

TÉZISEK MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉSHEZ

**Biomarkerek klinikai haszna ischaemiás eredetű akut
kórképekben – úton a személyre szabott medicina felé**

Dr. Molnár Tihamér Szabolcs



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet
Pécs, 2020**

INVOKÁCIÓ

PhD dolgozatomat angol nyelven írtam meg “Biomarker investigations in acute brain injuries” címmel, melyet 2009-ben védtem meg. A logikus tudományos gondolkodás és lelkesedés, valamint a felfedezés öröme egy olyan pályára állított, melyet csak utólag értettem meg. Egy olyan terület kutatója lettem, ami mindennapos kihívást jelent egy olyan szakorvos számára, aki egyszerre műveli az aneszteziológiát és intenzív terápiát, és ezt ötvözni igyekszik a neurológiai szakvizsgával megszerzett tapasztalataival. A stroke terápiájában megjelenő ’paradigma váltás’ a 2000-es évek elején rendkívüli kihívást jelentett a kórházi ellátásban dolgozók számára. Előbb a szisztémás vérrög oldó kezelés elterjedése jelentett reményt a sikeres rekanalizációra, majd az ún. “idő ablakon túl” érkező, tehát trombolízis terápiára alkalmatlan betegek számára nyújtott további esélyt a neurointervenció látványos fejlődése. Az ember azt gondolhatta, hogy egy specifikus terápia elhozta egy konkrét betegség kezelésére a megoldást. A kép azonban nem ilyen egyszerű. Eredmények csak jól szervezett prehospitális rendszer, stroke centrumok és nagyon drága intervenciók eljárások árán érhetők el, ráadásul a betegek jelentős része a gyors és szakszerű ellátás ellenére sem profitál a költséges beavatkozásokból. A fogyatékossgal tovább élők pedig komoly szociális terhet jelentenek a család és az egész társadalom számára. Így a sok nyitott kérdés alapján tudományos tevékenységemet a primér stroke prevenció, a már bekövetkezett stroke prognosztikai elemzése, és a stroke-ot követő szekunder prevenció tárgyában végeztem és az alábbi dolgozatot erre a logikai láncára építettem fel (**1. ábra**).

Abszolút prioritás a stroke kialakulásának megelőzése. Az akut ellátásban dolgozó intenzív orvosnak erre nem sok befolyása van. Szerencsés módon sikerült egy olyan kutatást elindítanom, mely a prevenciók eszköztár része lehet. Ennek alapja az a saját megfigyelés volt, hogy a járószalagos terhelésre alkalmatlan szívbetegek, dipyridamol terhelése kapcsán az esetek kb 20%-ban percek alatt múltó neurológiai tüneteket figyeltem meg. Feltételezésem az volt, hogy bár a beteg valamilyen szívpanasszal fordult orvosához, de betegsége nem szervspecifikus, hanem szisztémás kór állapot része, mely az agyi erek szintjén is megjelenik. Ez motivált a jelenség hátterében álló mechanizmusok tisztázására azzal a reménnyel, hogy eljutunk a fenyegető stroke előszobájának számító agyi atherosclerosis még szubklinikus stádiumban való detektálásához. Amennyiben hipotézisünk helytálló, akkor megfelelő prevenciók terápiai és egyéb befolyásolható rizikó faktorok eliminálásával esélyt adhatunk a stroke megelőzésére (**1. ábra**, „Dipyridamol indukált steal-jelenség”, Tézis 1).

A második kérdés új biomarkerek vizsgálatára fókuszált már bekövetkezett ischaemiás stroke-ban és a szintén stroke megelőző állapotnak számító szignifikáns carotis stenosisban

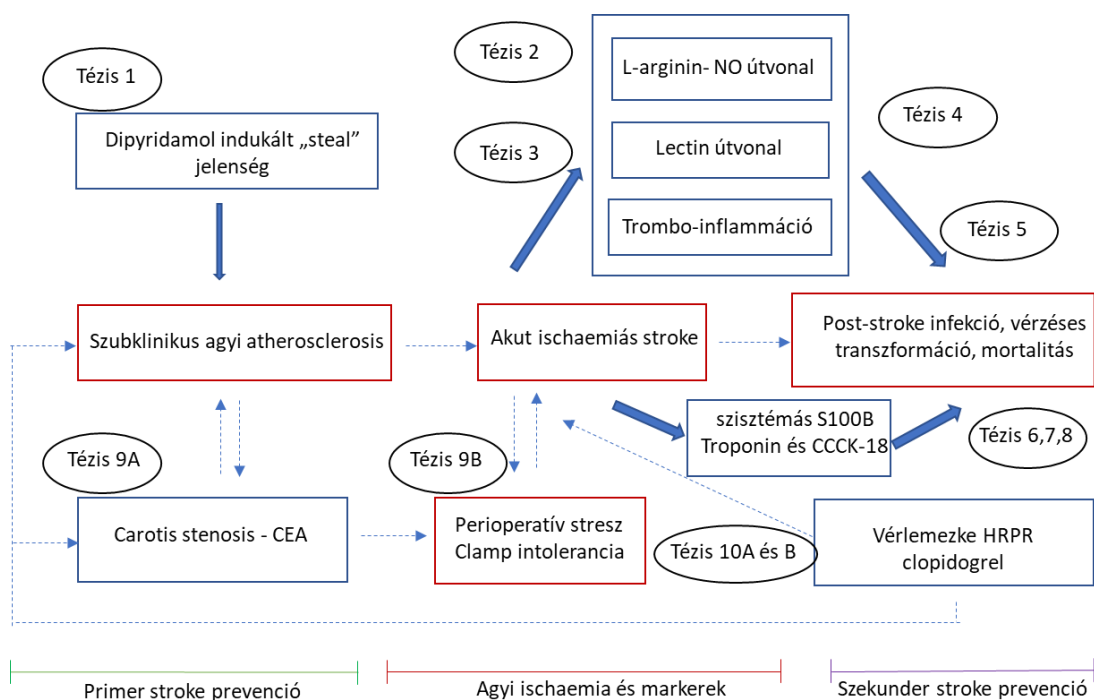
szenvedő betegekben. Itt olyan új útvonalakat kezdtünk el vizsgálni (L-arginin útvonal, komplement rendszer, thrombo-inflammatorikus kaszkád), melyek azóta sem veszítették el aktualitásukat a nemzetközi irodalomban. Részben a szóbajöhető molekulák kinetikájának feltérképezésére, részben a prognózis független prediktorainak feltárására koncentráltunk (**1. ábra**, „Akut ischaemias stroke”, Tézis 2.).

A harmadik kérdéskör ahhoz a megfigyeléshez kapcsolódik, hogy a kedvezőtlen kimenetel olyan szövődményekkel áll összefüggésben, mint a post-stroke infekció. Elsők között tártuk fel a post-stroke immundepresszió jelenségét, mely terápiás célpontok azonosítását kínálhatja a jövőben (**1. ábra**, „Post-stroke infekció, vérzéses transzformáció, miokardiális érintettség és mortalitás”, Tézis 3,4,5,6,7,8A és 8B).

A negyedik problémakör visszatükrözi kettős szakmai érdeklődésemet, és a neurológia/aneszteziológia határterületére koncentrált. Intézményünkben a carotis endarterectomiák (CEA) lokoregionális anesztéziában történnek. Az éber, de a beavatkozás miatt nyilván szorongó beteg perioperatív stresszének csökkentésére irányultak erőfeszítéseink. Olyan éber-szedációs protokollt dolgoztunk ki, melynek kedvező hatásait a szervezetben zajló komplex stresszválasz vizsgálatával igyekeztünk alátámasztani. Majd betegeink sorsának több éves nyomonkövetésével a mindennapi orvosi gyakorlatban is használható megfigyelésekhez jutottunk. Emellett érsebészeti szempontból sem elhanyagolható, hogy olyan markert azonosítottunk, mely előrejelezte a műtét alatti shunt igényt. (**1. ábra**, „Carotis stenosis- CEA”, Tézis 9A és 9B).

Ezt követően a szekunder stroke prevencióban használt vérlemezke gátlás, illetve a gyógyszer szedése ellenére fennálló ún. 'magas reziduális vérlemezke reaktivitás' került tudományos érdeklődésünk középpontjába (**1. ábra**, „vérlemezke reziduális reaktivitás”, Tézis 10A és B). A rendelkezésre álló funkcionális vérlemezke vizsgálatokat (impedancia aggregometria), új módszerekkel egészítettük ki. Ezek közé sorolható, a saját fejlesztésű trombocita antiszedimentációs ráta (TAR), mely azt vizsgálja, hogy egyórási gravitációs ülepítés során mi történik a vérlemezkekkel. Emellett a labormedicina által nyújtott új vérlemezke paraméterekkel, valamint morfológiai (transzmissziós elektronmikroszkópia és atomerő mikroszkópia) vizsgálatokkal egészítettük ki kutatásunkat. Amennyiben ez az innovatív megközelítés eredményes lesz, akkor a személyre szabott medicina gyakorlati alkalmazása felé egy újabb nagy lépést tehetünk, megelőzve a stroke és egyéb vaszkuláris események recidíváját.

Az eltelt évek alatt számos hazai és nemzetközi kollaborációt sikerült kialakítani, de büszkén mondhatom, hogy valamennyi kutatás, mely dolgozatomban említésre kerül hazánkban történt. Minden eredményünk csapatmunka volt, amiért minden résztvevőnek hálás vagyok.



1. ábra. A Tézisben szereplő tudományos munkák logikai összefüggése

CEA: carotis endarterectomia; NO: nitrogén monoxid; CCCK-18: caspase cleaved cytochrome c; HRPR: 'high residual platelet reactivity' (kezelés ellenére fennálló reziduális vérlemezzo reaktivitás).

Saját klinikai területem az aneszteziológia és intenzív terápia, rendkívüli módon támaszkodik “high-tech” eszközök alkalmazására. Ráadásul a nem túl távoli jövőben mindez valószínűleg kiegészül a mesterséges intelligencia, illetve “deep learning” alapján működő döntéshozatali algoritmusok használatával. Ennek ellenére személyes meggyőződésem, hogy a beteg, a monitor és az altatógép mellett álló jól képzett klinikust semmi sem pótolja. Ami a kutatást illeti, a másik rendkívül gyorsan fejlődő ágazat a biotechnológia, mely a transzlációs lehetőségekkel remélhetőleg tényleg elhozza az egyénre szabott gyógyítás lehetőségét. Mindezek a jövőben az orvosbiológiai szakemberek még szorosabb együttműködését kívánják meg, különben az ugrásszerű fejlődések egyszerűen maguk alá temetnek bennünket.

Összefoglalva, egy olyan orvosgeneráció tagja vagyok, aki pályája kezdetén tanúja volt az “eminencia” alapú, majd napjainkban az „evidencia” alapú és remélhetőleg a jövőben az „egyéni szabott”, molekuláris medicina fejlődésének. MTA doktori értekezéssel a bennünket körülvevő biológiai világ értelmezésének egy apró szeletét szeretném elhelyezni, úgy, hogy abban egyaránt visszatükröződjön tudományos és klinikai érdeklődésem két specifikus területen, a neurológiában és aneszteziológiában a betegek kezelésének előtérbe helyezésével.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACAS: Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study
ACC: arteria carotis communis
ACI: arteria carotis interna
ACS: acute coronary syndromes
ACST: Asymptomatic Carotid Surgery Trial
ACTH: adreno-corticotrop hormon
ADMA: asszimetrikus dimetilarginin
ADP: adenosine diphosphate
AIS: akut ischaemiás stroke
AF: atrial fibrillation
AICS: acute ischemic coronary syndromes
AMI: akut miokardiális infarktus
BDZ: benzodiazepin
BMI: body mass index
CABG: Coronary artery bypass graft
CAS: carotid artery stenting
CHS: cerebrális hiperperfúziós szindróma
COPD: chronic obstructive pulmonary disease
CRP: C-reaktív protein
CREST: Carotid revascularization endarterectomy versus stenting trial
CT: computer tomográfia; CTA: CT angiográfia
DSA: digitális szubtrakciós angiográfia
DWI: diffúzió-súlyozott képalkotás
ECST: European Carotid Surgery Trial
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
EKG: elektrokardiogram
ESR: erythrocyte sedimentation rate
FasL: fas ligand
FSC: forward scattered light
GA: általános érzéstelenítés (general anesthesia)
GALA: General anaesthesia versus local anaesthesia (for carotid surgery)
GCS: Glasgow Coma Scale
GOS: Glasgow Outcome Scale
H-IPF: high fluorescent immature platelet fraction
HLA-DR: Human Leukocyte Antigen – DR isotype
HPLC: High Pressure Liquid Chromatography
hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein
ICSS: International Carotid Stenting Study
IFN- γ : interferon- gamma

IL-1: interleukin-1
IL-6: interleukin-6
IPF: immature platelet fraction
LAR: leukocyte antisedimentation rate
LCR: large cell platelet ratio
LDL: low density lipoprotein
LOX-1: low-density oxidized lipoprotein receptor-1
MMSE: Mini Mental State Examination
MAP-1: MBL/Ficolin associated Protein-1
MASP-3: MBL associated serine protease-3
MBL: mannose binding lectin
MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1
MPV: mean platelet volume
MRA: MR angiográfia
NASCET: North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial
NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale
NK cells: natural killer cells; NKT-like cells: natural killer T-like cells
NO: nitrogén-monoxid
NOS: NO synthase; eNOS: endothelial NOS; iNOS: inducible NOS; nNOS: neuronal NOS
NSE: neurone specific enolase
PAR: platelet antisedimentation rate
 $P(j-a)CO_2/C(a-j)O_2$: jugulo-arteriális szén-dioxid nyomás különbség/arterio-juguláris oxigéntartalom különbség
PCI: perkután koronária intervenció
PESA: Progression of Early Subclinical Atherosclerosis Study
POCD: posztoperatív kognitív diszfunkció
PSV: csúcs szisztolés sebesség (peak systolic velocity)
RA: regionális érzéstelenítés (regional anaesthesia)
SAPPHIRE: Stenting and Angioplasty with Protection in Patients at High Risk for Endarterectomy
sCD40L: soluble CD40 ligand
SDMA: szimmetrikus dimetilarginin
sP-selectin: soluble P-selectin
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
sVCAM-1: soluble vasculare cell adhesion molecule-1
TBI: traumatic brain injury
TCD: transzkraniális Doppler
TCI: target controlled infusion
TEM: transzmissziós elektronmikroszkópia
TIA: transient ischemic attack
tPA: tissue plasminogen activator
WBC: White Blood Cell

BEVEZETÉS

BIOMARKEREK JELLEMZŐI

Az akut kórképek kezelése rendkívül idő érzékeny. Mind a gyors diagnosztikában, mind a terápia hatásosságának nyomonkövetésében de a prognózis becslésében is ma már nélkülözhetetlen a biomarkerek használata. Ezek egy rész már 'point of care' módon a betegágy mellett is hozzáférhető, jelentősen gyorsítva a klinikai döntéseket. A kutatási céllal használt biomarkerek fontosak a patomechanizmusok megértéséhez, és a jövőben használt rutin markerek kiválasztásának alapjait képezik. A National Institute of Health definíciója szerint: „A biomarker olyan tulajdonság, melyet objektíven lehet mérni, és amely indikátora lehet a fizioiógias biológiai folyamatoknak, patológiás folyamatoknak, vagy egy terápiára adott farmakológiai válasznak”. Ez alapján nem csak a klasszikus testfolyadékokban mérhető molekulákat, hanem állapot súlyossági pontszámokat, illetve képkalkító eljárással szerzett jeleket/kritériumokat is markereknek tekinthetünk. A kritikus állapotú betegek diagnosztikája és terápiája jelentős fejlődésen ment át az elmúlt időszakban, mely számos költséges és a beteg számára megterhelő invazív beavatkozást igényel. Így a költséghatékonyság szempontjából is elengedhetetlen a biomarker alapú algoritmusok használata, különösen a magas negatív prediktív értékkel rendelkező markereké, melyek lehetővé teszik a felesleges diagnosztikus és terápiás beavatkozások elkerülését. Mivel egy folyamatosan fejlődő biotechnológiai forradalomnak vagyunk tanúi, így a biomarkerekről szóló ismereteink is folyamatosan szélesednek. Egyre érzékenyebb és specifikusabb markerek tűnnek fel a tudományos horizonton, megcsillantva a személyre szabott medicina lehetőségét.

VASZKULÁRIS BETEGSÉGEK – PARADIGMA VÁLTÁS

Az atherosclerosis patogenezisében számos új útvonal került feltérképezésre. A kardiovaszkuláris kockázat értékelésében használt hagyományos rizikó faktorok (például cukorbetegség, diszlipidémia, dohányzás, nem, és életkor) nem elég pontosak, hiszen értelmezhetetlen, hogy egyes magas kockázatú betegeknél miért nem tapasztalható kardiovaszkuláris esemény, míg az alacsony kockázatúnak minősített populáció egy százaléka mégis fatális esemény áldozata lesz. Hasonló a probléma az evidencia alapú orvoslással, melynek nagy vívmánya, hogy a tekintély alapú szemléletet szigorú tudományos gondolkodás váltotta fel, de már ennek a koncepciónak a kritikája is látható, miszerint “ugyanaz a méret nem biztos, hogy mindenki számára jó”. Jelenleg úgy tűnik, hogy a jövőben a személyre szabott

medicina alkalmazásától várhatjuk a morbiditási és mortalitási adatok további javulását. Ebben a transzlációs medicina fontos szerepet játszhat a maga eszközeivel (mesterséges intelligencia alapú “big data” analízis stb.). A cél csoportok azonosítása és a megfelelő kezelés bevezetése megelőzhetné az akut vaszkuláris esemény bekövetkezését, például, ha a vérlemezke gátló terápiára rezisztens eseteket a mindennapi gyakorlat szintjén szűrni tudnánk. Ha pedig bekövetkezett egy vaszkuláris esemény (pl. ischaemiás stroke), akkor a komplikációkra (pl. vérzéses transzformáció vagy post-stroke infekció) leginkább fogékony betegek szűrése segítene hozzá, a személyre szabott kezeléshez, jelentősen javítva annak kimenetelét. A korábbiakban felvetett problémák mindegyikére kitérek az alábbi kutatásaimban.

Az önálló útvonalakhoz tartozó és különböző patofiziológiai eseményeket tükröző több biomarker közötti kölcsönhatások és kompozit biomarkerek vizsgálata egy új és izgalmas terület. Ez a koncepció igaz lehet az L-arginin- nitrogén monoxid (NO) útvonal metabolitjai, az akut vaszkuláris kórképeket kísérő trombo-inflammatorikus és a központi idegrendszeri sejtsejtülés neuroinflammációs molekulái közötti összefüggések feltérképezése során is.

1. RIZIKÓ CSOPORTOK FELTÁRÁSA

1.1. AGYI KÉPALKOTÓ VIZSGÁLATOK

Az orvostudomány közelmúltbeli rohamos fejlődésének köszönhetően az ischaemiás stroke egyre nagyobb sikerrel kezelhető betegséggé vált. Ennek alapkövei a laikus oktatás (tünetek felismerése laikus által), a prehospitalis ellátás és a centrumok kialakítása, ahol a modern képalkotás, a farmakológiai beavatkozás (thrombolysis) és/vagy neurointervenció a nap 24 órájában folyamatosan elérhető. Az idősödő társadalomban megfigyelhető stroke prevalencia növekedés, valamint a terápia ellenére kialakuló morbiditás miatt – a stroke a tartós fogyatékoság leggyakoribb oka - a prevenció fontosságát nem lehet eléggé hangsúlyozni. Ezen a területen a fejlett neuro-képalkotó technikák használata forradalmi. A mágneses rezonancia (MR) technikák és a pozitron emissziós tomográfia (PET) segíthetnek olyan premorbid állapotok feltárásában, amelyek egyébként stroke-hoz vezethetnek, és mind az elsődleges, mind a másodlagos stroke prevencióban hasznosak lehetnek. A definitív stroke kialakulását megelőző carotis stenosis és az átmeneti ischaemiás rohamok (TIA) diagnosztikája, kezelése és a progresszió dinamikájának értelmezése elengedhetetlen. Megállapítást nyert, hogy a carotis stenosis olyan jelentős lézió jelenlétében kell kezelni, amely neurológiai tüneteket is okoz. Felmerül azonban a kérdés: hogyan kell kezelni azokat

a betegeket, amikor a stenosis és a tünetek közötti kapcsolat nem egyértelmű, vagy a tünetek nem tisztázottak. Ilyen esetekben a carotis PET és/vagy zsírtartalmú T1 MRI képei segíthetnek a plakk embolikus jellegének igazolásában. Ismert, hogy a vulnerábilis nyaki plakkok embolizációt okozhatnak. A plakkban zajló gyulladásos folyamatokat a PET, míg a plakk bevérzését az MRI detektálni képes. Habár e két vizsgálat a plakkok vulnerabilitásának különböző stádiumait mutatja, mindkettő segíthet olyan érrendszeri léziók észlelésében, amelyek az ischaemiás események kialakulásának valódi kockázatát hordozzák. A diffúzióval súlyozott MR képalkotás (DWI) kimutatta, hogy egyes TIA-k valóban ischaemiás agyi léziók lehetnek, átmeneti tünetekkel. A DWI korai alkalmazása tehát hozzájárulhat ezeknek a betegeknek az időben megkezdett kezeléséhez. Azonban további innovációra és újabb képalkotó technikák kifejlesztésére rendkívül nagy tudományos és társadalmi igény van.

1.2. DIPYRIDAMOL TESZT A NEUROLÓGIÁBAN?

Ebben az alfejezetben szeretném összefoglalni a téma korábbi kutatási eredményeit, melyek elvezettek a jelenleg is zajló fejlesztésekig. Először a kardiológiai diagnosztikában alkalmazott dipyridamole (DP) stressz-teszt során észlelt átmeneti (percek alatt múlt) neurológiai tüneteket kezdtük el vizsgálni. A DP-teszt rutin eljárás az ischaemiás szívbetegség felismerésében, továbbá a koronária intervenció indikációjának felállításában. A protokoll szerint 0,56 mg/kg dipyridamolt juttatunk be a keringésbe 4 perc alatt, intravénásan és a vitális paramétereket monitorozzuk. A radiofarmakon (99mTc-methoxyisobutyl-isonitrite, MIBI) beadását követően, cardio-SPECT vizsgálat történik. Elsőként publikáltuk a jelenséget, hogy a betegek egy negyedében a DP beadását követően percek alatt regrediáló transziens neurológiai jelek alakulhatnak ki. Definitív stroke sohasem maradt vissza. Tekintettel a DP értágító hatására, feltételeztük, hogy „steal” jellegű hatás érvényesül az agyi vazoregulációban. Ezt követően egy prospektív vizsgálatban a DP-al tesztelt koronária betegektől DP stressz előtt és utána 15 illetve 60 perccel vénás vért vettünk S100B és neuron specifikus enoláz (NSE) meghatározás céljából. A betegeket a DP által indukált transziens neurológiai jelek alapján pozitív és negatív alcsoportokra osztottuk. A DP pozitív betegek szérumában a DP teszt elvégzése után egy órával diszkrét, de szignifikáns S100B emelkedést ($p < 0.01$) találtunk mind a DP teszt előtti, mind a kontroll alanyokban mért értékekhez képest. Ugyanezt az NSE esetében nem tapasztaltuk. Ennek a tanulmánynak folytatásaként egy retrospektív analízist végeztünk, melyben a DP indukálta S100B

emelkedés és a betegek 7 éves után követése alatt észlelt agyi vaszkuláris események (TIA illetve stroke) közötti kapcsolatot elemeztük kérdőíves módszerrel. Dokumentált ischaemiás agyi esemény a betegek 48% -ánál fordult elő (TIA: 15/37, stroke: 3/37) hét év alatt. ROC analízis alapján a DP által indukált S100B emelkedés 60 perccel a DP stress után, S100B \geq 0,11 ng/ml cut-off érték mellett 7 év távlatában előre jelezte az összes cerebrovaszkuláris ischaemiás eseményt 70,6% érzékenységgel és 83,3% specifitással (AUC: 0,781, $p < 0,01$). A cerebrovaszkuláris események százalékos aránya 7 év alatt szignifikánsan magasabb volt, ha a DP-indukált S100B koncentráció 7 évvel korábban meghaladta ezt a küszöbértéket ($p < 0,01$). Ezen túlmenően, a többváltozós regressziós analízis igazolta, hogy a küszöbérték fölötti S100B független módon előrejelzi az ischaemiás cerebrovaszkuláris események kockázatát (OR: 70,1; 95% CI: 1,5-3372; $p=0,03$).

1.3. DIPYRIDAMOL TESZT ÉS MR PERFÚZIÓS KÉPALKOTÁS

Ezek után a DP-indukált átmeneti neurológiai tünettan képalkotó vizsgálattal való megközelítést helyeztük fókuszba. A DP teszt pozitív betegek agyi HMPAO-SPECT vizsgálatának eredményeit korábban már publikáltuk. A terheléses és a nyugalmi agyi SPECT képek elemzése alapján fogalmaztuk meg azt a hipotézisünket, hogy a DP teszt a neurológiában a szubklinikus agyi keringészavarok diagnosztikájában értékes eljárás lehet. Az MR képalkotás fejlődésével a cerebrovascularis rezerv (CVR) vizsgálata, illetve TIA-n átesett betegek agyi keringészavarának korai felismerése lehetőséget ad a fenyegető stroke megelőzésére, a preventív stratégiák kialakítására. Ezért olyan vizsgálati protokollt terveztünk, melyben (i) a DP tesztet perfúziós MR képalkotással egészítettük ki; (ii) és a betegek szisztémás keringésében mértük az NO donor L-arginin koncentrációját. Ez utóbbtól az L-arginin útvonal és az adenzin mediálta vazodilatáció, valamint az endotél funkció szerepének tisztázását vártuk agyi ereken, mivel azt korábban szívizomzatban már leírták.

1.4. CÉLKITŰZÉS

(i) DP stress hatásban elvégzett perfúziós MR vizsgálattal feltárni a betegek tranziens neurológiai kórjelei háttérében álló vaszkuláris eltéréseket az agyi vértartalom (cerebral blood volume, CBV), az átlagos kontrasztanyag áthaladási idő (mean transit time, MTT) illetve a kontraszt csúcsig eltelt idő (time to peak, TTP) alapján; (ii) tisztázni a jelenség dinamikáját: az észlelt eltérések megszűnnek-e a nyugalmi MR vizsgálat során?; (iii) van-e különbség a tranziens neurológiai jeleket mutató és nem mutató betegek L-arginin szérumszintjében?

1.5. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Összesen 9 beteget vontunk be obszervációs “pilot vizsgálatunkba”, akik sem neurológiai betegségben, sem a nagy artériák proximális stenosisában nem szenvedtek. Korábban mindegyikükönél ischaemiás koszorúér betegség gyanújával DP stresszel kombinált myocardialis perfúziós szcintigráfia (MPS) zajlott és a szérum L-arginin meghatározására pre-és post-stressz vérvétel történt. Az L-arginin bemérése HPLC-vel történt a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Intézetében. Röviddel az intravénás DP beadása után négy betegnél enyhe és átmeneti bal féltekei neurológiai tüneteket (TNJ) észleltünk, mely 15 percen belül eltűnt. Egyikükönél sem maradt vissza tartós deficit. A másik 5 betegnek nem voltak DP indukált neurológiai tünetei. Az írásbeli beleegyezést követően mind a 9 beteget újabb intravénás DP-tesztre jegyeztük elő, a korábbival megegyező protokoll szerint, és azt perfúziós agyi MR vizsgálattal kombináltuk. A DP-teszt alatt a hemodinamikai paramétereket mint például pulzusszám (HR), szisztolés (SBP), diasztolés vérnyomás (DBP), átlagos artériás nyomás (MAP), pulzusnyomás (PP) és perifériás oxigén szaturáció (SpO₂), szintén rögzítettük.

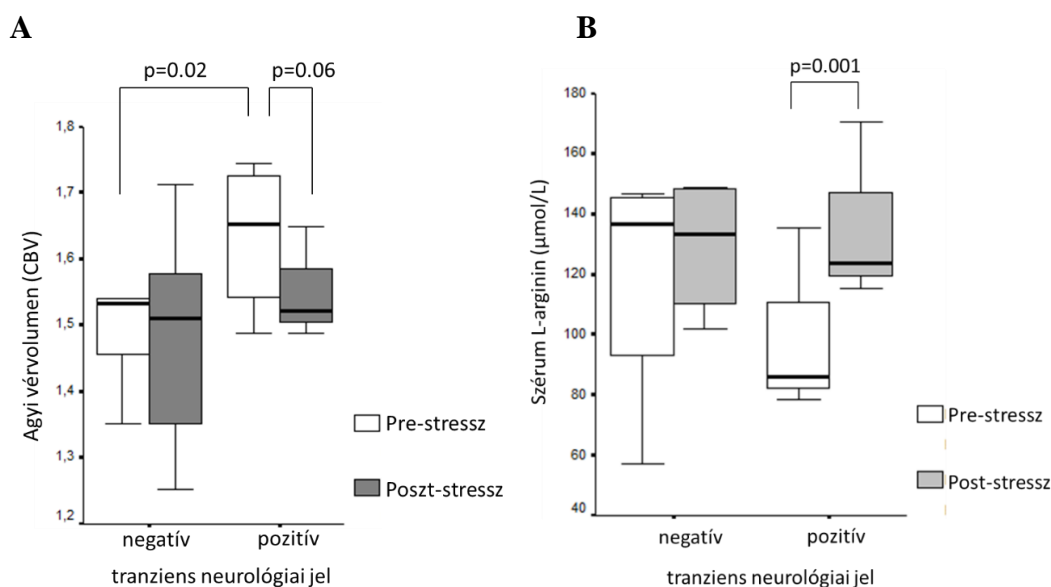
1.6. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS program alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). A poszt-DP vs nyugalmi perfúziós és diffúziós paraméterek, valamint a jobb és bal félteke identikus régiói közötti értékek összehasonlítását kétmintás *t*-próbával végeztük. Az L-arginin szérum koncentrációk összehasonlítása Mann-Whitney teszttel történt. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

1.7. EREDMÉNYEK

A két csoport makro-hemodinamikai és oxigenizációs változóiban nem találtunk különbséget. A nyugalmi MR vizsgálattal a TNJ pozitív betegekben szignifikánsan magasabb cerebral blood volume (CBV) volt észlelhető a bal féltekei senso-motoros areának megfelelően, a TNJ negatív betegek identikus területében mérthez képest (**2. ábra**). Ez a különbség a DP hatásban egy hónap múlva elvégzett terheléses MR felvételeken eltűnt. Az MTT és TTP értékekben nem találtunk különbséget a két csoport összehasonlításakor. A TNJ pozitív betegekben az L-arginin szint szignifikánsan emelkedését tapasztaltuk a DP-teszt után a kiindulási értékhez képest (átlag: $136,4 \pm 29,7$ umol/l vs. $99,9 \pm 30,9$ umol/l, $p = 0,001$). Viszont a TNJ pozitív vs negatív betegek között sem a pre-stressz, sem a poszt-

stressz L-arginin nem mutatott szignifikáns különbséget (**2. ábra**).



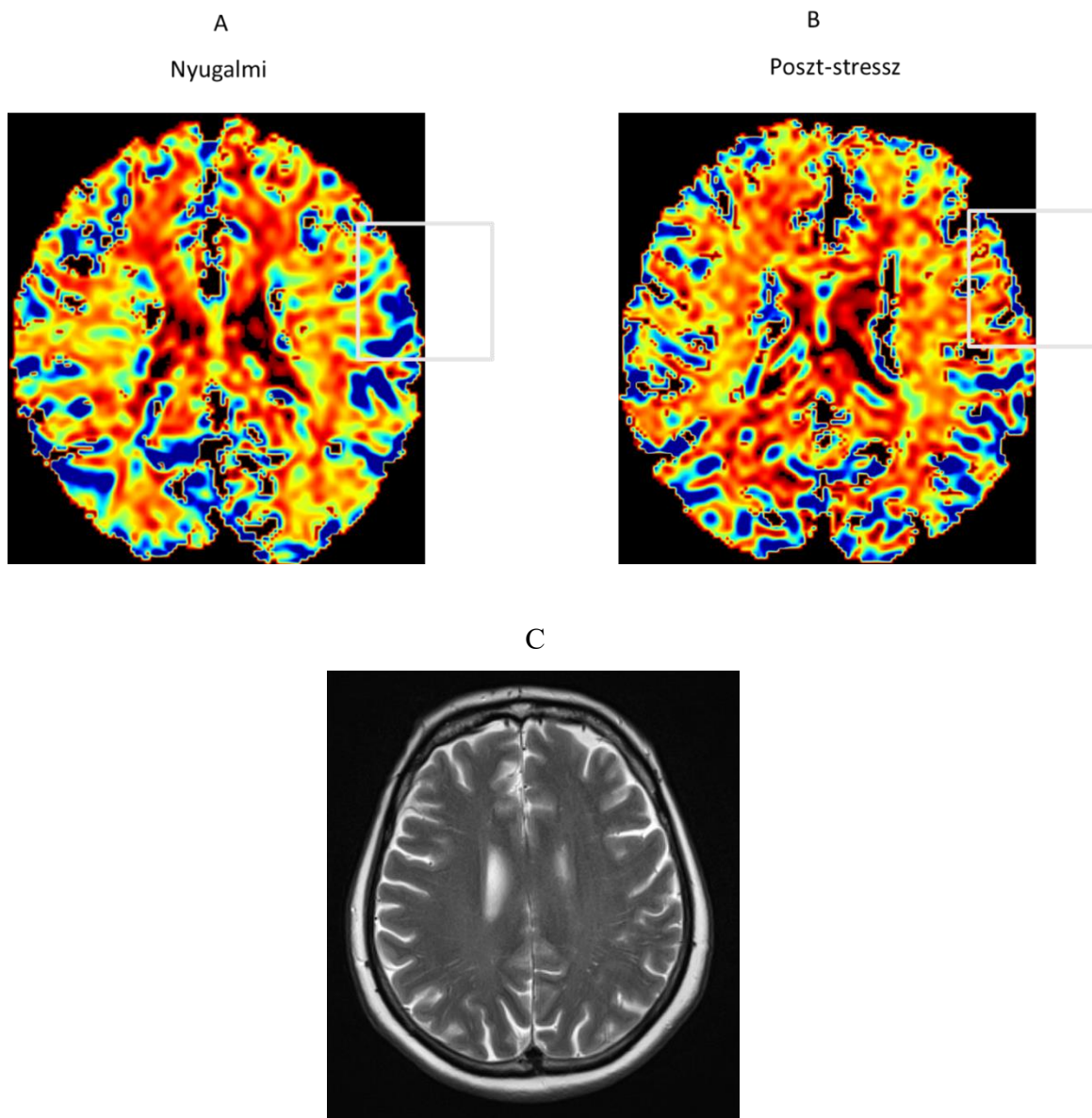
2. ábra. A dipyridamol adás előtt (pre-stressz) és után (post-stressz) mért agyi vérvolumen (CBV) a szenzo-motoros áréában (**A**) és a szérumban L-arginin koncentráció a dipyridamole (DP) teszt pozitív (+) és negatív (-) csoportban (**B**).

DP teszt negatív (kontroll) és pozitív= átmeneteli neurológiai jelek hiánya, illetve jelenléte

1.8. MEGBESZÉLÉS

Adataink arra utalnak, hogy a mikrocirkulációs zavarral élő TNJ pozitív betegeknél a rezisztencia erek átmérőjének növekedése (magasabb lokális CBV) képes a szükséges, magasabb áramlást biztosítani a kritikus területen. A DP terhelés során a CBV normalizálódik vagy a maradék területeken is létrejön a vazodilatáció (**3. ábra**). A hatásmechanizmus nem tisztázott. Az endotél funkció helyreállításáért a DP indukálta adenozin koncentrációemelkedés, míg a miogén válaszáért a lokális S100B felszabadulás szerepe merül fel. Mindkettő az erek átmérőjének növekedését váltja ki vazodilatáció illetve vazorelaxáció útján. Ezért egy izolált érpreparátum modellen megvizsgáltuk az S100B protein élettani hatásait *ex vivo* patkány basilaris artérián (BA). Az S100B dózis függő módon szignifikánsan növelte a BA átmérőjét (diaméter: 280 ± 7 -ről 317 ± 8 μm -re, 10^{-6} M koncentrációnál, $n=5$, $p<0.05$), valamint szignifikáns BA relaxációt is okozott ($0 \pm 0,02$ -ről $-0,7 \pm 0,03$ Nm-re, $n=5$, $p<0.05$). Ismételt S100B adagolás hasonló nagyságrendű változást okozott. Az acetil-kolin indukálta vazomotor válasz nem változott S100B hozzáadása után (diaméter: 92 ± 15 μm vs. 108 ± 9 μm , $n=5$). Ezek alapján feltételezzük, hogy a Ca^{2+} kötő S100B az izolált basilaris artérián dilatációt és relaxációt vált ki az endotél funkciótól függetlenül. Adataink alapján felmerül, hogy a sérült agyterületek vérátáramlásának (CBF)

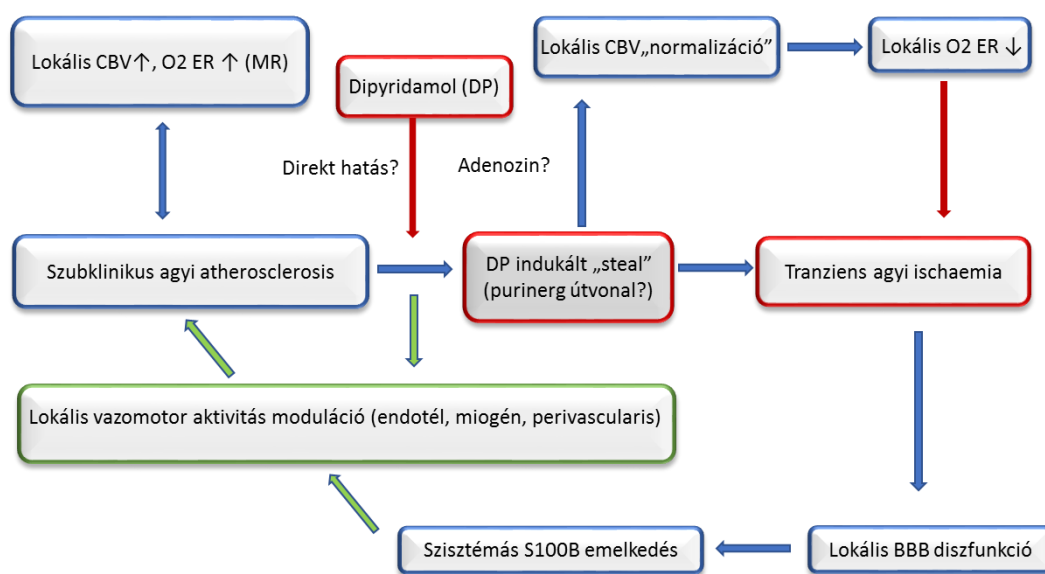
fokozása révén az S100B neuroprotektív szerepet játszik bizonyos központi idegrendszeri sejsérüléssel járó kórállapotokban. A pontos hatásmechanizmus (például a simaizom sejtek $[Ca^{2+}]_i$ tartalmának szerepe) feltárása azonban még további vizsgálatokat igényel.



3. ábra. Egy dipyridamol (DP) stressz pozitív beteg nyugalmi (A) és DP hatásban elvégzett perfúziós MR képe (B), valamint T2 kép az érintett síkban (C).

A tranziens bal féltekei tüneteket mutató beteg nyugalmi többlet perfúziója látható a szenzo-motoros kéregben az A képen (kék szín= magasabb CBV), míg a B képen DP hatásban globális CBV növekedés észlelhető, lokális relatív csökkenéssel a tünetképző területen (világos keret). Normál T2 szekvencia a C képen.

Az intravénás DP a kritikus területen *ab ovo* fokozott CBV-t csökkenti, paralell L-arginin szint emelkedés kíséretében. Ez egyrészt direkt vazorelaxációs hatást jelez az agyi erekben, másrészt egy közvetett vazodilatációs hatást, mely feltehetően az L-argininből történő NO felszabadulás révén jön létre. A DP stressz előtti heterogén CBV-vel rendelkező területeken az ilyen kettős hatások átmeneti neurológiai tüneteket okoztak valószínűleg “steal” jelenség következtében. Az intravénás DP stressz segíthet a koszorúsér betegek stroke kockázatának becslésében. A dipyridamole teszt alatt észlelt klinikai megfigyelés és az agyi mikrocirkuláció közötti összefüggést saját és mások kísérletes adatai alapján az alábbi sematikus ábrán foglaltam össze (**4. ábra**).



4. ábra. A dipyridamole (DP), az agyi térfogat (CBV), az oxigén extrakció (O2ER) és a vér-agy gát (BBB) illetve az S100B közötti összefüggések hipotetikus kapcsolata

A kék nyilak a patofiziológiai, a piros nyilak a stresszor tényezőket, míg a zöld nyilak a “repair” folyamatokat szimbolizálják.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Csepló P, Vámos Z, Hamar J, Molnár T, Koller A. Ca²⁺-binding protein-S100B elicits dose-dependent dilation/relaxation of rat cerebral arteries. *Ideggyógy Sz.* 2013;66:3-4 pp.130-1.

Molnár T, Szabo Z, Schmidt E, Barta E, Zambo K, Illes Z. “Cerebrovascular stressing”: drug-induced S100B elevation and transient neurological signs predict ischemic cerebrovascular events. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51:e69-72.

Molnár T, Horvath A, Szabo Z, Vámos Z, Dóczi T, Illes Z. Detection of silent cerebral microcirculatory abnormalities in patients with manifest ischemic coronary disease: a perfusion brain MRI study combined with dipyridamole stress. *Scand Cardiovasc J.* 2020;DOI:10.1080/14017431.2020.1821911

2. SZIGNIFIKÁNS CAROTIS STENOSIS ÉS AKUT ISCHAEMIÁS STROKE

2.1. AZ L-ARGININ ÚTVONAL METABOLITJAINAK VIZSGÁLATA SZIGNIFIKÁNS CAROTIS STENOSISBAN ÉS AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN

Ismert, hogy olyan inzultusok, mint a hypoxia és ischaemia fokozza a fehérjékben lévő L-arginin metilációját. Ennek eredményeképpen nagy mennyiségű metilált arginin származék (ADMA, SDMA) keletkezik a protein metiltranszferáz (PRMT) enzim hatására. Az ADMA lebontását a dimetil-diamino-hidroláz (DDAH) végzi, míg az SDMA kizárólag vesén át választódik ki. Az ADMA bizonyos koncentrációt meghaladva a szisztémás keringésben, gátolja nitrogén-monoxid (NO) termelődését, ezért a különböző vaszkuláris betegségek kialakulásában etiológiai tényezőként említik. Feltételezik, hogy az L-arginin, mint a legfontosabb NO donor, antagonizálja az ADMA hatását. Az SDMA a végállapotú vesebetegekben a mortalitás fontos markere.

A nitrogén-monoxid (NO) az erek átmérőjének szabályozásában játszik fontos szerepet. Az L-arginin és dimetilált származékai, az ADMA és az SDMA plazmakoncentrációja összefüggésbe hozható az akut ischaemiás stroke utáni hosszú távú kimenetellel. Az ischaemiás stroke utáni szubakut ADMA és SDMA emelkedés a 90 napos funkcionális kimenetel kedvezőtlen prediktorának bizonyult. Emellett a plazmában mérhető SDMA az ischaemiás stroke-ot követő 30 napos kedvezőtlen kiemenetelt is előrejelzi. A vaszkuláris betegekben észlelt endotél diszfunkció összefüggésbe hozható a szisztémás keringésben mért emelkedett ADMA szinttel. Az ADMA a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) gátlása révén az értónus szabályozásában kulcs szerepet játszó NO termelődését csökkenti.

2.2. CÉLKITŰZÉS

Célul tűztük ki az akut ischaemiás stroke első 72 órájában: (i) az L-arginin útvonal molekuláinak kinetika elemzését; valamint korrelációjuk vizsgálatát (ii) az infarktus nagyságát jelző S100B; (iii) és az atherosclerosis (AS) marker C-reaktív protein (CRP) szintekkel. Kontroll csoportként olyan betegeket gyűjtöttünk, akik előrehaladott atherosclerosisban, szignifikáns carotis stenosis-ban szenvedtek.

2.3. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Tanulmányunkban prospektív módon vizsgáltunk 55 akut ischaemiás stroke-ban (AIS) szenvedő beteget. Sorozatos vérmintavételt végeztünk az L-arginine, ADMA, SDMA, S100B és magas szenzitivitású C-reaktív protein (hsCRP) meghatározása céljából a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül, majd 24 és 72 óra múlva. A szérumban L-arginin, ADMA és SDMA mérését a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Intézetével való kooperációban történt high-performance liquid chromatographia (HPLC) módszerrel. Adatainkat 44 aszimptomás szignifikáns carotis stenosis-ban (AsCS) szenvedő beteg, illetve 45 egészséges kontroll alany adataival hasonlítottuk össze (**1 táblázat**). A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Skála (NIHSS) pontszáma alapján jellemeztük.

2.4. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). A két csoport adatainak összehasonlítására chi-négyzet próbát és Mann-Whitney tesztet használtunk. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

2.5. EREDMÉNYEK

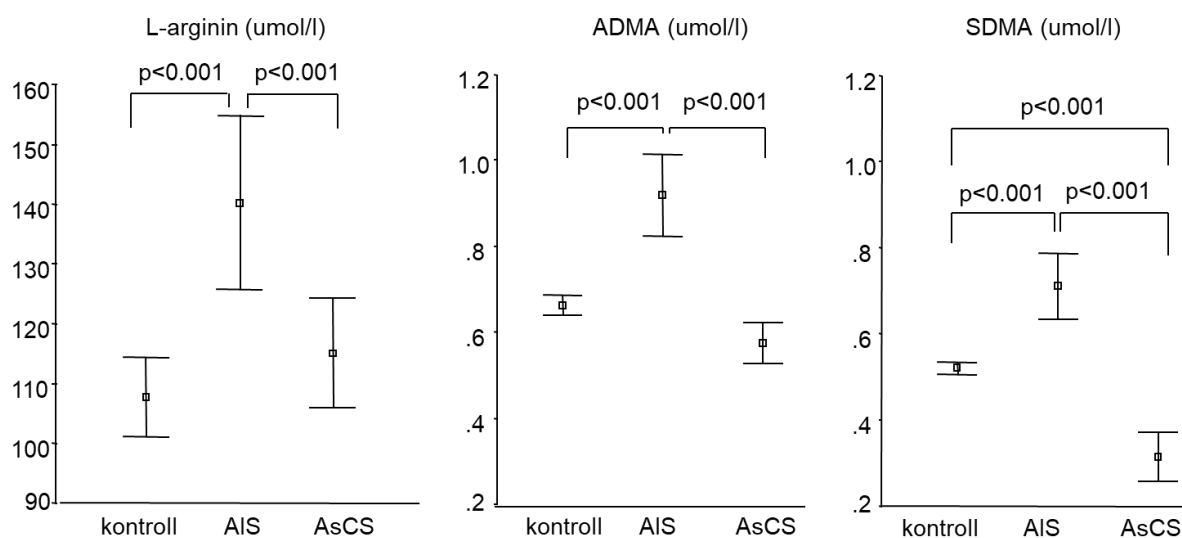
Az akut ischaemiás stroke-ban és aszimptomás szignifikáns carotis stenosisban szenvedő betegek demográfiai és klinikai adatait a **1. táblázatban** foglaltuk össze. Az utóbbi csoportban a statin és clopidogrel terápiában részesülők aránya szignifikánsan nagyobb volt, viszont demográfiai szempontból és a társbetegségeket tekintve a két kohorsz hasonló volt. Már a hyperakut szakban emelkedett L-arginin, ADMA és SDMA értékeket mértünk a stroke betegek szérumban, mely mind a carotis stenosisban szenvedő betegekhez, mind az egészségesekhez viszonyítva szignifikáns volt (**5. ábra**).

1. táblázat. Akut ischaemiás stroke-ban (AIS) és aszimptomás szignifikáns carotis stenosisban (AsCS) szenvedő betegek demográfiai és klinikai adatai

	AIS N= 55	AsCS N=44	<i>p</i>
Életkor, évek	70±10	66±10	NS
Férfi	28 (51)	29(66)	NS
ISZB	8 (14)	7 (16)	NS
COPD	7 (13)	5(11)	NS
Dohányzás	12 (22)	13 (29)	NS
Hypertonia	40 (72)	39 (88)	NS
Diabetes mellitus	7 (13)	8 (18)	NS
Creatinin (µmol/l)	75.5±14.5	74.5±13.8	NS
Statin terápia	25 (45)	38 (86)	<0.01
Clopidogrel	5 (9)	29 (66)	<0.01
Aspirin	32 (58)	24 (55)	NS
NIHSS felvételtkor	11.5±5.4	NA	NA
NIHSS elbocsátáskor	8.4±6.4	NA	NA
Post-stroke infekció	16 (29)	NA	NA
Halálozás	13 (24)	NA	NA

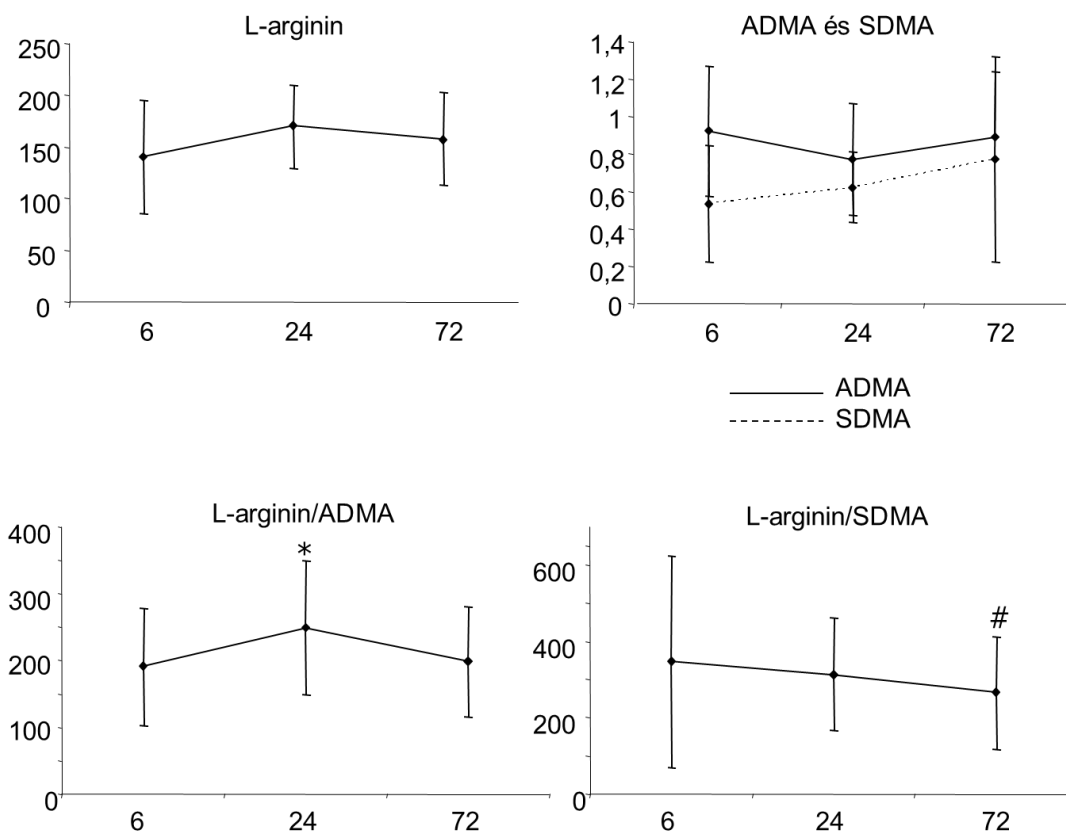
Az adatokat, mint átlag±SD vagy abszolút szám (százalék) ábrázoltuk (chi-négyzet és két mintás T próba); AIS:

Akut ischaemiás stroke; AsCS: aszimptomás szignifikáns carotis stenosis; BMI: body mass index; ISZB: ischaemiás koronária betegség; COPD: chronic obstructive pulmonary disease, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale



5. ábra. Szérum L-arginin, ADMA és SDMA értékek egészséges kontrollban, akut ischaemiás stroke-ban (AIS) és aszimptomás szignifikáns carotis stenosisban (AsCS)

Az L-arginin útvonal markereinek a 6, 24 és 72 órás kinetikáját akut ischaemiás stroke-ban a **6. ábrán** (* L-arginin/ADMA 24 vs 6 órás; # L-arginin/SDMA 72 vs 6 órás) mutatjuk be.



6. ábra. Szérum L-arginin, ADMA és SDMA, valamint az L-arginin/ADMA és L-arginin/SDMA hányadosok kinetikiája akut ischaemiás stroke első 72 órájában

Az adatokat, mint átlag és 95% konfidencia tartomány ábrázoltuk. (L-arginin/ADMA 24 vs 6 órás; # L-arginin/SDMA 72 vs 6 órás szignifikáns különbséget jelöl)*

Az agyi infarktus nagyságával arányos S100B protein és a post-stroke 72 óránál mért SDMA között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk. Hasonlóan pozitív korrelációt találtunk a baseline és a post-stroke 72 óra közötti S100B és ADMA koncentrációváltozás között. Mindkét metilarginin származék koncentrációváltozása pozitívan korrelált a hsCRP koncentrációváltozásával (**2. táblázat**). A post-stroke 72 óránál mért csökkent L-arginin (OR:1.03, 95% CI: 1.0-1.05, $p < 0.05$) és emelkedett hsCRP (OR:1.1, 95% CI: 1.0-1.11, $p < 0.05$) a post-stroke infekció független prediktorának bizonyult. A hyperakut szakban (6 órán belül) emelkedett S100B (OR:14.3, 95% CI: 1.4-147.4, $p < 0.05$) és a post-stroke 72 óránál mért hsCRP (OR:1.04, 95% CI: 1.0-1.1, $p < 0.05$) pedig a halálozás független prediktorai voltak.

2. táblázat. Az L-arginin útvonal és a hsCRP, valamint az S100B közötti korrelációk akut ischaemiás stroke első 72 órájában

	L-arginin	ADMA	SDMA
<6 óra			
hsCRP <6 óra	r= - 0.317, p<0.05	NS	NS
S100B <6 óra	NS	NS	NS
72 óra			
hsCRP 72 óra	NS	NS	r= 0.478, p<0.01
S100B 72 óra	NS	NS	r= 0.375, p<0.05
változás 72 óra alatt (Δ)			
Δ hsCRP 72 óra	NS	r= 0.362, p<0.05	r= 0.363, p<0.05
Δ S100B 72 óra	NS	r= 0.326, p<0.05	NS

ADMA=asszimmetrikus dimetilarginin; SDMA=sszimmetrikus dimetilarginin; hsCRP= magas-szenzitivitású C reaktív protein; NS= nem szignifikáns. Spearman korreláció.

2.6. MEGBESZÉLÉS

Tanulmányunkban alapján megállapítható, hogy: (i) az L-arginin útvonal metabolitjai (ADMA, SDMA) már az akut ischaemiás stroke korai fázisában emelkedettek, ráadásul ez kifejezettebb, mint szignifikáns carotis stenosisban, ami az atherosclerosisnál súlyosabb endotél diszfunkciót tükröz; (ii) feltételezzük, hogy stroke betegekben a baseline L-arginin emelkedett szérum koncentrációja, egy adaptív válasz lehet az eleve fennálló érfaლი bántalomra. Erre utalhat, a post-stroke 24 óránál mért szignifikánsan magasabb L-arginin/ADMA hányados; (iii) az L-arginin és az ADMA ellentétes mozgása az L-arginin protektív szerepét sugallja; (iv) adatainkból úgy tűnik, hogy az L-arginin koncentráció mérése a post-stroke infekció előre jelzésére is alkalmas, mely lehetővé teszi az adekvát antimikrobás kezelés időben való megkezdését.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY

Molnar T, Pusch G, Papp V, Feher G, Szapary L, Biri B, Nagy L, Keki S, Illes Z. The L-arginine pathway in acute ischemic stroke and severe carotid stenosis: temporal profiles and association with biomarkers and outcome. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2014; 23:2206-14.

3. A LEKTIN ÚTVONAL MOLEKULÁINAK VIZSGÁLATA AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN

3.1. NEUROIMMUNOLÓGIAI ELŐZMÉNYEK

Az ischaemiás stroke elsősorban, de nem kizárólagosan, az idős populáció betegsége. Mivel az immunrendszer működésének a hatékonysága az életkor előrehaladtával hanyatlik, a stroke immunológiai aspektusainak vizsgálata az utóbbi években reflektorfénybe került. Egy folyamatosan fennálló „szisztémás gyulladásos állapot” (atherosclerosis) mellett, csökkent sejt regenerációval és szöveti reparációval is számolni kell az idősokban. A stroke és az immunrendszer kapcsolatának vizsgálata alapvetően 3 irányú:

(i) Állatkísérletes és humán klinikai bizonyítékok támasztják alá, hogy a szisztémás gyulladás/infekció fennállása önmagában is rizikófaktora a vaszkuláris betegségek (coronária és cerebrovaszkuláris kórképek) kialakulásának. A stroke evolúciójában szerepet játszó társbetegségek, mint az atherosclerosis, hypertónia, elhízás, hyperlipidaemia, vagy cukorbetegség mind kapcsolatba hozhatók a szisztémás gyulladás tartós jelenlétével.

(ii) Számos evidencia szól a már bekövetkezett stroke esetén az immunrendszer működésének (mind az ősi, mind az adaptív) diszregulációja mellett.

(iii) Stroke esetén paralel zajlik egy lokális és egy szisztémás immunválasz. Klinikai vizsgálatainkban ez utóbbira koncentráltunk.

Jelenleg is intenzív kutatás tárgyai olyan immunológiai, illetve gyulladásos markerek, melyek segítségével egyrészt a stroke kialakulásának rizikóját becsülni tudjuk, másrészt segítenek feltárni a stroke miatt megváltozott immunválasz (stroke indukálta immundepresszió) kulcs szereplőit, továbbá prognosztikai értékkel bírnak a kórlefolyás és a kimenetel szempontjából. A közelmúltban megjelent adatok hívták fel a figyelmet a komplement rendszer lectin útvonalának szerepére az ischaemiás stroke kialakulásában. A lectin útvonal aktiválódása a mannose-binding lectin (MBL), ficolin-2 vagy ficolin-3 különböző ligandokhoz való kapcsolódása révén indul el. Míg az MBL jelentőségéről számos adat áll rendelkezésre, addig a ficolinok szerepe kevésbé ismert.

3.2. CÉLKITŰZÉSEK

Az akut ischaemiás stroke-ot kísérő komplement aktiváció növeli az agyi infarktus nagyságát és befolyásolja a klinikai kimenetelt.

3.3. BETEGEK ÉS MÓDSZER

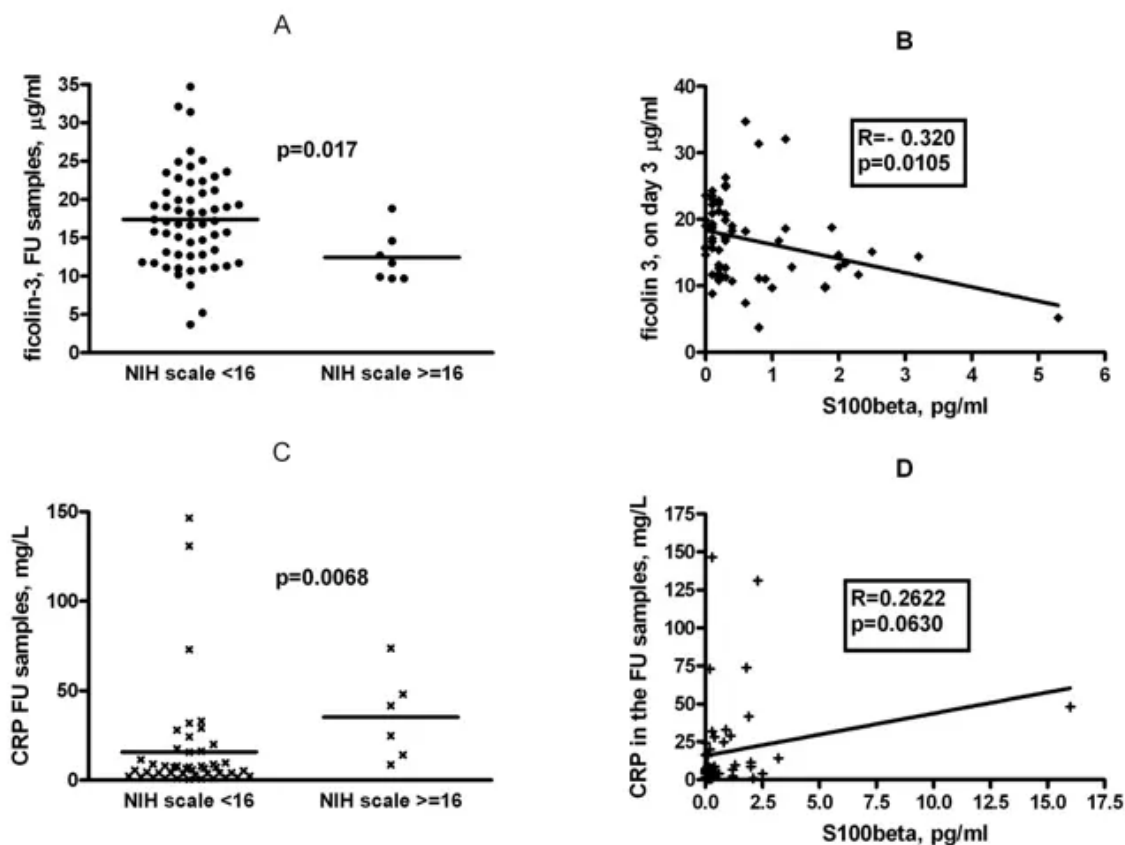
Összesen 65 akut ischaemiás stroke-ban (AIS) szenvedő beteg (kor: 69.8 ± 9.8 , férfi: 20) szérumát vizsgáltuk. Adatainkat 100 egészséges kontrollhoz (kor: 35.5 ± 9 , férfi: 47) és 135 szignifikáns carotis stenosisban szenvedő beteghez (kor: 69.8 ± 9.9 , férfi: 88) hasonlítottuk. A tünetek kezdetétől számított 12 órán belül és azt követően 3-4 napon keresztül sorozatos vénás mintavétel történt. A ficolin-2 és ficolin-3 koncentráció meghatározása ELISA módszerrel történt (Laboratory of Molecular Medicine, Department of Clinical Immunology, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark). Emellett az S100B szérum szinteket (BioVendor, Modrice, Czech Republic) és a C-reaktív protein (CRP) koncentrációt is mértük particle-enhanced immunturbidimetric assay (Roche Cobas Integra 400, Basel, Switzerland) módszerrel. A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Skála (NIHSS) pontszáma, míg a kimenetelt a módosított Rankin Skála (mRS) alapján jellemeztük. Kedvezőtlen kimenetelnek az mRS:3-6, míg kedvezőnek az mRS: 0-2 értékeket tekintettük.

3.4. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). Mann-Whitney U tesztet használtunk a nem normál eloszlást mutató paraméterek összehasonlításához. A korrelációs analízist Spearman korrelációs együttható (ρ) kiszámításával végeztük. A bináris logisztikus regressziót használtuk a független prediktorok feltárására, és a ROC elemzést végeztünk a küszöbérték kiszámításához. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

3.5. EREDMÉNYEK

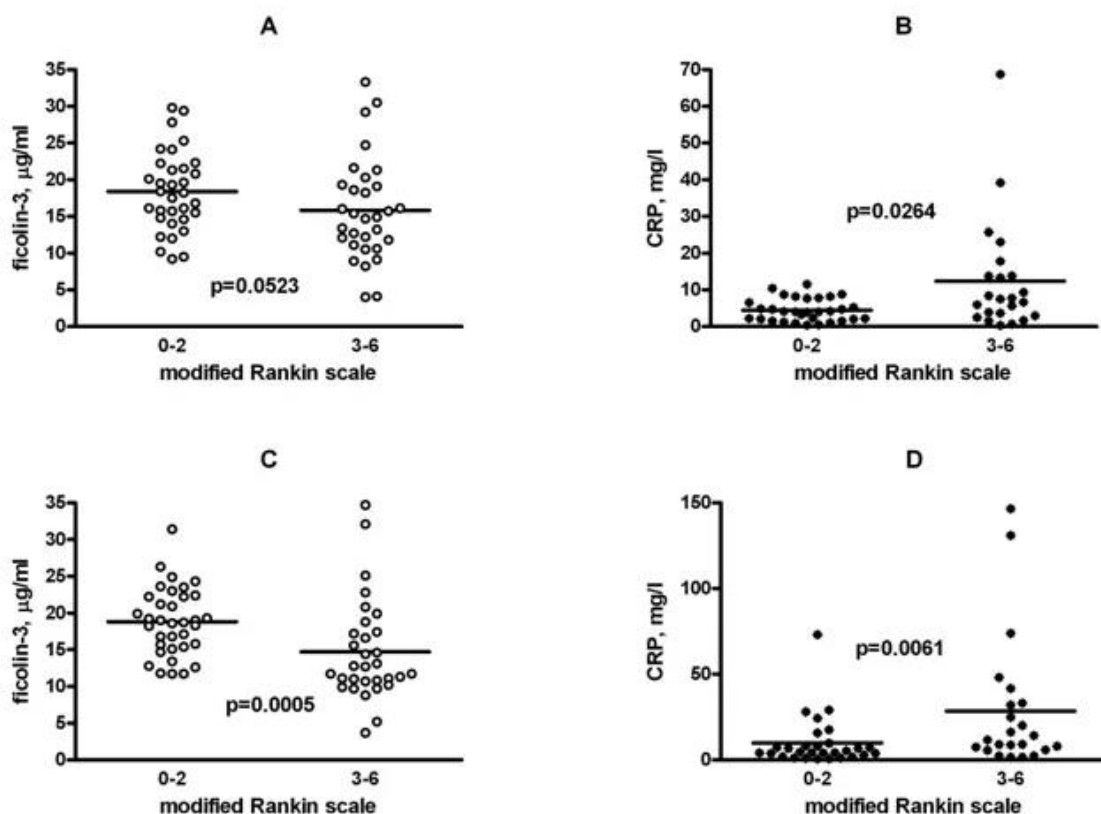
A ficolin-2 és a ficolin-3 egyaránt szignifikánsan alacsonyabb volt az AIS betegekben az egészségesekhez viszonyítva ($p < 0.001$) valamennyi mérési időpontban. Ezzel szemben a kontroll betegekben mindkét marker koncentrációja magasabb volt, mint egészségesekben, jelezve, hogy az alacsony ficolin-2 és ficolin-3 szérum koncentráció a stroke akut fázisában az ischaemiás eseményhez köthető. A stroke súlyosságát jellemző felvételi NIHSS skála pontszáma és a ficolin-3 szintek között erős negatív korrelációt találtunk, mely magmaradt a szubakut periódusban is (**7. ábra**). Hasonlóan negatív korrelációt találtunk az infarcerált területtel arányosan felszabaduló szérum S100B protein és a ficolin-3 szintje között a sorozatos mérések során (**7. ábra**). Érdekes módon a ficolin-2 esetén a fenti korrelációkat nem észleltük.



7. ábra. A ficolin-3 (A) és a hsCRP (C) a stroke súlyossága szerinti csoportokban, illetve korrelációjuk (B és D) az infarctus nagyságával (FU= 72 óras 'follow-up' minta)

NIHS: National Institute of Health Stroke Scale; CRP: C-reaktív protein. Az adatokat, mint medián és individuális értékek (A és C), a korrelációkat scatter plot diagram formájában ábrázoltuk (Spearman korreláció)

A ficolin-3 és CRP szinteket összehasonlítottuk a dichotomizált betegség kimeneteli csoportok között (**8. ábra**). Amikor a betegeket az mRS alapján kedvezőtlen (3–6) és kedvező kimenetel (0–2) szerint csoportosítottuk, akkor a ficolin-3 szint alacsonyabb volt az előző csoportban. A különbség csak a 72 óras mintákban volt szignifikáns (**8. ábra, C panel**), míg a felvételtkor mintákban trendet észleltünk (**8. ábra, A panel**). A 9 post-stroke infekciós beteg kizárása után, a CRP szintje mind a felvételtkor, mind a 72 óras mintákban szignifikánsan magasabb volt a kedvezőtlen kimenetelű betegcsoportban (**8. ábra, B és D panel**).



8. ábra. A kórházi felvételtori (A és B) és 72 órás (C és D) ficolin-3 és a hsCRP kapcsolata a módosított Rankin Skála (mRS) alapján mért stroke kimenetellel

CRP: C-reaktív protein. A módosított Rankin Skála: 3-6 a kedvezőtlen kimenetelt jelzi. Az adatokat, mint medián és individuális értékek ábráztuk.

Mivel korábbról ismert, hogy mind a magasabb NIHSS pontszám, mind az emelkedett S100B prediktora a kedvezőtlen kimenetelnek, ezért érthető, hogy azon betegeknek, akikben alacsonyabb ficolin-3 (OR: 0,7 $p=0,003$) és magasabb CRP (OR: 1,4 $p=0,006$) szérumszinteket mértünk szignifikánsan rosszabb volt a kimenetele az mRS szerint definiált klinikai kimenetelt tekintve (**3. táblázat**). A magas CRP koncentráció, a ficolin-3 szinttől függetlenül is hasonlóan prediktívnek bizonyult a kedvezőtlen kimenetelre nézve.

3. táblázat. Ficolin-3 és hsCRP, mint a kiemenetel (mRS: 3-6 vs 0-2) független prediktorai

	OR (95% CI)	
	Felvételi minták	72 órás minták
ficolin-3, µg/ml	0,989 (0,776-1,020) (p = 0,093)	0,736 (0,603-0,899) (p = 0,003)
CRP, mg/L	1,226 (1,040-1,446) (p = 0,015)	1,375 (1,095-1,727) (p = 0,006)
NEM (nő/férfi)	0,951 (0,238-3,794) (p = 0,943)	0,969 (0,207-4,535) p = 0,968
Életkor, évek	1,005 (0,925-1,092) (p = 0,904)	0,981 (0,902-1,066) (p = 0,652)

OR= esély hányados; CI= konfidencia intervallum; CRP= C-reaktív protein

3.6. MEGBESZÉLÉS

Eredményeink alapján megállapítható: (i) adataink is támogatják, hogy a komplement aktiváció hozzájárul a stroke-ot követő ischémiás/reperfúziós károsodáshoz; (ii) a korábban leírt MBL-dependens aktiváció mellett, a lectin-útvonal ficolin-3-dependens aktivációja is részt vesz a patológias folyamatok alakításában; (iii) a 72 órával későbbi mintákban mért alacsony ficolin-3 és magas CRP szintek klinikai korrelációja egymástól független, sugallva, a patogenezisben résztvevő két különböző gyulladási útvonal lehetőségét, melynek terápiás következményei lehetnek.

Összefoglalás: a komplement rendszer aktiválódása a ficolin mediálta lectin útvonalon keresztül részt vesz az ischaemiás stroke patogenezisében és valószínűleg súlyosbít más, komplementtől független gyulladási folyamatokat.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Füst G, Munthe-Fog L, Illes Z, Széplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Széplaki Z, Prohászka Z, Skjoedt MO, Garred P. Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2011, 29;8:185.

Molnar T, Csuka D, Pusch G, Nagy L, Garred P, Illes Z. Associations between serum L-arginine and ficolins in the early phase of acute ischemic stroke- a pilot study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2020;29(8):104951.

4. AZ L-ARGININ ÉS A LECTIN ÚTVONAL KÖZÖTTI KAPCSOLAT VIZSGÁLATA AKUT ISCHAEMIÁS STROKE- BAN

A neuroinflammáció kulcsfontosságú szerepet játszik a stroke okozta agyszövet károsodás progressziójában. A stroke utáni gyulladást és az immundepressziót a szisztémás immunsejtek, endotélsejtek, mikroglia és neuronok közvetítik. Mind a fertőzés, mind a gyulladás *per se* is befolyásolhatja az ischaemiás stroke kimenetelét. A komplement rendszer agyi sérülést követő aktiválódása kulcsfontosságú elem az ischaemiás kaszkádban, amely a másodlagos agyi sérülés miatt hozzájárul a kedvezőtlen kimenetelhez. A lektin útvonal molekuláinak időbeli kinetikáját korábban kutatócsoportunk is vizsgálta akut ischaemiás stroke-ban (AIS) szenvedő betegek szérumában. Megfigyeltük, hogy: (i) a stroke hiperakut szakaszában a ficolin-3 koncentrációja feltehetően a konzumpció miatt csökken; (ii) koncentrációja változatlan a szubakut fázis alatt; (iii) a ficolin-3 és az asztrocita-eredetű S100B között fordított a korreláció a 72 órás mintákban, ami arra utal, hogy az agyi infarktus nagyobb mérete fokozott ficolin-3 felhasználódást eredményez, feltehetően az apoptotikus és nekrotikus sejtekhez történő kötődés révén. Ezen túlmenően az alacsony ficolin-3 szint az AIS kedvezőtlen prognózisával is összefüggést mutat.

A komplementrendszer mellett az L-arginin útvonal molekulái is hozzájárulnak az ischaemiás stroke patogeneziséhez és kimeneteléhez. Az ischaemiás stroke hiperakut fázisában az L-arginin-útvonal molekuláinak kifejezettebb emelkedését figyeltük meg, mint a tünetmentes szignifikáns carotis stenosisban szenvedő betegek szérumában. Ez előrehaladott endotél diszfunkcióra utal. Az NO donor L-arginin szintje már a betegek felvételekor (a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül) emelkedett volt. A kritikus post-stroke 24. órában az L-arginin/aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) arány átmeneti emelkedését is megfigyeltük és felvetettük, hogy az L-arginin védő szerepet tölthet be. Emellett azt találtuk, hogy az L-arginin útvonal változásai előrejelzik a stroke utáni fertőzéseket. Az L-arginin útvonal és a komplement rendszer közötti kapcsolatot akut stroke-ban eddig még nem vizsgálták.

4.1. CÉLKITŰZÉS

Korábbi tanulmányaink eredményei alapján kíváncsiak voltunk, hogy a komplement rendszer akut ischaemiás stroke-ot kísérő ficolin mediálta lektin útvonal diszfunkciója és az L-arginin útvonal aktiválódása között van-e összefüggés?

4.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Vizsgálatainkat a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumával kooperációban végeztük el. Tanulmányunkban prospektív módon vizsgáltunk 44 akut ischaemiás stroke-ban szenvedő beteget. Sorozatos vérmintavételt végeztünk az L-arginine, ADMA, SDMA, ficolin-2, ficolin-3, mannóz-kötő lectin (MBL), MBL/ficolin-asszociált protein 1 (MAP-1), MBL/ficolin-asszociált szerin proteáz (MASP-3) és high-sensitivity C-reaktív protein (hsCRP) meghatározása céljából (a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül, majd 24 és 72 óra múlva). A szérum L-arginin, ADMA és SDMA mérése a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Intézettel való kooperációban történt high-performance liquid chromatographia (HPLC) módszerrel. A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) pontszáma alapján jellemeztük. A 30 napos mortalitást, illetve a post-stroke infekciót használtuk klinikai végpontoknak.

4.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). Mann-Whitney U tesztet használtunk a nem normál eloszlást mutató paraméterek összehasonlításához. A korrelációs analízist Spearman korrelációs együttható (ρ) kiszámításával végeztük. A bináris logisztikus regressziót használtuk a független prediktorok feltárására, és a ROC elemzést végeztünk a küszöbérték kiszámításához. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

4.4. EREDMÉNYEK

Összesen 44 AIS-ban szenvedő beteget (átlag életkor: 67, SD: 10 év, férfi: 21) vontunk be a vizsgálatba. A demográfia és a klinikai paramétereket a **4. táblázatban** tüntettük fel. A betegeket az infekciós szövődmények alapján két alcsoportba osztottuk: post-stroke fertőzés kialakult ($n = 7$) és post-stroke fertőzés nélkül ($n = 37$). A NIHSS alapján a stroke súlyossága a post-stroke 24. órában szignifikánsan magasabb volt a post-stroke fertőzős csoportban, összehasonlítva az ilyen szövődményekkel nem rendelkezőkkel ($19,7 \pm 5,0$ vs $6,5 \pm 6,0$, $p=0,001$). A post-stroke fertőzést 7 betegnél sikerült azonosítani átlagosan az 5. post-stroke napon. Közülük öt beteg súlyos fertőzés (elsősorban pneumonia) miatt halt meg.

4. táblázat. Demográfiai és klinikai adatok

	összes beteg n=44	infekcióval n=7	infekció nélkül n=37	P
Életkor (év)	67±10	66±6	72±9	NS
Férfi	21	3	18	NS
BMI	27.5±5.8	31.1±8.5	26.8±5.3	NS
Dohányzás, %	7 (16)	1 (14)	6 (16)	NS
Hypertonia, %	36 (81)	5 (71)	31 (84)	NS
Diabetes mellitus, %	8 (18)	1 (14)	7 (19)	NS
Dyslipidemia, %	18 (41)	3 (43)	15 (41)	NS
NIHSS felvételkor	10.4±5.3	14.4±6.9	9.5±4.6	NS
NIHSS 24 órás	10.5±8.4	19.7±5.0	6.5±6.0	0.001
Halálozás, %	5 (11)	5 (71)	0	<0.001
TAG terápia, %	25 (57)	5 (71)	20 (54)	NS
Statin terápia, %	18 (41)	3 (43)	15 (41)	NS

BMI=body mass index; NIHSS=National Institute of Health Stroke Scale; TAG= trombocita ggregáció gátlás; NS= nem szignifikáns. Az adatok, mint átlag±SD vagy abszolút szám (%). Chi-négyzet teszt és Mann-Whitney teszt.

A hyperakut szakban (tünetek kezdetétől 6 órán belül) szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az L-arginin és a ficolin-3, MAP-1 és MBL között (**5. táblázat**).

5. táblázat. A szérumban L-arginin, S100B és a lektin útvonal molekulái közötti korreláció a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül

	L-arginin	<i>p</i>	S100B	<i>p</i>
Ficolin-2	0,276	NS	-0,216	NS
Ficolin-3	0,398	0,03	-0,307	0,05
MAP-1	0,519	0,004	0,160	NS
MASP-3	0,262	NS	0,094	NS
MBL	0,419	0,02	-0,082	NS
hsCRP	-0,190	NS	0,194	NS

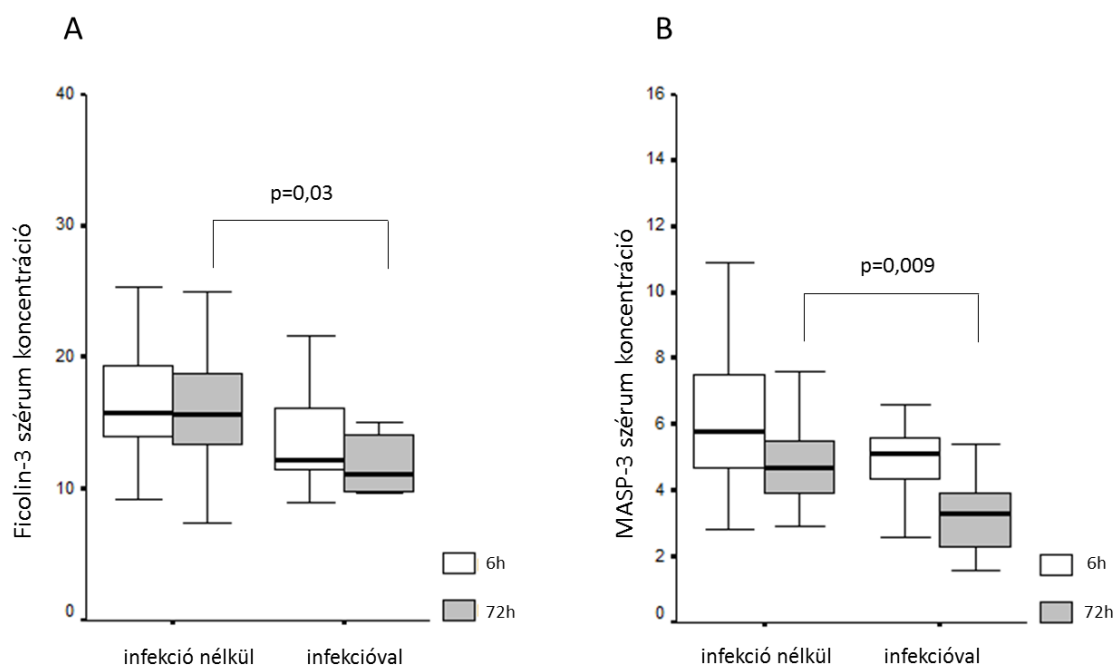
MBL=mannose-binding lectin; MAP-1= MBL/Ficolin asszociált Protein-1; MASP-3= MBL asszociált szerin proteáz-3; hsCRP= magas-szenzitivitású C reaktív protein; NS= nem szignifikáns; NA= nem alkalmazható. Spearman korreláció.

Ezek az összefüggések azonban a post-stroke 72 óránál már eltűntek. Megjelent viszont egy szignifikáns negatív korreláció az MBL és az ADMA között, valamint egy pozitív korreláció az L-arginin és hsCRP között 72 óránál (**6. táblázat**). A károsodott agyszövetből felszabaduló S100B protein csak a 72 órás mintákban korrelált a lektin útvonal markereivel (ficolin-3 és MBL). Mindkét korreláció negatív volt. Emellett, az S100B a hsCRP-vel egy szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a 72 órás mintákban (**6. táblázat**). A betegeket a post-stroke infekció, mint szövödmény, alapján dichotomizáltuk, majd a lektin útvonal molekuláit a két alcsoport között összehasonlítottuk. A 72 órás mintákban, mind a ficolin-3 ($p=0,03$), mind a MASP-3 ($p=0,009$) szignifikánsan alacsonyabb azokban a betegeknél, akikben jellemző módon a 4-5. napon pneumonia vagy húgyúti infekció jelent meg (**9. ábra, A és B panel**).

6. táblázat. A szérumban L-arginin, ADMA, S100B és a lektin útvonal molekulái közötti korreláció a 72 órás mintákban

	L-arginine	<i>p</i>	ADMA	<i>p</i>	S100B	<i>p</i>
Ficolin-2	0,058	NS	0,155	NS	-0,301	NS
Ficolin-3	-0,104	NS	NA	NA	-0,397	0,01
MAP-1	0,167	NS	0,211	NS	-0,093	NS
MASP-3	-0,173	NS	-0,081	NS	-0,294	NS
MBL	0,059	NS	-0,397	0,04	-0,434	0,006
hsCRP	0,485	0,01	0,089	NS	0,428	0,02

ADMA=asszimmetrikus dimetilarginin; MBL=mannose-binding lectin; MAP-1= MBL/Ficolin asszociált Protein-1; MASP-3= MBL asszociált szerin proteáz-3; hsCRP= magas-szenzitivitású C reaktív protein; NS= nem szignifikáns; NA= nem alkalmazható. Spearman korreláció.



9. ábra. A ficolin-3 (A) és MASP-3 (B) szérumban a 6 órán belüli és 72 órás mintákban az infektált és anélküli csoportokban

MASP-3, MBL/ficolin-asszociált szerin proteáz

Többváltozós regressziós modellt alkalmazva, a csökkent 72 órás ficolin-3 76%-os szenzitivitással és 72%-os specificitással a post-stroke infekció független prediktorának bizonyult (OR: 0,73; 95% CI:0,53-1,00; cut-off<13,3 µg/ml, Area: 0,753; p=0,03). Ugyanebben a modellben a MASP-3 nem bizonyult független prediktornak. A 30 napos mortalitás független prediktora (OR: 1,05; 95% CI: 1,002-1,100; p=0,04) csak a 72 órás hsCRP volt (cut-off \geq 39,6 mg/l, Area: 0,830, p=0,02) 80%-os szenzitivitással és 82%-os specificitással.

4.5. MEGBESZÉLÉS

A post-stroke fertőzések kialakulásának kitett személyekben, a ficolin-3 és a MASP-3 koncentráció csökkenése figyelhető meg a stroke után 72 órával. A közelmúltban arról számoltak be, hogy a MASP-2 kulcsszerepet játszik a szövetkárosodásban és a kedvezőtlen kimenetelben ischaemiás agysérülés egérmódelijében. Korábbi kutatásainkban az alacsony ficolin-3 és az emelkedett hsCRP koncentráció független prediktora volt a rosszabb kimenetelnek. Megállapításunk, miszerint a stroke utáni 72. órában mért ficolin-3 az infekció független prediktora, összhangban áll azokkal a megfigyelésekkel, amelyek szerint a ficolin-3 a legnagyobb komplement-aktiváló képességgel rendelkező molekula a lektin útvonal iniciátorai között akut ischaemiás stroke-ban. Az a tény, hogy a 30 napos mortalitás független előrejelzője csak a hsCRP volt, de a ficolin-3 nem, arra utal, hogy ezek két különböző gyulladásos útvonalat reprezentálnak, amelyek eltérően járulnak hozzá a stroke kimeneteléhez. Eredményeink azt sugallják, hogy a stroke korai fázisában a kiterjedtebb agyszövet pusztulást súlyosabb neuroinflammációs válasz kíséri, ami fokozott komplement felhasználódással jár, mely a post-stroke infekciós szövődmények számát is emeli. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a szisztemás immundepresszió és a komplement aktiváció kettős hatású, negatív (infekció) és pozitív hatással egyaránt jár (autoimmunitás prevenció). Az L-arginin szérum szintje és az egyes komplement faktorok közötti összefüggés, az L-argininnek az immunválaszban játszott protektív szerepe mellett szólhat, azonban a pontos hatásmechanizmus még nem tisztázott.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY

Molnar T, Csuka D, Pusch G, Nagy L, Garred P, Illes Z. Associations between serum L-arginine and ficolins in the early phase of acute ischemic stroke- a pilot study. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2020;29(8):104951.

5. CITOKINEK VIZSGÁLATA AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN ÉS SZIGNIFIKÁNS CAROTIS STENOSISBAN

Egyre több adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy az endotél diszfunkció, a koagulációs kaskád és a gyulladásos válasz egymást erősítve determinálják a másodlagos agysérülés, következésképpen a funkció kiesés nagyságát, illetve a klinikai kimenetelt akut ischaemiás stroke-ban.

5.1. CÉLKITŰZÉS

Célunk a trombo-inflammatorikus markerek időbeli profiljának (több biomarker kombinációjával), és azok prediktív szerepének prospektív vizsgálata volt. A stroke-ban szenvedő betegekben mért koncentrációkat két csoporthoz hasonlítottuk: (i) súlyos atherosclerosis; (ii) és egy neurodegeneratív betegcsoporthoz, akik Parkinson-kórban szenvedtek. Megvizsgáltuk a mért biomarkerek egyidejű kapcsolatát a klinikai végpontokkal (halálozás, post-stroke infekció) egy többszörös regresszió felhasználásával, és megvizsgáltuk a regressziós modellek predikciós képességét.

5.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Sorozatos vérmintavételt végeztünk (a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül, majd 24 és 72 óra múlva) 76 akut ischaemiás stroke-ban szenvedő betegben a thrombo-inflammatorikus molekulák, mint a P-selectin, a szöveti Plasminogén Aktivátor (tPA), a monocita kemoattraktáns protein (MCP-1), a szolubilis CD40 ligand (sCD40L), valamint az interleukin-6 és -8 (IL-6 és IL-8), továbbá az S100B és a magas szenzitivitású C-reaktív protein (hsCRP) meghatározása céljából. Eredményeinket, 44 carotis duplex scan segítségével diagnosztizált szignifikáns carotis szűkületben, illetve 66 Parkinson kórban szenvedő betegben mért adatokkal hasonlítottuk össze. Ezek a betegek vaszkuláris szempontból neurológiailag tünetmentesek voltak. Vérzéses stroke, valamint akut fertőzésre utaló jelek (láz 4 héten belül, valamint magas 10mm/h<We, 10 mg/dl<CRP, leukocitózis) esetén a betegeket kizártuk. A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) alapján határoztuk meg. A szövetkárosodás nagyságára a szisztémás keringésben mérhető S100B koncentráció alapján következtettünk. Végpontoknak a 28 napos Barthel Indexet, a mortalitást és a post-stroke infekció kialakulását választottuk. Az AIS típusát a TOAST kritériumok alapján osztályoztuk: 22 betegnél volt nagy ér elzáródás (átlag életkor:

68,76±10,03; felvételtkor NIHSS: 12,656±5,88), 26 lacunar infarktus (életkor: 66,46±10,25; NIHSS: 6,896±3,71), és 28 esetben kardio-emboliás stroke volt (életkor: 77,36±9,48 év; NIHSS: 14,076±4,89). Egyik betegnél sem volt meghatározhatatlan etiológiájú stroke. A post-stroke infekció definiálása egy evidencia alapú ajánlás szerint történt (röviden, fizikális és labor eredmények: láz, leukocita szám, We, CRP, procalcitonin, vizelet, mellkas Rtg, mikrobiológiai leoltások).

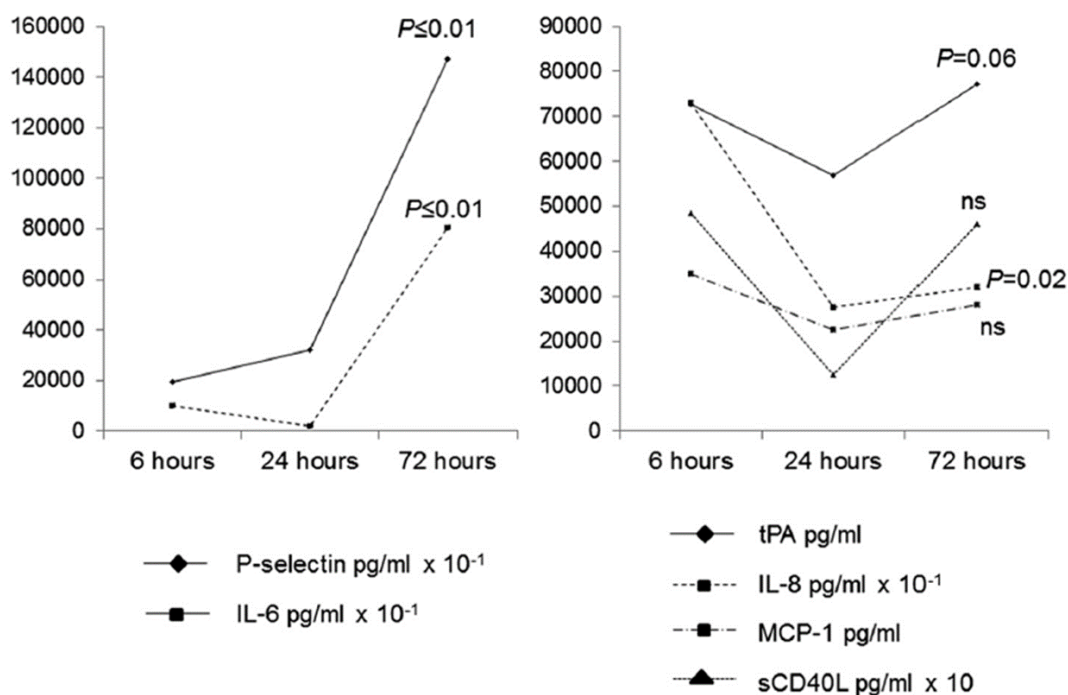
5.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS

A csoportok közötti összehasonlításra Mann-Whitney tesztet, míg a folyamatos változók közötti kapcsolat elemzéséhez Spearman korrelációt végeztünk. A regresszióanalízishez (R version 3.0.1) 3 klinikai végpontot használtunk (mortalitás, post-stroke infekció és a 7. napon észlelt NIHSS pontszám). A bináris kimenetek (halál és post-stroke fertőzések) esetén a Firth logisztikus regressziót az R csomag logistf 1.21 verziójával végeztük. Az NIHSS pontszám 7. napra történő meghatározásához szokásos lineáris regressziós modellt alkalmaztunk. A biomarkerek, a demográfiai adatok és a társbetegségek figyelembevételével többszörös regressziós analízist végeztünk, melynek során a post-stroke infekció, a halálozás, illetve a funkcionális kimenetelt előrejelző faktorokat kerestünk. Megvizsgáltuk a modellek végpontokat előrejelző képességét (ugyanazon adatbázison belül), a Pearson korrelációs együttható és a görbe alatti terület (AUC, a bináris eredményekhez) felhasználásával.

5.4. EREDMÉNYEK

Hiperakut fázis: a P-selectin, MCP-1, CD40L, IL-6, tPA, S100B és hsCRP szérumszintek a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül szignifikánsan magasabbak voltak az AIS csoportban, mint a két kontroll csoportban. A carotis stenosisban szenvedő betegekben a P-selectin kivételével magasabb marker értékeket találtunk a Parkinson betegcsoporthoz képest.

Biomarker kinetika: A releváns biomarker változásokat (post-stroke 6, 24 és 72 órában) a **10. ábrán** tüntettük fel. Az IL-6, P-szelektin, hsCRP és S100B emelkedést mutatott 6 óránál, további emelkedéssel 72 óránál. Ezzel szemben az IL-8 csak 6 óránál magasabb, majd ezt követően csökken. Míg a tPA, CD40L és MCP-1 esetén folyamatos emelkedés észlelhető az első 72 órában. Az összes biomarker koncentrációja mindhárom időpontban magasabb volt a Parkinson-kóros kontroll csoporthoz képest.



10. ábra. A biomarkerek kinetikája a post-stroke első 72 órában.

tPA, szöveti Plasminogén Aktivátor; MCP-1, monocita kemoattraktáns protein; sCD40L, szolubilis CD40 ligand; IL-6, interleukin-6; IL-8, interleukin-8. NS, nem szignifikáns.

Korrelációk: A TOAST kritériumok alapján létrehozott alcsoportokban megvizsgáltuk az életkort, a felvételtkor NIHSS pontszámot, a 28 napos Barthel-indexet és a biomarkerek koncentrációját a stroke kezdete után 6 és 72 órával. A felvételtkor NIHSS alapján, a kisér elzáródásos stroke kevésbé súlyos volt (NIHSS: 6,9±3,7) összehasonlítva a nagyér elzáródásos (NIHSS:12,6±5,8; p=003) és a kardioembolikus stroke-kal (14,1±4,9; p<001). Mind a fertőzés, mind a halálozás gyakoribb volt a kardioemboliás stroke-ban, a lakunáris és nagyérelzáródásos betegekhez képest (fertőzési arány: 35% vs 10% és 14,3%; halálozás: 32%, szemben a lacunar stroke 5% -ával és a nagy artériák elzáródásában megfigyelt 23,8%-al). A P-selectin koncentrációja 72 óra elteltével szignifikánsan magasabb volt a nagyérelzáródásos stroke-ban szenvedő betegeknél (29999,7±653381,8), mint a lacunaris stroke-ban szenvedőknél (3312,56±61192,367; p=0,03). Az IL-6 koncentrációja mind 6 órán belül, mind a 72 óra után magasabb volt a nagyérelzáródásos stroke esetén (5722,7±19823 és 28702±10809), mint lakunáris stroke-ban (13,14±49,2 és 145,1±439,8; p=0,04). A hsCRP szintje nem különbözött a felvételtkor, viszont szignifikánsan magasabb lett a 72. órában a nagyérelzáródásos stroke-ban (p=0,04) és kardioemboliát elszenvedett betegeknél (p<0,001), összehasonlítva a lacunaris infarktuson átesett betegeknél.

Korreláció a szövet pusztulásal: Az S100B koncentráció pozitívan korrelált a hsCRP szintekkel a 72 órás mintákban ($p < 0,001$). A szérumban mérhető IL-6 abszolút szintek és az IL-6 változása az első 72 órában szintén pozitív korrelációt mutatott az agyszövet sérülésének nagyságát jelző S100B koncentrációval. A 72. órában az IL-6 és P-selectin szintek szignifikánsan magasabbak voltak a nagyér elzáródásos betegekben, mint lacunaris stroke-ban.

Infekció és mortalitás: A 6 órán belül magasabb IL-6, MCP-1 és S100B értékeket mértünk azokban a stroke betegekben, akiknek később post-stroke infekciójuk alakult ki. A magas IL-6, S100B és hsCRP koncentrációk korreláltak a mortalitással.

Független prediktorok: A stroke első 72 órájában a P-selectin egységnyi emelkedése és a post-stroke infekciók incidenciája között szoros kapcsolatot találtunk (OR: 22,7). Minden 100 egységnyi baseline IL-6 emelkedés 9%-el növelte a halálozás esélyét, míg a 72 óránál észlelt hasonló arányú emelkedése 4%-el növelte a post-stroke infekció valószínűségét. Hasonlóan, az egységnyi baseline hsCRP 7% -al növelte a halálos kimenetelt.

5.5. MEGBESZÉLÉS

Akut ischaemiás stroke-ban a szisztémás keringésben mért tPA, P-selectin, MCP-1, IL-8, IL-6 és sCD40L a stroke után 6 órán belül és 72 órával később is emelkedett maradt a Parkinson kóros csoporthoz képest, mely elhúzódó thrombo-inflammatorikus aktivitást jelez. Mivel a 6 órán belül mért markerek szintje az ateroszklerózis súlyosságát is tükrözheti, ezért a stroke betegek adatait tünetmentes carotis stenosisban szenvedő betegekhez hasonlítottuk és vizsgáltuk a kinetikát is. Az az IL-8 kivételével az összes biomarker koncentrációja magasabb volt a 6 órán belüli stroke mintákban, mint a carotis stenosisban szenvedő betegekben, ami arra utal, hogy a megnövekedett szintek nem pusztán az atherosclerosishoz köthetőek. További lényeges megfigyelés, hogy a tPA, MCP-1, IL-8, IL-6 és sCD40L koncentrációja ugyan magasabb volt carotis stenosisban szenvedő betegekben, mint a Parkinson csoportban, jelezve, hogy a súlyos atherosclerosishoz valóban társul egy emelkedett szisztémás koncentráció, viszont az akut stroke további növekedést eredményez. Ezen logisztikus regressziós modellek felhasználásával számos tényező szerepe merült fel a végpontok előrejelzésében: az akut fázisban a hsCRP és a P-selectin változása, valamint az IL-6 korai és késői emelkedése, korai NIHSS és elhízás. Különösen a P-selectin koncentráció 6 és 72 óra közötti egységnyi változása (pg/ml) 22,7-es esély hányadossal növelte a stroke utáni fertőzések előfordulását; továbbá minden 100 egységnyi

(pg/ml) IL-6 emelkedés a kiindulási értéknél 9% -kel, a 72 óra múlva pedig 4% -kel növelte a halálozás esélyét; hasonlóan a kiindulási hsCRP-koncentráció minden további egységni (mg/L) növekedése 7% -kel emelte a mortalitás valószínűségét.

Összefoglalva, a korábbi tanulmányokból ismert hsCRP mellett, két thrombo-inflammatorikus marker domináns szerepe merült fel az akut ischaemiás stroke kedvezőtlen kimenetelének előrejelzésére: a P-selectin és az IL-6 korai változása a szisztémás keringésben.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY

Pusch G, Debrabant B, Molnar T, Feher G, Papp V, Banati M, Kovacs N, Szapary L, Illes Z. Early Dynamics of P-selectin and Interleukin 6 Predicts Outcomes in Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2015** 24:1938-47.

6. A THROMBO-INFLAMMATORIKUS MOLEKULÁK ÉS AZ L-ARGININ ÚTVONAL METABOLITJAINAK ÖSSZEFÜGGÉSE AKUT ISCHAEMIÁS STROKE-BAN

Korábban igazolni tudtuk, hogy mind a thrombo-inflammatorikus rendszer bizonyos molekulái, mind az L-arginin útvonal metabolitjai kapcsolatban vannak az akut ischaemiás stroke kimenetelével. A két rendszer kapcsolatát és együttes prediktív értéküket ischaemiás stroke-ban eddig még nem vizsgálták.

6.1. CÉLKITŰZÉS

Mivel korábbi tanulmányaink alapján az L-arginin protektív szerepét sejtettük, feltételeztük, hogy a prekursor molekula L-arginin és a metabolitjai (ADMA és SDMA) eltérően korrelálnak a citokinekkal.

6.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Tanulmányunkban sorozatos vérmintavételt végeztünk (a tünetek kezdetétől számított 6 órán belül, majd 72 óra múlva) 55 akut ischaemiás stroke-ban szenvedő betegben a thrombo-inflammatorikus molekulák, mint a P-selectin, a szöveti Plazminogén Aktivátor (tPA), a monocita kemoattraktáns protein (MCP-1), a szolubilis CD40 ligand (sCD40L), valamint az interleukin-6 és -8 (IL-6 és IL-8), továbbá az L-arginin, aszimmetrikus dimethylarginin (ADMA) és szimmetrikus dimethylarginin (SDMA) meghatározása céljából. A trombo-

inflammatorikus molekulák szérumszintjének meghatározása immunoassay módszerrel történt (BMS711F, Bender GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, Vienna, Austria). A szérumszint L-arginin, ADMA és SDMA mérése a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Intézetével való kooperációban történt high-performance liquid chromatographia (HPLC) módszerrel.

6.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). Mann-Whitney U tesztet használtunk a nem normál eloszlást mutató paraméterek összehasonlításához. A korrelációs analízist Spearman korrelációs együttható (ρ) kiszámításával végeztük. A bináris logisztikus regressziót használtuk a független prediktorok feltárására, és a ROC elemzést végeztünk a küszöbérték kiszámításához. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

6.4. EREDMÉNYEK

A szérumszint L-arginine koncentrációja és az IL-6, IL-8, tPA között negatív, míg az ADMA és MCP-1, továbbá az SDMA és MCP-1, P-selectin között pozitív korrelációt találtunk a stroke hyperakut fázisában (**7. táblázat**). Ezen korrelációk többsége (kivéve SDMA és MCP-1 közötti) a tünetek kezdetétől számított 72 óra múlva eltűnt (**7. táblázat**). Az MCP-1 baseline korrelációja az ADMA és SDMA szintekkel és az NIHSS pontszám romlása, valamint a post-stroke infarktus kialakulása között erős kapcsolatot találtunk (**8. táblázat**). Hasonló asszociációt figyeltünk meg a korai időpontban, az sCD40L és SDMA közötti korreláció és az NIHSS pontszám között. Míg a P-selectin és az L-arginine közötti negatív korreláció a hyperakut szakban szintén az NIHSS pontszám változásával volt arányos. Azon betegek szérumszintjében, akiknek később post-stroke infarktus lett, erős negatív korrelációt találtunk a korai IL-6 és az L-arginin szintek között (**8. táblázat**). Több változós regressziós analízist használva, a 72 órás mintákban mért L-arginin és SDMA független asszociációt mutatott a post-stroke infarktus megjelenésével (OR: 1.05; 95% CI: 1,005-1,089; $p=0,02$, illetve OR: 4.69; 95% CI: 1,034-21,31; $p=0,04$). A halálozás előrejelzésében ez már nem volt megfigyelhető.

7. táblázat. A trombo-inflammatorikus markerek és az L-arginin útvonal markerei közötti korrelációk akut ischaemiás stroke-ban

	sCD40L	MCP-1	P-selectin	IL-6	IL-8	tPA
6 órán belüli minták						
L-arginin	NS	NS	NS	-0,444 p=0,001	-0,378 p=0,004	-0,282 p=0,04
ADMA	NS	0,640 p<0,001	NS	NS	NS	NS
SDMA	NS	0,602 p<0,001	0,269 p<0,05	NS	NS	NS
72 órás minták						
L-arginin	-0,306 p<0,05	NS	NS	NS	NS	NS
ADMA	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SDMA	0,412 p=0,006	0,380 p=0,01	NS	NS	NS	NS
6 és 72 óra közötti koncentráció változás (Δ)						
Δ L-arginin	NS	-0,300 p=0,05	-0,338 p=0,027	NS	NS	NS
Δ ADMA	NS	NS	0,358 p=0,019	NS	-0,304 p=0,048	NS
Δ SDMA	NS	NS	NS	NS	NS	NS

sCD40L= szolubilis CD40 Ligand; MCP-1= monocita kemoattraktáns protein-1; IL-6= interleukin-6; IL-8= interleukin-8; tPA= szöveti plazminogen aktivátor; ADMA= asszimmetrikus dimetilarginin; SDMA= szszimmetrikus dimetilarginin; NS= nem szignifikáns. Spearman korreláció.

8. táblázat. Az L-arginin útvonal és a trombo-inflammatorikus markerek kimenetellel való kapcsolata

		romló NIHSS 24 óra alatt n=10	Post-stroke infekció n=16	Mortalitás n=13
6 órán belüli minták				
P-selectin	L-arginin	p=0,008 (-0,778)	NS	NS
MCP-1	ADMA	p=0,04 (0,648)	p=0,01 (0,709)	NS
	SDMA	p=0,005 (0,806)	p=0,04 (0,618)	NS
	L-arg/ADMA	p<0,001 (-0,952)	NS	NS
	L-arg/SDMA	p<0,001 (-0,915)	NS	NS
sCD40L	SDMA	p=0,06 (0,612)	NS	NS
	L-arg/ADMA	p=0,01 (-0,758)	NS	NS
	L-arg/SDMA	p=0,02 (-0,709)	NS	NS
IL-6	L-arginin	NS	p=0,004 (-0,756)	NS
	L-arg/SDMA	NS	p=0,001 (-0,832)	p=0,006 (-0,862)
IL-8	L-arg/ADMA	p=0,02 (-0,701)	NS	NS
72 órás minták				
sCD40L	SDMA	NS	p=0,04 (-0,636)	p=0,02 (-0,886)
	L-arg/SDMA	NS	p=0,04 (0,661)	NS
IL-8	SDMA	NS	NS	p=0,05 (0,812)
	L-arg/SDMA	NS	p=0,04 (-0,650)	p=0,05 (-0,812)

sCD40L= szolubilis CD40 Ligand; MCP-1= monocita kemoattraktáns protein-1; IL-6= interleukin-6; IL-8= interleukin-8; tPA= szöveti plazminogen aktivátor; ADMA= asszimmetrikus dimetilarginin; SDMA= szimmetrikus dimetilarginin; NS= nem szignifikáns. Spearman korreláció (rho).

6.5. MEGBESZÉLÉS

Az L-arginin, az ADMA és az SDMA eltérő módon korrelálnak a thrombo-inflammatorikus molekulákkal az ischaemiás stroke hyperakut fázisában. A stroke kimenetel pontosabb előrejelzésében a két rendszer szereplői additív értékkel bírnak. Az L-arginin „hasznos” szerepe a jövőben terápiás lehetőségekkel kecsegtethet.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Molnar T, Pusch G, Nagy L, Keki S, Berki T, Illes Z. Correlation of the L-Arginine Pathway with Thrombo-Inflammation May Contribute to the Outcome of Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2016** Jun 1. pii: S1052-3057(16)30089-1.

7. A TROPONIN-T ÉS A THROMBO-INFLAMMATORIKUS MOLEKULÁK ÖSSZEFÜGGÉSE AKUT ISCHAEMIÁS STROKE KIMENETELÉVEL

Az emelkedett szérum troponin koncentráció a zajló szívizom nekrosis jele akut koronária szindrómában, de szívelégtelenségben, myocarditisben, Takotsubo kardiomiopátiában és bizonyos ritmuszavarokban is leírták. *Scheitz és mtsai* azonban az akut ischaemiás stroke kedvezőtlen prognózisával is összefüggésbe hozták.

A stroke-ban szenvedő betegek troponin szint emelkedésének okát manifeszt miokardiális károsodás nélkül még nem vizsgálták. Nemrégiben egy nagy esetszámú stroke adatbázisban értékelték a stroke utáni mortalitás és a troponin, illetve az echocardiogram adatok közötti összefüggést. *Wrigley és mtsai* azt találták, hogy a sürgősségi osztályon észlelt troponin emelkedés megnövekedett 1 és 3 éves mortalitással járt, még az egyidejű miokardiális infarktus hiányában is.

7.1. CÉLKITŰZÉS

Ennek a tanulmánynak a célja a magas szenzitívitású troponin-T (hs-cTnT), a vér-agy gát károsodás és az agyi infarktus nagyságát jelző S100B, a hsCRP mint atherosclerosis marker, valamint a thrombo-inflammatorikus markerek, például a monocita kemoattraktáns protein (MCP-1), a szöveti plazminogén aktivátor (tPA), a szolubilis CD40 ligand (sCD40L), és a P-selectin közötti összefüggések feltárása volt akut ischaemiás stroke-ban szenvedő betegek vérében.

7.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Az akut ischaemiás stroke kezdete után 6 órán belül összesen 35 beteget vontunk be prospektív vizsgálatainkba. A stroke súlyosságát a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) alapján rögzítettük. A Sürgősségi Osztályon való megjelenéskor a betegek kardiológiai anamnézise, 12 elvezetéses EKG és a fizikai vizsgálat alapján az akut koronária események és a korábbi stroke-n átesett betegek kizárásra kerültek.

Részletezett *bevonási kritériumok* a következők voltak: (i) első elszenvedett ischaemiás stroke; (ii) az AIS kezdete 6 órán belül; (iii) a neurológiai tünetek 24 órán túl fennálló időtartama; (iv) A CT vagy az MRI által detektált agyi infarktus megfelel a klinikai tüneteknek és jeleknek. A bevont betegek mind konzervatív kezelést kaptak, így a keringésben kizárólagosan az endogén tPA szintjét tudtuk mérni.

A *kizárási kritériumok* a következők voltak: (i) vérzéses stroke; (ii) akut koronária szindróma, szívizom infarktus, stabil angina, (iii) akut fertőzéseket jelző klinikai tünetek és más krónikus fertőző betegségek; (iv) immunrendszeri rendellenességek, máj- vagy veseműködési zavarok, myopathia; (v) mind a felírt, mind a vény nélkül kapható gyulladáscsökkentő gyógyszerek használata a vérvételt megelőző 48 órában.

Biomarkerek. Vénás vérmintákat vettünk a hs-cTnT mérésére az első neurológiai tünetek megjelenése után 6 órán belül és 24 órával később és 12 elvezetéses EKG regisztrátum történt az esetleges ST mozgás detektálása céljából. A P-selectint, az MCP-1-t, az sCD40L-t és a tPA-t, a hsCRP-t és az S100B-t a kialakulást követő 6 órán belül és 72 órás mintákban mértük. A vérmintákat 10 percig 3000xg-vel centrifugáltuk. A felülúszókat fagyasztottuk és -80°C -on tároltuk az elemzésig. A hs-cTnT koncentrációkat teljesen automatizált szilárd fázisú elektro-kemilumineszcenciás immunvizsgálattal mértük Cobas e 411 analizátorral (Roche, Svájc). Az S100B szérumszintjét automatizált elektrokemilumineszcens immunoassay-módszerrel (Liaison Sangtec 100 system; DiaSorin, Bromma, Sveden) vizsgáltuk. A hsCRP szérumszintjét automatizált fluoreszcencia immunvizsgálattal vizsgáltuk (BRAHMS Kryptor, Berlin, Germany). A P-szelektin, az MCP-1, az sCD40L és a tPA koncentrációját immunvizsgálattal vizsgáltuk (BMS711F, Bender GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, Vienna, Austria).

7.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az adatokat SPSS alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). Mann-Whitney U tesztet használtunk a nem normál eloszlást mutató paraméterek összehasonlításához. A korrelációs analízist Spearman korrelációs együttható (ρ) kiszámításával végeztük. A bináris logisztikus regressziót használtuk a független prediktorok feltárására, és a ROC elemzést végeztünk a küszöbérték kiszámításához. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

7.4. EREDMÉNYEK

A betegek átlagéletkora $66,8 \pm 11,7$ év volt (min-max:40-90). A demográfiai és klinikai adatokat az **9. táblázat** foglalja össze. A cukorbeteg (férfi: 6/16 vs. nő: 2/19; $p=0,04$) és a dohányosok (férfi: 8/16 vs nő: 0/19; $p=0,003$) között szignifikánsan több volt a férfi. *Markerek és NIHSS:* A stroke után 6 órán belül levett mintákban az MCP-1 koncentráció magasabb volt azokban a betegekben, akik neurológiai tünetei romlottak (magasabb NIHSS)

az első 24 órában, összehasonlítva a stabil vagy javuló NIHSS pontszámmal rendelkező betegekkel ($p=0,009$).

9. táblázat. Demográfiai és klinikai adatok az első 24 óra alatti stroke progresszió alapján

	összes beteg n=35	NIHSS javult n=13	NIHSS romlott n=22	p
Kor, év	67±11	61±10	70±11	0.02
Férfi	16	7	9	NS
BMI	27,3±4,4	26,8±4,6	27,7±3,0	NS
Dohányzás	8	3	5	NS
Hypertonia	29	10	19	NS
Diabetes mellitus	8	4	4	NS
Diszlipidemia	10	4	6	NS
Cardioembolia	12	2	10	NS
Atherothrombosis	21	9	12	NS
Lacunaris	2	1	1	NS
NIHSS felvételtkor	12±6	9±6	14±6	0.04
NIHSS 2. nap	12±6	7±5	15±6	0.05
NIHSS elbocsátáskor	9.5±6	3.5±1	11±6	0.04
Halálozás	7	0	7	0.02

NIHSS= National Institute of Health Stroke Skála; BMI= body mass index; NS= nem szignifikáns. Az adatok, mint átlag és szórást ábrázoltuk.

A hs-cTnT koncentrációja mind a 6, mind a 24 órás mintákban emelkedést mutatott azokban, akiket súlyosabb NIHSS pontszámmal bocsátottak el ($p=0,026$ és $p=0,001$). A 24 órás mintákban mért $hs-cTnT \geq 9,4$ ng/l küszöbérték mellett, 81% érzékenységgel és 74% specifitással előrejelezte a romló neurológiai státuszt (magasabb NIHSS) a kórházi elbocsátáskor (ROC analízis: Area: 0,808; $p = 0,002$).

Markerek és mortalitás: A nem túlélők szérumban (n=7) a túlélőkhöz képest, szignifikánsan magasabb hs-cTnT koncentrációt mértünk a stroke kezdete után 6 órán belül (medián: 17,4; IQR: 15,6-25,5 vs. 7,8; 5,1-17,2), ami 24 óra elteltével is magmaradt (19,2; 16,3-26,2 vs 7,1; 6,4-20,5; p=0,03). A mortalitási csoport tagjai azonban szignifikánsan idősebbek voltak (80 ± 8 vs. 67 ± 11 év; $p < 0,001$), és szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az életkor és a hs-cTnT között mind a 6 órán belüli, mind a 24 órás mintákban ($r = 0,492$; $p = 0,003$ és $r = 0,538$; $p = 0,001$). Az S100B koncentrációja az AIS után 6 órán belül szintén szignifikánsan magasabb volt azoknál a betegeknél (n=7), akik meghaltak a túlélőkhöz képest (medián: 1,17; IQR: 0,17-2,24 vs 0,13; 0,09-0,29; $p = 0,009$). A hsCRP szérumkoncentrációja 72 órával az AIS után szintén magasabb volt a nem túlélőknél (medián: 114,1; IQR: 40,8-204 vs 4,0; 2,7-14,2; $p = 0,001$).

Markerek közötti korreláció: Az AIS után 6 órán belül és 24 óránál mért emelkedett hs-cTnT koncentráció pozitív korrelációt mutatott: mind a 72 óránál mért magasabb hsCRP szinttel ($r = 0,592$ és $0,596$, mindkét esetben $p = 0,001$); mind a 6 órán belül mért tPA szinttel ($r = 0,550$ és $0,534$; $p = 0,001$ és $p = 0,002$); mind a 6 órán belül mért MCP-1 koncentrációval ($r = 0,465$ és $0,442$; $p = 0,01$ és $p = 0,015$). A hs-cTnT és az S100B szintek között azonban nem találtunk összefüggést. A stroke kezdetétől számított 6 órán belül mért MCP-1 szérum koncentráció viszont pozitívan korrelált az S100B-val, mind 6 órán belül, mind 72 óránál ($r = 0,379$ és $0,456$; $p = 0,04$ és $0,019$).

Független prediktorok: Az életkor, a nem és a biomarkerek bevonásával végzett bináris logisztikus regresszió alapján, csak az AIS után 24 órával mért hs-cTnT volt a kórházi elbocsátáskor észlelt neurológiai romlás (magas NIHSS) független előrejelzője (OR: 1,58; 95% CI: 1,063-2,370; $p = 0,024$). Érdekes módon, hasonló független prediktort a halálra, mint kemény végpontra nem találtunk.

7.5. MEGBESZÉLÉS

A stroke hiperakut fázisában mért tPA és MCP-1 korrelál az AIS után 24 órával mért hs-cTnT szintjével. A troponin T emelkedés független prediktora a neurológiai tünetek progressziójának azokban a betegeknél, akiknek nyilvánvaló miokardiális károsodása nincs.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY Csecsei P, Pusch G, Ezer E, Berki T, Szapary L, Illes Z, Molnar T. Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2018;27(4):951-956.

8. AZ ISCHAEMIÁS STROKE VÉRZÉSES TRANSZFORMÁCIÓJÁNAK RIZIKÓTÉNYEZŐI

Ebben az alfejezetben két tanulmány kerül tárgyalásra: **A.** egy prospektív, mely akut ischaemiás stroke-ban (AIS) egy apoptózis marker (CCCK-18) kinetikáját és annak a kimenetellel való kapcsolatát elemzi; **B.** a multicentrikus STAY ALIVE Akut Stroke Regiszter adatai alapján a tünetes intrakraniális vérzéses transzformáció prediktorait vizsgálja.

Mind az intravénás trombolízissel (IVT), mind az endovaszkuláris terápiával (EVT) kezelt AIS lesúlyosabb szövődménye a tünetes intrakraniális vérzés (symptomatic ICH, sICH). A mechanikus thrombectomiát (MT) kísérő sICH általános kockázata 4,4% körül van. Számos tényező befolyásolja az endovaszkuláris terápia hatékonyságát, mint az életkor, a stroke tünetek súlyossága, a preintervenciós ASPECT (Alberta stroke program early CT score) pontszám és a stroke kezdetétől eltelt idő (ébredési stroke). Ennek ellenére az intrakraniális vérzés prediktorait még nem sikerült teljesen tisztázni.

Az apoptózissal kapcsolatos kaspáz aktivitás olyan sejtekben van jelen, amelyek elveszítették a plazmamembrán integritását az agyi ischaemia során. Az enzim hasítási termékeinek kimutatását a kaspáz útvonal aktiválódás bizonyítékának tekintik. A cytokeratin-18 (CK-18) protein az intermedier filamentum család tagja, mely az apoptózis során kaspázok hatására hasad. Ezt követően a kapott fragmensek, például a kaspázzal hasított cytokeratin-18 (CCCK-18) a szisztémás keringésben is megjelennek.

8.1. CÉLKITŰZÉS

Tanulmány **A:** célunk az AIS után különböző időpontokban levett vérmintákból meghatározott CCCK-18 koncentrációk és a stroke kimenetel közötti kapcsolat feltárása volt. Emellett, a CCCK-18 és a vérzéses transzformáció közötti kapcsolatot is vizsgáltuk.

Tanulmány **B:** célunk a rekanalizáció (IVT, EVT vagy ezek kombinációja) során szövődményként jelentkező sICH független prediktorainak feltárása multicentrikus stroke centrumok által létrehozott regiszter alapján (GINOP-2.3.2-15-2016-00048).

8.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Tanulmány **A:** A módosított Rankin-skála >1 betegeket, és az onkológiai betegeket kizártuk. A betegek kórtörténeti adatbázisából rögzítettük a társbetegségeket. A felvételtől labor paraméterek alapján kiszámítottuk a vérlemezke-limfocita arányt (PLR) és a neutrofil-

limfocita arányt (NLR). Rögzítettük a Glasgow kimeneti skálát (GOS). Az ischaemiás infarktus és a vérzéses transzformáció (HT) detektálására Siemens SOMATOM Definition 64 Slice CT szkennert használtunk. A nagy artériák elzáródását CT-angiográfiával (CTA) igazoltuk. A HT különféle típusait, azaz a vérzéses infarktusot (HI, 1. és 2. típus) és a parenchimális vérzést (PH, 1. és 2. típus) a CT jellemzői alapján határozták meg. A HI1 izolált petechialis vérzések az infarktusos szövetben, míg a HI2-et összefolyó petechiák jellemzik, de egyik sem jár térfoglaló hatással. A PH1-et egy homogén vérzéses lézió jellemzi, minimális térfoglaló hatással, amely az infarktusos terület kevesebb, mint 30% -át foglalja el. A PH2 meghatározása szerint az infarktusos terület több mint 30% -át elfoglaló lézió térfoglaló hatással bír, valamint a vérzés intraventriculárisan és az infarktusos területen kívül is megjelenhet. Az ASPECTS meghatározása képzett neuroradiológus által történt. A stroke felvételtkor súlyosságát az National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) alapján jellemeztük. A súlyos stroke-nak az NIHSS \geq 9 definiáltuk. Kimeneteli végpontoknak az elbocsátáskori és 6 hónappal a stroke után mért módosított Rankin-skálát (mRS) tekintettük (kedvezőtlen kimenetel: mRS 4–6; kedvező kimenetel: mRS 0–3).

Mintavétel és plazma CCK-18: A tünetek kezdete után 6 órán belül és 72 óra múlva vénás vérvétel történt. A marker plazma koncentrációját CCK-18 ELISA teszttel (Shanghai YL Biotech Co., Ltd., Kína) határoztuk meg.

Tanulmány B: Összesen 355 beteg adatait elemeztük. Az IVT csoportban az ajánlás szerinti rt-PA kezelés, annak hatástalansága esetén EVT kezeléssel való kombinációja történt. Az IVT ellenjavallata, illetve CTA-val igazolt nagyér elzáródás (ICA, MCA, VA, BA) esetén priméren EVT történt. Az EVT indikációi a következők voltak: (i) noninvazív érrendszeri képalkotással igazolt nagyér elzáródás; (ii) preorbid mRS pontszám <3; (iii) ASPECT pontszám > 6 az első CT vizsgálat során. Az EVT indikációja a 6 órás időablakon túl az ASPECT pontszámon alapult, mivel nem minden primer stroke központban történt CT perfúziós vizsgálat. Minden ASPECT pontszámot tapasztalt neuroradiológus validált. A betegeket a kapott terápiától függően 3 csoportra osztottuk: csak trombolízist kapó betegek (IVT); kombinált terápiában részesültek (IVT + EVT); csak thrombectomia-ban részesülő betegek (EVT). Az elsődleges végpontok a halálozás és a kedvező 30 és 90 napos kimenetek voltak. Kedvező kimenetelnek az mRS 0-2-t tekintettük. Másodlagos végpontnak a 'thrombolysis in cerebral infarction' (TICI) pontszám alapján mért rekanalizáció (teljes: TICI 2C – 3) sikerességét tekintettük. Statisztikai elemzés céljából a betegeket a multifázisos CTA (mCTA) alapján jó és rossz kollaterális keringésű csoportokba soroltuk (gyenge kollaterális: 0–3, jó kollaterális: 4–5). A rekanalizációs

kezelés után 24 órán belül elvégzett kontroll CT eredményét (ICH hiánya vagy jelenléte) használtuk biztonsági végpontnak. Az ICH diagnosztizálását és osztályozását a Heidelberg vérzéses skála alapján végeztük. A betegeket a klinikai állapot és a kontroll képalkotó eredmények alapján tünetes (sICH) és tünetmentes (aICH) vérzéses alcsoportba soroltuk.

8.3. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adatokat SPSS alkalmazásával értékeltük (11.5 verzió; IBM, Armonk, NY, USA). A normalitás ellenőrzésére Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. A demográfiai és klinikai tényezők elemzéséhez chi-négyzet próbát és Student t tesztet használtuk. A nem normál eloszlást mutató adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány ábrázoltuk, és Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze. ROC analízissel számoltuk ki a CCK-18 vágópontját ($n=54$) a 6 hónapos utánkövetés során a kedvezőtlen kimenetel előrejelzésére. Korrelációs elemzést Spearman teszttel (ρ) végeztünk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

8.4. EREDMÉNYEK

Tanulmány **A**: Betegeink demográfiai és klinikai adatait a **10. táblázatban** foglaltuk össze. A HT csoportban szignifikánsan alacsonyabb ASPECT, magasabb felvételtori NIHSS, plazma glükóz szint, INR érték, gyakoribb pitvarfibrilláció és magasabb CCK-18 értékek fordultak elő. Ebben a csoportban az mRS alapján mért kimenetel is rosszabb volt. A plazma CCK-18 szintje a stroke kezdete után 72 órával előrejelezte a 6 hónapos kedvezőtlen kimenetelt (AUC: 0,851 (95% CI = 0,745-0,955; $p < 0,001$). ROC analízissel azt találtuk, hogy a plazma CCK-18 szintje > 223 ng/l cut-off érték mellett, 84,4% érzékenységgel és 77,3% specificitással előre jelezte a 6 hónapos kedvezőtlen kimenetelt. Azokban a betegeknél, akiknél magasabb plazma CCK-18 szintet mértünk, gyakoribb volt a kórházi fertőzés és magasabb volt a felvételt követő 24 órában mért hsCRP.

Tanulmány **B**: A három kezelési csoport demográfiai és klinikai adatait a **11. táblázatban** mutatjuk. A kimeneteli végpontokat az egyes kezelési csoportokban a **12. táblázatban** foglaltuk össze. A kontroll képalkotó eredménye alapján igazolt ICH közül a tünetes ICH nagyon magas mortalitással járt (a túlélőknél is $mRS > 3$). Ezzel szemben a tünetmentes ICH-ban szenvedő betegek 43% -ánál az mRS alapján kedvező 90-napos kimenetelt észleltünk. A részlegesen sikeres rekanalizáció ($TICI \leq 2B$), a kezdeti CT vizsgálat során észlelt korai ischaemiás lézió ($ASPECT < 6$) és a rossz kollaterális keringés gyakrabban vezetett szimptomás ICH megjelenéséhez a kontroll képalkotás során. Többváltozós regressziós analízis alapján a stroke után 24 órával felvett NIHSS pontszám függetlenül prediktora volt a sICH-nak (OR: 1,376; 95% CI: 1,129-1,678, $p < 0,001$).

10. táblázat. Demográfiai és klinikai adatok az ischaemiás stroke vérzéses transzformációja (HT) alapján dichotomizált csoportokban

	nincs HT n=45	HT n=9	<i>p</i>
Férfi	29 (64)	3 (33)	0,086
Életkor (év)	66±10	71±8	0,226
GCS	15 (13-15)	11 (4-14)	0,009
ASPECT score	9 (5-10)	4 (2-6)	<0,001
NIHSS felvételtkor	10 (7-15)	16 (13,5-20,5)	<0,001
NLR	3,7 (2,2-6,1)	6,8 (3,4-19,9)	0,027
hsCRP, mg/L	4,6 (2,1-9)	19 (6,9-46,9)	0,008
glükóz	6,8 (6-8)	9,2 (7,5-10,2)	0,014
kreatinin	83 (67-103)	62 (59-101)	0,370
INR	1,04 (1-1,15)	1,19 (1,1-2)	0,007
vérlemezke, G/L	245 (193-307)	159 (138-273)	0,133
thrombolysis	28 (62)	7 (78)	0,382
thrombectomy	10 (22)	2 (22)	1,000
pitvar fibrilláció	12 (27)	7 (78)	0,003
infekció	16 (35)	8 (89)	0,003
CCCK-18 72h, ng/L	234 (179-271)	285 (247-580)	0,025
CCCK-18>223 ng/L	23 (51)	9 (100)	0,006
mortalitás	12 (27)	7 (78)	0,003
rossz kimenetel *	26 (58)	9 (100)	0,015

*Az adatokat, mint esetszám (%), átlag±SD illetve medián (25-75 percentilis) ábrázoltuk. HT: hemorrágiás transzformáció; GCS: Glasgow coma skála; ASPECT: Alberta stroke program early CT score; NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale; NLR: Neutrofil-limfocita arány; CRP: C-reaktív protein; INR: international normalized ratio; CCCK-18, caspase-cleaved cytokeratin; *mRS: 4-6 a kórházi elbocsátáskor*

ROC elemzéssel azt találtuk, hogy a 24 órás NIHSS $\geq 15,5$ küszöbérték mellett 100% -os érzékenységgel és 92% -os specifitással előre jelezte a tünetes vérzést (AUC: 0,973; 95% CI: 0,955–0,991, $p < 0,001$). Ezt követően meghatároztuk a 30 és 90 napos kimenetel prediktorait is. Az alacsonyabb életkor, a kezdeti mCTA által igazolt jó kollaterális keringés és az alacsonyabb 24 órás NIHSS pontszám független prediktorai voltak a 90 napos kedvező kimenetelnek (mRS 0-2) (**13. táblázat**).

11. táblázat A kezelési csoportok STAY ALIVE stroke regiszterben felvett adatai

	EVT n=131	IVT n=157	IVT+EVT n=67	p
Demográfia				
Kor, év	69±11	68±11	67±13	0,547
≥80 év, (%)	26 (20)	23 (15)	9 (13)	0,383
Női nem, (%)	65 (50)	69 (44)	43 (64)	0,021
BMI	27,3±5,4	27,2±5	28,2±4,8	0,268
Társbetegségek, n (%)				
Hipertónia	112 (85)	130 (83)	52 (78)	0,373
Atrial fibrillation	51 (41)	19 (12)	21 (32)	<0,001
Diabetes mellitus	43 (33)	43 (27)	10 (15)	0,027
Smoking	58 (44)	55 (35)	25 (37)	0,266
Klinikai adatok n, (%)				
NIHSS felvételtkor	12 (8-16)	6 (4-8)	15 (10-18)	<0,001
NIHSS ≤6	25 (19)	93 (59.2)	9 (13.4)	<0,001
NIHSS 24 órás	7 (3-12)	2 (0-5)	6 (2-14)	<0,001
SBP, Hgmm	151±28	158±29	152±31	0,083
Glükóz, mmol/l	7,9±3,6	7,8±3,7	7,7±2,3	0,194
DBP, Hgmm	84±16	86±13	85±14	0,203
ASPECT score<6	11 (9)	1 (14)	8 (13)	0,698
Gyenge kollaterális†	45 (37)	1 (25)	26 (41)	0,742
Elzáródás helye, n (%)				
ICA	6 (5)	5 (3)	6 (9)	<0,001
tandem	19 (14)	0 (0)	9 (14)	<0,001
M1	66 (50)	4 (2)	34 (51)	<0,001
M2	24 (18)	5 (3)	13 (20)	<0,001
M3	2 (1)	1 (1)	1 (1)	<0,408
VA/B	14 (11)	1 (1)	3 (4)	0,325
nem meghatározott	0 (0)	138 (89)	0 (0)	<0,001
Idő, perc				
door to needle	NA	72 (112-205)	135 (110-175)	<0,001
onset to needle	NA	150 (112-205)	135 (110-175)	0,088
onset to groin	310 (218-512)	NA	240 (182-305)	<0,001
beavatkozás ideje	38.5 (25-59)	NA	35 (25-59)	0,666

EVT: endovascularis trombektómia; IVT: intravénás trombolízis; ASPECT: Alberta stroke program early CT score; BMI: body mass index; SBP: szisztolés vérnyomás; DBP: diasztolés vérnyomás; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale; ICA: artéria carotis interna; tandem: ICA+MCA; M1: artéria cerebri média M1 ág; M2: artéria cerebri média M2 ág; M3: artéria cerebri média M3 ág; VA/B: vertebralis, basilaris artéria; † multifázisos CT angiográfia pontszám≤3; NA: nem alkalmazható. Az adatokat, mint átlag±SD vagy medián (interkvartilis tartomány) ábráztuk.

12. táblázat. Kimeneteli végpontok az egyes kezelési csoportokban

	EVT n=131	IVT n=157	IVT+EVT n=67	p
Kórházi halálozás (%)	13 (10)	2 (1)	5 (7)	<0,005
30-napos mRS	3 (1-5)	0 (0-3)	3 (1-5)	<0,001
sICH (%)	6 (5)	3 (2)	3 (4)	0,394
30-napos mRS 0-2 (%)	53 (40)	114 (73)	32 (48)	<0,001
90-napos mRS	3 (1-6)	0 (0-2)	2 (0-4)	<0,001
90-napos mRS 0-2(%)	60 (45,8)	119 (75,8)	35 (52,2)	<0,001

EVT: endovasculáris trombektómia; IVT: intravénás trombolízis; mRS: módosított Rankin Skála; sICH: tünetes intrakraniális vérzés; mRS 0-2: kedvező kimenetel.

13. táblázat. A 90 napos kedvező kimenetel (mRS \leq 2) prediktorai (a független változók vastagítva)

	OR	95% CI	p
Kor	1,055	1,01-1,10	0,014
NIHSS felvételtkor	1,045	0,94-1,16	0,401
ASPECT	0,953	0,66-1,37	0,796
Jó kollaterális†	3,546	1,33-9,46	0,011
NIHSS 24 órás	1,255	1,13-1,40	0,001

OR: esély hányados; NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale; ASPECT: Alberta stroke program early CT score; † multifázisos CT angiográfia pontszám \geq 4. Többváltozós regressziós analízis.

8.5. MEGBESZÉLÉS- Tanulmány A

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az ischaemiás stroke után 72 órával mért magasabb plazma CCCK-18 koncentráció: (i) mind az elbocsátáskori, mind a stroke után 6 hónappal mért kedvezőtlen kimenetellel; (ii) a halálozással; (iii) a nagy artériás elzáródással és a magasabb stroke súlyossági pontszámmal; (iv) a vérzéssel transzformáció nagyobb esélyével; valamint (v) a kórházi fertőzések magasabb arányával mutatott összefüggést. Mások az emelkedett szérum CCCK-18 szintet a szepszis súlyosságával, a többszervi elégtelenség kifejlődésével és a mortalitással is összefüggésbe hozták. A CCCK-18 szisztémás emelkedése tehát valószínűleg nem stroke specifikus jelenség, mert más betegségekben is a prognosis prediktora. Vizsgálatunk korlátai: (i) a bevont betegek alacsony száma; (ii) a képalkotó vizsgálattal való nyomonkövetés hiánya miatt nem tudtuk vizsgálni a korrelációt a penumbra, illetve a hipoperfundált agyterületek nagysága és a markerek között; (iii) habár ez egy prospektív vizsgálat volt, az infarktus volumenének meghatározása nem történt meg minden betegnél, így a 24 órás kontroll képalkotásból csak az ASPECT pontszámot tudtuk felhasználni.

Összefoglalva: Saját anyagunkban egy nem szelektált vizsgálati populációban sikerült igazolni, hogy a magasabb szérumszintű CCCK-18 szint mind az elbocsátáskori, mind a 6 hónapos kedvezőtlen kimenetellel összefüggést mutat, továbbá előre jelezheti további szövődmények megjelenését.

8.6. MEGBESZÉLÉS- Tanulmány B

Saját anyagunkban azt találtuk, hogy a tünetes vérzés kialakulásának a rizikófaktoraai a kiterjedt korai ischaemiás lézió, a részleges rekanalizáció, a rossz kollaterális keringés és a női nem voltak. *Hao és munkatársai* hozzánk hasonlóan a kollaterális keringés gyenge minőségét, a preoperatív ASPECT <6 és az 'onset-to-groin' (OGT) időt hozták összefüggésbe a sICH-val. Másokkal ellentétben saját anyagunkban nem a felvételi, hanem a 24 órás NIHSS bizonyult az sICH független prediktorának. A beavatkozás után perzisztáló magas NIHSS ($\geq 15,5$) jelzi a vérzéses transzformáció veszélyét. Egy nemrégiben közzétett metaanalízis a szignifikáns ICH prediktoraiként a női nemet, a kezelési intervallum hosszát, a tirofiban használatot és a felvételi ASPECTS pontszámot, míg az összes ICH prediktoraként a diabetes mellitust, a diffúzióval súlyozott képalkotás által igazolt mély fehérállományi léziókat és az intravénás rt-PA kezelést találta. Ebből látható, hogy eltérő tényezők játszanak szerepet a tünetes és a tünetmentes ICH kialakulásában. Tanulmányunk potenciális korlátai: (i) a betegeknél, akik több mint hat órával a stroke kezdete után érkeztek, nem történt perfúziós CT, itt az ASPECT pontszámra támaszkodtunk a beteg kiválasztásakor; (ii) az eltérő trombektómiai eszközök használata torzíthatja eredményeinket.

Összefoglalva: Habár a részleges rekanalizáció, az ASPECT <6 és a hiányos kollaterális keringés növeli a tünetes intrakraniális vérzés esélyét, az egyetlen független prediktor a 24 órás NIHSS $\geq 15,5$ volt, mely arra utal, hogy a megfelelő kezelés ellenére súlyosbodó NIHSS betegeket körültekintőbben kell monitorozni. A személyre adaptált ideális vérnyomásviszonyok feltárása a jövőben vizsgálatot kíván.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Molnar T, Borocz K, Berki T, Szapary L, Szolics A, Janszky J, Illes Z, Csecsei P. Subacute Elevation of Plasma Level of Caspase-Cleaved Cytokeratin-18 is Associated with Hemorrhagic Transformation and Functional Outcome in Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2019**;28:719-727

Csecsei P, Tarkanyi G, Bosnyak E, Szapary L, Lenzser G, Szolics A, Buki A, Hegyi P, Abada A, Molnar T. Risk analysis of post-procedural intracranial hemorrhage based on STAY ALIVE Acute Stroke Registry *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2020**; DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104851

9. PERIOPERATÍV STRESSZ CAROTIS ENDARTERECTOMIA SORÁN ÉS A SHUNT IGÉNY ELŐREJELZÉSE

Ebben az alfejezetben szintén két tanulmányt tárgyalok: **A.** egy prospektív és egy retrospektív részből álló vizsgálat a perioperatív stressz akut és hosszú távú hatásait elemzi; **B.** carotis endarterectomia során a kirekesztési intolerancia háttérében álló faktorok feltárásával foglalkozik.

A CEA elvégezhető általános és regionális érzéstelenítésben is. Ez utóbbi anesztézia modalitás egyik leggyakrabban említett hátránya a perioperatív stressz, mely fokozza az adrenocorticotrop-hormon (ACTH) felszabadulását. Ennek hatására megemelkedik a kortizol koncentrációja a szisztémás keringésben. A stressz-válasz emelkedett miokardiális oxigén felhasználással, a vércukorháztartás zavarai, fertőzések szövődésével és lassabb sebgyógyulással társul. Helyi érzéstelenítésben, éber végzett beavatkozás megfelelő stressz csökkentéssel ideális körülményeket biztosít a CEA-hoz. Titrálható felületes szedáció mellett a beteggel az egész operáció alatt megmarad a verbális kontaktus. Az éber szedációhoz használt propofol jól kormányozható, pleiotrop molekula, mely csökkenti a cerebrális metabolikus rátát. Szövet kultúrában és állatkísérletes modellekben neuroprotektív (antioxidáns és antiinflammatorikus) tulajdonságúnak bizonyult.

Az ér tónus szabályozásában a nitrogén-monoxid (NO) az egyik kulcs molekula. Az NO, az L-arginin L-citrullinná történő átalakulása során szabadul fel a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim segítségével. A NO szintézisét gátolni lehet az L-arginin guanin-szubsztituált analógjaival, mint az aszimmetrikus dimetil-argininnal (ADMA). Hipoxiás-ischaemiás inzultus hatására ADMA és a szimmetrikus dimetil-arginin (SDMA) képződik az L-arginin csoportokat tartalmazó fehérjék metilációjával. L-argininben gazdag fehérjéket neuroprotektív hatásúnak találtak állatkísérletes modellekben. Magasabb ADMA-szintet figyeltek meg COPD-ben, ischaemiás stroke-ban, valamint carotis szűkületben szenvedőkben, de endotél diszfunkcióval és az ateroszklerózis progressziójával is összefüggésbe hozták. Carotis endarterectomia utáni reocclusióban szintén magasabb szérumszintű ADMA-t találtak.

A perifériás vérben mért S100B érzékeny markere a vér-agy gát diszfunkciójának és még klinikailag tünetmentes CEA során is a szubklinikus agyi ischaemiának. Feltételeztük, hogy a carotis kirekesztése alatt a véna jugularis internából származó és az artériás oldalról vett sav-bázis paraméterek tükrözik a cerebrális hipoperfúzió mértékét. Ennek jellemzésére a jugulo-

artériás CO₂ differenciát (P(j-a)CO₂) és az arterio-juguláris oxigén extrakció (C(a-j)O₂) segítségével képzett arányt (P(j-a)CO₂/C(a-j)O₂) használtuk.

9.1. CÉLKITŰZÉSEK

Perioperatív stressz akut és hosszútávú hatásai carotis endarterectomia során

A1. Prospektív rész: A perioperatív stressz csökkentésében a premedikáción túl annak kiegészítése a műtét alatt propofollal végzett éber szedációval milyen előnyöket biztosít?

A2. Retrospektív rész: A perioperatív időszakban észlelt klinikai és laboratóriumi paraméterek milyen hatással vannak a hosszú távú kimenetelre, különös tekintettel az operált ér újbóli elzáródására, az ellenoldali szűkület progressziójára és a mortalitásra?

Carotis endarterectomia során a kirekesztési intolerancia háttérében álló faktorok

B1. A jugulo-artériás CO₂-gap és a P(j-a)CO₂/C(a-j)O₂ arány tükrözik-e a kritikus agyi hipoperfúziót?

B2. Az L-arginin út metabolitjai összefüggést mutatnak-e az agyi metabolizmussal, a vér-agy gát integritásával, illetve az agyi ischaemiás károsodással éberén végzett CEA során?

B3. A markerek intraoperatív „shunt-igény” előrejelző képességét is vizsgáltuk.

9.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Tanulmány A: Erőanalízis alapján legalább csoportonként 22 beteg bevonását terveztük. A lehetséges drop-out miatt, végül 25-25 beteget randomizáltunk mindkét csoportba (borítékos randomizációval). A premedikáció+TCI csoportban 3 betegből hibás mintavétel történt, ezért a végső analízisbe 22 beteg adatai kerültek be, melyeket a 25 csak premedikációban részesül beteg adataival hasonlítottunk össze.

Tanulmány B: Összesen 55 beteget vontunk be prospektív vizsgálatunkba.

Mindkét tanulmányban kizárási kritériumok voltak a végállapotú vesebetegség, illetve a vizsgálatban való részvétel visszautasítása. A betegeket neurológiai vizsgálat után jegyezték elő carotis endarterectomiára. A carotis szűkület oldalosságának megfelelő neurológiai deficittel rendelkező, illetve tranziens ischaemiás attack (TIA) vagy minor stroke után lévő betegeket tekintettük tünetesnek (n=32 beteg). A Carotis Consensus Panel kritériumai alapján, Philips HD7XE készülékkel diagnosztizáltuk a szignifikáns carotis stenosiszt (PSV > 230 cm/s, end-diastolic velocity > 100 cm/s, ACI/ACC ratio > 4). A nemzetközi ajánlásokkal összhangban, a 70-99%-os szűkületeket tekintettük szignifikánsnak.

Premedikáció és a szedáció protokollja

Az összes beteg 0,5 mg alprazolam premedikációt (BDZ) kapott 30 perccel a műtét előtt. Borítékos randomizációt követően a szedációs csoportban (BDZ+TCI) az érzéstelenítés

elkezdése előtt, TCI pumpa segítségével propofol szedációt kezdtünk. A kezdeti „effect site” propofol koncentrációt (0,5 ng/ml) a hatás alapján módosítottuk a kívánt Ramsay szerinti 2-3-as szedációs szint eléréséig úgy, hogy a beteggel a verbális kontaktus megmaradt. A kontroll csoport a permedikáción kívül nem kapott más anxiolyticumot.

Regionális anesztézia, shunt behelyezés

Minden beteg regionális anesztéziában, éberén végzett carotis endarterectomián esett át. Mély és felületes cervikális blokádot végeztünk, amit szükség esetén további helyi érzéstelenítő adásával egészített ki az érsebész a műtét alatt. A betegekkel verbális kontaktust tartottunk és az operált oldallal ellentétes kéz motoros működését is ellenőriztük. Shunt behelyezés indikációja: a carotis kirekesztése után a beteg tudat állapotában, illetve a motoros vagy verbális funkciókban hirtelen romlást tapasztaltunk.

Vérmintavétel és laboratóriumi mérések

Vérgáz és laktát: artériás és bulbus juguli vérmintákat vettünk párhuzamosan (Radiometer Abl 800 flex) négy időpontban: (i) a carotis kirekesztése előtt; (ii) a kirekesztés után 3 perccel; (iii) a kirekesztés felengedése előtt és (iv) után 1-1 perccel.

Markerek: artériás vért vettünk a műtét kezdetén (T₁), majd a bulbus juguliból a carotis kirekesztésének felengedése előtt (T₂) és a kirekesztés felengedése után (T₃), ezt követően a posztoperatív szakban csak artériából két órával a műtétet követően (T₄) és a műtét után 24 órával (T₅). A kortizol mérése kompetitív chemiluminescens immunoassaymódszerrel (Immulite 2000 Siemens, Healthcare Diagnostics, Germany), míg az S100B plazma koncentrációjának meghatározása automatizált elektrokemiluminescens immunoassay módszerrel történt (Liaison Sangtec 100 system; DiaSorin, Bromma, Sweden). A vérminták L-arginin, ADMA és SDMA tartalmát a Debreceni Tudományegyetem Alkalmazott Kémia Intézete végezte. Szilárd fázis extrakciós módszerrel (SPE) határozták meg és derivatizálás után magas teljesítményű folyadék kromatográfiával (HPLC) számszerűsítették.

5 éves utánkövetés

Regisztráltuk az 5 éven belüli érsebészeti eseményeket (amputációt, az operált ACI későbbi restenosisát, az ellenoldali ACI-n szignifikáns szűkület kialakulását) és a mortalitást.

9.3. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adatokat SPSS 20.0 segítségével dolgoztuk fel (IBM, Armonk, NY, USA). A normalitás vizsgálatára a Kolmogorov-Smirnov tesztet használtuk. Demográfiai és klinikai tényezők analízisére kategorikus adatok esetén a chi-négyzet próbát, folyamatos változók esetén Student-féle t-tesztet alkalmaztunk. Az adatokat, mint átlag és 95%-os konfidencia intervallum (CI),

illetve átlag±standard deviáció (SD) adtuk meg. A nem normál eloszlást mutató adatokat Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze és mint, medián és interkvartilis tartomány adtuk meg. Bináris logisztikus regressziót használtunk a független prediktorok vizsgálatára. Az L-arginin cut-off értékét a shunt behelyezés előrejelzésére ROC analízissel határoztuk meg. Korreláció analízis Spearman teszttel történt (rho). A $p < 0,05$ értéket fogadtuk el szignifikánsnak.

9.4. EREDMÉNYEK

Az **A** tanulmányba randomizált betegeink demográfiai és klinikai adataiban egyik paraméter sem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport összehasonlításakor (**14. táblázat**).

14. táblázat. A szedációs csoportok demográfiai és klinikai adatai (tanulmány A)

	BDZ+TCI n=22	BDZ n=25	összes beteg n=47	p^*
tünetes (%)	12 (54)	14 (56)	26 (55)	0,245
folt CEA (%)	13 (59)	16 (64)	29 (62)	0,687
életkor	63,7±8,5	67,7±7,7	65,8±8,3	0,156
férfi (%)	15 (68)	21 (84)	36 (76)	0,206
BMI	27.56 ± 5.92	27.32 ± 2.94	27.43 ± 4.52	0,716
jobb oldali műtét (%)	10 (45)	13 (52)	23 (49)	0,658
operált szűkület (%)	85.91 ± 5.9	83.60 ± 6.21	84.68 ± 6.12	0,203
ellenoldali szűkület (%)	43 ± 22.38	42.62 ± 27.05	42.8 ± 24.57	0,974
kirekesztési idő, perc	22.07 ± 6.79	21.82 ± 6.62	21.94 ± 6.63	1,00
shunt (%)	2 (9)	4 (16)	6 (13)	0,117

BDZ= alprazolam premedikáció; TCI= target controlled infusion propofol; BMI=body mass index. A p^ érték a két szedációs csoport összehasonlítására vonatkozik.*

A **B** tanulmány betegeinek demográfiai és klinikai adatait a **15. táblázatban** tüntettük fel. Itt sem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport összehasonlításakor.

15. táblázat. A shunt igény alapján képzett csoportok klinikai adatai (tanulmány B)

	shunt n=6	shunt nélkül n=49	összes beteg n=55	<i>p</i> *
életkor	66±8	65±8	66±8	0,668
férfi	6	38	44	0,205
BMI	27.7±3.0	26.8±4.6	27.3±4.4	0,342
preop Hgb, g/L	148±6	141±10	142.8±10.3	0,229
postop Hgb, g/L	133±12	129±9	128±10	0,567
operált szűkület (%)	81±7	84±6	84±6	0,589
SBP max, Hgmm	187±27	196±26	191±26	0,771
kirekesztési idő, perc	18±8	22±6	22±7	0,930
kreatinin, µmol/L	90±27	76±17	81±21	0,418

BMI=body mass index; preop= preoperatív; postop= postoperatív; Hgb= hemoglobin; SBP= szisztolés vérnyomás. p a shunt igény alapján képzett csoportok összehasonlítására vonatkozik.*

A plazma kortizol dinamikája a szedáció szerinti két csoportban

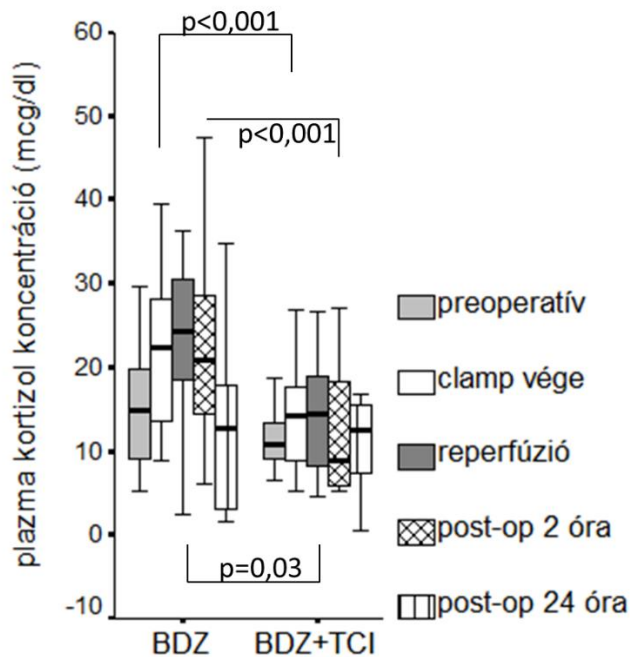
A kortizol kinetikája a plazmában a **12. ábrán** látható. A BDZ vs BDZ+TCI csoportok között nem volt különbség a műtét előtti (T₁) kortizol értékekben. Ezzel szemben a kirekesztés végén (T₂), a carotis felengedés után (T₃) és a műtét után 2 órával (T₄) szignifikánsan magasabb stresszhormon szinteket mértünk a műtét alatt propofol szedációt nem kapott csoportban.

Az alprazolam és a kortizol szintjének összefüggése

Minden betegnél meghatároztuk az alprazolam plazmaszintjét a műtét előtt (T₁) és a műtét végén (T₃). Az összes beteget és az egyes csoportokat külön-külön tekintve sem találtunk statisztikai kapcsolatot az alprazolam és a kortizol plazmaszintje között, egyik időpontban sem.

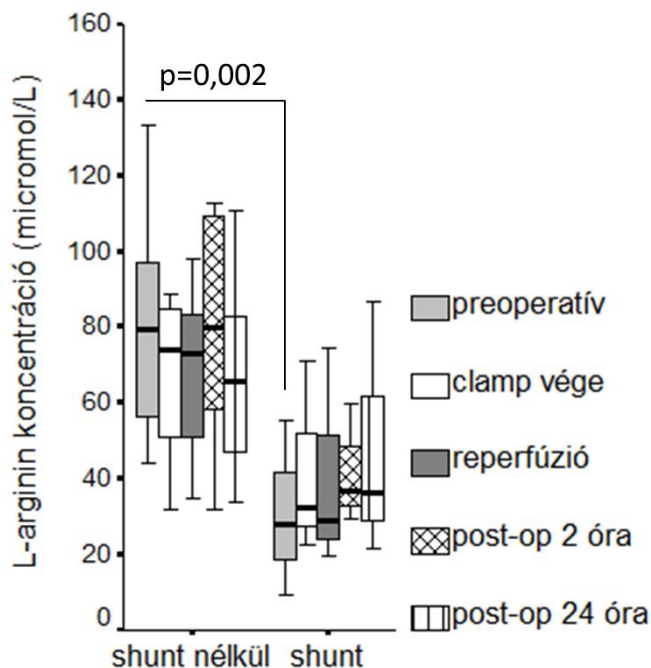
Kirekesztési idő és shunt

A kirekesztési idő nem különbözött szignifikánsan a tünetes és tünetmentes csoport között (23±6 perc vs. 22±6 perc). Friss neurológiai kórjel jelentkezett 6 betegnél, melyek a shunt behelyezése után megszűntek. A shunt-idő 20 ± 8 perc volt a shuntölt csoportban. A 6 beteg közül, akiknél shunt behelyezésre volt szükség, 2 a BDZ+TCI csoportban, 4 a BDZ csoportban volt.



12. ábra. A kortizol szint kinetikája a plazmában a csak premedikáció vs. premedikáció+ intraoperatív propofol szedáció csoportokban

BDZ= benzodiazepin (alprazolam); TCI= target controlled infusion (propofol); clamp=carotis kirekesztés. Az adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány mutatjuk (Mann-Whitney teszt).



13. ábra. Perioperatív L-arginin plazma szintek a shunt nélkül vs shunttel végzett carotid endarterectomi során

Shunt nélkül= jó kirekesztési tolerancia; shunt= kirekesztési intolerancia, shunt igény; clamp=carotis interna kirekesztés. Az adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány mutatjuk (boks-plot diagram, Mann-Whitney teszt).

Preoperatív összefüggések

A preoperatív artériás vérből mért L-arginin szint szignifikánsan alacsonyabb volt azokban, akiket később shuntolni kellett (median: 30,3 $\mu\text{mol/L}$; IQR: 24,4-34,4 vs. 57,6; 42,3-74,5; $p=0,002$) (13. ábra). A többi paraméter tekintetében nem volt különbség a két csoport között.

A vizsgált markerek szintjének időbeli változása

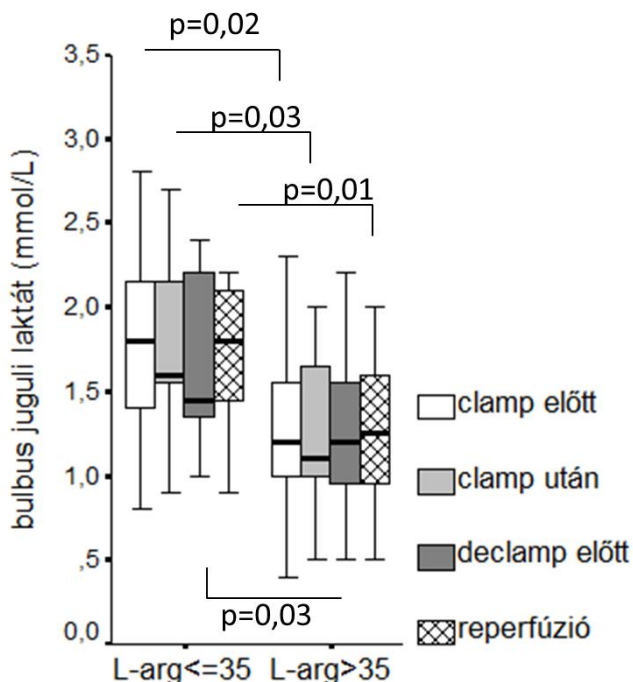
Megvizsgáltuk a preoperatív L-arginin útvonal molekulák korrelációját az agyi anaerob metabolizmus mutatójával: (i) $P_{(j-a)}\text{CO}_2/C_{(a-j)}\text{O}_2$ aránnyal; és (ii) a jugularis laktát szinttel, a műtét kritikus időpontjaiban (kirekesztés előtt és után, kirekesztés felengedése előtt és után). Az artériás vérben a preoperatív L-arginin inverz korrelációt mutatott a preoperatív laktát szinttel (-0,447, $p=0,002$). Negatív korrelációt találtunk a preoperatív L-arginin és a jugularis laktát szintek között is, ami megmaradt a kirekesztés és a reperfúzió alatt (-0,757, $p=0,002$ és -0,678, $p=0,008$). Ezzel szemben a preoperatív artériás ADMA koncentráció pozitív korrelációt mutatott az agyi anaerob metabolizmus mutatójával, a $P_{(j-a)}\text{CO}_2/C_{(a-j)}\text{O}_2$ aránnyal a kirekesztés és a reperfúzió alatt is (0,701, $p=0,005$ és 0,644, $p=0,01$). Az ADMA és SDMA szintek egyik időpontban sem korreláltak a jugularis laktát koncentrációkkal. A preoperatív artériás L-arginin koncentráció, az ADMA-val és SDMA-val ellentétben, fordított korrelációt mutatott a reperfúzió után mért jugularis S100B-val (-0,702, $p=0,005$). A $P_{(j-a)}\text{CO}_2/C_{(a-j)}\text{O}_2$ hányados a reperfúziót követően szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a műtét után 2 órával mért S100B koncentrációval. A műtét után 24 órával ez az összefüggés már nem volt megfigyelhető.

A preoperatív L-arginin prediktív szerepe

A preoperatív L-arginin és a jugularis laktát közötti fordított korreláció a nitrogén-monoxid donor L-arginin protektív szerepére utalhat a carotis kirekesztése alatt. Meghatároztuk az L-arginin cut-off értékét. Preoperatív L-arginin < 35 mmol/L érték (area: 0,904; szenzitivitás: 95,0%; specificitás: 83,3%; $p=0,002$) előre jelezte a shunt behelyezés szükségességét (pozitív prediktív érték: 83%, negatív prediktív érték: 95%). A betegeinket dichotomizáltuk: magas rizikójú (preoperatív L-arginine ≤ 35 mmol/L , $n=7$) és alacsony rizikójú (preoperatív L-arginine > 35 mmol/L , $n=42$) csoportokra osztva. Többváltozós regressziós analízis alapján, az életkor, társbetegségek, az ellenoldali carotis szűkület súlyossága, a biomarkerek kiindulási értékei közül egyedül a preoperatív L-arginine ≤ 35 $\mu\text{mol/L}$ jelezte előre a shunt behelyezés szükségességét (OR: 0,061, 95%, CI 0,004 – 0,866; $p=0,039$). Az esély hányados azt mutatja, hogy a cut-off értéknél magasabb műtét előtti L-arginin szint protektív a későbbi shunt behelyezés szempontjából.

A magas és alacsony kockázatú alcsoportok összehasonlítása

A preoperatív L-arginin szint alapján magas kockázatú alcsoportban a juguláris laktát koncentráció (mmol/L) szignifikánsan magasabb volt valamennyi időpontban (**14. ábra**). Hasonló összehasonlításban a magas rizikójú csoportban az S100B koncentráció is szignifikánsan magasabb volt 24 órával a műtét után (median: 53,9; IQR: 43,9-57,0 vs. 12,4; 1,7-34,0; $p=0,02$).



14. ábra. A preoperatív L-arginin szint alapján képzett alcsoportokban (L-arginine ≤ 35 vs > 35 $\mu\text{mol/L}$) megfigyelt perioperatív jugularis laktát kinetikája

clamp= kirekesztés; declamp= felengedés; reperfúzió= felengedés után. Mann-Whitney teszt, az adatokat mint medián és interkvartilis tartomány ábráztuk boks-plot diagram formájában.

Az anaerob metabolizmus indikátorai

Megvizsgáltuk a nem shuntölt betegekben a carotis kirekesztési ideje és az anaerob metabolizmus mutatói, mint az artériás és juguláris laktát és a $P_{(j-a)}\text{CO}_2/C_{(a-j)}\text{O}_2$ hányados közötti kapcsolatot. A kirekesztési idő fordított korrelációt ($-0,296$; $p = 0,035$) mutatott a kirekesztés felengedése előtt mért $P_{(j-a)}\text{CO}_2/C_{(a-j)}\text{O}_2$ hányadossal. Mind a juguláris, mind az artériás laktát koncentráció fordítottan korrelált a $P_{(j-a)}\text{CO}_2/C_{(a-j)}\text{O}_2$ hányadossal a kirekesztés előtt ($0,345$; $p=0,013$ illetve $-0,332$; $p=0,017$). Ez utóbbi inverz korreláció a reperfúzió alatt mért artériás laktát és $P_{(j-a)}\text{CO}_2/C_{(a-j)}\text{O}_2$ hányados között is megmaradt ($-0,422$; $p=0,002$).

5 éves utánkövetés

Retrospektív feldolgozás során 54 betegről szereztünk információt. Összesen 7 páciensnek (13%) lett 5 éven belül restenosis az operált oldalon (átlagéletkor: 61 ± 11.33 év, 6 férfi, 1 nő). Az ellenoldali carotison 13 (24%) betegben alakult ki szignifikáns stenosis. Ezen kívül 14 (25,9%) betegnél jelentkeztek az alsó végtagi artériás betegség tünetei, közülük 5 (9,3%) betegnél történt amputáció. Klinikailag jelentős koronária esemény (anginás panaszok, PCI, CABG, AMI) 18 (33,3%) betegnél lépett fel és 13 (24%) beteg halt meg 5 éven belül. Retrospektíven vizsgálva, szignifikáns különbség volt a műtét után 2 órával mért kortizol koncentráció tekintetében az 5 éven belül akut coronaria szindróma tüneteit mutató és a tünetmentes betegek között. Bináris logisztikus regresszió független prediktorokat kerestünk a követéses végpontok tekintetében. Ez alapján egyedül a posztoperatív plazma kortizol koncentráció (T_4) volt az 5 éven belüli carotis restenosis független prediktora (OR: 1,67; 95% CI: 1,02-2,73; $p=0,04$) (cut-off érték: kortizol $\geq 19,45$ $\mu\text{g/ml}$, szenzitivitás: 67%, specificitás: 76%, area: 0,708; 95% CI: 0,651-0,958; $p=0,01$). Hasonlóképp, a T_4 időpontban mért kortizol koncentráció az 5 éven belül kialakuló akut coronaria szindróma független prediktorának is bizonyult (OR: 1,11; 95% CI: 1,02-1,21; $p=0,01$). A 13 elhunyt beteg (24%) közül 8 szenvedett alsó végtagi artériás betegségben. Szignifikáns összefüggést találtunk az alsó végtagi artériás betegség és az 5 éven belüli mortalitás között ($p=0,01$).

9.5. MEGBESZÉLÉS

A propofol szedáció és a premedikáció hatása a preoperatív stresszre

A plazmában mért kortizol szintek alapján a premedikáció és propofol szedáció kombinációja kedvezőbb stressz csökkentő effektusát észleltük. A perioperatív időszakban rögzített paraméterek közül, a műtét után 2 órával mért magasabb kortizol szint összefüggést mutatott a carotis restenosis későbbi kialakulásával és a panaszokat okozó ischaemiás szívbetegség megjelenésével. Eredményeink alapján felmerül, hogy a műtéti stressz nagysága és az atherogenesisben szerepet játszó faktorok között összefüggés lehet, mely befolyásolhatja a hosszútávú kimenetelt.

Az L-arginin út és az agyi ischaemia kapcsolata CEA során

A műtét előtti plazma L-arginin koncentráció előre jelezte a későbbi shunt behelyezés szükségességét carotis endarterectomia során. Ezzel összhangban a beavatkozás előtti L-arginin koncentráció fordított korrelációt mutatott a kirekesztés előtti és a reperfúzió utáni juguláris laktát szinttel. Ezek alapján az NO-donor L-arginin protektív hatását is feltételezzük, mely lehet a javuló perfúzió, de akár direkt metabolikus eredetű is. Ezt támogatja, hogy a posztoperatív 24. órában mért S100B alacsonyabb volt azokban, akiknél a preoperatív L-arginin szint magasabb volt (neuroprotektív hatás?).

A preoperatív ADMA pozitívan korrelált az anaerob agyi metabolizmus mutatójával ($P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$) jelezve, hogy az emelkedett ADMA szintet cerebrális hipoperfúzió kíséri. Mások adatai szerint az ADMA infúzió növelte az erek merevségét és csökkentette az agyi vérátáramlást egészséges önkéntesekben. A $P_{(j-a)}CO_2/C_{(a-j)}O_2$ arány a reperfúzió után pozitívan korrelált az S100B 2 órával a műtét után mért koncentrációjával. Ez arra utalhat, hogy a reperfúzió utáni magasabb jugulo-arteriális CO_2 differencia és az ischaemia nagysága vagy a vér-agy gát sérülése között összefüggés lehet. Magas rizikójúnak tartotjuk a kirekesztési intolerancia szempontjából azokat, akik kezdeti L-arginin szintje 35 mmol/L-nél kisebb volt. Ezek a betegek az anaerob metabolizmusnak jobban ki vannak téve, amire a juguláris laktát emelkedése és az eseménytelen endarterectomiák ellenére észlelt magasabb S100B szint is utal.

Összefoglalva: éber-szedációs aneszteziológiai protokollunk, perioperatív stresszválasz csökkenését eredményezte: 5 éves utánkövetés az intraoperatív stressz minimalizálásának hosszútávú előnyét jelezte. Tisztáztuk a carotis kirekesztés alatti metabolikus agyi változásokat, és olyan markert azonosítottunk, mely előrejelzi a műtét alatti shunt igényt.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Szabo P, Lantos J, Nagy L, Keki S, Volgyi E, Menyhei G, Illes Z, Molnár T. l-Arginine Pathway Metabolites Predict Need for Intra-operative Shunt During Carotid Endarterectomy. Eur J Vasc Endovasc Surg. **2016**;52(6):721-728.

Szabó P, Mayer M, Horváth-Szalai Z, Tóth K, Márton S, Menyhei G, Sínay L, Molnár T. Awake Sedation With Propofol Attenuates Intraoperative Stress of Carotid Endarterectomy in Regional Anesthesia. Ann Vasc Surg. **2019** Sep 26. pii: S0890-5096(19)30733-2.

Szabó P, Menyhei G, Horváth-Szalai Z, Molnár T. A műtét alatti szedáció hatása a perioperatív stresszre és a hosszútávú kimenetelre regionális anesztéziában végzett carotis endarterectomia során. Érbetegségek, **2019**;26(1):5-

10. CLOPIDOGREL SZEKUNDER PREVENCIÓBAN RÉSZESÜLŐ STROKE BETEGEK VÉRLEMEZKE FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

A vérlemezkék kulcsszerepet játszanak a stroke patogenezisében. A vérlemezke aggregációgátló terápia (TAG), hatékony az aterotrombotikus szövődmények prevenciójában. Ugyanakkor a TAG terápiára adott válasz betegenként eltérő lehet. Számos kockázati tényezőt azonosítottak a kezelés ellenére fennálló, magas reziduális vérlemezke reaktivitás (high-on-treatment residual platelet reactivity, HRPR) háttérében, beleértve a fokozott vérlemezke turnover jelenségét. Ez utóbbi megbecsülhető a reziduális messenger RNS tartalmuk miatt retikulált, fiatal vérlemezkék arányából. Ezek az éretlen vérlemezkék (IPF) nagyobbak, reaktívabbak. Okozati és prognosztikai tényezőt képeznek az aterotrombotikus betegségekben. Napjainkban új diagnosztikus vérlemezke-paraméterek kerültek bevezetésre: (i) plateletcrit (PCT) – a trombocitafrakció százaléka a teljes vérhez viszonyítva; (ii) mean platelet volume (MPV) – az átlagos trombocitaterfogat; (iii) platelet distribution width (PDW) – a trombocitaterfogat eloszlásgörbe szélessége; (iv) larger cell ratio (LCR) – 12 fL-nál nagyobb térfogatú trombociták százaléka. Az MPV és a PCT a módosított Rankin Skála (mRS) alapján mért kedvezőtlen stroke kimenetellel korreláltak.

Bogár és munkatársai a 1990-es évek közepén kezdték vizsgálni a leukociták mozgását a Westergren csőben. Megfigyelték, hogy a teljes vér 1-órás üleptése során a leukociták az aktivációjukkal arányosan felfelé mozognak a csőben. Feltételezték, ha mérik a véroszlop felső felében lévő fehérvérsejtek számát, akkor az akut fázis reakcióra utaló kórélettani változást jellemző értékhez jutnak. Mivel a fehérvérsejtek a vörösvértestek szedimentációjával ellentétes irányban mozogtak, a jelenséget leukocita antiszedimentációs rátának (LAR) nevezték el. Feltételeztük, hogy a vérlemezkék a leukocitákhoz hasonlóan aktivációjukkal arányos flotációt végeznek a teljes vért tartalmazó oszlopban.

10.1.CÉLKITŰZÉS

(i) A LAR mintájára kiszámolt trombocita antiszedimentációs ráta (TAR) meghatározása egészségesekben és clopidogrelt szedő betegekben; (ii) az IPF, MPV, LCR, H-IPF különbözik-e az üleptés után nyert alsó és felső vérmintában a kontroll csoport és clopidogrelt szedő betegek összehasonlításakor; (iii) a szeparáció során ketté választott alsó és felső részben mért vérlemezke aggregáció különbözik-e egymástól, illetve a teljes vérben mért aggregációtól egészségesekben és clopidogrelt szedőkben; (iv) a fenti paraméterek mutatnak-e különbséget a clopidogrel szedő reszponder és non-reszponder alcsoportokban; (v) végül képalkotó

vizsgálatokkal (transzmissziós elektronmikroszkópia, TEM és Atomerő mikroszkópia, AFM) van-e különbség a szeparálódó trombocita szubpopulációk morfológiájában?

10.2. BETEGEK ÉS MÓDSZER

Két tanulmányt végeztünk:

Tanulmány A: *Vérlemezkék funkcionális és morfológiai vizsgálata egészségeseken*

A vérlemezke paraméterek, a TAR és a vérlemezkefunkció vizsgálatát 31 egészséges személynél végeztük el. A TEM és AFM felvételekhez 6-6 egészséges személytől vettünk vért.

Tanulmány B: *Vérlemezkék funkcionális, morfológiai vizsgálata clopidogrelt szedő betegekben*

Iszkémiás stroke miatt legalább 3 hónapja, napi 75 mg clopidogrel prevencióban részesülő beteg és korban hasonló egészséges személy került bevonásra. Akut vaszkuláris esemény, trombocitopénia (<50 G/L), veleszületett trombocitafunkciós és véralvadási zavar, anémia és a méréseinket befolyásoló gyógyszerek szedése (orális antikoaguláns, NSAID, diuretikumok, antiglikémiás szerek) kizárási kritériumot jelentett.

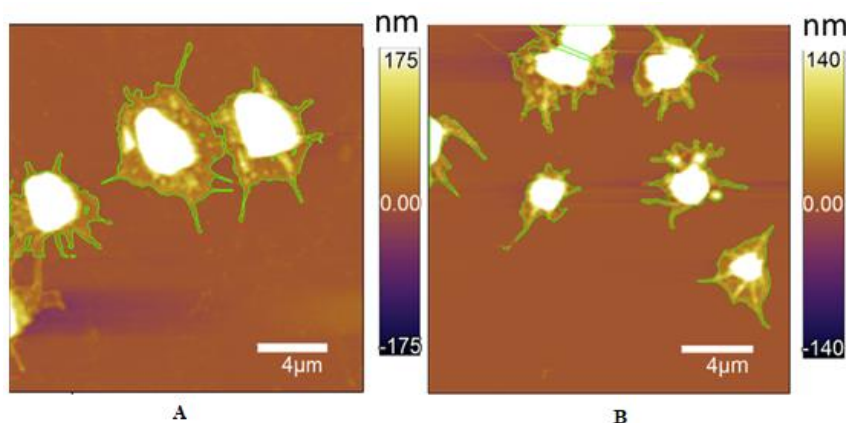
A vérlemezke paramétereket (trombocita (TCT) szám, MPV, IPF, H-IPF, P-LCR) Sysmex-XN 9000 integrált hematológiai automata rendszeren (Sysmex Co, Japán, 2017) végeztük. **TAR meghatározás:** Az egyik csőből vérszámoló automatával (Sysmex XN 9000) meghatároztuk a teljes vérképet. A másik EDTA-s csőben lévő vért 1 óra hosszan ülepítettük, majd a csőben lévő véroszlop magasságának felső ½ részét átpipettáztuk egy másik EDTA-s csőbe. Az alsó és a felső frakcióban is megmértük a trombociták számát, majd a **felső rész TCT–alsó rész TCT/ felső rész TCT+alsó rész TCT** egyenlet szerint kiszámoltuk a TAR értékét és százzal szorozva százalékban adtuk meg.

Vérlemezke funkció: Az egyik hirudinos csőből elvégeztük a teljes vér trombocitaaggregációs vizsgálatot (Multiplate® Analyzer, Roche, Switzerland). A másik cső hirudinos vért ülepítettük 1 óra hosszan, majd a korábban leírt szeparálási technika segítségével alsó és felső frakcióhoz jutottunk. Ezekben is megmértük a trombocitaaggregációt. Az így kapott eredményekből a görbe alatti területet (area under the curve, AUC), az aggregációt (az impedancia növekedése) és a velocity-t (aggregációs görbe maximális meredeksége) használtuk fel adatelemzésünkben. **Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM):** Hat egészséges személytől történt vérvétel. Egy óras ülepítés után a felső részt átpipettáztuk egy másik EDTA-s csőbe, majd az alsó és a felső részt 5 percig 200 g-n centrifugáltuk. Ezt követően mindkét cső felülúszóját egy új natív csőbe

tettük, s ezt 1200 g-n 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítás után trombocitadús plazmát nyertünk. A trombociták előkészítése után félvékony metszeteket toluidine-kékkel festettük és fénymikroszkóppal vizsgáltuk. Az ultravékony rétegeket rácsokra helyeztük és JEOL JEM 1200EX TEM-el elemeztük. A digitális fényképek az iTEM szoftver (Olympus, Japan) segítségével készültek. A következő vizsgálatok készültek:

- 1., TEM kép az alsó - és felső részben lévő trombocitákról
- 2., iTEM program segítségével (interpolált poligon) megmértük a felső- és alsó részben lévő 21-21 vérlemezke (50000x nagyítás) területét, kerületét, konvex területét és konvex kerületét.
- 3., Meghatároztuk az alsó- és felső részben lévő 70-70 közel azonos nagyságú (2 μm) vérlemezékében (50000x nagyítás) látható sötét (alfa) és világos (denz) granulumok számát.

Atomerő mikroszkópia (AFM): Hat egészséges egyén alkar vénájából vettünk vért K-EDTA-t tartalmazó csőbe. Egyórás, szobahőn történő ülepitést követően a vér felső felét azonnal egy másik K-EDTA-t tartalmazó csőbe pipettáztuk és mindkét felet 150 g-n, 8 percig centrifugáltuk. A csillámpala felszínre ülepedett, fixált és szárított trombocitákat Cypher ES atomerő-mikroszkóppal (Asylum Research, Santa Barbara, CA), tapogató módban pásztáztuk AR16 programmal. A pásztázáshoz szilikon-nitrid rugólapkát használtunk, amelynek a rugóállandója ~ 42 N/m és a rezonanciafrekvenciája ~ 300 kHz (OTESPA-R3, Bruker, Billerica, MA). A szabad amplitúdót 1V-ra állítottuk, a pásztázási amplitúdót 0,5-0,7 V-ra, az erősítést 7-10 -szeresre. A pásztázás során alkotott képet az AFM AR16 programjával analizáltuk (Igor Pro 6.34 A, Wavemetrics, Lake Oswego, OR). A pásztázott terület 20x20 μm -es volt, amelyen a programmal megfelelő élesen körbe határoltuk a trombociták területét (**15. ábra**).



15. ábra. A trombociták kijelölése képanalízisere AFM-mel készült magasságképen. Az ábra **A** része a felső, a **B** része az alsó frakcióból származó trombocitákat mutatja

A trombociták analizéséhez használt paraméterek: magasság maximum (Z max), a középpontban (Z Center), átlagmagasság (Z Average); terület (Area), térfogat (Volume), kerület (Perimeter), hossz (Length) és szélesség (Width).

10.3. STATISZTIKAI ELEMZÉS.

Az adatokat SPSS (Version 19.0, SPSS Inc, Chicago, USA) segítségével analizáltuk. A diszkrét változókat Chi-négyzet próbával, a normal eloszlású értékeket két-mintás Student-t próbával, míg nem normál eloszlást mutató változókat Mann-Whitney-tesztel hasonlítottuk össze. Korreláció analizéshez Spearman-korrelációt használtunk (ρ). Az adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány vagy átlag \pm szórás ábrázoltuk. A p-érték $<0,05$ tekintettük szignifikánsnak.

10.4. EREDMÉNYEK- Tanulmány A.

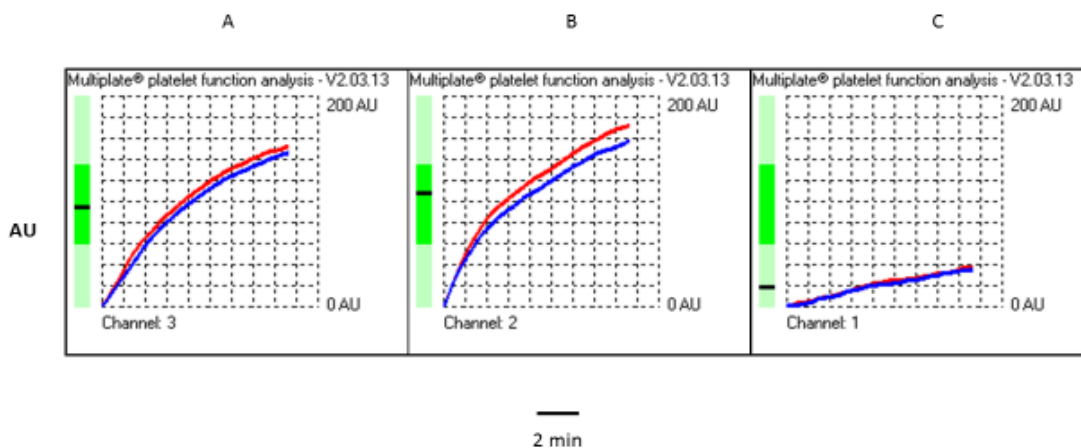
Az egészségesekben (n=31; átlag életkor: 41,1 \pm 12,8; férfi/nő: 22/9) a vérlemezke antiszedimentációs ráta (TAR) átlaga 55,6 \pm 21,7 % volt. A vérlemezke szám, az abszolút értékű IPF, valamint a százalékos arányban kifejezett H-IPF szignifikánsan magasabb volt a felső frakcióban az alsóhoz viszonyítva (**16. táblázat**).

16. táblázat. Egészséges önkéntesekben mért vérlemezke paraméterek

	teljes vér	felső frakció	alsó frakció	p*
TCT (G/l)	253 \pm 66	348 \pm 154	93 \pm 50	0,003
MPV (fl)	10,2 \pm 0,9	10,6 \pm 0,6	10,2 \pm 0,6	0,584
IPF (abs)	4,96 \pm 4,4	7,1 \pm 4,5	2,9 \pm 1,9	$<0,001$
H-IPF (%)	1,7 \pm 1,2	1,2 \pm 0,7	2,1 \pm 1,7	0,009
LCR	27,5 \pm 4,0	26,3 \pm 4,6	26,9 \pm 4,7	0,385

TCT= trombocita szám; MPV= mean platelet volume, IPF= immature platelet fraction, H-IPF= high-fluorescent IPF, LCR= large cell ratio. Az adatokat, mint átlag \pm SD ábrázoltuk. p a felső vs alsó rész között.*

Egy egészséges egyéntől vett vérminta aggregometriai görbéit mutatja a **16. ábra**. Az aggregometriai vizsgálat során szignifikáns különbséget tapasztaltunk a teljes vérben mért (69,9 \pm 13,1) vs. az alsó frakcióban mért (26,1 \pm 9,6) vs. a felső frakcióban mért görbe alatti terület (103,3 \pm 35,8) között a vér egyórás szedimentációját követően (valamennyi, p $<0,001$) (**17. táblázat**). Ugyanezt tapasztaltuk az aggregáció és a görbe meredekségét jelző velocity esetén.



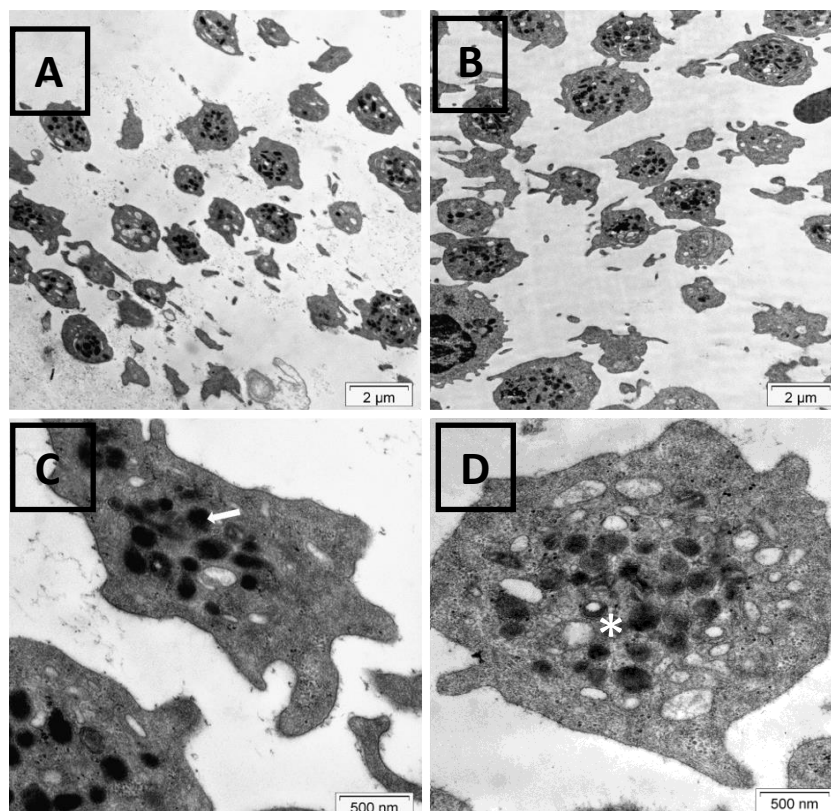
16. ábra. *Ex vivo* ADP indukálta trombocita aggregáció (A, teljes vér; B, felső és C, alsó frakció)

17. táblázat. Egészséges önkéntesekben (n=24) mért vérlemezke-aggregabilitási adatok

Impedancia-aggregometria				
	teljes vér	felső rész	alsó rész	p^*
AUC	56,3±26,6	80,9±50,1	22,2±11,0	0,001
aggregáció	130,9±23,7	174,3±53,0	52,2±16,2	<0,001
velocity	15,5±3,8	26,5±10,9	6,5±1,7	<0,001

AUC, area under the curve; Velocity, görbe meredkség. Átlag±SD. p^* a felső vs alsó rész között.

17. ábra. A kis nagyítású képek az alsó (A) és felső (B) frakcióban lévő vérlemezkek számát és méretét mutatja. A C és D képeken nagy nagyításban látható vérlemezke. A nyíl a C jelzésű felvételen egy α -granulátumra mutat, míg a D-ben lévő csillag egy denz granulátumot jelöl. Skálaértékek A és B: 2 μ m, C és D: 500 nm.



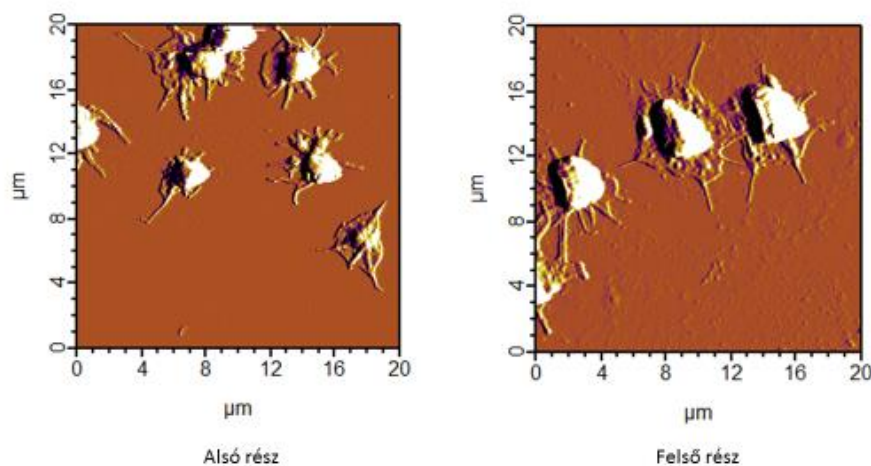
A felső frakcióban mért AUC értékek az egészségesek 38%-ában (n=8) túllépték a normál tartomány (AUC: 53-122) felső határát, tehát a felfelé vándorló trombociták *ex vivo* hiperaggegálnak ADP jelenlétében. Az AUC értékek az alsó frakcióban az effektív antithrombotikus kezelés során várt tartományban voltak (AUC: 0-53), mintha a szedimentálódott trombociták *ex vivo* nem aktiválódnának ADP hozzáadására (17. táblázat). *Elektronmikroszkópos eredmények:* Kis nagyítás során különbséget tapasztaltunk a felső és alsó vérfrakció vérlemezkéinek morfológiai megjelenésében. A trombociták területe és kerülete szignifikánsan nagyobb volt a felső frakcióban ($p < 0,001$) (18. táblázat). A felső frakcióban elhelyezkedő trombocitákban 1,6-szor több alfa granulumot találtunk az alsókhoz képest (17. ábra), míg a denz granulumok számában nem találtunk különbséget.

18. táblázat. Transzmissziós elektronmikroszkóppal nyert adatok egészségesekben

	alsó frakció	felső frakció	<i>p</i>
vérlemezke-terület (nm ²)	$2,26 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^5$	$3,69 \times 10^6 \pm 9,3 \times 10^5$	<0,001
vérlemezke-kerület (nm)	$7,21 \times 10^3 \pm 1,55 \times 10^3$	$9,17 \times 10^3 \pm 1,42 \times 10^3$	<0,001

Az adatokat, mint átlag \pm SD ábrázoltuk.

Atomerő-mikroszkópos eredmények: A magasság, az amplitúdó, a fázis és a Z szenzor képek egyaránt azt mutatták, hogy mindkét fázis trombocitái rögzülés közben gömb alakot vehettek fel, kiterültek a felszínen, majd különböző mértékben összehúzódtak (18. ábra).



18. ábra. Trombociták AFM-képe az ülepítés után szeparált alsó és felső vérfrakcióból

A képen jól látszik, hogy az alsó fázis trombocitái kiterjedésükben kisebbek. A felső frakció trombocitáinak térfogata nagyobb, mint az alsóé (átlag \pm SE: $1,6 \pm 0,45$ vs. $1,0 \pm 0,60$; $p < 0,001$), míg a középmagasságuk nem különbözött szignifikánsan (átlag \pm SE: 456 ± 20 vs. 484 ± 20).

10.5. EREDMÉNYEK-Tanulmány B.

Összesen 46, stroke szekunder prevenció miatt clopidogrel kezelésben részesülő beteg és 15 egészséges egyén adatait hasonlítottuk össze. A csoportok demográfiai és laborértékeit a **19. táblázat**ban foglaltuk össze. A kontroll csoport szignifikánsan fiatalabb volt ($p < 0,001$). Az eritrocita-szedimentációs ráta (ESR) szignifikánsan magasabb volt a betegpopulációban ($p < 0,001$), viszont a CRP tekintetében nem volt különbség a két csoport között. A TAR nem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport között, azonban a betegekben magasabb TAR-tendencia volt megfigyelhető (**20. táblázat**). Az MPV értékben nem találtunk szignifikáns különbséget sem betegek vs egészségesek (**19. táblázat**), sem pedig a csoportokon belül (teljes vér vs. felső frakció, teljes vér vs. alsó frakció, felső vs. alsó frakció) (**20. táblázat**). Az aggregometriai vizsgálat során szignifikáns különbséget tapasztaltunk a betegek alsó és a felső frakcióiban mért AUC értékei között a vér egyórás ülepedését követően (mindegyik $p = 0,001$) (**21. táblázat**).

19. táblázat. A kontroll csoport és a clopidogrel kezelt egyének demográfiai és laboratóriumi adatai

	Kontroll (n=15)	Clopidogrel kezelt (n=46)	<i>p</i>
Életkor	40±13	66±8	<0,001
Nem (férfi/nő)	6/14	31/15	0,06
Dohányzás (%)	2 (18)	9 (19)	0,586
CRP (mg/l)	1,70 (0,8-3,1)	1,75 (0,7-3,5)	0,237
ESR (mm/óra)	2 (1-4)	10 (6-18)	<0,001
Hematocrit (%)	42,8±0,9	43,6±0,7	0,416
Leukocita (G/l)	6,3±1.2	8,3±1.7	0,251
Vérlemezke (G/l)	282±75	239 ± 65	0,098
MPV (fl)	10,2±1,6	10,7±0,9	0,528

BMI= body mass index, CRP= C-reaktív protein, ESR= eritrocita szedimentációs ráta, MPV= mean platelet volume. Az adatokat, mint átlag±SD illetve abszolút érték (%), kivéve CRP és ESR, melyeket medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk.

20. táblázat. Vérlemezke paraméterek és a TAR egészségesekben és clopidogrel szedőkben

	Kontroll (n=15)	Clopidogrel kezelt (n=46)	<i>p</i>
Felső tct szám (G/L)	316 (218-478)	345 (301-428)	0,68
Alsó tct szám (G/l)	88 (51-124)	71 (54-86)	0,43
TAR (%)	58,5 (45,0-67,5)	67,7 (61,7-72,9)	0,15
MPV felső (fl)	10,7 (10,0-10,8)	10,8 (10,2-11,6)	0,30
MPV alsó (fl)	10,0 (9,8-10,6)	10,5 (9,8-11,2)	0,47
LCR felső (%)	28,9 (24,5-30,6)	33,0 (26,8-38,9)	0,14
LCR alsó (%)	25,5 (22,7-28,7)	30,5 (24,2-36,2)	0,14

Az adatokat, mint medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk. tct=trombocita, TAR=trombocita antiszedimentációs ráta, MPV= mean platelet volume, LCR= large cell ratio.

A clopidogrelt szedő betegek 59%-ában (n=27) a felső frakcióban az AUC értékek meghaladták a terápiás tartomány felső határát (AUC: 0-53). Kérdés volt, hogy a clopidogrel kezelésre nem reagáló betegek (teljes vér Multiplate mérése alapján non-responderek, n=12) és a felső frakcióban mért 53 feletti AUC értékkel rendelkező betegek átfedést mutatnak-e? A 12 non-responderből 11-nek a felső frakcióban is 53 feletti AUC-értéket mértünk, így a két csoport közötti közötti incidencia szignifikáns volt (p=0,001).

Hasonlóan, a teljes vérből mért AUC-értékek a kontroll csoportban szignifikáns eltérést mutattak mind a felső, mind pedig az alsó vérfrakcióból meghatározott AUC-értékekhez képest **(21. táblázat)**.

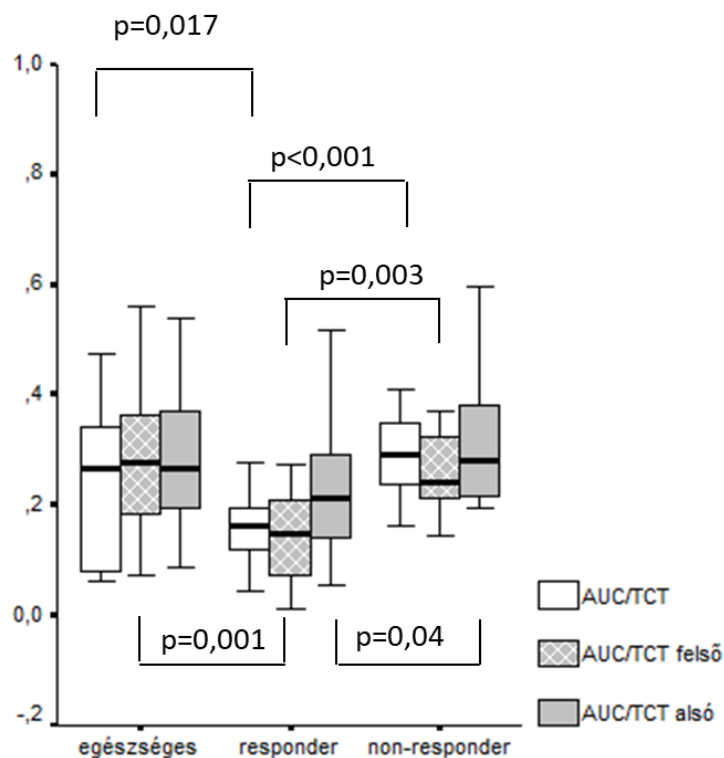
A felső frakcióban mért AUC-értékek az egészséges populáció 40%-ában (n=6) magasabb volt a normál tartomány felső értékénél (AUC: 53-122) **(21. táblázat)**, ennek hátterében a felső frakció magasabb trombocita száma is szerepet játszhatott **(20. táblázat)**. Az alsó frakcióban mért AUC-értékek szignifikáns különbséget nem mutattak az egészséges és a betegcsoport között **(21. táblázat)**. Ezek az értékek a hatásos antitrombotikus terápiás tartományban voltak (AUC: 0-53), még a clopidogrelt nem szedő egészségesekben is. Mind a teljes vérben, mind a felső frakcióban mért aggregáció (aggregation unit, AU) és velocity érték szignifikánsan alacsonyabb (p<0,001) volt a clopidogrelt szedő betegekben, mint az egészségesekben **(21. táblázat)**. A clopidogrelt szedőkben, mind a felső frakcióban mért MPV (r=0,311, p=0,04), mind pedig a felső frakcióból meghatározott LCR (%) érték (r=0,373, p=0,04) pozitívan korrelált a felső frakcióban mért AUC-értékekkel.

21. táblázat. Impedancia aggregometriai adatok egészségesekben és clopidogrelt szedőkben

	Kontroll (n=15)	Clopidogrelt kezelt (n=46)	<i>p</i>
AUC	73,5 (59,5-78,5)	41,5 (29-54)	<0,001
AUC felső	112,5 (73-137)	57,5 (33-79)	0,003
AUC alsó	23 (16-35)	18 (14-23)	0,26
Aggregáció, AU	135 (105-146)	76,3 (59,3-107,3)	<0,001
Aggregáció felső	164 (131-203)	100,1 (48,8-138)	<0,001
Aggregáció alsó	39,8 (34,1-60,4)	37,4 (30,8-45,8)	0,200
Velocity	15,1 (12,2-16,6)	9,4 (7,4-11,4)	<0,001
Velocity felső	27,5 (17,5-33,6)	12,3 (6,5-21,1)	<0,001
Velocity alsó	5,3 (5,0-7,0)	5,1 (4,3-6,5)	0,254

Az adatokat, mint medián és 25-75 percentilis ábrázoltuk. AUC= area under the curve; AU= aggregation unit; velocity= a görbe meredeksége, AUC/TCT= az egy trombocitára jutó AUC.

A clopidogrelt szedő betegeket a Multiplate[®] analizátor segítségével responder (AUC<53, n=34) és non-responder (53≤AUC, n=12) alcsoportokra osztottuk. Mivel a felső és alsó frakcióban különbség van a TCT szám tekintetében, ezért összehasonlítottuk az egy trombocitára jutó AUC értéket a teljes vérben, valamint a felső és alsó frakcióban az egészséges vs responder vs non-responder betegekből (19. ábra). A non-responderok inkább a normál kontrollhoz hasonlítottak, de a responder vs non-responder különbség így is megmaradt. Majd megmértük a H-IPF (%) értékét hasonló összehasonlításban. A felső frakció H-IPF aránya a non-responder alcsoportban volt a legmagasabb, de ez csak a kontroll csoporthoz viszonyítva volt szignifikáns (p=0,04). A felső vs alsó frakció összehasonlításakor, a H-IPF (%) minden egyes alcsoportban magasabbnak bizonyult a felső frakcióban (H-IPF egészséges: 0,9; 0,8-1,35 vs 0,8, 0,8-1,0; p=0,04; H-IPF responder: 1,2; 0,8-1,4 vs 0,7; 0,6-1,2; p<0,001; H-IPF non-responder: 1,7; 1,15-2,0 – 0,9; 0,7-1,55; p=0,02). A TAR nem különbözött szignifikánsan a non-responder vs responder összehasonlításakor. A teljes betegcsoportban és a responder alcsoportban, a TAR pozitív korrelációt mutatott a teljes vérből meghatározott MPV-értékekkel (r=0,300, p=0,04; 0,364, p=0,04). Több változó bevonásával bináris logisztikus regressziót végeztünk a clopidogrel kezelés ellenére fennálló reziduális vérlemezke aggregáció (HRPR, „non-responder” státusz) független prediktorának feltárása céljából.



19. ábra. Az egy trombocitára jutó AUC érték a teljes vérben (AUC/TCT) vs felső frakcióban (AUC/TCT felső) vs alsó frakcióban (AUC/TCT alsó) egészségesekben és a clopidogrel kezelésre responder és non-responder alcsoportokban

Mann-Whitney teszt, az adatokat, mint medián és interkvartilis tartomány ábráztuk box-plot diagram formájában.

Csak a felső rész AUC bizonyult független rizikófaktornak (OR: 1,07; 95%CI: 1,013-1,128; $p=0,015$), mely 62 feletti cut-off érték esetén, 84%-os szenzitivitással és 71%-os specificitással pontosította a Multiplate által definiált „non-responder” status fennállását (Area: 0,863; 95% CI: 0,728-0,998; $p<0,001$). Amennyiben a felső frakcióban mért IPF, H-IPF és LCR értéket is beletettük a modellbe, a szenzitivitás (88%) és specificitás (100%) tovább javult (Area: 0,893; 95% CI: 0,695-1,091; $p=0,001$). Ezt követően, a betegeket 30 hónapon keresztül követtük. Ezalatt összesen 11 érrendszeri esemény (stroke/TIA $n=5$, ACS $n=6$) került regisztrálásra. Retrospektíven vizsgálva, a recidív stroke/TIA-t elszenvedő betegek felső vérfrakciójában mért AUC szignifikánsan magasabb volt a követés kezdetén, összehasonlítva az eseménytelen betegekkel ($p=0,03$). A recidív eseményre, mint végpontra vonatkozóan azt találtuk, hogy a felső frakcióban mért $AUC \geq 62$ képes megjósolni a jövőbeli stroke/TIA eseményt ($p=0,01$). Ezzel szemben a Multiplate alapján elfogadott határérték ($53 < AUC$) szerint definiált HRPR státusz egyik érrendszeri esemény (stroke/TIA, ACS) előfordulását sem jósolta meg. Ez alapján a vér egy órás ülepítése után, a felső frakcióban mért $AUC \geq 62$ cut-off érték a non-responder (HRPR) betegek szűrésére pontosabb, mint a Multiplate®.

10.6. MEGBESZÉLÉS

A LAR analógiájára írtuk le a trombociták mozgását egy órás szedimentáció során. Morfológia alapján a felső frakcióban elhelyezkedő vérlemezkék területe, kerülete nagyobb volt és több α -granulumot tartalmaztak. Másokhoz hasonlóan a nagyobb és több granulumot tartalmazó vérlemezkék fokozott aggregabilitását feltételezzük. Az aszcendáló trombociták összefüggést mutattak a vérlemezkék korával (IPF, H-IPF %), és a trombociták térfogatával, méretével és granularitásával. A TAR klinikai jelentőségét adhatja, hogy míg a Multiplate kevés helyen hozzáférhető, addig a TAR egy városi kórház laboratóriumában is mérhető. A TAR az érett/éretlen vérlemezke szubpopulációk arányának indirekt indikátora lehet. A trombociták AFM képe azok részleges aktivációját mutatta filopódiák és lamellopódiák megjelenésével. Egy órás szedimentáció után térfogatukban különböznek a vér alsó és felső frakcióiból izolált trombociták. A clopidogrel szedőkben megfigyelt pozitív korreláció a felső frakció AUC, valamint az MPV és az LCR között, a felfelé mozgó és nagyobb méretű vérlemezkék trombotikus aktivitására utal, míg a pozitív korreláció a szérum CRP szint és a vérlemezkeszám között a felső frakcióban, a felfelé mozgó vérlemezkék gyulladásos folyamatokban játszott szerepét jelzi. A non-responder betegek felső frakciójában megfigyelt pozitív korreláció a CRP és a H-IPF között a trombociták szisztémás gyulladásos válaszban betöltött szerepére utalhat.

Összefoglalva: a krónikus gyulladásos állapot összefüggésben lehet a megnövekedett vérlemezke turnover-rel, melyre az éretlen vérlemezke frakció méretének növekedése utal. Ezek a hiperreaktív vérlemezkék tehetők felelőssé az *ex vivo* fokozott aggregáció kialakulásáért. A TAR, így a felfelé szálló vérlemezkék aránya, a legnagyobb a clopidogrelt szedő non-responder betegekben volt. A clopidogrelt szedő betegek felső frakciójában észlelt $AUC > 62$, mint vágópont segíthet a reziduális magas trombocitareaktivitással (HRPR) bíró egyének szűrésében, mely a felső frakcióban mért éretlen alakok számának mérésével tovább pontosítható. Amennyiben nagyobb esetszámon is igazolni sikerül, hogy a szeparált felső frakcióban mért $AUC > 62$ betegek követése során gyakoribb thrombotikus szövődmény észlelhető, az elvezethet a személyre szabott terápia (hatóanyag, dózis) kialakításához.

A FEJEZET ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Ezer E, Schrick D, Tőkés-Füzesi M, Szapary L, Bogar L, Molnar T. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel. Clin Hemorheol and Microcirc, 2019; DOI: 10.3233/CH-190580

Schrick D, Tőkés-Füzesi M, Hársfalvi J, Kellermayer M, Ábrahám H, Molnár T, Ezer E. Funkcionális és morfológiai különbséget mutató trombociták clopidogrelt szedő betegekben és egészséges önkéntesekben. Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2020; elfogadva

12. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Az intravénás dipyridamol az *ab ovo* fokozott regionális CBV-t csökkenti, paralell L-arginin emelkedés kíséretében.
2. (i) az L-arginin útvonal metabolitjai az akut ischaemiás stroke korai fázisában emelkedettek, mely kifejezettebb, mint carotis stenosisban, ami az atherosclerosisnál súlyosabb endotél diszfunkciót tükröz; (ii) a post-stroke 24 óránál mért magasabb L-arginin/ADMA hányados alapján az L-arginin emelkedés adaptív válasz lehet; (iii) az L-arginin és az ADMA ellentétes mozgása az L-arginin protektív szerepét sugallja.
3. (i) a lectin-útvonal ficolin-3-dependens aktivációja is részt vesz a stroke-ot kísérő patológiás folyamatokban; (ii) a követéses mintákban mért alacsony ficolin-3 és magas CRP szintek egymástól független gyulladásozó útvonalak szerepét sugallják.
4. A stroke korai fázisában megfigyelt korreláció a szövet pusztulás, a neuroinflammáció illetve komplement felhasználódás között, a post-stroke infekció kockázatát jelzi. Az L-arginin és a lectin útvonal közötti összefüggés, az előbbi immunmoduláns szerepére utalhat.
5. A hsCRP mellett a P-selectin és az IL-6 mint thrombo-inflammatorikus markerek korai változása a keringésben domináns szerepet játszik a kedvezőtlen stroke kimenetel előrejelzésében.
6. Az L-arginin, az ADMA és az SDMA eltérő módon korrelálnak a thrombo-inflammatorikus molekulákkal az ischaemiás stroke hiperakut fázisában. A stroke kimenetel előrejelzésében a két rendszer szereplői additív értékkel bírnak.
7. A stroke hiperakut fázisában mért tPA és MCP-1 korrelál a 24 órás troponin szinttel, mely független prediktora a neurológiai tünetek progressziójának miokardiális lézió hiányában is.
8. A szérum CCK-18 szint összefüggést mutat a kedvezőtlen kimenetellel. Stroke Regiszter adatok alapján a részleges rekanalizáció, az ASPECT \leq 6 és a hiányos kollaterális keringés növeli a tünetes vérzés esélyét, de az egyetlen független prediktor a 24 órás NIHSS \geq 15,5.
9. (i) Propofollal végzett éber szedáció csökkenti a CEA indukálta perioperatív stresszválaszt. (ii) A magas preoperatív ADMA-koncentráció és az anaerob agyi metabolizmus közötti pozitív korreláció, az ADMA és a csökkent cerebrális perfúzió kapcsolatára utal. (iii) Az alacsony preoperatív L-arginin szint képes előre jelezni a carotis kirektsztési intoleranciát. (iv) CEA-t kísérő stresszválasz nagysága és a hosszútávú szövődmények (5 éven belüli restenosis kialakulása, coronaria események száma) között összefüggést figyeltünk meg.

10. (i) Teljes vér egy órás szedimentációjával kettéválasztott vérfrakciók vérlemezkei számos tulajdonságukban különböznek. (ii) A flotáló és szedimentálódó vérlemezkek morfológiai (TEM és AFM) különbségeket mutatnak. (iii) A felső frakcióban lévő trombociták területe, kerülete és térfogata is nagyobb, valamint több α -granulumot tartalmaznak. (iv) A TAR kifejezi az aktivált vérlemezkek arányát, mely összefügg az életkorral és bizonyos patológiás változásokkal. (vi) A felső frakció Multiplate vizsgálata pontosíthatja a HRPR felismerését.

13. AZ EREDMÉNYEK KLINIKAI HASZNA

1. Az intravénás DP stressz segíthet a koszorúsér betegek stroke kockázatának becslésében, mely különösen hasznos lehet a szívsebészeti műtétek előtt.
2. Az L-arginin útvonal metabolitjai (ADMA, SDMA) korrelálnak az érfali bántalom súlyosságával. Az L-arginin prediktora a post-stroke infekció kialakulásának, ezért segíthet a fogékony betegek antibiotikus kezelésének tervezésében.
3. A komplement rendszer aktiválódása a ficolin mediálta lectin útvonalon keresztül részt vesz az ischaemiás stroke patogenezisében ezért potenciális terápiás targetnek tekinthető.
4. Az L-arginin és a lectin útvonal molekulái közötti összefüggés, az L-arginin immunmoduláns szerepét jelezheti, ezért az L-arginin pótlása, mint potenciális terápiás eszköz merül fel.
5. A P-selectin és az IL-6 kinetikájának követése prognosztikus értékű ischaemiás stroke-ban.
6. Mivel nincs meg az „agy troponinja”, ezért központi idegrendszeri sejsérülés esetén multiplex marker kombinációkra kell támaszkodnunk, ennek az L-arginin is része lehet.
7. A troponin-T alkalmas lehet a korai neurológiai romlás előrejelzésére manifeszt koronária esemény nélkül is.
8. A CCK-18 az ischaemiás stroke kimenetelének prediktora. Romló NIHSS_{24 órás} esetén a beteg fokozott monitorozása szükséges a vérzéses szövődmény kivédésre.
9. A preoperatív ADMA a csökkent cerebrális perfúzió, míg az L-arginin a kirekesztési intolerancia markere carotis endarterektómiában (CEA), ezért preoperatív mérésük segíthet a műtét tervezésében. A betegre adaptált propofollal végzett éber szedáció csökkenti a CEA indukálta stresszválaszt.
10. A TAR fizikai alapja egy ‘size-exclusion’ kromatográfiás jelenség, ahol a vörösvértetek képezik az „oszlopot”, mely szedimentálódik, így a kiszorított részecskék a méretükkel arányos módon csak felfelé mozdulhatnak (antiszedimentáció). A TAR klinikai jelentősége, hogy feltárta, milyen nagy gradiens van a trombociták méretében és granularitásában, mely rávilágít további funkcionális összefüggésekre.

14 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik elindítottak a kutatói pályán. Abban a szerencsés helyzetben voltam, hogy még orvostanhallgatóként Nagy Ferenc bevezetett a klinikai neurofiziológia rejtelseibe. Ezért lettem neurológus szakorvos a Czopf József professzor vezette klinikán. Majd Dóczi Tamás professzor Pécsre érkezésével tanúja lehettem az idegsebészeti intenzív ellátás látványos fejlődésének. Ekkor érett meg bennem az elhatározás, hogy aneszteziológus leszek, és az a megtiszteltetés ért, hogy egy komoly nemzetközi kapcsolatokkal rendelkező intézetbe kerülhettem, ahol Tekeres Miklós professzor egyengette utamat, és adott az egész életre szóló iránymutatást. Ugyanezt a jóindulatot kaptam meg Bogár Lajos professzor részéről is, aki messzemenően támogatott multidiszciplináris érdeklődésem kibontakozásában. Nagyon szerencsésnek érzem magamat, hogy Illés Zsolt professzor témavezetése alatt klinikai területen írhattam PhD Tézisemet. Illés professzor segítségével kapcsolódhattam be nemzetközi kollaborációkba, tanulhattam meg a tudományos publikáció alapjait, de amire a legbüszkébb vagyok, hogy Zsolt az egyik legjobb barátom lett. Önzetlen segítségük formálta jellememet és egyben példát adott, hogy a fiatal kollégák talentumainak kibontakoztatásában én is aktív szerepet vállaljak.

Végül, de nem utolsó sorban, kimondhatatlan hálával tartozom orvos feleségemnek és gyermekeimnek Máténak, Abigélnek és Lídiának.

15. KÖZLEMÉNYEK

15.1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Molnar T, Szabo Z, Schmidt E, Barta E, Zambo K, Illes Z. “Cerebrovascular stressing”: drug-induced S100B elevation and transient neurological signs predict ischemic cerebrovascular events.
Clin Chem Lab Med. **2013**;51:e69-72.
Q1, IF:2,955
2. Molnar T, Horvath A, Szabo Z, Vamos Z, Dóczi T, Illes Z. Detection of silent cerebral microcirculatory abnormalities in patients with manifest ischemic coronary disease: a perfusion brain MRI study combined with dipyridamole stress.
Scand Cardiovasc J. **2020**; DOI:10.1080/14017431.2020.1821911
Q2, IF: 1,084

3. Molnar T, Pusch G, Papp V, Feher G, Szapary L, Biri B, Nagy L, Keki S, Illes Z. The L-arginine pathway in acute ischemic stroke and severe carotid stenosis: temporal profiles and association with biomarkers and outcome.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2014**;23:2206-14.
Q2, IF:1,669
4. Füst G, Munthe-Fog L, Illes Z, Széplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Széplaki Z, Prohászka Z, Skjoedt MO, Garred P. Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke.
J Neuroinflammation. **2011**;29;8:185.
Q1, IF: 3,827
5. Molnar T, Csuka D, Pusch G, Nagy L, Garred P, Illes Z. Associations between serum L-arginine and ficolins in the early phase of acute ischemic stroke – a pilot study.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2020**;DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104951
Q2, IF:1,787
6. Pusch G, Debrabant B, Molnar T, Feher G, Papp V, Banati M, Kovacs N, Szapary L, Illes Z. Early Dynamics of P-selectin and Interleukin 6 Predicts Outcomes in Ischemic Stroke.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2015**;24:1938-47.
Q2, IF: 1,598
7. Molnar T, Pusch G, Nagy L, Keki S, Berki T, Illes Z. Correlation of the L-Arginine Pathway with Thrombo-Inflammation May Contribute to the Outcome of Acute Ischemic Stroke.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2016** Jun 1. pii: S1052-3057(16)30089-1.
Q2, IF:1,517
8. Bustamante A, Vilar-Bergua A, Guettier S, Sánchez-Poblet J, García-Berrocso T, Giralt D, Fluri F, Topakian R, Worthmann H, Hug A, Molnar T, Waje-Andreassen U, Katan M, Smith CJ, Montaner J. C-reactive protein in the detection of post-stroke infections: systematic review and individual participant data analysis.
J Neurochem. **2017**;141:305-314.
Q1, IF: 4,083
9. Csecsei P, Pusch G, Ezer E, Berki T, Szapary L, Illes Z, Molnar T. Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2018**;27:951-956.
Q2, IF: 1,646
10. Csecsei P, Nagy L, Keki S, Szapary L, Illes Z, Farkas N, Molnar T. L-Arginine Pathway Metabolites Predict 6 Months Outcome after Acute Ischemic Stroke.
Int J Neurorehabilitation **2018**,5:315. DOI: 10.4172/2376-0281.1000315
11. Csecsei P, Várnai R, Nagy L, Kéki S, Molnár T, Illés Z, Farkas N, Szapáry L. L-arginine pathway metabolites can discriminate paroxysmal from permanent atrial fibrillation in acute ischemic stroke.
Ideggyógyászati szemle **2019**;72(3-4):79-88.
Q4, IF:0,252
12. Molnar T, Borocz K, Berki T, Szapary L, Szolics A, Janszky J, Illes Z, Csecsei P. Subacute Elevation of Plasma Level of Caspase-Cleaved Cytokeratin-18 is Associated with Hemorrhagic Transformation and Functional Outcome in Ischemic Stroke.
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2019**;28:719-727.
Q2, IF:1,787

13. Csecsei P, Tarkanyi G, Bosnyak E, Szapary L, Lenzser G, Szolics A, Buki A, Hegyi P, Abada A, Molnar T. Risk analysis of post-procedural intracranial hemorrhage based on STAY ALIVE Acute Stroke Registry
J Stroke Cerebrovasc Dis. **2020**; DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104851
Q2, IF:1,787
14. Szabo P, Lantos J, Nagy L, Keki S, Volgyi E, Menyhei G, Illes Z, Molnar T. l-Arginine Pathway Metabolites Predict Need for Intra-operative Shunt During Carotid Endarterectomy.
Eur J Vasc Endovasc Surg. **2016**;52:721-728.
Q1, IF:4,061
15. Szabó P, Mayer M, Horváth-Szalai Z, Tóth K, Márton S, Menyhei G, Sinay L, Molnár T. Awake Sedation With Propofol Attenuates Intraoperative Stress of Carotid Endarterectomy in Regional Anesthesia.
Ann Vasc Surg. **2020**;63:311-318.
Q2, IF:1,125
16. Szabó P, Menyhei G, Horváth-Szalai Z, Molnár T. A műtét alatti szedáció hatás a perioperatív stresszre és a hosszútávú kimenetelre regionális anesztéziában végzett carotis endarterectomia során.
Érbetegségek, **2019**;26:5-9.
17. Ezer E, Schrick D, Tökés-Füzesi M, Szapary L, Bogar L, Molnar T. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel.
Clin Hemorheol and Microcirc, **2019**; DOI: 10.3233/CH-190580
Q2, IF: 1,741
18. Schrick D, Tökés-Füzesi M, Hársfalvi J, Kellermayer M, Ábrahám H, Molnár T, Ezer E. Funkcionális és morfológiai különbséget mutató trombociták clopidogrelt szedő betegekben és egészséges önkéntesekben.
Aneszteziológia és Intenzív Terápia **2020**; közlésre elfogadva

15.2. AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Molnar T, Zambo K, Schmidt E, Tekeres M. Dipyridamole teszt az agyi keringészavarok korai felismerésében?
Orv Hetil, **2000**, 141:2717-2722
2. Molnar T, Peterfalvi A, Szereday L, Pusch G, Szapary L, Komoly S, Bogar L, Illes Z. Deficient leukocyte antisedimentation is related to post-stroke infections and outcome. J Clin Pathol, **2008**, 61:1209-1213
Q1, Impakt factor: 2,342
3. Molnár T. S100 fehérje meghatározás és szerepe az intenzív osztályon.
Focus Medicinæ, **2008**, 2:25-31
4. Molnar T, Jakab L, Palinkas L, Molnar FT, Bogar L, Illes Z. Increased levels of baseline biomarkers reflecting platelet and endothelial activation predict early cognitive dysfunction after lung surgery
Eur J Anaesthesiol, **2009**, 26:708-10
Q1, IF:1,435

5. Peterfalvi A, Molnar T, Pusch G, Szereday L, Illes Z. Impaired function of innate T lymphocytes and NK cells in the acute phase of ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*, **2009**, 28(5):490-8
Q1, IF:3,535
6. Molnar T, Papp V, Banati M, Szereday L, Pusch G, Szapary L, Bogar L, Illes Z. Relationship between C-reactive protein and early activation of leukocytes indicated by leukocyte antisedimentation rate (LAR) in patients with acute cerebrovascular events
Clin Hemorheol and Microcirc, **2010**, 44(3):183-92
Q2, IF:2,838
7. Papp V, Molnár T, Illés Z. Az immunválasz és a neuroimmun moduláció szerepe az akut ischaemiás stroke és a post-stroke infekció patogenezisében.
Ideggyogy Sz. **2010**, 30;63(7-8):232-46.
Q4, IF:0,236
8. Erdélyi-Bótor S, Komáromy H, Kamson DO, Kovács N, Perlaki G, Orsi G, Molnár T, Illes Z, Nagy L, Kéki S, Deli G, Bosnyák E, Trauninger A, Pfund Z. Serum L-arginine and dimethylarginine levels in migraine patients with brain white matter lesions.
Cephalalgia. **2016** May 19. pii: 0333102416651454.
Q1, IF:3,886
9. Tarkanyi G, Csecsei P, Szegedi I, Feher E, Annus A, Molnar T, Szapary L. Detailed severity assessment of Cincinnati Prehospital Stroke Scale to detect large vessel occlusion in acute ischemic stroke.
BMC Emerg Med. **2020**;20(1):64. doi: 10.1186/s12873-020-00360-9.
Q1, IF:1,480
10. Nagy B, Engblom E, Matas M, Maróti P, Kőszegi T, Menyhei G, János Lantos J, Szabó P, Molnár T. Increased serum level of high sensitivity troponin T even prior to surgery can predict adverse events during carotid endarterectomy.
Vascular, 2020 (accepted)
Q2, IF: 1,315

15.3. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. The In TIME-II Investigators: Intravenous NPA for the treatment of infarcting myocardium early. InTIME-II, a double-blind comparison of single-bolus lanoteplase vs accelerated alteplase for the treatment of patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, **2000**, 21:2005-2013
Q1, IF:3,840, sokszerzős
2. Molnár T, Kőszegi T, Szakmány T, Bogár L. A szérumban S100 β és procalcitonin szintjének prognosztikai jelentősége újraélesztett betegeknél. [Prognostic role of serum S100 β and procalcitonin in patients after cardio-pulmonary resuscitation]
Újraélesztés, **2004**, 1:51-56
3. Molnar T, Bogar L, Koszegi T, Szakmany T. NT- proBNP: a szeptikus komplikáció korai markere újraélesztett betegeknél.
Aneszteziológia és Intenzív Terápia, **2009**, 39(3):164-70.

4. Banati M, Csecsei P, Koszegi E, Nielsen HH, Suto G, Bors L, Trauninger A, Csepány T, Rozsa C, Jakab G, Molnar T, Berthele A, Kalluri SR, Berki T, Illes Z. Antibody response against gastrointestinal antigens in demyelinating diseases of the central nervous system. *Eur J Neurol.* **2013**; 20:1492-5.
Q1, IF:3,852
5. Suto B, Szitter I, Bagoly T, Pinter E, Szolcsányi J, Loibl C, Nemeth T, Tanczos K, Molnar T, Leiner T, Varnai B, Bardonicsek Z, Helyes Z. Plasma somatostatin-like immunoreactivity increases in the plasma of septic patients and rats with systemic inflammatory reaction: experimental evidence for its sensory origin and protective role. *Peptides.* **2014**;54:49-57.
Q2, IF:2,618
6. Ruzsics I, Nagy L, Keki S, Sarosi V, Illes B, Illes Z, Horvath I, Bogar L, Molnar T. L-arginine pathway in COPD patients with acute exacerbation: a new potential biomarker. *COPD.* **2016**;13(2):139-45
Q1, IF:2,576
7. Kovacs KT, Kalluri SR, Boza-Serrano A, Deierborg T, Csepány T, Simo M, Rokusz L, Miseta A, Alcaraz N, Czirjak L, Berki T, Molnar T, Hemmer B, Illes Z. Change in autoantibody and cytokine responses during the evolution of neuromyelitis optica in patients with systemic lupus erythematosus: A preliminary study. *Mult Scler.* **2016** Aug;22(9):1192-201.
Q1, IF:4,671
8. Elkjaer ML, Molnar T, Illes Z. Teriflunomide for multiple sclerosis in real-world setting. *Acta Neurol Scand.* **2017** Nov;136(5):447-453.
Q1, IF:3,126
9. Ruzsics I, Biri B, Nagy L, Kéki S, Sárosi V, Horváth I, Bogár L, Molnár T. Metilált arginin származékok szerepe a stabil és az exacerbált COPD betegeknél – követéses vizsgálat *Medicina Thoracalis.* **2017**;70: 71-80.
10. Bocskai T, Loibl C, Vamos Z, Woth G, Molnar T, Bogar L, Lujber L. Cost-effectiveness of anesthesia maintained with sevoflurane or propofol with and without additional monitoring: a prospective, randomized controlled trial. *BMC Anesthesiol.* **2018**;18(1):100. doi: 10.1186/s12871-018-0563-z.
Q2, IF:1,619
11. Tőkés-Füzesi M, Ruzsics I, Rideg O, Kustán P, Kovács GL, Molnár T. Role of microparticles derived from monocytes, endothelial cells and platelets in the exacerbation of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* **2018**;13:3749-3757.
Q1, IF:3,274
12. Martin NA, Nawrocki A, Molnar V, Elkjaer ML, Thygesen EK, Palkovits M, Acs P, Sejbaek T, Nielsen HH, Hegedus Z, Sellebjerg F, Molnar T, Barbosa EGV, Alcaraz N, Gallyas F Jr, Svenningsen AF, Baumbach J, Lassmann H, Larsen MR, Illes Z. Orthologous proteins of experimental de- and remyelination are differentially regulated in the CSF proteome of multiple sclerosis subtypes. *PLoS One.* **2018**;13(8):e0202530.
Q1, IF:2,766
13. Csiszár B, Németh Á, Márton Z, Riba J, Csécsei P, Molnár T, Deres L, Halmosi R, Tóth K, Kenyeres P. A citokeratin-18 sejthalálmarker vizsgálata sikeres cardiopulmonalis resuscitációban. *Orv Hetil.* **2020**;161:26-32. doi: 10.1556/650.2020.31564
Q3, IF:0,564

14. Loibl C, Rozanovic M, Bogár L, Pankaczi A, Kovács P, Miseta A, Molnár T*, Csontos C. Lack of early platelet and leukocyte activation can indicate complications after major burn injury. Clin Hemorheol and Microcirc, **2020**; DOI: 10.3233/CH-190779.
Q2, IF: 1,741, * megosztott utolsó szerzőség
15. Kovács P, Mayer M, Tőkés-Füzesi M, Schrick D, Ezer E, Molnár T. Porckorongsérv műtét alatt alkalmazott diklofenák tartalmú infúziós készítmények összehasonlítása: gyógyszerkinetika és műtéti stressz – előtanulmány. Aneszteziológia és IntenzívTerápia 2020;elfogadott
16. Szabo Z, Bartha E, Nagy L, Molnar T. Increased symmetric dimethylarginine, but not asymmetric dimethylarginine, concentrations are associated with transient myocardial ischemia and predict outcome. J Int Med Res **2020**;48:1-9.
Q3, IF:1,287

15.4. KÖNYVFEJEZETEK

1. Molnár, Tihamér. Központi Idegrendszeri betegségek anesztéziája. In: Bogár, Lajos (szerk.) Aneszteziológia és intenzív terápia. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt., (2009) pp. 271-275.
2. Molnár, Tihamér. Neuromuscularis betegségek anesztéziái vonatkozásai. In: Bogár, Lajos (szerk.) Aneszteziológia és intenzív terápia. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt., (2009) pp. 275-278.
3. Molnár, Tihamér. Intenzív ellátást igénylő neuroinfekciók. In: Fülesdi, B; Tassonyi, E; Molnár, Cs (szerk.) Neuroanesztézia és neurointenzív ellátás. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt., (2013) pp. 261-267.
4. Molnár, Tihamér. Központi idegrendszeri betegségek. In: Bogár, Lajos (szerk.) Aneszteziológia és intenzív terápia. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt., (2014) pp. 292-296.
5. Molnár, Tihamér. Neuromuscularis betegségek anesztéziái vonatkozásai. In: Bogár, Lajos (szerk.) Aneszteziológia és intenzív terápia. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt., (2014) pp. 296-299.
6. Molnár, Tihamér: Súlyos koponya-, és agysérült felnőtt anesztéziája. In: Vámos Zoltán (szerk.) Baleseti agysérültek ellátása. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt., (2021) pp. (elfogadott kézirat)