

Doktori (PhD) értekezés tézisei

***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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudomány tudományágban

Írta: Orbán-Kálmándi Rita Angéla okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bagoly Zsuzsa, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Fagyas Miklós, PhD
Dr. Wohner Nikolett, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Fülesdi Béla, PhD, MTA doktora

Prof. Dr. Bereczki Dániel, PhD, MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2021. december 09. 10:00 (online)

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a kalmandi.rita@med.unideb.hu e-mail címen a vitát megelőző nap (2021.12.08.) 16:00 óráig.

BEVEZETÉS

A cerebrovaszkuláris megbetegedések a fejlett országokban a vezető halálokok közé sorolhatóak. 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. 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 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. 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. 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. Számos klinikai tényezőről tudunk, mely potenciálisan növeli a stroke kedvezőtlen kimenetelének kockázatát (pl. előrehaladott életkor, stroke felvételtkor súlyossága, artériás magasvérnyomás stb.) azonban a klinikai kimenetel pontos előrejelzése a betegek felvételekor jelenleg még nem lehetséges. Mivel a véralvadási és fibrinolitikus rendszer fontos szerepet játszik mind az AIS és az ICH patogenezisében, a megfelelő speciális hemosztázis laboratóriumi markerek ill. tesztek felkutatása elméletileg lehetőséget teremthet arra, hogy megjósoljuk a stroke kimenetelét. A stroke prognózisának és a potenciális szövődményeknek a korai előrejelzése segíthet a megfelelő terápia kiválasztásában, már a betegség akut szakaszában, javítva a betegek esélyeit a túlélésre és a kisebb mértékű neurológiai deficit kialakulására. Problémát jelent azonban, hogy logisztikai okok miatt a 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. 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 fiziológiás védekező mechanizmus. A vérárvadás 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 létrejöhessen.

A vérárvadás kaszkádra emlékeztető aktiválódási rendszerét 1964-ben MacFarlane és munkatársai írták le először. Az általuk felvázolt kaszkádszerű aktiválódási folyamatot két szakaszra tagolták; az intrinsic és az extrinsic útra, mely a közös útvonalban folytatódott. Napjainkban a MacFarlane és kutatócsoportja által leírt kaszkádszisztémát felváltotta a hemosztázis sejt alapú modellje, melyet Hoffman és Monroe 2001-ben definiált. Az általuk leírt rendszer a hemosztázist három egymással átfedő részre bontja: az iniciációs, az amplifikációs és a propagációs fázisra.

Az iniciációs lépés a szöveti faktort expresszáló sejtekre (endotél, szubendotéliális struktúrák) lokalizálódik. Ebben a szakaszban az aktivált VII-es faktor (FVIIa) – szöveti faktor komplex kis mennyiségben aktiválja a IX-es és X-es faktorokat. Ezt követően az aktivált X-es faktor (FXa) az aktivált V-ös faktoral (FVa) együtt kis mennyiségben protrombináz komplexet képez a szöveti faktort hordozó sejtek felszínén, mely a protrombint trombinná konvertálja. 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 iniciációs szakaszban ennek megfelelően csak kevés aktív koagulációs fehérje képződik.

Az amplifikációs lépés során a vérlemezkék és kofaktorainak aktiválódása történik meg a szöveti faktor hordozó sejteken képződő kis mennyiségű trombin által. Noha a trombociták már a sérülés helyén kitapadnak és részben aktiválódnak, a trombin jelenléte magasabb prokoaguláns aktivitást indukálhat, mint az adhézións 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. A trombociták denz granulumaiból felszabaduló adenzin-difoszfát (ADP) tovább erősíti a trombociták aktivációját és aggregációját. Az amplifikációs fázis végére fokozott trombin generáció jön létre.

A propagációs fázis az aktivált vérlemezkék felszínén történik, kialakulásában számos koagulációs fehérje játszik szerepet. Ebben a lépésben az iniciáció során aktivált FIX (FIXa) a trombocita felszínén kötődik az FVIIIa-hoz, pozitív feedback mechanizmussal létrehozva nagy mennyiségben a tenáz-komplexet. A FXa egyesülve kofaktorával, a FVa-val ezt követően nagy mennyiségben kialakítja a protrombináz komplexet. A protrombináz ebben a fázisban már nagy mennyiségű protrombint alakít át trombinná. A propagációs fázis során tehát a prokoaguláns komplexek aktivitása robbanásszerű trombinképződést eredményez, mely fibrinogénből fibrint hoz létre a fibrinopeptidek kihatása 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 alvadéket.

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. 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 gyulladásos stimulus hatására az aktivált neutrofilekből felszabaduló, főként DNS-ből, hisztonból és granuláris fehérjékből álló extracelluláris hálózatot. Brinkmann és munkacsoportja eredményei azt mutatták, hogy a NET-ek az azurofil (primer) granulumok egyes fehérjeit tartalmazzák, úgymint a neutrofil elasztáz, és a mieloperoxidáz, valamint a specifikus (szekunder) és terciér granulumokból származó fehérjék is jelen voltak. DNS-be interkalálódó festési eljárások eredményei alapján azt is leírták, hogy a DNS a NET-ek egyik fő szerkezeti eleme. A NET-ek globuláris doménjein végzett kettős immunfestés megerősítette a neutrofil elasztáz, és a hisztonok kolokalizációját. 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. 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. Steinberg és Grinstein 2007-ben megjelent tanulmányukban megalkották a NET-ek kialakulásához vezető NETózis fogalmát mely alapján elmondható, hogy a NETózis morfológiailag meglehetősen különbözik az apoptózistól és a sejthalál egyéb formáitól.

Brinkman és Zychlinsky 2012-ben megjelent összefoglaló tanulmányukban leírják, hogy a NET-ek helytől, időtől, és az aktivátor dózisától függően képesek harcolni a különböző kórokozókkal ill. az általuk okozott betegségekkel, azonban hozzájárulhatnak betegségek patomechanizmusához is, például krónikus inflammatorikus kórképek ill. trombotikus kórképek esetén. Manzenreiter és munkatársai 2012-ben cisztás fibrózisban szenvedő betegek tüdő váladékában mutatták ki a NET-ek jelenlétét, mely hozzájárult a viszkozitás növekedéséhez. Korábban megjelent tanulmányok kimutatták a NET-ek jelenlétét preeclampsziában szenvedő várandósok placentájában is, és összefüggésbe hozták a kórkép patomechanizmusával. 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. Az egyik legfontosabb hatása a NET-eknek feltehetően a koagulációra van. A NET-ek véralvadásban betöltött szerepe jó példa arra, hogy a képződött NET mennyisége hogyan modulálja egy adott kórkép patofiziológiáját. 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. 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.

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

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. 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.

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.

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 inaktíválja 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 inaktíválja. 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.

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, fiziológiás 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. 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 vérveszteséggel társulhat. A fibrinolízis alulműködése hipofibrinolízishez vezet. A hipofibrinolízist néhány közleményben összefüggésbe hozták trombotikus események kialakulásával is, különösen a vénás tromboembóliák rizikójának emelkedésével.

A fibrinolízis vizsgálatára alkalmazhatunk egyedi vagy individuális teszteket (pl. a plazminogén, plazminogén aktivátorok, plazminogén aktivátor inhibitorok, és plazmin

inhibitorok szintjének meghatározása, ill. a fibrinolízis aktivációját jelző egyes markerek szintjének meghatározása), valamint globális tesztek. A fibrinolízis globális tesztjeinek vizsgálata történhet teljes vérből, például viszkoelasztikus módszerek révén, mint a tromboelasztográfia (TEG) és rotációs tromboelasztometria (ROTEM). 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.

***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. 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. 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. 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. Az alkalmazott turbidimetriás módszer során az alvadék kialakulása az abszorbancia növekedésével, míg az alvadék lízise az abszorbancia csökkenésével jár. 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). A görbék kiértékelésére és a fent leírt paraméterek meghatározására 2017-ben kifejlesztésre került egy Shiny Apps ClotlysisCL elnevezésű, online ingyenesen elérhető szoftver.

Ahhoz, hogy a CLA módszer jobban tükrözze a valóságot, az egyes kutatócsoportok különböző sejtes elemeket, aktivátorokat, inhibitorokat adnak a rendszerhez a vizsgálat során. 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 paraméterei, 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.

Stroke

A stroke az iszkémiás szívbetegség után a második vezető halálok, és a leggyakoribb rokkantságot okozó betegség világszerte. Az elmúlt években a stroke incidenciája jelentősen emelkedett, a stroke-kal összefüggő halálozások száma globálisan kb. 30%-kal nőtt. 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 háttérű populációk esetén.

A stroke rizikófaktorait befolyásolható és nem befolyásolható rizikófaktorokra oszthatjuk. 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.

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 tipikus tünetei közé tartozik a hirtelen fellépő egyoldalú gyengeség, zsibbadás, látászavar, megváltozott beszédképesség, ataxia, és szédülés. Felismerésében segít a Face Arm and Speech Test (F.A.S.T.) vizsgálat, amellyel a stroke-ra leginkább jellemző tüneteket laikusok is felismerhetik. 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. 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.

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.

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. 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. Az iszkémiás stroke etiológiai altípusait a TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) kritérium rendszer alapján osztályozzuk.

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 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.

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.

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. 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 infarktusban és magasabb vércukor mellett. A trombolitikus terápia elkezdése előtt azonban nehéz megjósolni a kimenetelt, mely annak tulajdonítható, hogy a jelenleg elérhető rizikóbecslő skálák nem specifikusak, prediktív értékük alacsony. 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 segítségére.

Napjainkban a katéteres vérrögeltávolítás (mechanikus trombektómia) egy másik fontos lehetőség AIS esetén a keringés gyors helyreállítására, melyre kizárólag nagyér okklúzió esetén van lehetőség. A mechanikus trombektómia leginkább olyan betegeknél alkalmazható

sikerrel, akiknél jó a kollaterális keringés, anterior keringés érintett, súlyos a neurológiai deficit, ugyanakkor nincsenek kiterjedt korai iszkémiás jelek, a betegnek nincsenek súlyos társbetegségei, és a stroke előtti funkcionális állapot megfelelő. A mechanikus trombektómia terápia 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 betegeken.

Nem traumás vérzéses stroke

Az intracerebrális vérzés stroke (ICH) az összes stroke eset kb. 15-18%-át teszi ki, halálozási aránya azonban jóval magasabb. A betegség mortalitása az első hónapban kb. 40%, az első évben pedig 54%-ra tehető. Az ICH globális incidenciája az elmúlt évtizedekben emelkedett. 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. Kockázati tényezőként tartjuk számon a diabetes mellitust, dohányzást, alkoholfogyasztást ill. egyes drogok használatát is. 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.

Az ICH-ban szenvedő betegeket ideális esetben egy átfogó kórházi környezetben kell kezelni, amely 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 antikoagulánst, van-e intraventriculáris kiterjedés, mutatja-e a beteg a hydrocephalus jeleit, van-e bizonyíték makrovaszkuláris vérzési forma jelenlétére,

valamint, hogy van-e kockázata a hematoma expansziójának. Mindezek az adatok kritikusak lehetnek az ICH gyors diagnózisának és kezelési protokolljának felállítása szempontjából. 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 vagy az MR angiográfia alkalmas lehet a vérzés forrás kimutatására is. 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. A diagnózist követően az azonnali cél az újravérzés és a hematoma terjedési kockázatának minimalizálása az első 24-72 órán belül. Fontos a vérnyomás stabilizálása, a tartósan megemelkedett vérnyomás lehetséges következménye a hematoma növekedése. 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. 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 intraventrikuláris 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% halálozási aránnyal társul.

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. 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, 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. Minden iszkémiás stroke-ot elszenvedett beteg a tünetek jelentkezésétől számított 4,5 órán belül intravénás (rt-PA, Alteplase Boehringer Ingelheim, Németország) trombolízis kezelésben részesült a standard protokolloknak megfelelően. 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. 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 lipidcsökkentő terápiák). A stroke súlyosságát a klinikusok az NIHSS skálarendszer alapján határozták meg felvételnél, valamint 7 nappal a terápiát követően. A stroke etiológiájának meghatározása a TOAST kritériumok szerint történt. A betegek követése és a hosszútávú funkcionális kimenetel megítélése az mRS pontrendszert alkalmazva történt 3 hónappal a terápiát követően.

A tanulmány során a következő kimeneteleket állítottuk fel:

1. Rövidtávú funkcionális kimenetel: az NIHSS változása alapján a 7. npra. Az NIHSS minimum 4 ponttal való csökkenése vagy 0 NIHSS pontérték a kedvező rövidtávú kimenetelt, az NIHSS legalább 4 pontos emelkedése vagy a 7. npra bekövetkező halál a kedvezőtlen hosszútávú kimenetelt jelentette.
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.

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. 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. A neurológusok emellett számos klinikai és demográfiai adatot regisztráltak (tünetek jelentkezésének ideje, kor, nem, gyógyszerek, cerebro- és kardiovaszkuláris kórtörténet, cerebrovaszkuláris rizikó faktorok, dohányzás) a kórházba kerülés pillanatában. A stroke súlyosságának meghatározására az NIHSS skálarendszert alkalmazták, felvételnél és az eseményt követő 7. napon. A mortalitás veszélyének becslésére a klinikusok az ICH score pontrendszert alkalmazták minden beteg esetén. A betegek hosszútávú funkcionális kimenetelének értékelésére az mRS pontrendszert használták. 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 felvételnél orr/garat váladékból származó RNS mintából reverz transzkripció polimeráz-láncreakció (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 kimeneteket 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.

Etikai engedély

Mindkét tanulmány tervezése a Helsinki 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 betegről felvételtkor 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, szérum 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 alvadásgátolt (Becton Dickinson, Franklin Lane, NJ) vérmintákból trombocita szegény plazmamintákat készítettünk (kétszeri centrifugálás, 15 percig, 1500 G, szobahőmérsékleten). A hemosztázis szűrőtesztek 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 alvadásgátolt 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 1ng/mL-től 1µg/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. 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 alvadégszétoldó 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 hisztin optimális koncentrációját az irodalomban leírt előkísérletek alapján állítottuk be, ahol a hisztin (50 µg/mL) és a különböző koncentrációjú cfDNA (50-250 µg/mL) együttes hatását vizsgálták a fibrinolízis kinetikájára, tisztított kísérleti körülmények között. A plazmaminták megalvasztását mindkét kísérleti elrendezésben az automata által injektált 21 mM CaCl₂-ot tartalmazó HEPES pufferrel iniciáltuk. A minták abszorbanciáját 340 nm hullámhosszon, 37°C-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. 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, EPO5-A3) irányelvei alapján. 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.

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. Az α értékét (I. típusú hiba arány) 0.05-ben állapítottuk meg, 0.80 statisztikai erő mellett. A kimenetelek 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. Az AIS betegek korának mediánja 67 (IQR: 50-76) év volt, 54,6%-uk férfi volt. A felvételtől NIHSS mediánja 7 (IQR: 4-11) volt. A tünetek kialakulása és a kezelés megkezdése közötti idő mediánja 150 (IQR: 111-206) percnél adódott. A cerebrovaszkuláris rizikók közül az artériás hipertónia volt a legnagyobb arányban jelen. 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.

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 felvételtől cfDNA szintek és a stroke súlyossága között lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető. Azok a betegek, akik a felvételtől 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 felvételtől cfDNA szintek között vizsgálatunk során nem találtunk összefüggést. A szabad cfDNA szintek szintén nem mutattak kapcsolatot a stroke kedvező vagy kedvezőtlen rövidtávú kimenetelével. 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. A terápiával összefüggő intrakraniális vérzéses szövődményt elszenvedő betegek felvételtől cfDNA szintjei nem tértek el szignifikánsan azon betegek eredményeitől, akiknél nem alakult ki ez a komplikáció.

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. 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. 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, $p = 0,301$). A vizsgálatunk során a CLA paraméterek nem mutattak összefüggést a stroke rövid- illetve hosszútávú kimeneteleivel. Szintén nem találtunk kapcsolatot az 50%CLT és a vérzéses komplikációk kialakulása között a vizsgált betegpopulációban, azonban a CLA AUC paraméter szignifikánsan alacsonyabb volt a lízist követően agyvérzett betegek körében. A TOAST kritériumok alapján meghatározott stroke etiológiája és az ASPECTS értékek nem mutattak összefüggést a CLA eredményekkel.

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 mintaoldatunkhoz (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. 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. A hagyományos CLA mérések során tapasztaltakhoz hasonlóan, a módosított CLA vizsgálatok eredményeként kapott 50%CLT paraméter és a stroke felvételtől súlyossága között lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető, továbbá szignifikáns összefüggés volt megfigyelhető 10%CLT és a CLA AUC paraméterek esetében is a módosított CLA mérések során. 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 konszumpcióra vagy fokozott fibrinolízisre utaló specifikus hemosztázis fehérjék, markerek szintjét. Míg a fibrinogén szintek nem utaltak a stroke súlyosságával összefüggésben konszumpcióra, 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. Ez a különbség nem volt szignifikáns abban az esetben, ha a mérés nem tartalmazott hozzáadott cfDNA-t és hisztont. A stroke hosszútávú funkcionális kimenetele és a módosított CLA eredmények között nem találtunk szignifikáns kapcsolatot. A terápiával összefüggő intrakraniális vérzéses szövődmény előfordulása szignifikáns összefüggést mutatott a CLA paraméterekkel, ha a mérés tartalmazott cfDNA-t és hisztont. 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 AIS betegekben a terápia-asszociált vérzésre ill. rövidtávú kimenetelre nézve

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 megjelölésére 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%). 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; $p=0,008$. 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, $\alpha 2$ -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). 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; $p=0,004$).

Nem traumás intracerebrális 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. Az ICH betegek átlag életkora 68 ($\pm 11,6$) év volt, a betegek 64%-a férfi volt. A felvételtkor NIHSS mediánja 14 (IQR: 8-20), a medián ICH score 1 (IQR: 1-3) volt. A cerebrovaszkuláris rizikó tényezők közül az artériás magasvérnyomás volt a legnagyobb arányban jelen (96,6%). A koagulációs szűrőtesztek és a fibrinogén szintek eredményei nem utaltak hemorrágiás diathesisre egyetlen betegnél sem. A felvételtkor becsült vérzésvolumen érték mediánja 20,0 cm³-nek (IQR: 3,7-48,0 cm³) adódott, és 46 betegnél (51,7%) alakult ki intraventrális hemorrágia. A betegpopuláció mortalitása az első 14 napban 29,0% volt, mely 43,8%-ra nőtt 90 nappal az eseményt követően.

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

A vártak megfelelően az alvadék lízis paraméterek (maximális abszorbanca, 10%CLT, 50%CLT, CLA AUC) szignifikáns megnyúlása volt megfigyelhető, ha a CLA rendszerhez cfDNA-t és hisztont adtunk. Ezt követően összehasonlítottuk az ICH betegek CLA ill. módosított CLA paramétereit egészséges önkéntesek plazmamintáiból meghatározott lízis idő paraméterekkel. A vártak megfelelően az ICH betegek szignifikánsan rövidebb lízis idővel rendelkeztek az önkéntesek alvadék lízis idejéhez viszonyítva. A vérzéses stroke-ot elszenvedett betegek esetén 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. Következő lépésként megvizsgáltuk a betegek hagyományos CLA paraméterei és a kialakult stroke súlyossága és az előzőekben meghatározott kimenetek közötti összefüggéseket. A stroke súlyossága és a konvencionális CLA paraméterek között nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált betegpopulációban. Megvizsgálva a hagyományos CLA paraméterek és a stroke 14 napos mortalitása ill. a hosszútávú funkcionális kimenetele közötti kapcsolatot, 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. Hasonlóan, szignifikánsan rövidebb alvadék lízis volt megfigyelhető a módosított CLA mérések során a magasabb ICH pontszámú, kedvezőtlenebb prognózisú betegeknél (ICH score 2-5). A 14. napig elhunyt betegek esetén szignifikánsan rövidebb 10%CLT értékeket detektáltunk az új módszer alkalmazásakor, 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 felvételtől NIHSS, az INR, a dohányzás, és a trombocitaszám szintén összefüggést mutatott a 14. napig bekövetkezett halálozással. Hasonlóan a rövidtávú kimenetelhez, a hosszútávú funkcionális kimenet is szignifikáns összefüggést mutatott a CLA paraméterekkel, ha cfDNA-t és hisztont is adtunk a rendszerhez. Azok a betegek, akik meghaltak, vagy kedvezőtlen hosszútávú kimenetellel ($mRS>2$) rendelkeztek az eseményt követő 3 hónapon belül, szignifikánsan rövidebb felvételtől CLA paraméterekkel rendelkeztek, azokhoz a betegekhez képest, akiknél kedvező hosszútávú kimenetel alakult ki. A módosított CLA

paraméterek mellett, a felvételi NIHSS, a BMI, az INR és a trombocitaszám is összefüggést mutatott a 90 napos kimenetellel.

A vártak megfelelően a felvételi becsült vérzésvolumen értékek szoros összefüggést mutattak a 14 és 90 napig bekövetkezett halálozási adatokkal. Azon betegek esetén, akik az eseményt követő 14. illetve 90. napig elhaláloztak, vagy kedvezőtlen hosszútávú funkcionális kimenetellel ($mRS \geq 2$) rendelkeztek, szignifikánsan nagyobb felvételi becsült vérzésvolumen érték volt megfigyelhető a kedvező kimenetelű betegekhez képest. A módosított CLA paraméterek szignifikáns korrelációt mutattak a felvételi becsült vérzésvolumen értékekkel. A gyorsabb alvadék képződést és lízist jelző paraméterek (rövidebb maximális abszorbanca eléréséhez szükséges idő, rövidebb 10%CLT, alacsonyabb CLA AUC) szignifikáns asszociációt mutattak a nagyobb vérzésvolumen értékekkel. A módosított CLA paraméterek diagnosztikai hatékonyságának vizsgálata érdekében ROC analízist végeztünk. 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. 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 felvételi 10%CLT értéket mutató betegek túlélése között az eseményt követő 90. napig vizsgálva ($p=0,010$). 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, hypertonia, 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, felvételi NIHSS, INR, BMI, trombocitaszám, 10%CLT, vérzésvolumen érték, és hypertonia) 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; $p=0,038$).

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. 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 FXIIIa 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 körképekben 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.

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. A legtöbb tanulmányban a stroke kialakulását követő 24 órán belül gyűjtött

vérmentát 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. 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 kimeneteket 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. 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. 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. Vizsgálatunk alapján elmondhatjuk, hogy a cfDNA és hiszton hozzáadása az *in vitro* CLA keverékhez, a vártak megfelelően, szignifikánsan megnyúlt alvadék képződést

és lízist eredményezett. 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. 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. Bár a cfDNA és hiszton hatása koránt sem azonos az intakt NET-ek hatásával, kimutatták, hogy a DNS-nek és a hisztonnak fontos alvadék-stabilizáló és antifibrinolitikus szerepe van. Egyéb mechanizmusok mellett azt is igazolták, hogy a cfDNA felgyorsítja a t-PA-PAI-1 komplex képződését, lelassítja a t-PA által közvetített plazmin képződést, modulálja az alvadék szerkezetét, és késlelteti a plazmin által indukált lízist, a fibrinszálakkal való interkalációja révén. A hiszton megköti a fibrinogént és a fibrint, valamint a hiszton polimerizált fibrinbe történő beépülésének eredményeként stabilabb alvadék képződik. A biokémiai modellek során alkalmazott koncentrációk, csakúgy, mint az általunk alkalmazott vizsgálati körülmények kórosan magas DNS ill. hiszton koncentrációkat tükröznek, amelyek a trombusok belsejében fordulhatnak elő. Nehéz megbecsülni az alvadékokban előforduló DNS mennyiségét, korábbi vizsgálatok igen magas koncentrációkat valószínűsítettek. Egészséges egyéneknél a keringő cfDNA relatíve alacsony szintjei figyelhetők meg (0,02-1,7 µg/mL), de emelkedett szintet (5 µg/mL vagy annál magasabb) észleltek számos megbetegedés során, például szepszisben. A tanulmányunk során

alkalmazott módosított CLA mérések során a cfDNA és hiszton optimális koncentrációját korábbi *in vitro* tanulmányok eredményei alapján választottuk. 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 lízist 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 felvételtkor NIHSS értékhez. A hemorrhágiás transzformáció az rt-PA terápia egyik legsúlyosabb mellékhatása, mely korlátot szab a kevésbé tapasztalt központok számára a terápia széleskörű alkalmazásának. Mindazonáltal csak néhány tanulmány áll rendelkezésre olyan hemosztázis vagy fibrinolízis biomarkerekről, melyek előrejelzik a lízis utáni vérzést, mivel a vérzéses komplikációkban szenvedő betegek száma a vizsgált kohorszokban gyakran túl alacsony a megfelelő következtetések levonásához. 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 felvételtől 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 felvételtől súlyosságával. Ez a fordított összefüggés egy rejtélyes eredmény, amelynek magyarázatára megvizsgáltuk néhány hemosztázis ill. fibrinolitikus fehérje szintjét a plazmamintákban, konszumpcióra 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. Dolgozatunk során bemutattuk, hogy a betegek felvételtől módosított CLA paraméterei korrelálnak a becsült felvételtől 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.

Eredményeink alapján a fibrinolitikus egyensúly felborulása fontos szerepet játszhat az intracerebrális hematoma kialakulásában. A vizsgált kohorszban a felvételtől 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 $\alpha 2$ -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. A második tanulmányunk során az iszkémiás stroke-ot szenvedett betegkohorsz vizsgálatai 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. attól 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 plazmamintáiból végeztük el. A stroke súlyosságának megállapítására az NIHSS skálarendszer, a terápia asszociált vérzés klasszifikációja az ECASS II kritériumok alapján történt. A betegek funkcionális kimenetelének meghatározása az eseményt követő 7. és 90. napon történt a Δ NIHSS és a modifikált Rankin Skála (mRS) alapján.

A cfDNA és hisztin 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: 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: 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.

Az értekezés új eredményei, megállapításai

1. Új, módosított alvadék-lízis módszert (CLA) fejlesztettünk ki, mely során a cfDNA és hiszton hozzáadása a konvencionális CLA módszerhez növelte a teszt diagnosztikai hatékonyságát a stroke kimenetelének előrejelzésére.
2. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a cfDNA és hiszton jelenléte szignifikánsan nyújtotta az alvadék lízist a vizsgált betegpopulációkban.
3. Az AIS betegekben a stroke felvételtől súlyossága és az 50%CLT értékek között lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető.
4. 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.
5. Megállapítottuk, hogy a módosított CLA magas negatív prediktív értékkel bír (97,9%) a lízist követő intrakraniális vérzés előfordulásának kimutatására. A logisztikus regressziós analízis eredménye alapján elmondhatjuk, hogy a módosított CLA mérés során detektált alacsony CLA AUC paraméter (<29,9 OD*perc) a terápia asszociált intrakraniális vérzéses szövődmény szignifikáns, független előrejelzője, hasonlóan az emelkedett felvételtől NIHSS értékhez.
6. Az ICH betegek felvételtől módosított CLA paraméterei korreláltak a becsült felvételtől vérzésvolumen nagyságával, ami fontos előrejelzője a kimenetelnek.
7. Kimutattuk, hogy 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 ICH betegpopulációban.
8. 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.

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., Láncri, 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., Flak, 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 alapjául szolgáló közleményekre): 8,382

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



Debrecen, 2021.08.09.

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.