

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Fibrinolízis inhibitorok hatása az intravénás trombolízis
kimenetelére akut iszkémiás stroke-ot szenvedett
betegekben**

Székely Edina Gabriella

Témavezető: Dr. Bagoly Zsuzsa



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

**FIBRINOLÍZIS INHIBITOROK HATÁSA AZ INTRAVÉNÁS
TROMBOLÍZIS KIMENETELÉRE AKUT ISZKÉMIÁS STROKE-OT
SZENVEDETT BETEGEKBEN**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a klinikai orvostudományok
tudományágban

Írta: Székely Edina Gabriella okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája (Hemosztázis és vaszkuláris
biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Csósz Éva, MTA doktora

Dr. Bodó Imre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, MTA doktora

tagok: Dr. Kerényi Levente, PhD

Dr. Oláh Zsolt Csaba, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet A épület,
tanterme, 2025 február 26., 11:00.

BEVEZETÉS

Az akut iszkémiás stroke (AIS) világszerte a vezető halálokok közé sorolható, és a felnőttkori rokkantság leggyakoribb oka. A trombus mesterséges lízise (trombolízise) forradalmasította az AIS kezelését és napjainkban a trombus oldására szolgáló rekombináns szöveti plazminogén aktivátor (rt-PA) kezelés a leghatékonyabb gyógyszeres terápia AIS esetén. Annak ellenére, hogy az rt-PA csak egy relatíve rövid időablakban alkalmazható, bevezetését követően azonnal egy valóban hatásos terápiás lehetőség lett egy olyan betegség esetén, ahol korábban a gyógyító eszköztár legfeljebb a rehabilitációban és a másodlagos szövődmények elkerülésében merült ki. A trombolitikus szerek közül a sztreptokinázt már az 1970-es évek óta tesztelték ugyan, de az eredmények rendszerint kiábrándítóak voltak a súlyos vérzéses szövődmények miatt. Az 1980-as években a neurológusok elkezdték vizsgálni az rt-PA-t, és egy úttörő tanulmányban Zivin és munkatársai ígéretes adatokat közöltek a használatáról. Jelenleg AIS esetén az egyetlen törzskönyvezett trombolitikus szer továbbra is az rt-PA, mely ugyan biztonságos és hatékony az esetek többségében, azonban a terápia legfőbb mellékhatása az akár végzetes kimenetelű intracerebrális vérzés, amely a betegek mintegy 3-40 %-a esetén fordul elő. Másfelől, az esetek többségében a terápia hatástalan, a vérrögöt nem sikerül oldani és így a klinikai javulás elmarad. Napjainkban még mindig keveset tudunk arról, hogy miért alakul ki vérzéses szövődmény egyeseknél és miért lesz hatástalan a terápia másoknál. A komplikációk előre nem megjósolhatók és kialakulásuk okait általában utólag sem lehet magyarázni. Feltételezhetjük, hogy a terápia kimenetele ill. a vérzéses szövődmények kialakulása összefüggésben lehet a lizálandó alvadék szerkezetével és a fibrinolízis ellen védelmet nyújtó fehérjék szintjével. A legfőbb fibrinolízis inhibitorok, melyek potenciális szerepe felmerül ebben a folyamatban, a véralvadás XIII-as faktora (FXIII), és az α 2-plazmin inhibitor (α 2-PI), de további fibrinolízist gátló fehérjék szerepe sem kizárható (pl. plazminogén aktivátor inhibitor-1, trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor). A téma társadalmi jelentősége és fontossága ellenére ez a kutatási terület erősen alulreprezentált. Mindezt bizonyítja egy nemrégiben publikált szisztematikus összefoglaló közlemény, melyben több, mint 6000 közlemény elemzése során csak négy olyat találtak, ahol a szerzők legalább 100 AIS beteg bevonásával vizsgálták a hemosztázis egyes elemeit trombolízis előtt vett vérmintákból. A fibrinolízis regulátorok trombolízisben betöltött szerepének jobb megismerése fontos lehet a jövőben az AIS betegek hatékonyabb kezelésének céljából: egyrészt az ismeretek irányt szabhatnak az új típusú gyógyszeres kezelések kifejlesztéséhez, másfelől olyan tényezőkre is fény derülhet, melyek kapcsán lehetőség nyílhat

az olyan betegek identifikálására még a terápia adása előtt, akikben nagy eséllyel alakulhat ki vérzéses szövődmény. Napjainkban a nagyérelzáródások során alkalmazható mechanikus trombektómia ill. kombinálása rt-PA kezeléssel új távlatokat nyitott, de továbbra is csak specializált centrumokban, kevés beteg számára elérhető. Annak ismerete, hogy milyen hemosztázis tényezők befolyásolják a trombolízis kimenetelét, hosszú távon hozzájárulhat a diagnosztikai eszköztárunk bővüléséhez, segítve a klinikai döntéshozatalt, a biztonságosabb és hatékonyabb terápiás gyakorlat érdekében.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A fibrinolízis

A fibrin - mint a véralvadási kaszkád elsődleges terméke és a fibrinolízis végső szubsztrátja - központi szerepet tölt be a hemosztázis folyamatában. A fibrin képződését a trombin katalizálja, azáltal, hogy kiasítja a fibrinopeptideket a fibrinogénből. A szolubilis fibrin polimerizáció révén oldhatatlanná válik, és szerkezetét az aktivált XIII-as faktor (FXIIIa) keresztkötések révén stabilizálja. A keresztkötött fibrinalvadék lokalizált, megfelelő időben történő lebontásáért a fibrinolitikus rendszer felelős, melynek központi proteáza a plazmin. A fibrinolízis hatékonyságát *in vivo* nagymértékben befolyásolják a fibrinalvadék szerkezetét meghatározó biokémiai tényezők, a véralvadékban lévő sejtes elemek, és az általános biokémiai környezet. A fibrinolitikus rendszer szabályozása, akárcsak az alvadási kaszkádé, kofaktorok, receptorok és inhibitorok finoman összehangolt rendszere révén valósul meg.

A fibrinolízis központi enzime a szerin proteázok csoportjába tartozó plazmin. A plazmin inaktív zimogén formája, a plazminogén túlnyomórészt a májban szintetizálódik és ~150 µg/ml koncentrációban kering a plazmában. A plazminogén szerkezetileg egy N-terminális Pan-apple doménből (PAp), 5 kringle (perec) doménből és egy szerin proteáz doménből áll. A kringle domének C-terminális lizin-reziduumok megkötésére alkalmas motívumot tartalmaznak. Ezek a lizin-kötő domének közvetítik a fehérje specifikus kölcsönhatásait a fibrinnel, sejt felszíni receptorokkal és más fehérjékkel, inhibitorokkal. A PAp domén vagy aktivációs peptid fontos szerepet játszik a plazmin aktivitásának és aktivációjának szabályozásában, jelenlétében a plazminogén zárt konformációban található. A nyitott konformáció a domén plazmin által történő hasításával, vagy lizinnek/lizin-analógoknak a lizin-kötő doménekhez való kötődésével stabilizálható. A plazminogén aktivációját fiziológiás körülmények között plazminogén aktivátorok katalizálják. Az aktiváció során a plazminogén C-terminális régiójában az 560-561 pozícióban lévő Arg-Val peptidkötés hasításával a katalitikus triád hozzáférhetővé válik a szerin proteáz doménben.

A két fiziológiás plazminogén aktivátor a szerin proteázok csoportjába tartozó urokináz típusú plazminogén aktivátor (u-PA) és a szöveti típusú plazminogén aktivátor (t-PA). A t-PA-t elsősorban az endotélsejtek szintetizálják és szekretálják, míg az u-PA-t monociták, makrofágok, renális epithel sejtek és egyes daganatsejtek termelik. A specifikus inhibitorok

magas koncentrációi miatt mindkét aktivátor rendkívül rövid felezési idővel rendelkezik a keringésben, féléletidejük mindössze 4-8 perc.

A t-PA fibrin hiányában gyenge affinitással kötődik a plazminogénhez. A plazminogén lizinkötő doménje és a fibrinogén C-terminálisán található lizinek közötti interakció több százszorosára növeli a plazminogén aktiváció hatékonyságát. A képződő plazmin által vezérelt fibrin degradáció újabb C-terminális lizin maradékokat eredményez, ezáltal még több kötőhelyet biztosít a plazminogénnek és a t-PA-nak, pozitív visszacsatolási mechanizmust hozva létre. A t-PA révén kialakuló plazminogén aktiváció leginkább az érpályán belüli fibrin degradációt segíti: megakadályozza az intravaszkuláris fibrin szükségtelen felhalmozódását és lehetővé teszi a már kialakult alvadékok eltávolítását. A t-PA-val ellentétben az u-PA nem rendelkezik fibrin kötőhellyel. Specifikus sejtfelszíni u-PA receptorokhoz kötődve elsősorban a sejtfelszínhez kötött plazminogént aktiválja. A sejtfelszínen aktivált plazmin fontos szerepet játszik az extracelluláris mátrix lebontásában és egyes növekedési faktorok aktiválásában, így az u-PA fiziológias körülmények között az intravaszkuláris fibrin lebontásban nem vesz részt. A fibrinolitikus rendszer proteázainak működése számos endogén inhibitor által biztosított szigorú szabályozás alatt áll. A plazminogén aktivátorokat és magát a plazmint a keringésben mindig túlsúlyban lévő szerin proteáz inhibitorok, másnéven szerpinek semlegesítik. A plazminogén aktivátorok legfőbb fiziológias inhibitora a t-PA-t és u-PA-t egyaránt hatékonyan gátló plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1). A PAI-1 egy 45 kDa nagyságú egyláncú glikoprotein, mely a fibrinolitikus rendszer kulcsfontosságú regulátora. Számos szövet- és sejttypusban termelődik, többek között a májban, lépben, endotélsejtekben, simaizom sejtekben, makrofágokban illetve adipocitákban. A keringő vérlemezkék is folyamatosan szintetizálják a PAI-1-et, így a trombocita aktiváció során felszabadulva akár tízszeresére emelkedhet a PAI-1 lokális koncentrációja, mérsékelve a fibrinolízist a véralvadás kezdetén. A PAI-1 termelődését és szekrécióját számos genetikai faktor és különböző állapotok, pl. inzulin rezisztencia, elhízás, plazma lipidek szintje, valamint a cirkadián ritmus is befolyásolja. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy több gyulladáscsökkentő citokin, egyes növekedési faktorok, hormonok, a glükóz és endotoxinok is stimulálják a PAI-1 expresszióját. Az elsőként placentából kinyert PAI-2 gyengébb inhibitor tulajdonságokkal rendelkezik, elsősorban az u-PA gátlásában vesz részt hatékonyan. A PAI-2 egészséges egyénekben lényegében nem mutatható ki, de a terhesség alatt plazmakoncentrációja drasztikusan megemelkedik.

Az aktivált plazmin legfőbb természetes inhibitora az α 2-PI. Az α 2-PI gyorsan és irreverzibilisen kötődik a szabad plazminhoz 1:1 arányú stabil, inaktív plazmin-antiplazmin

komplexet képezve. A fibrinhez kötött plazmin védett az α 2-PI gátló hatásával szemben, biztosítva a fibrin proteolitikus lebontását.

A fibrinolízis nem szerpin-függő szabályozása többek között a trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor (TAFI) révén valósul meg. A TAFI-t a máj és a megakariociták inaktív zimogénként szintetizálják. A proenzimet a trombin, a trombin-trombomodulin komplex vagy a plazmin alakítja át funkcionálisan aktív formává. A TAFI 4-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációban van jelen a keringésben. Aktív formája egy karboxipeptidáz, amely eltávolítja a fibrin C-terminális lizin- és arginin-oldalláncait, ezáltal csökkenti a rendelkezésre álló plazminogén kötőhelyek számát, lelassítva a plazmin képződését és ezáltal stabilizálva az alvadéket.

Az α 2-PI és főbb polimorfizmusai

Az α 2-PI-t először 1976-ban írta le három különböző kutatócsoport (Mullertz, Moroi és Collen és munkatársai) a plazmin gyorsan ható inhibitoraként. Ennek köszönhetően a szakirodalomban három eltérő elnevezés is használatos: α 2-plazmin inhibitor, antiplazmin és elsődleges plazmin inhibitor. Az emberben az α 2-PI szintézisének elsődleges helye a máj, de kisebb mértékben a vesében, a vérlemezkékben, a gyomor-bél traktusban, az izmokban, a tüdőben, a méhlepényben és az agyban (agykéreg, hippocampus és kisagy) is termelődik. Alzheimer-kórban szenvedő betegekben megnövekedett expressziója az amiloid β plakkokhoz köthető. Az α 2-PI körülbelül 70 kDa méretű, 464 aminosavból álló egyláncú polipeptidként szekretálódik a plazmába. Az α 2-PI egyedi szerkezeti elemeket mutató szerpin, mely egy 12 aminosavból álló N-terminálissal, központi szerpin doménnel és egy \sim 55 aminosav hosszúságú C-terminális farokkal rendelkezik.

A keringésbe kerülve mind az amino-terminális, mind pedig a karboxi-terminális rész proteolitikus módosításokon esik át. Ennek következtében négy heterogén, eltérő aktivitású α 2-PI izoforma jön létre. A szekretálódó fehérje N-terminálisán metionint hordoz (Met- α 2-PI). A keringésbe kerülve azonban az α 2-PI körülbelül 70%-a egy olyan proteolitikus hasításon megy keresztül, amely során az antiplazmin hasító enzim (APCE) az amino-terminális vég felől eltávolít egy 12 aminosavból álló oligopeptidet. Lee és munkatársai kimutatták, hogy a hasított (Asn- α 2-PI) izoforma 13-szor gyorsabban inkorporálódik a fibrinszálak közé, mint a teljes hosszúságú Met- α 2-PI fehérje. Az α 2-PI fibrinhez történő keresztkötését az FXIIIa katalizálja, a keresztkött inhibitor ellenállóbbá teszi a fibrint a plazmin révén létrejött degradációval szemben. Mivel a Met- α 2-PI keresztkötsége lassabban megy végbe, ezért ezen izoforma emelkedett szintje fokozott mértékű fibrinolízissel társul.

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

Az α 2-PI heterogenitását a felsorolt módosításokon kívül az azt kódoló SERPINF2 gén genetikai variációi is befolyásolják. Egy vérzésre hajlamos család vizsgálata során Lind és munkatársai az α 2-PI gén 3 polimorfizmusát azonosították. Ezek egyike a Met- α 2-PI gén 6. aminosavát kódoló nukleotidokat érintő C/T egyponos nukleotid polimorfizmus (SNP) volt, ami arginint vagy triptofánt eredményezhet a hatos pozícióban. A tanulmány továbbá igazolta, hogy mindkét forma előfordul egészséges humán plazmában. Christiansen és munkatársainak sikerült bizonyítani, hogy a p.Arg6Trp egy funkcionális polimorfizmus, ami befolyásolja a Met- α 2-PI átalakulását az Asn- α 2-PI formává, ezáltal befolyásolja az α 2-PI fibrinbe való beépülésének sebességét. Kimutatták, hogy az N-terminális hasítást végző APCE körülbelül nyolcszor gyorsabban hasítja a Met- α 2-PI (Arg6) formát, mint a triptofánt hordozó Met- α 2-PI-t, és az argininra nézve homozigóta egyénekben a legnagyobb az N-terminális proteolízis mértéke. A p.Arg6Trp polimorfizmus patofiziológiai ill. klinikai jelentősége jelenleg még kutatások tárgyát képezi. Intézetünk egyik munkacsoportja korábban úgy találta, hogy a Trp allél jelenléte nem befolyásolta a vénás trombózisok kialakulásának kockázatát. Bridge és munkatársai a p.Arg6Trp polimorfizmus és a hasi aorta aneurizma kialakulása közötti összefüggéseket vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy Trp allél hordozása kismértékben, de nem szignifikánsan csökkenti az aneurizma kialakulásának kockázatát. Eredményeik azt mutatták, hogy az α 2-PI egy másik polimorfizmusa (p.Arg407Lys) azonban szignifikánsan összefügg az hasi aorta aneurizma kialakulásával, a Lys407-t hordozókban 23%-kal csökkentve annak kockázatát.

A FXIII és főbb polimorfizmusai

A FXIII, más néven fibrin stabilizáló faktor, a koagulációs kaszkád utolsó alvadási faktora, egyben a fibrinolízis egyik legfőbb inhibitora. Fiziológias funkciója a fibrin keresztkötésekkel történő stabilizálása és ellenállóvá tétele a fibrinolízis gyors hatásával szemben. A plazmában

található FXIII heterotetramer szerkezetű (FXIII-A₂B₂), 325 kDa molekula tömegű fehérje. A tetramert két potenciálisan katalitikus A alegység (FXIII-A) és két hordozó/gátló B alegység (FXIII-B) alkotja. Fiziológiás körülmények között a plazmában mért koncentrációja 14-28mg/L, ahol az inaktív fehérje fibrinogénhez kötött formában kering. A FXIII-A csontvelői eredetű sejtekben, míg a FXIII-B hepatocitákban termelődik, az alegységekből a plazmában alakul ki a tetramer szerkezet. A feleslegben rendelkezésre álló B alegység körülbelül 50%-a szabad, nem komplex formában fordul elő a plazmában. A FXIII celluláris formája csupán a két potenciálisan katalitikus alegységből (FXIII-A₂) áll, mely számos sejtípus citoplazmájában megtalálható (pl. monocitákban/makrofágokban, vérlemezkékben, oszteoblasztokban). A vérlemezkékben a FXIII-A₂ mennyisége 46-82 fg/trombocita, ami az összes vérlemezkefehérje 3%-ának felel meg. A FXIII a transzglutaminázok családjába tartozó zimogén (protranszglutamináz). A katalitikus A alegységet 5 domén építi fel: a 37 aminosav hosszúságú N-terminális aktivációs peptid domén, egy β-szendvics, egy katalitikus központi domén, és két β-hordó domén. A katalitikus domén hordozza az enzimreakcióért felelős katalitikus triádot, ami az inaktív enzimben a szubsztrát számára hozzáférhetetlen. A B alegység egy kb. 8,5% szénhidrátot tartalmazó glikoprotein, mely összesen tíz, egyenként két diszulfid-híddal stabilizált, ún. sushi doménből áll. A B alegység protektív szerepet tölt be, gátolja a katalitikus alegység degradációját, ezáltal annak élettartamát 3 napról 11 napra növeli. Korábbi kutatási eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a fibrinogén és az FXIII-A₂B₂ zimogén közötti kölcsönhatást a FXIII-B alegységek közvetítik. A plazmában található FXIII protranszglutamináz aktivációja a véralvadási kaszkád utolsó lépésében történik, a trombin és a Ca²⁺ összehangolt hatása révén alakul át a fehérje aktív transzglutaminázzá. Első lépésként az FXIII-A alegységek N-terminálisáról a trombin lehasítja az aktivációs peptidet. Ezt követően Ca²⁺ hatására a B alegységek disszociálnak, majd a hasított katalitikus alegység konformációváltáson megy keresztül. Ennek hatására az aktív hely hozzáférhetővé válik, kialakul az aktív forma (FXIIIa). A fibrin jelenléte 80-100-szorosra gyorsítja az aktivációs folyamatot, a plazmában pedig az újonnan képződött fibrin felületén aktiválódik a FXIII. FXIII-B hiányában a FXIII celluláris formája nem igényel proteolitikus hasítást, az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedése elegendő az aktív konfiguráció létrejöttéhez. A FXIIIa egy acil-transzfer reakciót katalizál, amelyben az acil donor egy peptidláncban található glutamin γ-karboxamid-csoportja, az acil akceptor egy primer amin. A folyamatban a primer amin izopeptid kötéssel kovalensen kapcsolódik a γ-glutamil oldallánchoz. Ha a primer amin egy peptidben/fehérjében lévő lizin ε-amino csoportja, az FXIIIa intermolekuláris ε-N-(γ-glutamil)-lizil keresztkötés révén kovalensen keresztköti a két polipeptid láncot.

A FXIIIa meghatározó szerepet tölt be fibrinolízis szabályozásában. Antifibrinolitikus hatása 3 fő mechanizmus révén valósul meg. Egyrészt a FXIIIa kovalens keresztkötések révén beépíti az α 2-PI-t és más plazmakomponenseket a képződő fibrin alvadékba, ezáltal hatékony védelmet nyújt az idő előtti plazmin közvetített proteolitikus fibrinbontással szemben. Másrészt katalizálja fibrin α - és γ -láncainak keresztkötését. A keresztkötés mechanikusan stabilizálja a fibrin alvadékot a véráramlás okozta nyírófeszültséggel szemben és közvetlenül befolyásolja a fibrin alvadék fibrinolízissel szembeni érzékenységét. Harmadrészt, a fibrin α -láncok C-terminális lizinjeinek keresztkötése következtében csökken a plazminogén és t-PA számára elérhető kötőhelyek száma a fibrinen, tehát csökken a plazminogén aktiváció mértéke. A FXIII hiány következtében vérékenység alakul ki, mely a deficiencia mértékétől függően súlyos, akár életveszélyes is lehet. Veleszületett forma esetén jellegzetes a köldökcsomk elhúzódo vérzése, lassú sebgyógyulás, de jellemző a bőr-, izom-bevérzések, nyálkahártyavérzések kialakulása, továbbá rettegett következményként igen súlyos, akár végzetes intrakraniális vérzés is kialakulhat.

A humán FXIII-A-t kódoló gén (F13A1) több mint 160 kb méretű, és a 6p24–25 kromoszómán lokalizálódik. A FXIII-B-t (F13B) kódoló gén 28 kb hosszú; az 1q31-32.1 kromoszómán található, és 12 exonból és 11 intronból áll. Öt gyakori kódoló polimorfizmust azonosítottak az A-alegységben (p.Val34Leu, p.Tyr204Phe, p.Pro564Leu, p.Val650Ile, p.Glu651Gln) és kettőt a B-alegységben (p.His95Arg és c. 1952 + 144 C > G a K intronban).

Az FXIII leginkább tanulmányozott polimorfizmusa a p.Val34Leu. Ez az SNP az A alegységet kódoló gén 103-as kodonját érintő G>T csere, melynek következménye a 34-es pozícióban található valin leucinra történő cseréje. A p.Val34Leu polimorfizmus az aktivációs doménon belül található trombin hasítási hely közelében helyezkedik el, ezáltal befolyásolja FXIII aktiváció sebességét. A Leu34 variáns esetében a trombin hasítás 2,5-szer gyorsabban megy végbe, így a Leu34 allél jelenléte fokozott FXIII aktivációval jár együtt. Ennek megfelelően a növekvő alvadékban gyorsabban megy végbe a fibrin keresztkötése. A polimorfizmus hatással van a keresztkötött fibrinháló szerkezetére is, melyet a fibrinogén koncentrációja is befolyásol. Magas fibrinogén koncentráció mellett a Leu34 allélre homozigóta egyénekben vastagabb fibrinrostokkal, lazább szerkezettel és fokozott permeabilitással jellemezhető alvadék alakul ki, mely a fibrinolízissel szemben kevésbé ellenálló. A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus és a vénás ill. artériás trombózisok kialakulásának rizikójával az elmúlt két évtizedben számos tanulmány foglalkozott, melyek eredményei gyakran voltak ellentmondásosak. E vizsgálatok metaanalízise arra utal, hogy a 34Leu allél jelenléte kismértékű, de szignifikáns védelmet nyújt

a koszorúér-betegség és a vénás tromboembóliák kialakulásával szemben, ugyanakkor nem tűnik jelentős védő- vagy kockázati tényezőnek iszkémiás stroke kialakulására nézve.

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

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

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

Az iszkémiás stroke trombolitikus kezelése

A stroke definíció szerint az agyműködés vérellátási zavara által okozott, fokális (vagy globális) zavarral jellemezhető, gyorsan kialakuló klinikai tünetegyüttes, amely több mint 24 órán keresztül áll fenn vagy halált okoz, és amelynek bizonyíthatóan nincs más oka, mint az agyi érrendszerben kialakult elváltozás. A stroke az egyik legfontosabb és legsúlyosabb érrendszeri betegség, mely a mortalitási statisztikák élén áll világszerte. Mivel a stroke a felnőttkori rokkantság vezető oka, társadalmi-gazdasági terhe az összes vaszkuláris betegség között a legnagyobb. Ezért rendkívül fontos a stroke korai felismerése és gyors kezelése a morbiditás és

mortalitás megelőzése vagy minimalizálása érdekében. A patomechanizmus alapján leggyakrabban előforduló heveny agyi érkatasztrófák iszkémiás eredetűek, melyek az összes akut stroke 80%-át teszik ki. A fennmaradó mintegy 20%-ban vérzéses kóreredit áll a tünetek hátterében. A vérzéses stroke-on belül két fő altípust különböztethetünk meg: intracerebrális vérzés (ICH) (15%) és subarachnoideális vérzés, mely utóbbi az összes stroke esetek körülbelül 5%-át teszi ki.

Az iszkémiás stroke az agy körülírt területeinek hirtelen kialakuló funkcionális károsodása, amely úgy jön létre, hogy a kérdéses agyi régió vérellátását biztosító erekben akadály keletkezik. Az AIS esetek kb. 45%-a lokális ateroszklerózis talaján alakul ki, trombotikus eredetű. Az esetek jelentős részében az intrakraniális nagyerek érintettsége figyelhető meg, ahol a ruptúrált ateroszklerotikus plakkok felszínén alakul ki a trombus. A trombotikus stroke másik típusa a kis agyi erek elzáródásával jár. Ezek az ún. lakunáris stroke-ok általában hipertóniás előzmény talaján alakulnak ki. Amennyiben az artéria elzáródását pitvarfibrilláció során keletkező trombus, a carotis nyaki szakaszából, esetleg a felszálló aortából származó trombus embolizációja okozza, kardioembóliás stroke-ról beszélünk, mely az összes iszkémiás stroke kb. 20%-t adja. Az iszkémiás stroke-ok 20-30%-a kriptogén, azaz az infarktus nem köthető definitív embóliaforráshoz, nagyér-ateroszklerózishoz vagy kísérbetegséghez. A fentiek alapján az iszkémiás stroke etiológiai altípusai a klasszikus TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) kritérium rendszer szerint az alábbi etiológiai csoportba sorolhatóak: nagyartériás ateroszklerózis, kardioembólia, kísérelzáródás (lakunáris stroke), egyéb meghatározott patogenezisű, illetve kriptogén stroke.

Az iszkémiás stroke esetek súlyosságának objektív felmérésére a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) skálarendszert alkalmazzák. A NIHSS pontszámok növekedése jelzi a neurológiai deficit mértékét, korrelál a stroke súlyosságával és tükrözi a klinikai státuszt. Az NIHSS pontszám előrejelzi a klinikai kimenetelt és a magas pontszám felhívja a figyelmet a jövőben kialakuló szövődmények fokozott kockázatára. A stroke súlyosságának radiológiai felmérésére többféle pontrendszert alkalmaznak. Az Alberta Stroke Program Early CT Score (ASPECTS) az arteria cerebri media területi iszkémiás stroke kiterjedésének meghatározására használatos, 10 pontos kvantitatív rendszer. A rendszer az arteria cerebri media ellátási területét 10 szegmentumra osztja fel: 1 pont kerül levonásra, ha egy adott szegmentumban megfigyelhető iszkémiás lézió. A felvételi CT vizsgálat során a ≤ 7 pont a kedvezőtlen funkcionális kimenetel prediktora intravénás trombolízis esetén.

AIS-t elszenvedők gyógyulási esélye az elzáródott ér viszonylag rövid időn belül történő sikeres megnyitásán múlik. A rekanalizáció történhet a trombus gyors gyógyszeres

feloldásával (trombolízis) és/vagy műtéti eltávolításával (mechanikus trombektómia). Magyarországon jelenleg az egyetlen trombolízisként alkalmazható törzskönyvezett készítmény AIS esetén az rt-PA (Alteplase, Actilyse; Boehringer Ingelheim). Az intravénás rt-PA-val történő trombolízis alkalmazására leginkább a tünetek megjelenését követő 4,5 órában van lehetőség a bevásztási és kizárási kritériumok alapján alkalmas lízis-jelölt stroke betegek számára, speciális képkötő vizsgálatok esetén 9 órára kitolható az időablak. Annak ellenére, hogy manapság ez egy rutinszerűen alkalmazott terápia, a szűk időintervallum miatt az AIS-ban szenvedő betegek többsége nem részesül ilyen kezelésben. Az irányelvek szerint a készítmény alkalmazása 0,9 mg/ttkg dózisban történik, maximálisan adható mennyisége 90 mg. Az AIS betegek a dózis első 10%-át bólusban, a fennmaradó 90%-ot pedig 60 perc alatt perfúzorban kapják. Számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy az időablakon belül elvégzett intravénás trombolízis szignifikáns neurológiai javulást eredményezett, azonban hatékonysága annál nagyobb, minél rövidebb a tünetek megjelenése és az rt-PA kezelés között eltelt idő. Annak ellenére, hogy az rt-PA kétségtelen előnyökkel jár az AIS kezelésében, a kedvező terápiás kimenetel a betegek mindössze ~30-40%-ánál figyelhető meg, nagyér okklúzió esetén pedig nagymértékben csökken a hatékonysága. A trombolízis terápia szövődeményeként a vérzési kockázat minimalizálása ellenére is a betegek körülbelül 3-40%-ban kialakul az iszkémiás stroke vérzéses transzformációja (vizsgálattól ill. definíciótól függően), mely az esetek felében tünetekkel jár és rontja a betegség kimenetelét, akár halálos szövődeményt is okozhat.

Napjainkban a mechanikus trombektómia néven ismert endovaszkuláris terápia a standard ellátás nagyérelzáródások esetén. A mechanikus rekanalizáció során az eret elzáró trombuszt katéteres úton távolítják el. A beavatkozás 6 órás időablakkal hatékonyan alkalmazható, de válogatott betegcsoportnál az időablak 24 órára bővíthető. A kezelés gyakorlati korlátja, hogy a stroke-betegeknek csupán csak ~20%-a szenved nagyérelzáródásban, és az ilyen betegek időablakon belüli ellátása kihívást jelent, mivel az eljárást csak magasan specializált centrumokban lehet elvégezni.

CÉLKITŰZÉS

Munkánk során célunk volt megvizsgálni, hogy a fibrinolízis legfontosabb inhibitorai közül a FXIII ill. az α 2-PI szintje és gyakori polimorfizmusai mutatnak-e összefüggést az intravénás trombolízis kimenetelével AIS betegeknél.

Részleteiben, prospektív obszervációs tanulmányok révén célul tűztük ki megvizsgálni, hogy:

1. Intravénás trombolízis kezelésben részesülő AIS-t elszenvedett betegek trombolízis előtti ill. trombolízis utáni plazmamintáiban hogyan változik a FXIII ill. az α 2-PI aktivitás és antigénszintje, és mutatnak-e összefüggést az eredmények a betegek kimenetelével és a vérzéses szövődmények kialakulásával.
2. A FXIII-A és FXIII-B alegységek gyakori polimorfizmusai (FXIII-A p.Val34Leu, p.Tyr204Phe és FXIII-B p.His95Arg, intron K c. 1952 + 144 C > G) ill. az α 2-PI p. Arg6Trp polimorfizmusok befolyásolják-e a trombolízis kimenetelét és a vérzéses szövődmények kialakulását.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Intravénás trombolízis kezelésben részesülő akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek vizsgálata

Betegek bevonása

Két prospektív obszervációs tanulmányt végeztünk. Mindkét tanulmány esetén a stroke kezdetétől számított legfeljebb 4,5 órán belül intravénás trombolízis kezelésben részesült AIS betegek kerültek beválogatásra a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikájával kollaborálva. Az első tanulmányba a betegek beválogatása 2011 márciusában kezdődött, és 2013 januárban ért véget, a második tanulmány esetén a betegek beválogatása folytatódott és 2016 szeptember-2019 április között további betegek kerültek be a vizsgálatba. A betegek kezelése a vizsgálat teljes időtartama alatt egységes volt. Az intravénás trombolízist az Európai Stroke Organisation (ESO) 2008. évi rt-PA (Alteplase, Boehringer Ingelheim, Ingelheim an Rhein, Németország) kezelésre vonatkozó irányelvei szerint alkalmazták. A betegek beválogatási és kizárási kritériumai megegyeztek a trombolitikus terápia beválogatási és kizárási kritériumaival. A bevont betegek közül senki sem részesült mechanikus trombektómiában, a beavatkozás vagy nem volt elérhető a vizsgálati időszakban, vagy a beteg nem volt alkalmas a beavatkozásra. Az AIS jelenlétét a klinikai tünetek jelenléte és a képalkotó eljárások eredményei alapján diagnosztizálták nem kontrasztos számítógépes tomográfia (CT) és CT angiográfia (CTA) segítségével. A felvételtkor és a lízis után 24 órával készített CT-felvételeket három független radiológus egyidejűleg elemezte, és meghatározták az ASPECTS értéket. Minden betegnél regisztrálták a tünetek jelentkezésének időpontját, az alapvető demográfiai és klinikai jellemzőket (életkor, nem, BMI, korábbi gyógyszerek, cerebro- és kardiovaszkuláris rizikófaktorok jelenléte, pl. dohányzás). A stroke súlyosságát a National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) segítségével határozták meg a felvételtkor és a terápia utáni 7. napon. A stroke etiológiáját a TOAST kritériumrendszer alapján osztályozták. A betegek hosszú távú funkcionális kimenetelét 3 hónappal az eseményt követően a módosított Rankin Skála (mRS) használatával állapították meg.

A tanulmány során a következő kimeneteleket vizsgáltuk:

1. Rövid távú kimenetel az eseményt követő 7. napon: az NIHSS pontszám legalább 4 ponttal való csökkenését vagy 0-ra történő csökkenését értékeltük kedvező kimenetelként (neurológiai

javulás), míg az NIHSS pontszám legalább 4 ponttal történő növekedését kedvezőtlen kimenetelnek tekintettük.

2. Hosszú távú kimenetel az eseményt követő 90. napon: az mRS 0-1 értékeket definiáltuk kedvező hosszú távú kimenetelként.

3. Terápiával összefüggő intracerebrális vérzés (ICH): tünetet képző (SICH) vagy tünetmentes (aSICH) vérzés a European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) II kritériumai szerint, melyet minden beteg esetén a lízist követő napon (lehetőség szerint a 24. órában) CT-vizsgálatok segítségével igazoltak.

Etikai engedély

Mindkét tanulmány tervezése a Helsinkai 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 (engedély szám: 3287-2010 RKEB/IKEB, és 4672-2016 RKEB/IKEB és 12698-1/2017/EKU). A vizsgálatról a betegek vagy hozzátartozóik és az egészséges önkéntesek megfelelő tájékoztatásban részesültek és önkéntes, írásos beleegyező nyilatkozatot adtak a tanulmányban való részvételről.

Mintagyűjtés és laboratóriumi vizsgálatok

Minden betegtől perifériás vérmintát gyűjtöttünk felvételkor, az rt-PA infúzió megkezdése előtt és 24 órával a lízis után. A betegek egy részében (n=131, 2011-2013 között) közvetlenül az rt-PA teljes dózisának beadása után is történt mintavétel. A rutin laboratóriumi vizsgálatok (ionok, glükózsztint, vese- és májfunkciós vizsgálatok, nagy érzékenységű C-reaktív fehérje mérés, teljes vérkép) standard laboratóriumi módszerek segítségével történtek (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország és Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Németország) a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében.

A specifikus hemosztázis tesztek elvégzéséhez a 0,109 M nátrium-citrátot (Becton Dickinson, Franklin Lane, NJ) ill. nátrium-citrátot, teofillint, adenzint és dipyridamolt tartalmazó csövekbe (Vacutte CTAD tubes, Greiner Bio-One, Ausztria) gyűjtött vérmintákat a mintavételt követően 1 órán belül feldolgoztuk (kétszer centrifugáltuk 1500 g-vel, szobahőmérsékleten 15 percre). A véralvadás szűrővizsgálatai (protrombin idő, aktivált parciális tromboplastin idő és trombin idő) és a fibrinogén szint Clauss módszer szerinti meghatározása BCS koagulométerrel

történtek a gyári protokoll lépéseit követve (Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország). Az FXIII aktivitás és antigén szintek, valamint az α 2-PI aktivitás és antigénszintek meghatározásához a citráttal alvadásgátolt plazmaminták alikvotjait egyedi kóddal jelöltük, és -80 °C-on tároltuk a mérések elvégzéséig.

FXIII aktivitás, FXIII-A₂B₂ antigénszintek és főbb FXIII polimorfizmusok meghatározása

A plazma FXIII aktivitás szinteket ammónia felszabaduláson alapuló teszttel határoztuk meg egy kereskedelmi forgalomban kapható reagenskészlettel (REA-chrom FXIII kit, Reanal-ker, Budapest, Magyarország, referencia tartomány: 69-143%, CV: 3,8%). A FXIII-A₂B₂ antigénszinteket szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg, amely a B-alegység elleni biotinizált monoklonális befogó antitestből és az A-alegység elleni peroxidázzal jelölt monoklonális antitestből állt (referencia tartomány: 14-28 mg/L, CV: 2,0%). A DNS izolálást a CTAD alvadásgátolt mintavételi csőbe vett vérminták buffy coatjából végeztük a QIAamp DNA Blood Mini Kit segítségével, a gyártó leírását követve (Qiagen, Hilden, Németország). A FXIII-A p.Val34Leu (c.103G>T; rs5985), FXIII-A p.Tyr204Phe (c.614A>T; rs3024477), FXIII-B p.His95Arg (c.344G>A; rs6003) és FXIII-B intron K (IVS11 c.1952+144C>G; rs12134960) polimorfizmusait tanszékünk laboratóriumában beállított valós idejű PCR-módszerekkel határoztuk meg fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) detektálás és olvadási görbe elemzése segítségével LightCycler® 480 készüléken (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország). Egy beteg esetén jelentősen alacsony felvételi FXIII szintet detektáltunk (<50%), akinél terápia asszociált vérzéses szövödmény alakult ki, ezért a F13A1 exonjaiban, az intron régióiban és a promóter régióiban lévő mutációk azonosítására Sanger szekvenálást végeztünk ABI3130 Genetic Analyzer and Sequencing Analysis 5.4 szoftver segítségével (Termo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).

α 2-PI aktivitás, α 2-PI antigénszintek és az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus vizsgálata

Az α 2-PI aktivitást fagyasztott plazmamintákból mértük kromogén tesztben BCS koagulométeren, a gyártó utasításait követve (Berichrom α 2-PI aktivitás, Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország). A vizsgálat elve a következő: az α 2-PI-t tartalmazó betegplazmát inkubáljuk a plazmin feleslegben tartalmazó reagenssel. A plazmin gyorsan inaktiválódik az α 2-PI hatására, és a maradék plazmin aktivitást a plazmin-specifikus

kromogén szubsztrát (D-norvalil-ciklohexilalanil-lizil-nitroanilid) hasításán alapuló amidolitikus tesztben mérjük. Az α 2-PI aktivitás fordítottan korrelál az abszorpció váltoásaival 405 nm-en. A totál α 2-PI antigénszintet a tanszékünkön beállított in house ELISA módszerrel mértük. Ez a vizsgálat az α 2-PI minden izoformáját kimutatja, és nem befolyásolja a PAP komplexek jelenléte (a plazma totál α 2-PI antigénszintjének referencia tartománya: 48-85 mg/L). Az α 2-PI p.Arg6Trp (rs2070863) polimorfizmust tanszékünk laboratóriumában beállított valós idejű PCR-módszerrel azonosítottuk FRET detektálással és olvadási görbe elemzésével LightCycler R 480 készüléken (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország).

Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzésére a Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 26.0 verzió, Chicago, IL) és a GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Inc., La Jolla, CA) szoftvereket használtunk. A tanulmányok során vizsgált adatok normalitásának meghatározására Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztunk. Folyamatos változók esetén két csoport közötti különbség meghatározására Student-féle t-próbát, vagy Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk, párosított adatok esetén párosított t-próbát vagy Wilcoxon párosított tesztet használtunk a normalitástól függően. Több csoport adatainak folyamatos változói esetén ANOVA tesztet Bonferroni post hoc teszttel, vagy Kruskal-Wallis tesztet és Dunn-féle post hoc tesztet használtunk a normalitás próba eredményeinek megfelelően. A folytonos változók közötti összefüggések erősségének vizsgálatához Pearson vagy Spearman féle korrelációs analízist alkalmaztunk. A kategorikus változók közötti különbségek vizsgálata χ^2 teszttel vagy Fisher-féle egzakt teszttel történt az esetszámoktól függően. A Kaplan–Meier módszert alkalmaztuk a betegek túlélési arányának ábrázolására az α 2-PI szintek függvényében. A túlélési görbéket a log-rank teszttel hasonlítottuk össze. Backward bináris logisztikus regressziós modelleket használtunk a mortalitás és a hosszú távú funkcionális kimenetel 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 a vizsgált kimenet szempontjából. A logisztikus regressziós analízis eredményeit esélyhányadosban (OR) és 95%-os konfidencia intervallumban (CI) fejeztük ki. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Intravénás trombolízissel kezelt akut iszkémiás stroke betegekben mért FXIII szintek ill. gyakori FXIII polimorfizmusok összefüggése a terápia kimenetelével

Vizsgálati populáció

Összesen 132 konsekutív, trombolízis kezelésben részesülő AIS beteget vontunk be a vizsgálatba. Az átlagéletkoruk $69,0 \pm 12,2$ év volt, 58,3%-uk férfi volt. A felvételi NIHSS pontszám mediánja 8-nak adódott (interkvartilis tartomány (IQR): 5–14). A TOAST kritériumok szerint a legtöbb beteg esetén a stroke etiológiája nagyér aterotrombózis volt ($n=49$, 37,1%). A tünetek megjelenésétől az rt-PA kezelésig eltelt idő átlaga kevesebb, mint 3 óra volt a kohorszban, és a trombolízis időtartama körülbelül egy óra volt minden egyes beteg esetében. Hét beteg esetében az intravénás trombolitikus kezelést az érvényben lévő standard protokoll szerint intraarteriális trombolízissel egészítették ki; az rt-PA végső dózisa és a trombolízis időtartama nem különbözött szignifikánsan ezeknél a betegeknél a vizsgálati csoport többi tagjához képest. Kedvező rövid távú és hosszú távú funkcionális kimeneteleket 53 (40,2%), illetve 46 (34,8%) esetben figyeltünk meg. A mortalitás a 7. napon, a 14. napon és az esemény utáni 3. hónap végére 5 (3,8%), 18 (13,6%) és 29 (22,0%) eset volt. A terápiával összefüggő vérzéses szövődményt 13 esetben észleltünk, mely 6 esetben tünetképző, 7 esetben pedig tünetmentes komplikáció volt.

A trombolízis hatása a FXIII szintekre

A betegek jelentős részénél ($n=39$, 29,5%) a felvételi FXIII szint referencia tartomány felett volt (felső határérték: 143% vagy 28 mg/l felett). A trombolízist követően a FXIII szint fokozatos csökkenése volt megfigyelhető, közvetlenül a trombolízis után, valamint 24 órával később szignifikánsan alacsonyabb FXIII szinteket detektáltunk a felvételi értékekhez képest. Erős korrelációt figyeltünk meg az FXIII aktivitás és a FXIII antigénszintek között minden vizsgált alkalommal (felvételi: Pearson $r=0,915$, $p<0,001$; közvetlenül trombolízis után $r=0,919$, $p<0,001$ és 24 órával az eseményt követően: $r=0,917$, $p<0,001$).

A felvételi FXIII szintek összefüggése a stroke súlyosságával és etiológiájával

A felvételi mért FXIII szintek nem mutattak összefüggést a stroke súlyosságával amennyiben az NIHSS szerinti kategóriákra osztottuk, továbbá nem volt megfigyelhető szignifikáns

korreláció a FXIII szintek és a felvételtkor meghatározott NIHSS pontszámok között sem (Pearson $r=-0,09$, $p=0,28$). A FXIII aktivitás szignifikánsan magasabb volt aterotrombotikus háttérű stroke esetén, mint kardioembóliás eredetű stroke esetén. A FXIII aktivitás és az antigénszintek gyenge negatív korrelációt mutattak a betegek életkorával (Pearson $r=-0,299$, $p<0,001$ és $r=-0,286$, $p<0,001$). Az FXIII antigén szintje szignifikánsan magasabb volt az aktív dohányzóknak, mint a nem dohányzóknak ($24,60$ mg/L vs. $21,15\pm 0,9$ mg/L, $p<0,05$). A FXIII szintek és a mért rutin klinikai kémiai, hemosztázis és hematológiai paraméterek között nem találtunk szignifikáns összefüggést. A FXIII szintek és az ASPECTS értékek között sem találtunk szignifikáns korrelációt egyik mintavételi időpont esetén sem. Nem volt összefüggés a felvételtkor mért FXIII aktivitás/antigén szintek és a tünetek megjelenésétől a trombolízis kezelésig eltelt idő között (FXIII aktivitás: $r=0,081$, $p=0,186$ és FXIII antigén szint: $r=0,061$, $p=0,251$).

A FXIII szintek és a trombolitikus terápia kimenetelének kapcsolata

A terápia megkezdése előtt, valamint közvetlenül a trombolízis után mért FXIII szintek nem mutattak összefüggést a rövid távú funkcionális kimenetekkel. Ezzel szemben, trombolízis után 24 órával szignifikánsan alacsonyabb FXIII szintet észleltünk azoknál a betegeknél, akik a kezelést követő első héten elhunytak. A FXIII szintek ezeknél a betegeknél feltűnően alacsonyak voltak, körülbelül 50%-kal alacsonyabbak a más kimenetelű betegeknél mért értékekhez képest. A mortalitás és az alacsony FXIII szint azonban nem járt együtt vérzéses szövődményekkel. Az egyéb kimenetelű betegek FXIII szintjei között nem volt szignifikáns különbség (kedvező kimenetel vs. nincs változás vagy kedvezőtlen kimenetel). A terápia után vérzést szenvedett betegeket az elemzés során külön kezeltük, a feltételezett eltérő patomechanizmusok miatt.

Az alacsony FXIII szintek és az eseményt követő 14. napi mortalitás között szintén összefüggés mutatkozott. A második hét végéig elhunyt betegek kiindulási klinikai és laboratóriumi adatait vizsgálva úgy találtuk, hogy a felvételtkor meghatározott NIHSS értékek mellett csak a trombolízis előtt és 24 órával később mért FXIII szintek különböztek szignifikánsan a két csoport között.

Hasonló eredményeket figyeltünk meg, amikor a FXIII szinteket a stroke hosszú távú (esemény után 3 hónappal) funkcionális kimenetele tekintetében vizsgáltuk. Az FXIII szint a lízis után 24 órával szignifikánsan alacsonyabb volt azoknál betegeknél, akik az eseményt követő 3. hónap végéig elhunytak (mRS 6).

Annak vizsgálatára, hogy a trombolízis után 24 órával mért alacsony FXIII szintek független előrejelzői-e a betegek rövid és hosszú távú mortalitásának, többszörös logisztikus regressziós (backward) analízist végeztünk, mely magába foglalta az összes, a kimenetelre nézve potenciálisan releváns kockázati ill. befolyásoló tényezőt. Eredményeink alapján a felvételnél meghatározott NIHSS pontszám a 14. napi mortalitás (OR: 1,12; 95% CI: 1,02-1,23, p=0,013) és a 90. napi mortalitás (OR: 1,16; 95% CI: 1,05-1,28, p=0,004) független előrejelzőjének bizonyult. A felvételnél NIHSS mellett a trombolízis után 24 órával a legalacsonyabb kvartilisben lévő FXIII szintek a rövid távú mortalitás független előrejelzőjének bizonyultak (OR: 4,95; 95% CI: 1,31–18,68, p=0,018). Ugyanakkor a trombolízis után 24 órával mért alacsony FXIII szint nem bizonyult a 90. napi halálozás független előrejelzőjének (OR: 1,88; 95% CI: 0,55-6,41, p=0,311).

Korábbi feltételezésünkkel ellentétben a lízist követően intrakraniális vérzést szenvedett betegeknél (n=13) a trombolízis során tapasztalt FXIII szintek a szövődménymentes betegeknél megfigyelt szintekhez hasonlóan alakultak. Annak ellenére, hogy csökkenő tendencia volt megfigyelhető a közvetlenül trombolízis után mért értékek esetében, a FXIII aktivitás ill. antigénszintek egyetlen mért időpontban sem mutattak szignifikáns különbséget a vérzést nem mutató betegek és a SICH vagy aSICH szövődményt szenvedett betegek között. Ebben a kohorszban csak egy terápiával összefüggő vérzést szenvedett betegnél volt referencia tartomány alatti a FXIII szint (FXIII aktivitás felvételnél: 45,9%, közvetlenül trombolízis után: 50,2%, 24 órával a trombolízist követően: 39,9%). A heterozigóta FXIII-A hiányt ebben a betegben az F13A1 gén direkt fluoreszcens szekvenálásával zártuk ki. Ezen egyetlen beteg kivételével az FXIII szintek a referencia tartományon belül vagy a felett voltak minden mért időpontban azoknál a betegeknél, akiknél a terápiához társultan vérzéses komplikáció alakult ki. Egy beteg halt meg a trombolízist követő SICH miatt az 1. napon, de ebben az esetben is a FXIII szint referencia tartományon belül volt (FXIII aktivitás felvételnél: 107,7%, közvetlenül trombolízis után: 104,5%).

A FXIII gyakori polimorfizmusai és a trombolitikus terápia kimenetele közötti összefüggések vizsgálata

Az európai populációban leggyakoribb FXIII-A és FXIII-B polimorfizmusok allélfrekvenciái ebben az AIS-es betegkohorszban nem különböztek szignifikánsan az általunk korábban vizsgált kontrollcsoportokhoz képest. A korábbi irodalmi adatokkal összehangban a FXIII-A p.Val34Leu, FXIII-A p.Tyr204Phe és FXIII-B p.His95Arg polimorfizmusok nem befolyásolták a FXIII szinteket. A FXIII-B intron K nt29756 G allél hordozói esetén szignifikánsan alacsonyabb FXIII szint volt megfigyelhető a nem hordozókhoz képest (FXIII

aktivitás: $114,5 \pm 30,9\%$ vs. $130,46 \pm 36,9\%$, $p=0,021$, illetve FXIII antigén szint: $19,26$ vs. $23,5 \pm 0,75$ mg/L, $p=0,004$), de az ismert befolyásoló tényezőkre (életkor, CRP, dohányzás) való statisztikai adjusztálás után a különbségek nem voltak szignifikánsak a csoportok között. A vizsgált FXIII polimorfizmusok egyike sem mutatott szignifikáns összefüggést a stroke súlyosságával, a terápia kedvezőtlen rövid vagy hosszú távú kimenetelével, a terápiával összefüggő SICH kialakulásával és a mortalitással. A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus esetében megfigyelhető volt ugyan egy tendencia, mely szerint a FXIII-A 34Leu allél hordozása védő hatású lehet a kedvezőtlen rövid távú kimenetellel szemben (OR: 0,33; 95% CI: 0,09-1,10), de az összefüggés ennél az esetszámnál statisztikailag nem volt szignifikáns ($p=0,072$).

Az $\alpha 2$ -PI szintek és az $\alpha 2$ -PI p.Arg6Trp polimorfizmus összefüggése akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek intravénás trombolízis kezelésének kimenetelével

Vizsgálati populáció

Prospektív obszervációs tanulmányunkba összesen 421 intravénás trombolízis kezelésben részesülő AIS beteg került beválogatásra. A kohorsz medián életkora 68 (IQR: 60-77) év volt, a betegek 57,2%-a férfi volt. A felvételtkor NIHSS érték mediánja 7 volt (IQR: 4-11). A tünetek megjelenésétől az rt-PA kezelésig eltelt idő mediánja 150 (IQR: 115-185) perc volt. A leggyakoribb cerebrovaszkuláris rizikófaktor a magas vérnyomás volt (82,2%). Kedvező rövid és hosszú távú kimenetel a betegek 45,2%-ánál, illetve 48,6%-ánál volt megfigyelhető (a lízis után vérzést szenvedett eseteket külön csoportként kezelve). Terápia asszociált vérzéses szövődmény 34 betegnél (8,1%) fordult elő, 14 esetben (a teljes kohorsz 3,3 %-a) volt SICH, 20 betegnél (a teljes kohorsz 4,8%-a) pedig aSICH komplikáció alakult ki.

A trombolízis hatása a $\alpha 2$ -plazmin inhibitor szintekre

A felvételtkor $\alpha 2$ -PI aktivitás és az antigénszintek meglepően széles eloszlást mutattak, de a betegek többsége esetén az $\alpha 2$ -PI szintek a referencia határértékeken belül voltak. Mind az $\alpha 2$ -PI aktivitás, mind az antigénszintek szignifikáns csökkenést mutattak közvetlenül a trombolízis után, jelezve, hogy a terápia során a képződött szabad plazmin gyorsan komplexet alkot az $\alpha 2$ -PI-ral. Közvetlenül a trombolízis után az $\alpha 2$ -PI aktivitás és az antigénszint minden betegnél a referencia tartomány alatt volt ($\alpha 2$ -PI aktivitás medián: 8 [IQR: 1-29] %; $\alpha 2$ -PI antigén medián: 11,3 [IQR: 8,2-17,3] mg/L).

Huszonnégy órával a trombolízis után az α 2-PI aktivitás és az antigénszintek jelentősen megemelkedtek, de a betegek jelentős hányadában még mindig az alsó referencia határtérték alatt maradtak (α 2-PI aktivitás medián: 76 [66-86] %; α 2-PI antigén medián: 39,4 [IQR: 34,1-46,1] mg/L). Az α 2-PI aktivitás és antigénszintek között a legerősebb korrelációt ($r=0,770$, 95% CI: 0,723-0,808, $p<0,001$) a trombolízis után 24 órával mért plazmamintákból figyeltük meg. Érdekes módon ebben a kohorszban a felvételtől meghatározott α 2-PI aktivitás és antigénszintek közötti összefüggést találtuk a leggyengébbnek ($r=0,560$, 95%CI: 0,486-0,627, $p<0,001$). A felvételtől klinikai és laboratóriumi paraméterek közül mind az α 2-PI aktivitás, mind az antigénszintek gyenge, de szignifikáns negatív korrelációt mutattak az életkorral (Spearman r : -0,2244; 95%CI: -0,3168 és -0,1278, $p<0,001$ és r : -0,3908; 95%CI: -0,4739 és -0,3008 között, $p<0,001$). Az α 2-PI aktivitás szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a felvételtől fibrinogén szinttel ($r=0,3623$; 95%CI: 0,2723-0,4460, $p<0,001$), ez az összefüggés az antigén szintek esetén nem volt megfigyelhető. Az α 2-PI aktivitás és α 2-PI antigén szintek szignifikánsan magasabbak voltak az aktív dohányosokban a nem dohányzókhöz képest a betegek felvételekor (α 2-PI aktivitás: medián: 106 [98-114] % vs. 101 [92-109,5] %, $p=0,0024$, α 2-PI antigén: medián: 61,0 [56,4-70,4] mg/L vs. 58,7 [52,6-66,9] mg/L $p=0,0135$). Az aktív dohányosokban látott magasabb α 2-PI szint 24 órával a trombolízist követően is megfigyelhető volt (α 2-PI aktivitás: medián: 81 [69-90] % vs. 75 [65-83] %, $p=0,0005$, α 2-PI antigén: medián: 43,4 [35,7-48,7] mg/L vs. 38,4 [33,2-44,8] mg/L, $p=0,0011$). Az α 2-PI aktivitás és α 2-PI antigén szintek a betegek felvételekor szignifikánsan magasabbak voltak nőkben a férfiakhoz képest (α 2-PI aktivitás: medián: 105 [97-114] % vs. 100 [92-108] %, $p<0,001$, α 2-PI antigén: medián: 60,9 [55,1-69,1] mg/L vs. 58,6 [52,9-66,7], $p=0,0363$).

A felvételtől α 2-PI szintek és az akut iszkémiás stroke súlyosságának, etiológiájának kapcsolata

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

Az α 2-PI szintek és a trombolitikus terápia kimenetelének kapcsolata

A felvételi α 2-PI antigénszintek szignifikáns összefüggést mutattak a stroke rövid távú kimenetelével. Szignifikánsan alacsonyabb felvételtkori α 2-PI antigénszinteket találtunk a lízist követő 7. napon súlyosabb stroke-ban szenvedő betegeknél. Azoknál a betegeknél, akiknél a lízis után 7 nappal kedvezőtlen kimenetellel rendelkeztek, a felvételtkori α 2-PI antigénszintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak azokhoz képest, akik állapota javult, vagy nem mutattak változást (kedvező kimenetel/változatlan csoport medián: 60,4 [IQR: 54,5-68,8] mg/L vs. kedvezőtlen kimenetelű csoport medián: 58,0 [IQR: 49,6-64,1] mg/L, $p=0,045$) bár meg kell jegyezni, hogy mindkét csoport esetén a medián értékek a referencia tartományban voltak, és a különbség a csoportok között marginálisnak mondható.

A trombolízis utáni α 2-PI antigénszint és az α 2-PI aktivitás nem mutatott összefüggést a rövid távú kimenetellel. Hasonlóképpen, a hosszú távú funkcionális kimenetellel és a 90 napos mortalitás adatokkal csak a felvételtkori α 2-PI antigénszintek mutattak összefüggést. Megjegyzendő, hogy a trombolízis előtti és utáni α 2-PI aktivitás ill. α 2-PI antigénszintek csökkenésének mértéke nem mutatott összefüggést a kimenetelekkel. Azok a betegek, akik elhunytak (mRS 6) vagy kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel rendelkeztek (mRS 2-5), szignifikánsan alacsonyabb felvételtkori α 2-PI antigénszintet mutattak az esemény után 90 nappal legkedvezőbb kimenetelű betegekhez képest (mRS 0-1 medián: 61,6 [IQR: 55,9-70,5] mg/L vs. mRS 2-5 medián: 59,7 [IQR: 54,5-69,1] mg/L vs. mRS 6 medián: 56,0 [IQR: 48,5-61,0] mg/L, $p<0,001$). Kaplan–Meier túlélési analízis során úgy találtuk, hogy azok a betegek, akik a kórházi felvételtkor a legfelső kvartilisnek megfelelő α 2-PI antigénszinttel rendelkeztek, szignifikánsan jobb túlélést mutattak, mint azok, akiknél az α 2-PI antigénszint a legalacsonyabb kvartilisben volt (HR: 4,54; 95%CI: 1,92-10,8, $p<0,001$).

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

A lízis után ICH-t szenvedő betegeknél ($n=32$) a felvételi α 2-PI antigén szint szignifikánsan alacsonyabb volt azokhoz képest, akiknél nem volt vérzéses szövődmény. Ez az összefüggés nem volt megfigyelhető a betegek lízis utáni mintáiban ill. az α 2-PI aktivitás esetén egyik mért

időpontban sem. A felvételi medián α 2-PI antigénszintek közötti különbség, bár szignifikáns, de csekély mértékű volt a lízis követően agyvérzést szenvedett ill. a szövődménymentes betegek között (nincs ICH medián: 59,8 [IQR: 54,0-68,0] mg/L vs. ICH: 57,0 [IQR: 53,4-61,7] mg/L, $p=0,036$). Nem volt megfigyelhető szignifikáns korreláció a lízis utáni becsült hematoma térfogata és a felvételi α 2-PI antigén szintje között ($r=0,207$; 95% CI: -0,176-0,536, $p=0,272$). Az α 2-PI antigén ill. aktivitás szintek nem különböztek a SICH és aSICH alcsoportokban a vizsgált időpontokban. A várakozásoknak megfelelően az NIHSS szignifikánsan magasabb volt az ICH-t szenvedett betegeknél, a vérzéses komplikáció nélküli betegekhez képest (medián: 12 [IQR: 7-32] vs. 6,5 [IQR: 4-36], $p<0,001$).

Az α 2-plazmin inhibitor p.Arg6Trp polimorfizmusa és a trombolitikus terápia kimenetele közötti összefüggések vizsgálata

Az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus allélfrekvenciája a Hardy–Weinberg-egyensúlynak megfelelően alakult a kohorszban ($C = 0,8046$; $T = 0,1953$), és gyakorlatilag megegyezett az 1000 Genom projektben található, európai alcsoportra vonatkozó allélgyakoriságokkal ($C = 0,01$; $T = 0,1988$). Az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus egyetlen mért időpontban sem volt hatással az α 2-PI aktivitásra vagy antigénszintekre, és nem mutatott összefüggést a stroke súlyosságával, etiológiájával vagy kimenetelével (az adatok nincsenek bemutatva).

MEGBESZÉLÉS

A sikertelen trombolízis háttérében álló okok megértése elengedhetetlen az akut stroke ellátás javítása érdekében. Annak ellenére, hogy az aktivált FXIII és az α 2-PI egyaránt kulcsszerepet játszanak a plazmin-mediálta fibrinolízis elleni védelemben, az általunk leírt két obszervációs tanulmány az első két olyan átfogó vizsgálat, amely ezen két fehérje aktivitását és antigénszintjeit vizsgálja AIS betegekben trombolízis során, valamint ezen fibrinolízis inhibitorok legfőbb polimorfizmusainak összefüggését tanulmányozza a betegek klinikai kimenetelével. Első vizsgálatunk során bemutattuk, hogy a FXIII aktivitása és antigénszintje fokozatosan csökken a trombolízis során. A FXIII szintek ilyen mértékű csökkenésének mechanizmusa egyelőre nem tisztázott. A közelmúltban kimutatták, hogy a plazmin in vitro hasítja és inaktíválja az FXIIIa-t, de a FXIII zimogén formáját nem. A vizsgálatunkban elvégzett FXIII aktivitás és antigén mérések a keringő zimogén FXIII szinteket tükrözik, és ezen inaktív fehérjét a plazmin feltehetőleg nem képes hasítani. Ezt igazolja az is, hogy vizsgálatunkban a trombolízis előtti és közvetlenül utáni FXIII aktivitás és antigénszintek nem különböztek szignifikánsan. Jelentős csökkenés a FXIII szintekben 24 órával a lízis után következett be, ami arra utal, hogy a plazma FXIII szintjének trombolízis során megfigyelt csökkenése nagy valószínűséggel nem társul jelentős plazmin-mediált FXIII degradációval. Ezen túlmenően, mivel a FXIII aktivitás és a FXIII-A₂B₂ antigén szintje jó korrelációt mutatott a trombolízis előtt és alatt, a FXIIIa plazmin vagy más proteázok általi lebontása feltehetőleg elhanyagolható. A stroke utáni FXIII szintek jelentős csökkenésének legvalószínűbb magyarázata, hogy az aktivált fehérje folyamatosan beépül a növekvő trombusba, ami a vérárvadási rendszer folyamatos aktivitása miatt kialakuló konzumpcióhoz vezet. Ezt a hipotézist egy korábbi tanulmányban is vizsgálták, ahol a FXIII-A alegység szintjét (de nem a FXIII aktivitást) mérték AIS betegek egy kisebb csoportjában. Ebben a kohorszban 41 beteg kapott rt-PA vagy urokináz trombolízist, és eredményeik nem különböztek a trombolitikus kezelésben nem részesülő (n=23) AIS betegek eredményeitől.

Az összes, potenciálisan releváns kockázati tényezőt magában foglaló logisztikus regressziós modell segítségével megállapítottuk, hogy a betegek felvétele után 24 órával mért alacsony FXIII szint szignifikáns független előrejelzője a rövid távú mortalitásnak (14 nappal a stroke-ot követően). Ez az eredmény arra utal, hogy a FXIII szint csökkenése közvetlen összefüggést mutat a fatális stroke patomechanizmusával a trombolizált betegekben. Ez a hatás függetlennek tűnik a stroke NIHSS alapján kategorizált súlyosságától. Figyelemre méltó, hogy azoknál a

betegeknél, akik a stroke utáni első héten meghaltak, szokatlanul alacsony volt a FXIII szint a trombolízist követő napon; elmondható, hogy ezeknél a betegeknél a FXIII szint csak mintegy 50%-a volt a jobb kimenetelű betegek FXIII szintjéhez képest. A lízis után 24 órával mért alacsony FXIII szintek nemcsak a rövid távú, hanem a hosszú távú (90. napi) mortalitással is összefüggést mutattak. A logisztikus regressziós modellben azonban a 24 órával a lízis utáni alacsony FXIII szint nem bizonyult a hosszú távú mortalitás független előrejelzőjének. Fontos megjegyezni, hogy a stroke utáni mortalitást hosszú távon számos tényező befolyásolja, beleértve az életkort, a társbetegségeket, jelentős funkcionális neurológiai deficit kialakulása esetén a szociális háttér, ápolási körülményeket, stb., mely tényezők esetünkben is magyarázhatják a hosszú távú mortalitással kapcsolatos szignifikáns összefüggések eltűnését. Bár kiindulási hipotézisünkben feltételeztük, hogy az alacsony FXIII szint szerepet játszhat a lízist követően kialakuló intrakraniális vérzés patomechanizmusában, tanulmányunk eredménye ezt nem igazolta. Vizsgálatunk alapján feltételezhetjük, hogy a trombolízist követő vérzéses szövődmények kialakulása nem az alacsony FXIII szinthez köthető. Ez a megállapítás összhangban van a néhány korábban publikált, kislétszámú kohorsz bevonásával készült tanulmány eredményével. Betegcsoportunkban az FXIII szint nem volt összefüggésben a stroke súlyosságával. Azt is kimutattuk, hogy a FXIII aktivitás szignifikánsan magasabb volt aterotrombotikus stroke esetén, mint kardioembóliás eredetű stroke esetén, mely korábbi tanulmányokhoz hasonlóan felveti a FXIII aterotrombózisban betöltött szerepét, azonban ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek.

Ebben a vizsgálatban nem találtunk összefüggést a FXIII-A vagy FXIII-B gyakori polimorfizmusai ill. a stroke súlyossága, kedvezőtlen rövid ill. hosszú távú kimenetele, a terápiával összefüggő vérzéses szövődmények kialakulása és a mortalitás között. A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus esetében ugyanakkor megemlítendő egy érdekes tendencia, amely szerint a 34Leu allél hordozók esetén gyenge védő hatás lehetséges a kedvezőtlen rövid távú kimenetelekkel szemben, de az összefüggés az általunk vizsgált esetszámok esetén csak határérték statisztikai szignifikanciát mutatott, így az összefüggés igazolására vagy kizárására nagyobb esetszámú vizsgálat elvégzése szükséges. A tanulmányban vizsgált polimorfizmusok közül csak a FXIII-B intron K nt29756 G allélja társult alacsonyabb FXIII szintekkel, de az ismert befolyásoló tényezőkre való adjusztálás után a hordozók és nem hordozók közötti különbségek már nem voltak statisztikailag szignifikánsak. Egy koszorúér-szklerózisban és/vagy akut myocardialis infarktuszban szenvedő betegeket vizsgáló tanulmányban a FXIII-B intron K nt29756 G allél hordozóinak FXIII szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, és az allél jelenléte jelentős védelmet nyújtott a koronária szklerózis és myocardialis infarktus ellen az

emelkedett fibrinogén szinttel rendelkező betegeknél, de csak a FXIII-A Leu34 allél jelenlétében. Vizsgálatunkban úgy tűnt, hogy az FXIII-B intron K nt29756 G allél jelenléte nem befolyásolta a trombolízis kimenetelét. Tanulmányunk során a betegek limitált száma miatt azonban nem lehetett alcsoport-analízist végezni, hogy szinergikus hatást keressünk a FXIII-A Leu34 és a FXIII-B intron K nt29756 G allélja között. Egy nemrégiben közölt tanulmányunkban kimutattuk, hogy a FXIII-A Leu34 allél jelenléte szignifikáns védelmet nyújt AIS betegeknél a nagyobb (clot burden score: 0-9) alvadékok kialakulásával szemben. A többváltozós elemzés során azonban a polimorfizmus nem bizonyult a trombolízist követően a rövid ill. hosszú távú funkcionális kimenetek független prediktorának. Mivel a trombolízis kimenetelét számos tényező befolyásolja, különösen a stroke súlyossága és lokalizációja, ezen adatok fényében valószínűsíthető, hogy a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus modifikáló hatása önmagában gyenge és nem járul hozzá jelentősen a betegek általános funkcionális kimeneteléhez.

Bár az α 2-PI a fibrinolízis kulcsfontosságú szabályozói közé tartozik, keveset tudunk az AIS trombolízis kimenetelében betöltött szerepéről. A nemzetközi irodalomban csak néhány tanulmány jelent meg az α 2-PI szintek és az AIS trombolízis kimeneteleinek lehetséges kapcsolatáról, ellentmondásos eredményekkel. Egy 63 AIS beteg részvételével végzett vizsgálatban az α 2-PI aktivitás kiindulási szintjei jól korreláltak a rekanalizáció sikerességével. A rekanalizáció jeleit mutató betegek α 2-PI aktivitása alacsonyabb volt, és az α 2-PI szintet a rekanalizáció egyetlen prediktív markereként írták le, bár nem mutatott összefüggést a hosszú távú kimenetekkel. Másrészt, más kutatócsoportok által végzett vizsgálatokban, az α 2-PI szint csökkenését észlelték a trombolízist követően, azonban az α 2-PI szintek nem mutattak összefüggést a terápia kimenetelével. Amint arra egy közelmúltbeli szisztematikus tanulmány rámutatott, a hemosztázis és fibrinolízis markereivel, valamint az AIS trombolízis kimenetelével kapcsolatos ellentmondásos adatok számos módszertani kérdésből fakadhatnak. Először is, a legtöbb tanulmány viszonylag kis betegpopulációt vont be a vizsgálatokba, így ezen vizsgálatok statisztikai ereje alacsony. A szakirodalomban limitált azon közlemények száma, amelyekben legalább 100 beteg szerepel. Egy másik kritikus tényező a stroke kezdete és a mintavétel közötti időintervallum, mivel a legtöbb tanulmányban a stroke kezdete után 24 órán belül gyűjtik a vérmintát, ami meglehetősen tág időintervallum. Ezen túlmenően a trombolízisben részesülő betegeknél elengedhetetlen a trombolízis előtti és utáni vérminták eredményeinek megkülönböztetése. Ideális esetben a hemosztázis paramétereiket a trombolízis megkezdése előtt kellene vizsgálni AIS betegeknél. Végül a kutatási kérdéstől függően egynél több mintavételi időpontra is szükség lehet a megalapozott következtetések levonásához. A

második prospektív obszervációs vizsgálatunkban 421 trombolízis kezelésben részesülő AIS beteget vontunk be, így ez a kohorsz az egyik legnagyobb publikált betegcsoport a nemzetközi irodalomban. Minden betegtől vérmintát vettünk a trombolízis előtt és 24 órával a terápiát követően, míg a betegek egy részében a lízis után azonnali mintavételre is törekedtünk. Az α 2-PI szinteket minden időpontban funkcionális teszttel és antigénszint vizsgálattal is teszteltük, mely utóbbi mind a 4 α 2-PI izoformát kimutatta. Az α 2-PI természetes heterogenitásának köszönhetően mindkét tesztből származó eredmények hozzájárulnak az α 2-PI trombolízis során betöltött patofiziológiás szerepének jobb megismeréséhez. Hasonlóan a korábbi tanulmányok eredményeihez, az α 2-PI aktivitás és az antigén szintek jó korrelációt mutattak a vizsgált betegpopulációban. Érdekes módon felvételnél csak közepesen erős korrelációt találtunk az aktivitás és az antigén szintek között, mely jelentősen javult a trombolízist követően. Ez abból adódhat, hogy az α 2-PI beépülése a trombusba a FXIIIa által elsősorban a PB- α 2-PI-t érinti, ráadásul a beépülés mértékének is van határa (45-50%). Korábbi vizsgálatok szerint a tanulmányunkban is használt kromogén α 2-PI aktivitás tesztek elsősorban a PB- α 2-PI izoforma kimutatására alkalmasak. Ezzel szemben az általunk használt α 2-PI antigén teszt mind a 4 izoformát egységesen kimutatja, tehát jobban reprezentálja az α 2-PI csökkenésének mértékét. Ez a jelenség magyarázhatja azt, hogy az α 2-PI antigén teszt vizsgálatainkban szorosabb összefüggést mutatott a stroke súlyosságával és a kimenetekkel az α 2-PI aktivitáshoz képest. További tanulmányok szükségesek a különböző α 2-PI izoformák alvadékba történő beépülésének jobb megismerése érdekében és annak felfedésére, hogy a különböző mértékű beépülés milyen hatással bír a trombolízis kimenetele szempontjából.

Eredményeink alapján az α 2-PI csökkenése jelentős a súlyosabb stroke-ban szenvedő betegeknél. Vizsgálatunk során lépcsőzetes negatív összefüggést találtunk az α 2-PI antigénszintek és a stroke súlyossága között. Szignifikánsan alacsonyabb felvételi α 2-PI antigén szintet találtunk a kedvezőtlen rövid és hosszú távú kimenetelű betegeknél, továbbá a legalacsonyabb kvartilisú felvételi α 2-PI antigénszintek szignifikáns összefüggést mutattak a betegek hosszú távú mortalitásával is. Többváltozós regressziós analízisünkben azonban, amely a hosszú távú kimeneteket meghatározó összes releváns tényezőt is magába foglalta, az α 2-PI nem igazolódott szignifikáns független prediktorként, és csak az életkor és az NIHSS maradt a modellben, mint a hosszú távú kimenetek legfontosabb előrejelzője. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy bár az α 2-PI beépülése az intracerebrális trombusokba és így a fehérje konzumpciója feltehetőleg összefügg a stroke súlyosságával és nagy valószínűséggel a trombus méretével is, az α 2-PI nyilvánvalóan nem tekinthető a kimenetel független biomarkerének. Mindazonáltal ezek az eredmények azt sugallják, hogy az α 2-PI szerepet

játszhat a trombolízis sikertelenségének patomechanizmusában, és fontos tényező lehet a terápia hatástalanságában súlyos stroke esetén. A jelenlegi eredményekkel összhangban korábbi munkáink során kimutattuk, hogy az α 2-PI fibrinalvadékba való beépülésének mértéke a trombolízist követően kedvező kimenetelű AIS-betegeknél volt a legalacsonyabb. Ezek az eredmények összhangban vannak kutatócsoportunk egy másik közelmúltbeli munkájával, ahol kimutattuk, hogy az életkorral és az NIHSS-sel együtt a trombus mérete a trombolízis kimenetelének legfontosabb mutatója, és számos kulcsfontosságú hemosztázis-paraméter felvételekor vagy 24 órával később mért szintje nem mutatott összefüggést a kezelés kimenetelével egy többváltozós modellben vizsgálva.

Bár biológiai értelemben véve elképzelhetőnek tűnt, hogy a lízis utáni alacsony α 2-PI szint felelős lehet a terápiával összefüggő ICH eseményekért, a vizsgált kohorszban nem találtunk ilyen összefüggést. Az α 2-PI szintek közvetlenül a lízis után a referencia tartomány alsó határa alatt voltak ezen kohorsz minden vizsgált betegében, de a vérzéses szövődmények nem voltak közvetlenül összefüggésben az α 2-PI szintekkel egyik vizsgált időpontban sem. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal a korábbi tanulmányokkal, amelyek eredményei arra utalnak, hogy az α 2-PI célzott kiiktatása új farmakológiai stratégia lehet a trombusok feloldására vérzés veszélye nélkül. Az α 2-PI felvételkor mért szintje valóban szignifikánsan alacsonyabb volt a lízis utáni ICH-ban szenvedő betegeknél, azonban a csoportok közötti különbségek nagyon szerények voltak. Mivel a lízis utáni ICH-ban szenvedő betegek felvételekor súlyosabb stroke-ban szenvednek, feltételezhető, hogy a két csoport α 2-PI szintjei között megfigyelt szignifikáns különbség a stroke súlyosságában mutatkozó különbségekkel függ össze. Mivel az α 2-PI szintek az ICH-val vagy anélküli csoportokban jelentős átfedést mutattak a felvételkor, ráadásul az α 2-PI aktivitási szintek nem különböztek a csoportok között, nem valószínű, hogy az alacsony α 2-PI lenne az egyetlen felelős tényező a lízist követő vérzés kialakulásában. Eredményeink alapján elmondható, hogy az α 2-PI nem volt hatással a hematóma növekedésére, mivel az α 2-PI szintek nem mutattak szignifikáns korrelációt a lízis utáni hematóma becsült térfogatával. Másrészt az irodalomból ismert, hogy a súlyosabb stroke-ok nemcsak a lízis sikertelenségével, hanem a vérzéses szövődmények nagyobb esélyével járnak együtt, bár ennek az összefüggésnek az okai eddig nem tisztáztak.

Az α 2-PI heterogenitását befolyásoló paraméterek közül az α 2-PI p.Arg6Trp-t vizsgáltuk a második betegpopulációban. Tekintettel a viszonylag nagy mintaszámra, az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmusnak az α 2-PI szintekre, a stroke súlyosságára és a terápia kimenetelére gyakorolt hatását is vizsgáltuk, azonban összefüggést egyik esetben sem találtunk. Csak néhány tanulmány áll rendelkezésünkre, mely az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az

aterotrombotikus események kockázata vagy kimenetele közötti összefüggést vizsgálta. Az eddig közölt, korlátozott értékű adatok alapján arra lehet következtetni, hogy a polimorfizmus nincs hatással az iszkémiás események kockázatára vagy kimenetelére. Amint azt korábban leírtuk, az $\alpha 2$ -PI p.Arg6Trp polimorfizmus mellett az $\alpha 2$ -PI N-terminális hasításának mértékét befolyásoló fontos tényező a keringő APCE (sFAP) szint. Feltételezhető, hogy az $\alpha 2$ -PI Arg6Trp hatását az APCE-szintek tükrében kell figyelembe venni, azonban ez a mérés nem tartozott vizsgálatunk körébe.

Összefoglalva tanulmányaink eredményeit elmondható, hogy az alacsony FXIII szint 24 órával a trombolízis után szignifikáns független előrejelzője az AIS mortalitásnak az eseményt követő 14. napon. Az FXIII szintek vizsgálata 24 órával a lízis után segíthet azonosítani azokat a betegeket, akiknél magas a halálozási kockázat, melynek okán megfontolandó a terápiás lehetőségek újragondolása. A jövőben további vizsgálatokra van szükség nagyszámú betegek bevonásával annak kiderítésére, hogy az ilyen betegek korai kiválasztása segíthet-e javítani az eredményeket intenzifikált kezelési stratégiák biztosításával.

Konklúzióként levonható még, hogy az AIS-betegek $\alpha 2$ -PI szintje drámaian megváltozott a trombolízis során, de a lízis utáni $\alpha 2$ -PI szintek nem mutattak összefüggést a kezelés kimenetelével vagy biztonságosságával. Szignifikánsan alacsonyabb $\alpha 2$ -PI szintet találtunk a felvételnél súlyosabb stroke-ban szenvedő AIS betegeknél, valamint szignifikánsan alacsonyabb felvételi $\alpha 2$ -PI antigénszinteket voltak megfigyelhetőek a kedvezőtlen rövid és hosszú távú kimenetelű betegeknél, azonban egy többváltozós regressziós analízisben, amely minden, a hosszú távú kimenetelüket meghatározó releváns tényezőt tartalmazott, az $\alpha 2$ -PI szignifikáns hatása csökkent, és csak az életkor és a NIHSS maradt a modellben, mint a hosszú távú kimenetel legfontosabb előrejelzője. Összességében ezek az adatok azt sugallják, hogy bár az $\alpha 2$ -PI a fiziológiás fibrinolízis domináns inhibitora, a felvételnél szintje erősen összefügg a stroke súlyosságával, és nem független előrejelzője a trombolitikus terápia kimenetelének. Feltételezhető azonban, hogy súlyosabb stroke esetén az $\alpha 2$ -PI trombusokba való beépülésének mértéke nagyobb, ami fontos mechanizmusa lehet az rt-PA indukálta trombolízis korlátozott sikerességének ezekben az esetekben.

LIMITÁCIÓK

Mint minden obszervációs klinikai tanulmánynak, jelen vizsgálatainknak is vannak limitációi, és az eredményeket ezen tényezők ismeretében kell értelmezni. Először is, a vizsgálataink célja az volt, hogy a trombolízis során a FXIII ill. α 2-PI szint változásait megfigyeljük, és összehasonlítsuk a terápia kimenetelével, tehát nem eset-kontroll vizsgálatot terveztünk. Ennek megfelelően nem vizsgáltunk kontrollként olyan betegeket, akik nem részesültek trombolízisben. Elméletileg lehetséges lenne a trombolízisben részesülő és nem részesülő AIS betegek FXIII ill. α 2-PI szintjeinek összehasonlítása, azonban az rt-PA-kezelt betegek csoportja erősen szelektált betegcsoport, szigorú beválasztási kritériumokkal (pl. szűk időablak, hatékony véralvadásgátló kezelés hiánya stb.), míg a trombolízisben nem részesülő betegek definíció szerint nem felelnek meg ezen beválogatási kritériumoknak. A két csoport jelentős kiindulási különbségei és a trombolízisben nem részesülő csoport heterogenitása alapján úgy gondoljuk, hogy ezen csoportok összehasonlításából nem feltétlenül lehetne megfelelő következtetéseket levonni.

Másodszor, a betegek bevonása egy központban történt (single-center study), emiatt mintaszámunk korlátozott, de a témában korábban publikált közleményekhez képest az általunk bevont betegek száma a legnagyobb esetszámok közé sorolható. Az egyközpontú vizsgálati tervnek köszönhetően vizsgálataink előnye az egységes beteg- és mintakezelés volt; ezen túlmenően a követés miatt elveszített betegek aránya viszonylag alacsony volt, összehasonlítva más, hasonló vizsgálati felépítésű tanulmányokkal.

Bár az α 2-PI egyes izoformáinak meghatározásával összetettebb képet kaphattunk volna az α 2-PI patofiziológiájáról, ez meghaladta a vizsgálatunk célkitűzését.

Vizsgálataink a szisztémás hemosztázis rendszerről adtak információt az akut stroke kezelése során, így indirekt módon tükrözték csak a lokálisan zajló folyamatokat.

Végül, mivel mechanikus trombektómiával kezelt betegeket nem vontunk be a vizsgálatainkba, ezért az eredményekből nem lehet következtetéseket levonni nagyérelzáródásban szenvedő AIS-betegek jelenlegi kezelési gyakorlatára vonatkozóan.

ÖSSZEFOGLALÁS

A trombus oldására szolgáló intravénás rt-PA kezelés az AIS szenvedő betegek egy részében nem jár sikerrel, míg az esetek jelentős hányadában mellékhatásként ICH alakul ki. Két prospektív obszervációs klinikai tanulmányban célunk a FXIII és az $\alpha 2$ -PI szintek vizsgálata volt a trombolízis során, hogy megtudjuk, összefüggésben állnak-e a terápia kimenetelével. A tünetek megjelenéséhez képest 4,5 órán belül rt-PA kezelésben részesült AIS-betegek (n=132 és n=421) vérmintáit a trombolízis előtt és 24 órával később, valamint a betegek egy részében közvetlenül a lízis után vettük. A FXIII aktivitást és antigént ammónia-felszabadulási teszttel és ELISA-val, az $\alpha 2$ -PI aktivitást és antigént kromogén teszttel és az $\alpha 2$ -PI minden izoformáját kimutató ELISA-val mértük. A mintákból meghatároztuk a FXIII-A p.Val34Leu, p.Tyr204Phe, FXIII-B p.His95Arg, intronK (IVS11+144) és $\alpha 2$ -PI p.Arg6Trp polimorfizmusokat. A stroke súlyosságát a felvételtkor és a 7. napon az NIHSS alapján határoztuk meg. A lízis utáni ICH-t az ECASSII szerint osztályoztuk. A hosszú távú kimenetelt az esemény után 3 hónappal az mRS szerint osztályoztuk. Eredmények: A FXIII szintek fokozatos csökkenést mutattak közvetlenül a trombolízis után és 24 órával később, de ez nem volt összefüggésben a lízis utáni ICH-val. Többszörös logisztikus regressziós modellben a legalacsonyabb kvartilisben lévő FXIII szint 24 órával a lízis után a 14. napi mortalitás független előrejelzőjének bizonyult (OR:4,95, 95%CI:1,31-18,68, p<0,05). Az $\alpha 2$ -PI szintek szignifikánsan csökkentek közvetlenül a lízis után, majd újra emelkedtek az eseményt követő napon. A felvételi $\alpha 2$ -PI szintek szignifikáns negatív összefüggést mutattak a stroke súlyosságával. Kaplan–Meier túlélési analízisben a felvételtkor a legmagasabb kvartilisbe tartozó $\alpha 2$ -PI antigénnel rendelkező betegek szignifikánsan jobb hosszú távú túlélést mutattak azokhoz képest, akiknél a legalacsonyabb kvartilisben volt az $\alpha 2$ -PI antigén (HR:4,54; 95%CI:1,92-10,8, p<0,001); azonban többváltozós analízisben az alacsony felvételtkori $\alpha 2$ -PI antigén nem bizonyult a rossz hosszú távú kimenetel független kockázati tényezőjének. Az ICH-t szenvedett betegeknél az $\alpha 2$ -PI antigén csekély mértékben, de szignifikánsan alacsonyabb volt a szövődménymentes betegekhez képest. A FXIII és $\alpha 2$ -PI polimorfizmusok és a terápia kimenetele között nem volt összefüggés. Konklúzió: Eredményeink alapján a trombolízis után 24 órával mért FXIII szint segíthet azonosítani azokat a betegeket, akiknél magasabb a rövid távú mortalitás kockázata. Az alacsony $\alpha 2$ -PI antigénszint a felvételtkor súlyosabb stroke-kal és rossz hosszú távú kimenetellel társult a vizsgált kohorszban. Eredményeink arra utalnak, hogy súlyosabb stroke esetén az $\alpha 2$ -PI szerepet játszhat az rt-PA trombolízis korlátozott hatékonyság.

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/407/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Székely Edina Gabriella
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Székely, E. G.**, Orbán-Kálmándi, R. A., Szegedi, I., Katona, É., Baráth, B., Czuriga-Kovács, K. R., Lóczi, L., Molnárné Vasas, N., Fekete, I., Fekete, K., Berényi, E., Oláh, L., Csiba, L., Bagoly, Z.: Low [alfa]2-Plasmin Inhibitor Antigen Levels on Admission Are Associated With More Severe Stroke and Unfavorable Outcomes in Acute Ischemic Stroke Patients Treated With Intravenous Thrombolysis.
Front. Cardiovasc. Med. 9, 1-14, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2022.901286>
IF: 3.6
2. **Székely, E. G.**, Czuriga-Kovács, K. R., Bereczky, Z., Katona, É., Mezei, Z. A., Nagy, A. C., Tóth, N. K., Berényi, E., Muszbek, L., Csiba, L., Bagoly, Z.: Low factor XIII levels after intravenous thrombolysis predict short-term mortality in ischemic stroke patients.
Sci. Rep. 8 (1), 1-9, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26025-z>
IF: 4.011

További közlemények

3. Sadeghi, F., Sarkady, F., Zsóri, K. S., Szegedi, I., Orbán-Kálmándi, R. A., **Székely, E. G.**, Molnárné Vasas, N., Berényi, E., Csiba, L., Bagoly, Z., Shemirani, A. H.: High Neutrophil-Lymphocyte Ratio and Low Lymphocyte-Monocyte Ratio Combination after Thrombolysis Is a Potential Predictor of Poor Functional Outcome of Acute Ischemic Stroke.
J. Pers. Med. 12 (8), 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jpm12081221>
4. Orosz, A., Csapó, A., Bagoly, Z., **Székely, E. G.**, Tóth, E., Kovács, B., Bereczky, Z., Muszbek, L., Katona, É.: A new ELISA method for the measurement of total α 2-plasmin inhibitor level in human body fluids.
J. Immunol. Methods. 471, 27-33, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2019.05.004>
IF: 1.901





5. Szegedi, I., Nagy, A. C., **Székely, E. G.**, Czuriga-Kovács, K. R., Sarkady, F., Láncki, L., Berényi, E., Csiba, L., Bagoly, Z.: PAI-1 5G/5G genotype is an independent risk of intracranial hemorrhage in post-lysis stroke patients.
Ann. Clin. Trans. Neurol. 6 (11), 2240-2250, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/acn3.50923>
IF: 3.66
6. Tóth, N. K., **Székely, E. G.**, Czuriga-Kovács, K. R., Sarkady, F., Nagy, O., Láncki, L., Berényi, E., Fekete, K., Fekete, I., Csiba, L., Bagoly, Z.: Elevated factor VIII and von Willebrand factor levels predict unfavorable outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis.
Front. Neurol. 8, 1-10, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2017.00721>
IF: 2.635
7. Hudák, R., **Székely, E. G.**, Czuriga-Kovács, K. R., Nagy, A. C., Hofgárt, G., Berényi, E., Csiba, L., Kappelmayer, J., Bagoly, Z.: Low thrombin generation predicts poor prognosis in ischemic stroke patients after thrombolysis.
PLoS One. 12 (7), 1-13, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180477>
IF: 2.766

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,573

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,611**

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, 2023.09.04.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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 a kutatómunkában való részvételért.

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, Dr. Czuriga-Kovács Katalin Rékát, hogy elősegítette PhD munkámat a Neurológiai Klinikával történő kollaboráció során a klinikai vizsgálatok megszervezéséért, a betegminták és betegadatok szolgáltatásáért.

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, Csapó Juditnak, és Szabó Zsuzsannának a munkám során nyújtott szakmai tanácsadást és a módszerek elsajátításában nyújtott segítséget.

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

Köszönöm szüleimnek, 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: NKFIH OTKA K120042, FK128582, MTA-DE Lendület Hemosztázis és Stroke Kutatócsoport, HUN-REN-DE Cerebrovaszkuláris Kutatócsoport, Debreceni Egyetem ÁOK Lendület és OTKA Bridging támogatás, GINOP-2.3.2-15-2016-00048 és GINOP-2.3.2-15-2016-00043.