-reaktív fehérje meghatározás; INR, nemzetközi normalizált ráta; mCLA, módosított alvadék lízis teszt; mCLA AUC, módosított alvadék lízis teszt görbe alatti területe

Hasonlóan a rövidtávú kimenetelhez, a hosszútávú funkcionális kimenet is szignifikáns összefüggést mutatott a CLA paraméterekkel, ha cfDNA-t és hisztont is adtunk a rendszerhez (11.D ábra, 13. táblázat). Azok a betegek, akik meghaltak, vagy kedvezőtlen hosszútávú kimenetellel (mRS>2) rendelkeztek az eseményt követő 3 hónapon belül, szignifikánsan rövidebb felvételtkor CLA paraméterekkel rendelkeztek, azokhoz a betegekhez képest, akiknél kedvező hosszútávú kimenetel alakult ki. A módosított CLA paraméterek mellett, a felvételtkori NIHSS, a BMI, az INR és a trombocitaszám is összefüggést mutatott a 90 napos kimenetellel.

	mRS 0-1 (n=15)	mRS 2-5 (n=32)	mRS 6 (halál) (n=39)	p
Kor, év	64±12	67±13	71±10	0,054
Férfi, n (%)	10 (67)	21 (66,0)	28 (72)	0,920
Stroke súlyossága felvételtkor, NIHSS	5 (4-6)	13 (10-17)	19 (15-23)	<0,001 §<0,001 #<0,001 †0,015
Cerebrvaszkuláris rizikó faktrok, n (%)				
Artériás hypertonia	13 (87)	32 (100)	39 (100)	0,060
Pitvarfibrilláció	0 (0)	5 (16)	5 (13)	0,283
Diabetes mellitus	6 (40)	12 (38)	20 (51)	0,541
Hyperlipidémia	11 (73)	14 (44)	23 (59)	0,095
Dohányzás	5 (33)	6 (19)	4 (10)	0,109
BMI, kg/m ²	23,6 (21,5-26,0)	30,2 (25,0-33,2)	27,1 (25,4-31,6)	0,012 §0,037 #0,011
Felvételtkori laboratóriumi paraméterek				
INR	0,96 (0,94-0,99)	0,95 (0,91-0,99)	1,01 (0,94-1,21)	0,029 †0,033
APTI, sec	27,6 (25,7-29,6)	28,0 (24,8-30,4)	27,9 (25,4-33,3)	0,822
Fehérvérsejtszám, G/L	6,9 (6,5-9,4)	8,8 (7,6-12,3)	8,8 (6,7-11,4)	0,315
Trombocitaszám, G/L	250 (158-273)	253 (209-288)	200 (168-243)	0,032 #0,027

Szérum glükóz, mmol/L	7,4 (5,5-11,2)	7,3 (6,0-9,8)	7,7 (6,3-11,2)	0,563
hsCRP, mg/L	1,5 (0,7-4,1)	4,2 (1,3-8,1)	2,7 (1,2-7,0)	0,193
Kreatinin, μ mol/L	70 (54-88)	68 (55-83)	72 (64-88)	0,478
Fibrinogén, mg/ml	4,0 (3,2-4,3)	3,8 (3,3-4,6)	3,5 (3,0-4,5)	0,339
Plazminogén aktivitás %	111 (93-123)	113 (100-132)	107 (103-117)	0,456
α 2-plazmin inhibitor aktivitás %	103 (99-109)	112 (103-115)	105 (96-114)	0,135
FXIII aktivitás %	160 (138-175)	174 (160-180)	165 (141-178)	0,071
CLA paraméterek				
maximális abszorbancia (OD)	1,35 (1,3-1,7)	1,40 (1,3-1,6)	1,43 (1,3-1,6)	0,904
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	12,0 (8,5-16,5)	9,5 (9,0-12,0)	10,5 (9,0-15,0)	0,589
10%CLT (perc)	28,5 (17,5-36,5)	21,0 (15,0-27,0)	22,0 (16,5-35,0)	0,231
50%CLT (perc)	39,0 (27,5-48,5)	29,0 (21,0-43,5)	31,5 (25,0-48,0)	0,176
90%CLT (perc)	81,0 (57,5-88,5)	75,0 (69,0-87,0)	77,0 (63,0-87,0)	0,971
CLA AUC (OD*perc)	24,5 (22,0-38,1)	21,9 (17,8-29,3)	24,1 (19,3-28,3)	0,340
Módosított CLA (cfDNA és hiszton jelenlétében)				
maximális abszorbancia (OD)	1,37 (1,3-1,6)	1,50 (1,4-1,6)	1,42 (1,3-1,6)	0,454
max. abszorbancia eléréséhez szükséges idő (perc)	15,0 (12,0-16,5)	10,5 (8,0-14,0)	9,5 (7,5-14,5)	0,039 §0,047
10%CLT (perc)	36,0 (22,5-51,0)	23,5 (17,8-36,0)	22,5 (18,0-30,5)	0,027 §0,032
50%CLT (perc)	48,0 (42,0-63,0)	32,0 (28,0-49,5)	34,5 (27,0-45,0)	0,041 §0,043
90%CLT (perc)	81,0 (68,0-90,0)	75,0 (69,0-85,5)	75,0 (68,0-87,0)	0,490
CLA AUC (OD*perc)	29,4 (23,7-34,5)	24,6 (18,8-29,7)	24,4 (19,5-29,3)	0,149

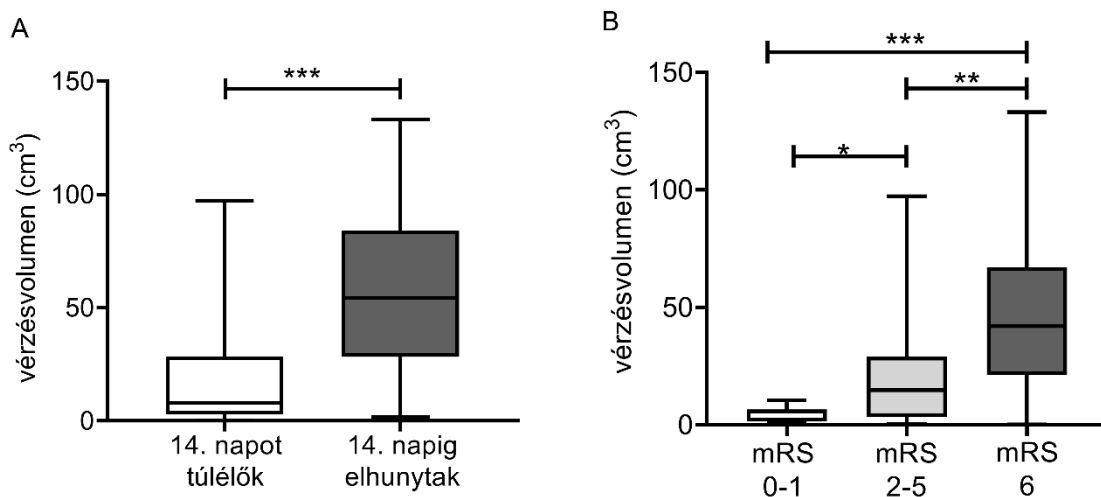
13. táblázat ICH betegek felvételi alapadatainak, laboratóriumi paramétereinek és alvadék lízis paramétereinek összefüggése a hosszútávú funkcionális kimenetellel. Az adatok átlag \pm SD vagy medián (interkvartilis tartomány) értékeként vannak feltüntetve. 10%CLT, 10% alvadék lízis idő; 50%CLT, 50% alvadék lízis idő; 90%CLT, 90% alvadék lízis idő; APTI, aktivált parciális tromboplastin idő; BMI, testtömeg index; FXIII, XIII-as faktor; hsCRP, nagy szenzitivitású C-reaktív fehérje meghatározás; INR, nemzetközi normalizált ráta; mRS, modifikált Rankin Skála; mCLA, módosított alvadék lízis teszt; mCLA AUC, módosított alvadék lízis teszt görbe alatti területe

§: mRS 0-1 vs, mRS 6 (ANOVA, Bonferroni post hoc teszt vagy Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc teszt);

‡: mRS 2-5 vs, mRS 6 (ANOVA, Bonferroni post hoc teszt);

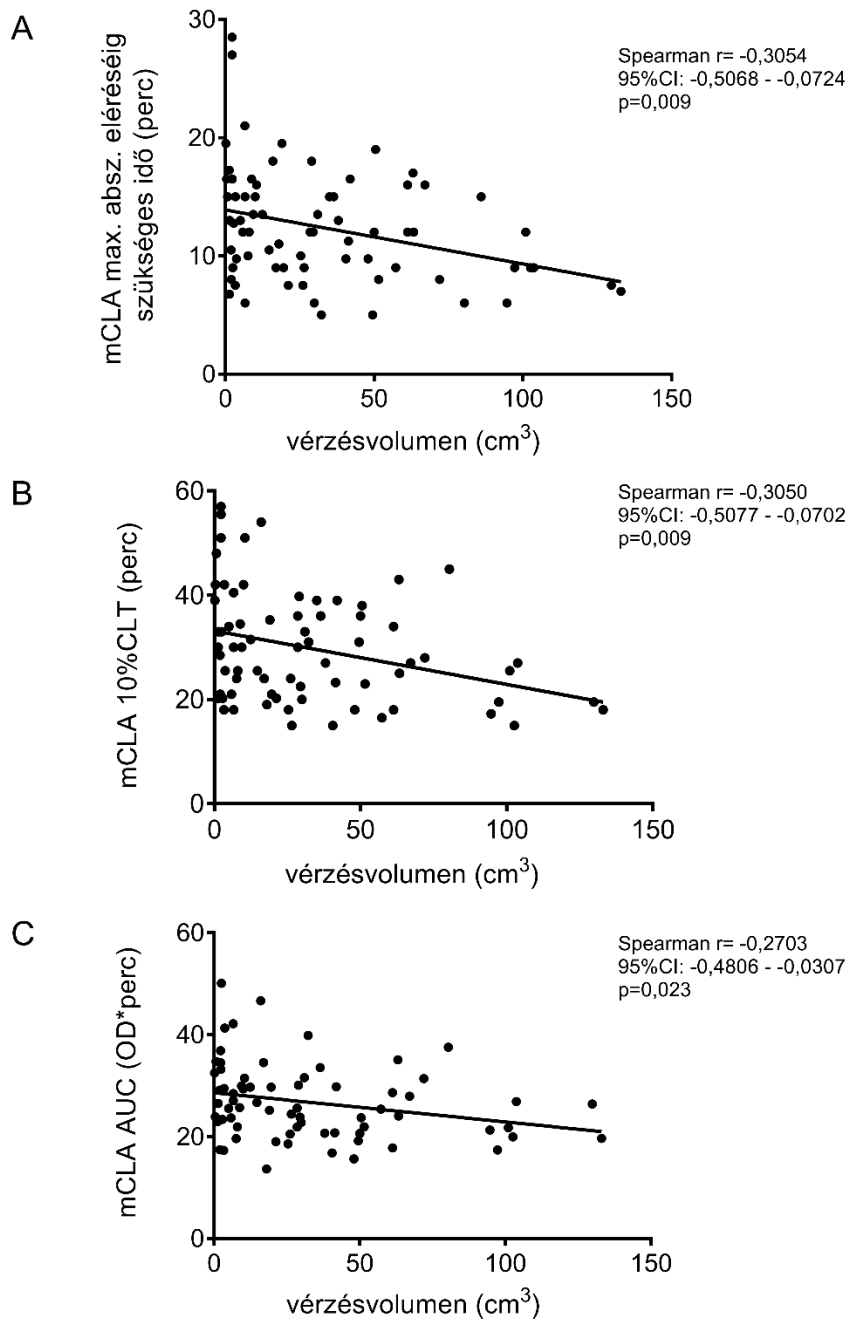
#: mRS 0-1 vs, mRS 2-5 (ANOVA, Bonferroni post hoc teszt or Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc teszt);

A vártnak megfelelően a felvételtől kezdve a becsült vérzésvolumen értékek szoros összefüggést mutattak a 14 és 90 napig bekövetkezett halálozási adatokkal (12. ábra). Azon betegek esetén, akik az eseményt követő 14. illetve 90. napig elhaláloztak, vagy kedvezőtlen hosszútávú funkcionális kimenetellel (mRS ≥ 2) rendelkeztek, szignifikánsan nagyobb felvételtől kezdve a becsült vérzésvolumen érték volt megfigyelhető a kedvező kimenetelű betegekhez képest.



12. ábra A felvételtől kezdve a becsült vérzésvolumen érték és a nem traumás intracerebrális stroke (ICH) rövidtávú (A) és hosszútávú (B) funkcionális kimeneteleinek összefüggése. mRS, módosított Rankin Skála; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$**

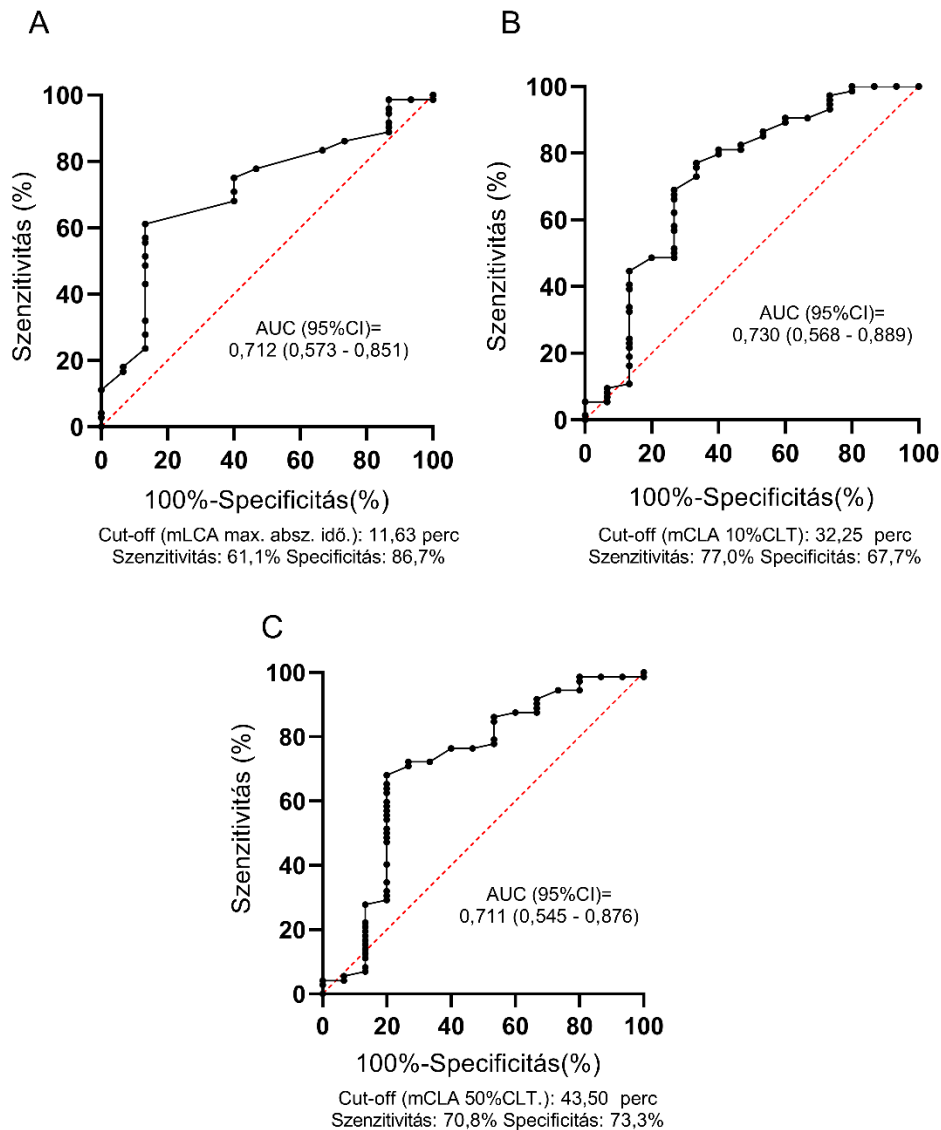
A módosított CLA paraméterek szignifikáns korrelációt mutattak a felvételtől kezdve a becsült vérzésvolumen értékekkel (13. ábra). A gyorsabb alvadék képződést és lízist jelző paraméterek (rövidebb maximális abszorbancia eléréséhez szükséges idő, rövidebb 10%CLT, alacsonyabb CLA AUC) szignifikáns asszociációt mutattak a nagyobb vérzésvolumen értékekkel.



13. ábra A módosított alvadék lízis (mCLA) paraméterek és az ICH betegek felvételtkori becsült vérzésvolumen értékének korrelációja. Korreláció az ICH betegek vérzésvolumen értéke és a maximális abszorbancia eléréséig szükséges idő (A), a 10% alvadék lízis idő (10%CLT) és a görbe alatti terület (AUC) között a módosított alvadék lízis vizsgálat során (mCLA).

A módosított CLA paraméterek diagnosztikai hatékonyságának vizsgálata érdekében ROC analízist végeztünk (14. ábra). A legjobb diagnosztikai hatékonyságot a 10%CLT paraméter

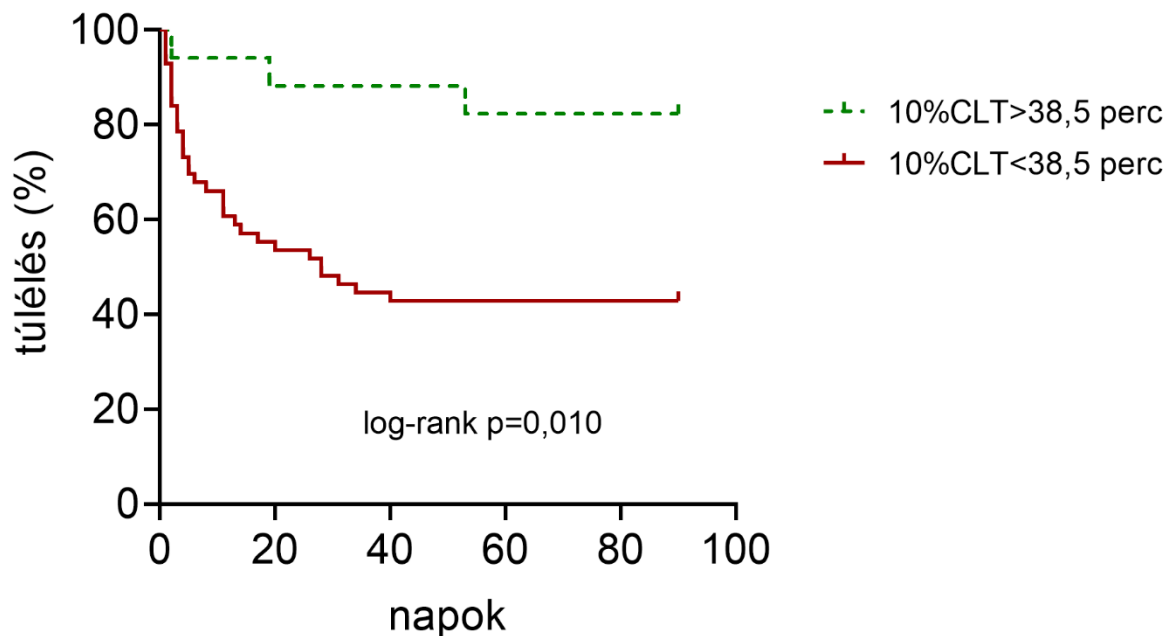
esetén figyeltük meg a kedvező hosszútávú kimenetel (mRS 0-1) előrejelzésére (ROC AUC 0,73; 95%CI: 0,57-0,89). A Youden index által meghatározott optimális küszöbérték (32,25 perc) alapján a módosított teszt esetén a 10%CLT paraméter szenzitivitása 77,0%, specificitása 67,7% volt a kedvező hosszútávú kimenetel (mRS 0-1) előrejelzésére (14.B ábra).



14. ábra A módosított alvadék lízis (mCLA) paraméterek ROC analízise a nem traumás vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek (ICH) hosszútávú 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 szenzitivitás ill. specificitás értékeket tüntettük fel a maximális abszorbancia eléréséig szükséges idő (A), a 10%CLT (B) és az 50%CLT (C) paraméterek esetén.

10%CLT, 10% alvadék lízis idő; 50%CLT, 50% alvadék lízis idő

A ROC analízist a 14 és 90 napig bekövetkező mortalitásra vonatkozóan elvégezve az egyes módosított CLA paraméterek esetén hasonló küszöbértékeket kaptunk (a 10%CLT paraméter küszöbértéke >38,5 percnél adódott a 90 napos túlélésre vonatkozóan). Ezt a küszöbértéket felhasználva a Kaplan-Meier túlélési analízis során eredményeink alapján jelentős volt a különbség a 38,5 percnél hosszabb ill. rövidebb felvételtől 10%CLT értéket mutató betegek túlélése között az eseményt követő 90. napig vizsgálva ($p=0,010$) (15. ábra).



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

A Kaplan-Meier túlélési vizsgálat során megfigyelt eredményekhez képest, a backward bináris regressziós modell (elemei: kor, nem, felvételi NIHSS, INR, trombocitaszám, vérzésvolumen érték, 10%CLT, dohányzás, hipertónia, BMI) alkalmazása során úgy találtuk, hogy a módosított CLA módszer 10%CLT értéke nem bizonyult a 14. és 90. napig bekövetkezett halálozás független prediktorának. Másfelől, egy másik bináris regressziós modell alkalmazása során (elemei: kor, nem, felvételtől NIHSS, INR, BMI, trombocitaszám, 10%CLT, vérzésvolumen érték, és hipertónia) a rövidebb 10%CLT (<32,25 perc) a kedvezőtlen hosszútávú funkcionális kimenetel ($mRS \geq 2$) független prediktorának minősült (OR: 6,14; 95%CI: 1,11-34,02; $p=0,038$) (14. táblázat).

	OR	95%CI	p
Halálozás a 14. napig §			
NIHSS felvételtkor	1,20	1,09-1,32	0,001
INR	3,54	1,06-11,85	0,041
Halálozás a 90. napig (mRS 0-5 vs mRS 6) #			
NIHSS felvételtkor	1,17	1,07-1,28	0,001
INR	2,02	0,71-5,75	0,190
mCLA 10%CLT <38,5 perc	3,69	0,84-16,15	0,083
Kedvezőtlen hosszútávú kimenetel (mRS 0-1 vs, mRS 2-6) †			
NIHSS felvételtkor	1,57	1,21-2,05	0,001
mCLA 10%CLT <32,25 perc	6,14	1,11-34,02	0,038

14. táblázat A mortalitás és a kedvezőtlen hosszútávú kimenetel független prediktorai az ICH betegpopulációban. A backward többszörös logisztikus regressziós analízis utolsó lépése alapján.

§Backward többszörös logisztikus regressziós modell elemei: kor, nem, NIHSS felvételtkor, magasvérnyomás, INR, trombocitaszám, dohányzás, vérzésvolumen, mCLA 10%CLT (küszöbérték: <30,25 perc),

#Backward többszörös logisztikus regressziós modell tartalmazta: kor, nem, NIHSS felvételtkor, magasvérnyomás, BMI, INR, trombocitaszám, vérzésvolumen, mCLA 10%CLT (küszöbérték: <38,5 perc),

†Backward többszörös logisztikus regressziós modell tartalmazta: kor, nem, NIHSS felvételtkor, magasvérnyomás, BMI, INR, trombocitaszám, vérzésvolumen, mCLA 10%CLT (küszöbérték: <32,25 perc),

95%CI, 95% konfidencia intervallum; INR, nemzetközi normalizált ráta; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; OR, esélyhányados; mCLA 10%CLT, 10% alvadék lízis idő a módosított alvadék lízis teszt során

MEGBESZÉLÉS

A legújabb nemzetközi tanulmányok nemrégiben az iszkémiás stroke háttérében álló vérrög képződésének új modelljét írták le. A modell egyik lényeges eleme, hogy a trombusképződés utolsó lépéseként a neutrofilek NET-ek formájában infiltrálják a vérrögöt, ezáltal egy jóval kisebb pórusátmérővel rendelkező, a fibrinolízisnek jobban ellenálló trombus jön létre (85). Eddigi ismereteink alapján az alvadék rt-PA általi feloldása a trombus kialakulásának korai szakaszában a legkönnyebb, mikor a fibrin és a fibrinolízis inhibitorok keresztkötése az aktivált XIII-as faktor révén még nem történt meg. Bár ezek az események valószínűleg döntő fontosságúak az rt-PA indukálta trombolízis során, jelenleg nem érhető el olyan hemosztázis teszt, amely figyelembe venné a NET komponenseinek hatását az alvadék képződésre ill. a lízisre. Feltételezhetjük, hogy a NET komponensek hatása az alvadék kialakulására ill. feloldódására nézve jelentős egyéni különbségeket mutathat, azonban a NET-ek ilyen hatásait klinikai kórképekben még nem vizsgálták.

Tanulmányunk során bebizonyítottuk, hogy az AIS betegek felvételi vérmintájából elvégzett módosított CLA cfDNA-sel és hisztonnal kiegészítve ígéretes vizsgálat lehet az intravénás trombolízis rövidtávú funkcionális kimenetelének, valamint a terápia asszociált intrakraniális vérzéses szövődmények előrejelzésére. Fontos további szempont, hogy egy másik küszöbérték kiválasztásával a teszt hasznosnak bizonyult az AIS betegpopulációban azon betegek azonosítására, akiknél nem kell a terápia során vérzéses komplikációtól tartani. A teszt ilyen jellegű alkalmazása kiemelt jelentőséggel bírhat olyan esetekben, amikor a trombolízist a mechanikus trombektómia előtt alkalmazzák. A legújabb irányelvek azt javasolják, hogy azoknál az AIS betegeknél, akiknél lehetséges, fontolóra kell venni az rt-PA adását még a mechanikus trombektómia megkezdése előtt. E megközelítés biztonságosságának javítása érdekében az új tesztek, mint például a módosított CLA, hasznosnak bizonyulhatnak a jövőben (85-90).

Annak ellenére, hogy AIS esetén a trombolízis kimenetelét megfelelő prediktív értékkel becsülő diagnosztikai tesztek egyértelműen előnyösek és hasznosak lennének a klinikai gyakorlatban, meglepően kevés tanulmány áll rendelkezésünkre ebben a témában. Egy nemrégiben készült metaanalízisben, ahol több mint 6400 közlemény eredményeit vizsgálták meg, csak négy olyan tanulmányt találtak, ahol a szerzők hemosztázis biomarkereket vizsgáltak relatíve nagy AIS betegkohorszban (>100 beteg), még a reperfüziós terápia megkezdése előtt (6). A legtöbb tanulmányban a stroke kialakulását követő 24 órán belül gyűjtött vérmintát használnak, ami meglehetősen nagy intervallum a hemosztázis egyensúlyának változása szempontjából. Ideális

esetben a trombolízis kimeneteleivel összefüggő hemosztázis biomarkerek szintjét még a kezelés megkezdése előtt meg kell határozni (6, 7). Tekintettel az intravénás trombolízis viszonylag rövid időablakára, a kellően nagylétszámú betegkohorszok ill. biobankok létrehozása során a mintagyűjtés kihívást jelent. Tanulmányunk előnye, hogy relatíve nagylétszámú (n=231) AIS-ot szenvedett beteget tudtunk beválogatni a vizsgált kohorszba, minden vizsgálatot a trombolízis megkezdése előtti vérmintákból végeztünk, a betegeket követtük, és a definiált kimeneteleket az eseményt követő 1., 7. és 90. napon is meghatároztuk. A legtöbb tanulmány, mely AIS miatt végzett trombolízis kimenetelének prediktív biomarkereit vizsgálja, gyakran csak egy vagy néhány hemosztázis vagy fibrinolízis tényező vizsgálatára korlátozódik. Feltételezhetjük, hogy a trombolízis kimenetelét számos hemosztázis faktor és inhibitora közötti kölcsönhatás befolyásolhatja, így logikus megoldás lehet globális tesztek használata a terápiás kimenetek előrejelzésére individuális faktorok szintjeinek időigényes és költségigényes meghatározása helyett. A CLA mérés elméletileg optimális módszer lehet erre a célra. 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 (82). Ugyanakkor meg kell említeni, hogy a CLA egy igen munkaigényes módszer, mely jelenleg még számos limitációval küzd. Először is rosszul standardizált, annak ellenére, hogy nemzetközi együttműködés keretében elkezdődtek erőfeszítések a vizsgálat standardizációja érdekében (43). 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 hibája, hogy a vizsgálat plazmamintákból 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 (30). Vizsgálatunk alapján elmondhatjuk, hogy a cfDNA és hiszton hozzáadása az *in vitro* CLA keverékhez, a vártak megfelelően, szignifikánsan megnyúlt alvadék képződést és lízist eredményezett (27, 42, 91). Eredményeink arra is rávilágítottak, hogy az alvadék lízisének cfDNA-el és hisztonnal történő megnyúlása az egyének között is jelentős különbséget mutatott.

A keringő cfDNA mennyiségének jelentős mértékű emelkedéséről már korábban beszámoltak az iszkémiás stroke okozta neurovaszkuláris károsodás eredményeként állatmodellekben és néhány klinikai vizsgálat során is (92-94). Vizsgálataink eredményeivel összhangban más tanulmányok is leírták a keringő cfDNA szintjének összefüggését az iszkémiás stroke súlyosságával és mortalitásával. Ugyanakkor a keringő cfDNA nemcsak stroke biomarker lehet, hanem potenciálisan befolyásolhatja a kialakult alvadék lízisét is. Eredményeink alapján ezt a feltételezést nem tudtuk megerősíteni, mivel a vizsgált betegpopulációban a keringő cfDNA szintek nem mutattak szignifikáns összefüggést a CLA paraméterekkel.

A NETózis következtében a trombusban felhalmozódó cfDNA jelenléte azonban potenciálisan befolyásolhatja a lízist, ezáltal az ezt a hatást imitáló teszt pontosabban előrejelezheti a kezelés kimenetelét. Tanulmányunkban leírtuk, hogy a hagyományos CLA trombolízis kimenetelére vonatkozó diagnosztikai teljesítményét jelentősen javította a cfDNA és hiszton jelenléte. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy a cfDNA és hiszton beépítése a tesztbe egy szimplifikált módja a trombuson belüli NET hatás imitálásának. A NET-ek felszabadulása egy igen összetett folyamat, mely nemcsak a DNS és a hiszton, hanem más fehérjék, köztük a neutrofil granulomok fehérjéinek (pl. humán neutrofil elasztáz, mieloperoxidáz) felszabadulását is magába foglalja, ami komplex interakciók sokféleségéhez vezet a trombuson belül (95). Bár a cfDNA és hiszton hatása koránt sem azonos az intakt NET-ek hatásával, kimutatták, hogy a DNS-nek és a hisztonnak fontos alvadék-stabilizáló és antifibrinolitikus szerepe van (91, 96). 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 (27, 42, 91, 97, 98). 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 (26, 27). 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 (98). A tanulmányunk során alkalmazott módosított CLA mérések során a cfDNA és hiszton optimális koncentrációját korábbi *in vitro* tanulmányok eredményei alapján választottuk (27). Vizsgálataink eredményeként úgy találtuk, hogy a módosított CLA paraméterei szignifikáns összefüggést mutattak a trombolízis kedvezőtlen rövidtávú

kimenetelével. Megállapítottuk, hogy a módosított vizsgálat során a megnyúlt 50%CLT paraméter (> 44 perc) a terápia sikertelenségének szignifikáns, független előrejelzőjének bizonyult az eseményt követő 7. napon. A rövidtávú kimenetellel csak a módosított CLA esetében találtunk szignifikáns összefüggést, ami arra utal, hogy a jobb diagnosztikai teljesítmény eléréséhez szükséges a cfDNA és hiszton hozzáadása a teszthez.

Fontos további eredményünk, hogy a módosított CLA magas negatív prediktív értékkel bír (97,9%) a lízis követő intrakraniális vérzés előfordulásának kimutatására. A logisztikus regressziós analízis eredménye alapján elmondhatjuk, hogy a módosított CLA mérés során kapott CLA AUC paraméter (<29,9 OD*perc) a terápia asszociált intrakraniális vérzéses szövődmény szignifikáns, független előrejelzője, hasonlóan az emelkedett felvételtkorNIHSS értékhez. A hemorrhágiás transzformáció az rt-PA terápia egyik legsúlyosabb mellékhatása, mely korlátot szab a kevésbé tapasztalt központok számára a terápia széleskörű alkalmazásának (99). 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 (6). Jelenleg az endovaszkuláris trombektómiát megelőző trombolízis kockázat/haszon profilját nem lehet pontosan megjósolni, így a CLA eredmények beépítése a klinikai kockázatbecslő modellekbe elméletileg javíthatná a betegek kezelésének optimális kiválasztását. Tekintettel a módosított CLA magas negatív prediktív értékére a vérzéses szövődmények előrejelzésével kapcsolatban, fel lehetne ezen eredményt használni azon nagyérelzáródást szenvedett betegek szelektálására, akiknél biztonsággal lehetne alkalmazni a mechanikus trombektómia előtt a trombolízist, vérzéses komplikációktól való félelem nélkül. Azokban az esetekben, amikor a módosított CLA megnövekedett vérzés kockázatot jelez, a kapott információ még akkor is releváns lehet a klinikai gyakorlatban, ha a beteg már megkapta a trombolízis terápiát, mivel ilyen 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, személyre szabott lízis utáni terápiás megközelítés 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.

A felvételtkorNIHSS CLA paraméterek eredményei nem mutattak összefüggést a hosszútávú funkcionális kimenetellel az iszkémiás stroke-ot szenvedett betegek esetén, ami feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a fogyatékoság szintjét a lízis után 90 nappal számos tényező

befolyásolja, gyakran függetlenül a hemosztázis/fibrinolízis rendszertől (társbetegségek, társadalmi/gazdasági helyzet, ápolás körülményei, esemény utáni fertőzések stb.).

Mindkét CLA teszt esetén úgy találtuk, hogy az 50%CLT paraméter szignifikáns fordított összefüggést mutatott a stroke felvételtkorai súlyosságával. Ez a fordított összefüggés egy rejtélyes eredmény, amelynek magyarázatára megvizsgáltuk néhány hemosztázis ill. fibrinolitikus fehérje szintjét a plazmamintákban, konzumpcióra gyanakodva. Meglepő módon azonban nem figyeltünk meg jelentős fogyást ezen fehérjék vizsgálata során. Kizárólag a plazminogén aktivitás esetén tapasztaltunk jelentős mértékű fogyást, mely fordított lépcsőzetes összefüggést mutatott a stroke súlyosságával ebben a betegpopulációban- ezen eredmények biológiai jelentőségének tisztázása azonban további vizsgálatokat igényel.

Miután a módosított CLA módszer a hemorrhágiás transzformáció előrejelzőjének bizonyult iszkémiás stroke trombolitikus kezelése esetén, megvizsgáltuk, hogy nem-traumás hemorrhágiás stroke-on átesett betegekben összefüggést mutat-e a vizsgálat a betegekben kialakuló hematoma méretével ill. a vérzés kimenetelével. Tudomásunk szerint a jelenlegi tanulmány az első, ami leírja, hogy a CLA módszer ígéretes lehet az intracerebrális vérzéses stroke kimenetelének előrejelzésében. Annak ellenére, hogy az akut ICH-t elszenvedő betegek kimenetelét előrejelző, megfelelő prediktív értékű diagnosztikai tesztek fontosak lennének a klinikai gyakorlat számára, meglepően kevés tanulmány áll rendelkezésünkre ebben a témában. Dolgozatomban bemutattuk, hogy a betegek felvételtkorai módosított CLA paraméterei korrelálnak a becsült felvételtkorai vérzésvolumen nagyságával, ami fontos előrejelzője a kimenetelnek. A gyorsabb alvadék képződés, és a rövidebb lízis idők, amelyek az újonnan képződött alvadék gyorsabb lebomlását jelzik, nagyobb hematoma térfogattal, súlyosabb stroke-kal, és rosszabb kimenetellel társultak a vizsgált betegpopulációban. Ezen eredményeink összhangban állnak korábbi tanulmányok eredményeivel, amelyek azt mutatták, hogy az emelkedett D-dimer szint, amely a trombus fibrinláncainak fokozott lebontását jelzi, az ICH kedvezőtlen kimenetelének prediktora (71, 72, 100).

Eredményeink alapján a fibrinolitikus egyensúly felborulása fontos szerepet játszhat az intracerebrális hematoma kialakulásában. A vizsgált kohorszban a felvételtkorai fibrinogén szint a referencia tartományon belül volt, ami arra utal, hogy ebben a folyamatban feltehetőleg fibrinolitikus faktorok, és nem maga a fibrinogén vesz részt. Másfelől a FXIII, plazminogén és az α 2-PI aktivitás nem mutatott összefüggést az eredményekkel, ami ezektől eltérő fibrinolitikus változások jelenlétére utal. A jövő farmakológiai terápiáinak megtervezése szempontjából fontosnak gondoljuk a vérzés megnövekedéséért vagy megszűnéséért felelős tényezők jobb ismeretét. Első lépésként elengedhetetlen lesz megérteni a betegek kedvezőtlen

kimenetelének alapjául szolgáló patomechanizmust, és megfelelő diagnosztikai tesztek bevezetni a klinikai gyakorlatba.

A CLA korábban már potenciálisan hasznosnak bizonyult egyes kimenetek előrejelzésében számos olyan kórkép esetén, ahol a fibrinolitikus rendszer egyensúlyának zavara alakult ki (26, 29, 30, 91, 101). A második tanulmányunk során az iszkémiás stroke-ot szenvedett betegkohorsz vizsgálatait során már beállított vizsgálati körülményeket alkalmazva, a módosított CLA módszer diagnosztikai teljesítményét különösen jónak találtuk az agyvérzett betegek kedvezőtlen hosszútávú funkcionális kimenetelének előrejelzésére. Bináris logisztikus regressziós modellben a módosított CLA módszer során kapott rövidebb 10%CLT (<32,25 perc) a kedvezőtlen hosszútávú kimenetel ($mRS \geq 2$) független prediktorának bizonyult.

Összegzésként elmondhatjuk, hogy az AIS betegek trombolízis előtti plazmájából elvégzett módosított CLA módszer hasznos lehet a trombolízis rövidtávú kimenetelének és különösen a lízis utáni intrakraniális vérzéses szövődmények előrejelzésére. Az agyvérzett betegek felvételi plazmamintáiból meghatározott, módosított CLA paraméterek jó korrelációt mutattak a betegek vérzésvolumen értékeivel, és a vizsgálat segítséget nyújthat a betegek kedvezőtlen hosszútávú kimenetelének és mortalitásának megjósolásában. 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.

Limitációk

Tanulmányaink eredményeit a klinikai vizsgálatok ismert korlátainak összefüggésében kell értelmezni. Mindkét tanulmány esetén a mintavételi populáció esetszáma limitált volt, azonban összehasonlítva az eddig publikált vizsgálatokkal, ahol hemosztázis vagy fibrinolízis biomarkereket határoztak meg akut stroke betegek kórházi felvételekor vett vérmintákból, 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 akut iszkémiás stroke kohorszban hemorrhágiás transzformációt elszenvedett betegek korlátozott számára. Mindkét vizsgálat egycentrumú vizsgálat volt, ami hozzájárult a 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. Ennek ellenére az AIS betegeket vizsgáló tanulmányban a lemorzsolódás mindössze 8,7%-nak adódott, míg az ICH betegek populációjában a három hónapos követési időszak alatt ez mindössze 3,4% volt (beleértve egy beteg esetét, amikor az időközben elszenvedett SARS-CoV-2 fertőzés miatt nem vettük figyelembe a hosszútávú funkcionális kimenetelt). Ez a lemorzsolódási arány más, akut stroke betegeket érintő prospektív vizsgálatok esetén látott arányoknak megfelel ill. annál alacsonyabbnak mondható. Megemlítendő azonban, hogy a lemorzsolódás kis mértéke ellenére is bizonyos mértékig befolyásolhatta az eredményeket, ezért a jövőben nagyobb klinikai vizsgálatokra van szükség eredményeink megerősítéséhez.

ÖSSZEFOGLALÁS

A stroke az egyik vezető halálok, és a leggyakoribb rokkantságot okozó kórkép a világ fejlett országaiban. A kialakult stroke esetek kb. 80%-át iszkémiás stroke (AIS), kb 15-18%-át intracerebrális vérzéses stroke (ICH) teszi ki. A stroke prognózisa mindkét esetben nehezen becsülhető. Célul tűztük ki megvizsgálni, hogy egy módosított *in vitro* alvadék lízis módszer, mely tartalmazza a neutrofil extracelluláris csapda (NET) egyes komponenseit képes-e megjósolni az AIS és az ICH klinikai kimeneteleit.

Munkánk során két prospektív obszervációs tanulmányban 231 intravénás trombolízis előtt álló AIS beteget, és 89 ICH beteget válogattunk be. A hagyományos alvadék lízis vizsgálatot (CLA) és a módosított CLA-t mely cfDNA-t és hisztont tartalmazott, a betegek felvételkor levett trombocitaszegény plazmamintáiból végeztük el. A stroke súlyosságának megállapítására az NIHSS skálarendszert alkalmazták. A terápia asszociált vérzés klasszifikációja az ECASS II kritériumok alapján történt. A betegek rövid- és hosszútávú funkcionális kimenetelének meghatározása az eseményt követő 7. és 90. napon történt a Δ NIHSS és a modifikált Rankin Skála (mRS) alapján.

A cfDNA és hiszton jelenléte szignifikánsan nyújtotta az alvadék lízist a vizsgált betegpopulációkban. Az AIS betegekben a stroke felvételkori súlyossága és az 50% alvadék lízis idő (50%CLT) között lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető. ROC analízis javuló diagnosztikai hatékonyságot mutatott a módosított CLA esetén a hagyományos teszttel szemben. Logisztikus regresszió során a megnyúlt 50%CLT a kedvezőtlen rövidtávú kimenetel (OR:2,19; 95%CI:1,17-4,11; $p=0,015$), míg az alacsony AUC paraméter a vérzéses szövődmény független prediktorának bizonyult (OR:5,85; 95%CI:1,24-27,7; $p=0,026$). Az ICH populációban a súlyosabb stroke-ban szenvedő betegek szignifikánsan rövidebb 10%CLT paraméterrel rendelkeztek a módosított CLA mérés során (10%CLT: NIHSS 0-10: medián 31,5 [IQR: 21,0-40,0] perc vs. NIHSS>10: medián 24,0 [18,0-31,0] perc, $p=0,032$). A rövidebb alvadék lízis paraméterek szignifikáns összefüggést mutattak a 14. napig bekövetkező mortalitással és a kedvezőtlen hosszútávú kimenetellel (mRS 0-1: medián 36,0 [22,5-51,0] perc vs. mRS: 2-5: medián 23,5 [18,0-36,0] perc vs. mRS 6: medián 22,5 [18,0-30,5] perc, $p=0,027$). Kaplan-Meier analízis alapján a >38,5 perc 10%CLT paraméterrel rendelkező betegek szignifikánsan jobb túlélést mutattak ($p=0,010$).

A módosított CLA mérés cfDNA-el és hisztonnal kiegészítve ígéretes módszer lehet a jövőben a trombolízissel kezelt AIS betegek rövidtávú funkcionális kimenetelének, és terápia

asszociált vérzéses szövődményeknek, valamint az ICH betegek hosszútávú funkcionális kimenetelének és mortalitásának előrejelzésére.

SUMMARY

Stroke is a leading cause of death and the most common disabling disease in all developed countries. Approximately 80% of all stroke cases are of ischemic origin (AIS), while about 15-18% are hemorrhagic strokes (ICH). In both subtypes, prognosis is difficult to estimate. Therefore, we aimed to investigate whether a modified *in vitro* clot lysis assay incorporating neutrophil extracellular trap (NET) components could predict the clinical outcomes of AIS and ICH.

In two prospective observational studies, 231 AIS patients undergoing intravenous thrombolysis and 89 non-traumatic ICH patients were enrolled. Conventional clot lysis assay (CLA) and a modified CLA (mCLA) containing cfDNA and histones were performed using platelet-poor plasma samples of patients taken on admission. Stroke severity was determined by NIHSS on admission. Therapy-associated bleeding complications were classified according to ECASSII criteria. Short- and long-term outcomes were determined at 7 and 90 days post-event based on Δ NIHSS and the modified Rankin Scale (mRS).

The presence of cfDNA and histones prolonged clot lysis significantly in both studied cohorts. A step-wise association was observed between stroke severity and the 50% clot lysis time (50%CLT) in case of AIS patients. ROC analysis showed improved diagnostic performance of the mCLA. Logistic regression analysis proved that a prolonged 50%CLT is a significant, independent predictor of unfavorable short-term outcome (OR: 2.19; 95%CI: 1.17-4.11; $p=0.015$), and a low AUC parameter is an independent predictor of hemorrhagic transformation (OR:5.85; 95%CI:1.24-27.7; $p=0.026$) in AIS patients receiving thrombolysis. In the ICH cohort, patients with more severe stroke showed significantly shorter 10% clot lysis time (10%CLT) of the mCLA (10%CLT: NIHSS 0-10: median 31.5 [IQR: 21.0-40.0] min vs. NIHSS>10: median 24.0 [18.0-31.0] min, $p=0.032$). Shorter clot lysis parameters of the mCLA showed significant association with mortality by day 14 and with unfavorable long-term outcomes (mRS 0-1: 36.0 [22.5-51.0] min vs. mRS: 2-5: 23.5 [18.0-36.0] min vs. mRS 6: 22.5 [18.0-30.5] min, $p=0.027$). In a Kaplan-Meier survival analysis, patients presenting with an mCLA 10%CLT result of > 38.5 min on admission demonstrated significantly better survival ($p= 0.010$).

The modified CLA incorporating the effect of cfDNA and histones, may be a promising method in the future to predict short-term functional outcomes and therapy-associated bleeding complications in AIS patients receiving thrombolysis, and to predict long-term outcomes and mortality in ICH patients.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(7):2064-89.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127(1):143-52.
3. Hankey GJ. *Stroke*. *Lancet*. 2017;389(10069):641-54.
4. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1317-29.
5. Pinho J, Costa AS, Araujo JM, Amorim JM, Ferreira C. Intracerebral hemorrhage outcome: A comprehensive update. *J Neurol Sci*. 2019;398:54-66.
6. 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.
7. Bagoly Z, Szegedi 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.
8. 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.
9. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature*. 1964;202:498-9.
10. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958-65.
11. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(1):41-8.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. Kattula S, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(3):e13-e21.
16. 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.
17. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 2012;198(5):773-83.
18. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 2012;189(6):2689-95.
19. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE*. 2007;2007(379):pe11.
20. 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.
21. Manzenreiter R, Kienberger F, Marcos V, Schilcher K, Krautgartner WD, Obermayer A, et al. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *J Cyst Fibros*. 2012;11(2):84-92.
22. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett*. 2010;584(14):3193-7.
23. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2610-5.
24. Craft JE. Dissecting the immune cell mayhem that drives lupus pathogenesis. *Sci Transl Med*. 2011;3(73):73ps9.
25. Thalín C, Hisada Y, Lundström S, Mackman N, Wallén H. Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(9):1724-38.
26. 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.

27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Wiman B, Hamsten A. The fibrinolytic enzyme system and its role in the etiology of thromboembolic disease. *Semin Thromb Hemost.* 1990;16(3):207-16.
33. Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):259-70.
34. Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost.* 2003;89(3):409-19.
35. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):4-13.
36. Rijken DC, Hoylaerts M, Collen D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1982;257(6):2920-5.
37. Longstaff C. Measuring fibrinolysis: from research to routine diagnostic assays. *J Thromb Haemost.* 2018;16(4):652-62.
38. Kolev K, Longstaff C. Bleeding related to disturbed fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2016;175(1):12-23.
39. 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.
40. 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.

41. Ilich A, Bokarev I, Key NS. Global assays of fibrinolysis. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(5):441-7.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Zabczyk M, Plens K, Wojtowicz W, Undas A. Prothrombotic Fibrin Clot Phenotype Is Associated With Recurrent Pulmonary Embolism After Discontinuation of Anticoagulant Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(2):365-73.
46. Cieslik J, Mrozinska S, Broniatowska E, Undas A. Altered plasma clot properties increase the risk of recurrent deep vein thrombosis: a cohort study. *Blood*. 2018;131(7):797-807.
47. 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. *Thromb Haemost*. 2017;117(7):1440-7.
48. 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.
49. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27(5):493-501.
50. Hankey GJ, Blacker DJ. Is it a stroke? *BMJ*. 2015;350:h56.
51. Brunser AM, Hoppe A, Illanes S, Diaz V, Munoz P, Carcamo D, et al. Accuracy of diffusion-weighted imaging in the diagnosis of stroke in patients with suspected cerebral infarct. *Stroke*. 2013;44(4):1169-71.
52. Henderson SJ, Weitz JI, Kim PY. Fibrinolysis: strategies to enhance the treatment of acute ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2018;16(10):1932-40.
53. Lyden P. Using the National Institutes of Health Stroke Scale: A Cautionary Tale. *Stroke*. 2017;48(2):513-9.

54. Kasner SE. Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurol.* 2006;5(7):603-12.
55. Zaidat OO, Liebeskind DS, Jadhav AP, Ortega-Gutierrez S, Nguyen TN, Haussen DC, et al. Impact of Age and Alberta Stroke Program Early Computed Tomography Score 0 to 5 on Mechanical Thrombectomy Outcomes: Analysis From the STRATIS Registry. *Stroke.* 2021:STROKEAHA120032430.
56. 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.
57. 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.
58. Alexandrov AV, Grotta JC. Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology.* 2002;59(6):862-7.
59. Larrue V, von Kummer RR, Muller A, Bluhmki E. Risk factors for severe hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a secondary analysis of the European-Australasian Acute Stroke Study (ECASS II). *Stroke.* 2001;32(2):438-41.
60. 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.
61. Catanese L, Tarsia J, Fisher M. Acute Ischemic Stroke Therapy Overview. *Circ Res.* 2017;120(3):541-58.
62. Wahlgren N, Moreira T, Michel P, Steiner T, Jansen O, Cognard C, et al. Mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke: Consensus statement by ESO-Karolinska Stroke Update 2014/2015, supported by ESO, ESMINT, ESNR and EAN. *Int J Stroke.* 2016;11(1):134-47.
63. Rajashekar D, Liang JW. Intracerebral Hemorrhage. *StatPearls. Treasure Island (FL)2021.*
64. Csiba L. FI. Fejezetek a neurológiából: Debreceni Egyetemi Kiadó; 2016. 294 p.
65. Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2001;344(19):1450-60.
66. 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.

67. Hostettler IC, Seiffge DJ, Werring DJ. Intracerebral hemorrhage: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother*. 2019;19(7):679-94.

68. Társaság MS. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja Cerebrovaszkuláris betegségekről. *Egészségügy Közlöny*. IX.2010. p. 2785-920.

69. Leary OP, Merck LH, Yeatts SD, Pan I, Liu DD, Harder TJ, et al. Computer-Assisted Measurement of Traumatic Brain Hemorrhage Volume Is More Predictive of Functional Outcome and Mortality than Standard ABC/2 Method: An Analysis of Computed Tomography Imaging Data from the Progesterone for Traumatic Brain Injury Experimental Clinical Treatment Phase-III Trial. *J Neurotrauma*. 2021;38(5):604-15.

70. 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.

71. 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.

72. 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.

73. European Stroke Organisation Executive C, Committee ESOW. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis*. 2008;25(5):457-507.

74. 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.

75. 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.

76. 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.

77. Rankin J. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60. II. Prognosis. *Scott Med J*. 1957;2(5):200-15.

78. National Institute of Neurological D, Stroke rt PASSG. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333(24):1581-7.
79. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet.* 1998;352(9136):1245-51.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. Chesher D. Evaluating assay precision. *Clin Biochem Rev.* 2008;29 Suppl 1:S23-6.
84. Mrozinska S, Cieslik J, Broniatowska E, Malinowski KP, Undas A. Prothrombotic fibrin clot properties associated with increased endogenous thrombin potential and soluble P-selectin predict occult cancer after unprovoked venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2019;17(11):1912-22.
85. Jolugbo P, Ariens RAS. Thrombus Composition and Efficacy of Thrombolysis and Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 2021;52(3):1131-42.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. 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.

90. 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.
91. Varju I, Kolev K. Networks that stop the flow: A fresh look at fibrin and neutrophil extracellular traps. *Thromb Res*. 2019;182:1-11.
92. Bustamante A, Mancha F, Macher HC, Garcia-Berrocso T, Giralt D, Ribo M, et al. Circulating cell-free DNA is a predictor of short-term neurological outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *J Circ Biomark*. 2016;5:1849454416668791.
93. Vajpeyee A, Wijatmiko T, Vajpeyee M, Taywade O, Pandey S, Chauhan PS. Clinical Usefulness of Cell-Free DNA as a Prognostic Marker in Acute Ischemic Stroke. *Neurologist*. 2020;25(1):11-3.
94. O'Connell GC, Petrone AB, Tennant CS, Lucke-Wold N, Kabbani Y, Tarabishy AR, et al. Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation. *Brain Inj*. 2017;31(10):1369-75.
95. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev Cell*. 2018;44(5):542-53.
96. 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.
97. Komissarov AA, Florova G, Idell S. Effects of extracellular DNA on plasminogen activation and fibrinolysis. *J Biol Chem*. 2011;286(49):41949-62.
98. 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.
99. Echouffo-Tcheugui JB, Woodward M, Kengne AP. Predicting a post-thrombolysis intracerebral hemorrhage: a systematic review. *J Thromb Haemost*. 2013;11(5):862-71.
100. 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.
101. Geddings JE, Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost*. 2014;111(4):570-4.

TÁRGYSZAVAK

Akut iszkémiás stroke

Nem traumás intracerebrális vérzéses stroke

Alvadék lízis vizsgálat

Módosított alvadék lízis vizsgálat

Neutrofil extracelluláris csapda

Trombolízis

Kimenetel

Súlyosság

KEY WORDS

Acute ischemic stroke

Non traumatic intracerebral hemorrhagic stroke

Clot lysis assay

Modified clot lysis assay

Neutrophil extracellular traps

Thrombolysis

Outcomes

Severity

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Bagoly Zsuzsának, a PhD tanulmányom során nyújtott rengeteg segítségért, támogatásért és bizalomért, illetve a PhD értekezésem elkészüléséhez nyújtott hozzájárulásért. Hálával tartozom neki azért a szakmai tudásért, amit átadott nekem, hogy lehetőséget teremtett nemcsak a kutatómunkába, hanem az oktatómunkába történő becsatlakozásba, ezzel is fejlesztve engem, mind szakmailag, mind emberileg.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Muszbek Lászlónak, és Dr. Bereczky Zsuzsannának, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a Klinikai Laboratóriumi Tanszéken kutatómunkám elvégzésére.

Köszönet illeti Prof. Dr. Csiba Lászlót, hogy elősegítette PhD munkámat a Neurológiai Klinikával történő kollaboráció során a klinikai vizsgálatok megszervezéséért, a betegminták és betegadatok szolgáltatásáért, valamint köszönöm Dr. Szegedi István neurológus PhD hallgatónak, és Dr. Árokszállási Tamás neurológus szakorvosnak, hogy mindig a segítségemre voltak, ha kérdésem merült fel a klinikai vizsgálatokkal kapcsolatban.

Köszönettel tartozom minden társszerzőnek, akik segítettek abban, hogy a disszertációm alapjául szolgáló közlemények megszülethessenek.

Köszönöm a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék valamennyi analitikusának, Sarkady Ferencnek, Haramura Gizellának, Szabó Zsuzsannának és Molnár Évának a munkám során nyújtott szakmai tanácsadást és a módszerek elsajátításában nyújtott segítséget.

Köszönet illeti Baráth Barbarát a doktori iskolával kapcsolatos adminisztratív ügyekben nyújtott segítségéért, valamint a PhD éveim alatt nyújtott baráti támogatásért és ösztönzésért.

Legfőképpen hálával tartozom férjemnek a folyamatos támogatásért, szeretetért, türelemért és a biztos háttérért, amit nyújtott nekem tanulmányaim során.

Köszönöm szüleimnek és testvéreimnek, hogy mindig kiálltak mellettem és támogattak mindenben az életem során, nélkülük ez a disszertáció nem jöhetett volna létre.

A tanulmányok megvalósulását, és a megjelent publikációk létrejöttét az alábbi pályázati támogatások tették lehetővé:

OTKA K120042, FK128582, GINOP-2.3.2-15-2016-00048 és GINOP-2.3.2-15-2016-00043
ELKH-DE Cerebrovaszkuláris és Neurodegeneratív Kutatócsoport, ÚNKP-19-3-DE-I-108,
EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009.

FÜGGELÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/397/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Orbán-Kálmándi Rita Angéla
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Orbán-Kálmándi, R. A.**, Szegedi, I., Sarkady, F., Fekete, I., Fekete, K., Molnárné 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-92041-1>
IF: 4.379 (2020)
2. **Orbán-Kálmándi, R. A.**, 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2021.613441>
IF: 4.003 (2020)

További közlemények

3. Szegedi, I., **Orbán-Kálmándi, R. A.**, Nagy, A. C., Sarkady, F., Molnárné 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0254253>
IF: 3.24 (2020)
4. Bagoly, Z., Baráth, B., **Orbán-Kálmándi, R. A.**, 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11030347>
IF: 4.879 (2020)





5. Árokszállási, T., Héja, M., Bagoly, Z., Kovács, K. B., **Orbán-Kálmándi, R. A.**, 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: 4.003 (2020)
6. Szegedi, I., **Orbán-Kálmándi, R. A.**, 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9103137>
IF: 4.241
7. Bagoly, Z., Hajas, O., Urbancsek, R., Kiss, A., Fiak, E., Sarkady, F., Tóth, N. K., **Orbán-Kálmándi, R. A.**, Kovács, K. B., Nagy, L., Nagy, A. C., 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9093050>
IF: 4.241
8. Bagoly, Z., Szegedi, I., **Orbán-Kálmándi, R. A.**, Tóth, N. K., 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2019.00513>
IF: 2.889

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,875

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 8,382

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.



Debrecen, 2021.08.09.