

Hemoreológiai és hemosztázis változások akut és krónikus vaszkuláris kórképekben

Tézisfüzet

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Vezető: Dr. Bogár Lajos, DSc

Keringésspatológiai állapotok vizsgálata kísérletes modelleken és klinikai beteganyagon

Programvezető: Dr. Jancsó Gábor, PhD



Dr. Schrick Diana Zsuzsanna

Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet,
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Témavezető:

Dr. Molnár Tihamér, DSc

Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet,
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2023

Rövidítések jegyzéke

ACE: angiotenzin konvertáló enzim
ACS: akut koronária szindróma
ANOVA: variancia analízis teszt
APS: antifoszfolipid szindróma
aPTT: aktivált parciális tromboplasztin idő
AUC: görbe alatti terület
CAHA: COVID-19-hez társuló hemosztázis változások
CD: cluster of differentiation
CFT: alvadék képződési idő
CRP: C-reaktív protein
CT: alvadási idő
Cy5: cychrome 5
DIC: disszeminált intravaszkuláris koagulopátia
ECA: ekarin alapú teszt
ECLIA: elektrokemilumineszcencia immuno-assay
EDTA: etiléndiamin-tetraecet sav
EKG: elektrokardiográfia
ESR: eritrocita szedimentációs ráta
FITC: fluorescein isothiocyante
G: gauge
g: gravitációs erő
GP: glikoprotein
HPS: hemofagocitózis szindróma
Ig: immunoglobulin
IL: interleukin
IPF: éretlen vérlemezke frakció
KK: Klinikai Központ
LAR: leukocita antiszedimentációs ráta
LMWH: alacsony molekulásúlyú heparin
LT: lízis idő
MCF: maximális rög szilárdság
ML: maximális lízis
MV: mikrovezikulum
NLR: neutrofil-limfocita arány
NSAID: nem-szteroid gyulladáscsökkentő
PAC: prokaspáz aktiváló anyag
PAR: trombocita antiszedimentációs ráta
PE: fikoeritrin

pl.: például

PTE: Pécsi Tudományegyetem
RAAS: renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
RECOVERY: Randomised Evaluation of COVID-19 Therapy
ROC: receivers operating curve
RT-PCR: valós idejű polimeráz láncreakció
SARS-CoV-2: severe acute respiratory distress syndrome – coronavirus – 2
SIC: szepszis indukálta koagulopátia
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
TMA: trombotikus mikroangiopátia
TNF α : tumor nekrosis faktor α
TRAP: trombin aktiváló polipeptid
vWF:Ag: von Willbrand faktor antigén
vWF:Rco: von Willebrand faktor riztocetin kofaktor aktivitás
WHO: Egészségügyi Világszervezet
YKL-40: humán kitináz mátrix protein

1. Prológus

Kardio- és cerebrovaszkuláris betegségekben a biomarkereket széles körben alkalmazzuk diagnózisok felállítására, prognózis becslésére, terápia monitorozására. A biomarkerek olyan jellegzetes, objektíven mérhető biológiai jelzőanyagok (pl. gének, sejtek, kémiai molekulák, enzimek, hormonok) amelyek a szervezetben játszódó fiziológiai és patofiziológiai folyamatokra utalhatnak. Az ideális biomarker magas szenzitivitással rendelkezik, a korai felismerést segíti elő és kellőképpen magas a specificitása az adott betegség kimenetlére vonatkozóan. Továbbá fontos szempont az is, hogy a biomarker legyen könnyen, non-invazív módon és elfogadható áron mérhető, így gyors, reprodukálható vizsgálatot tegyen lehetővé. A biomarker kutatások elősegítik a betegségek patofiziológiai folyamatainak könnyebb megértését, valamint új terápiás célpontokhoz vezetve javíthatják az egyes kórképek kimenetelét.

Doktori értekezésem két fő „vaszkuláris” betegséget vizsgált. A dolgozat első része strokeon átesett („krónikus” vaszkuláris betegség) egyéneket vizsgál. A dolgozat második részében a súlyos koronavírus fertőzés („akut” betegség) okozta vaszkuláris komplikációkkal kapcsolatos vizsgálati eredményeket taglalja.

KRÓNIKUS VASZKULÁRIS BETEGSÉG: POST-STROKE HEMOREOLÓGIAI ÉS HEMOSZTÁZIS VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA

2. Bevezetés

A stroke egy olyan akut kórkép, mely azonnali felismerést, diagnosztizálást és a kezelés mielőbbi megkezdését kívánja, hogy minimalizálni lehessen az érelzáródás okozta irreverzibilis agyszöveti károsodást. A diagnózis felállítása klinikai és radiológiai alapokon nyugszik. Az ellátás elsődleges célja az agyi perfúzió mielőbbi helyreállítása, a neurológiai tünetek javulása, megszüntetése céljából (ez történhet intravénás trombolízis során vagy mechanikus trombektómia elvégzésével). 2022. évi nyers statisztikai eredmények azt mutatták, hogy az incidencia 41-297 eset/100.000 fő/év, a különböző országok eredményeit összesítve. Csökkenő incidencia volt megfigyelhető a fejlett országokban, míg az alacsonyabb jövedelmű országokban a betegség előfordulása emelkedő tendenciát mutatott. A 28-30 napos halálozás ~10-40%. Az akut stroke-ot túlélő egyéneknél a visszatérő iszkémiás epizódok előfordulási esélye magas. Ahhoz hogy ezt a trombotikus rizikót csökkenteni tudjuk az aktuális szakmai ajánlások I.A evidencia szinttel javasolják az antitrombotikus terápia bevezetését a szekunder

prevenció részeként. A leggyakrabban alkalmazott antitrombotikum az aspirin, az aspirin-dipyridamol, a clopigorel és a ticagrelor. A gyógyszeres terápia mielőbbi megkezdése javasolt abban az esetben, ha a primér érelzáródást követően 24 órával készült koponya CT/MRI vizsgálat kizárta az intrakraniális vérzés fennállását (I.B. evidencia). A vérlemezlék élettana fontos a stroke patomechanizmusának megértésében. A trombogenezis iniciális kiváltója egy akutan kialakuló/látensen perzisztáló endotél sérülés, amely a vaszkuláris szubendotéliumot szabaddá teszi, ami a vérlemezkék aktivációjához, aggregációjához, fibrin generáció révén a koagulációs kaszkád beindításához, intravaszkuláris trombus képződéshez vezet. Az irodalom áttekintése során számos korábbi közlemény bizonyította azt, hogy a vérlemezkék igen magas aktivitást mutatnak az akut stroke gyógyulási fázisában.

2.1. Kezelés ellenére fennálló reziduális magas trombocita reaktivitás (high-on-treatment residual platelet reactivity, HTPR or HRPR)

A kezelés ellenére fennálló magas trombocita reaktivitást úgy definiáljuk, hogy a vérlemezkék reaktivitása fokozott, az antitrombotikum telítő dózisának beadását követően is. A HRPR státusz bizonyítása laboratóriumi alapokon nyugszik. Multiplate® analízátor használata esetén a vágóérték >468 egység/perc, ADP teszt során. Korábban publikált metaanalízisek független korrelációt igazoltak a kezelés ellenére fennálló reziduális magas vérlemezke reaktivitás és a rekurrens iszkémiás epizódok fellépte között; minél magasabb volt a reziduális vérlemezke reaktivitás, annál nagyobb volt a kardio-cerebrovaszkuláris események újboli előfordulásának rizikója.

2.2. Ismétlődő stroke előrejelzésére használatos biomarkerek

A biomarkereket röviden két fő csoportra bonthatjuk: klasszikus és új(abb) biomarkerekre. A széles körben elterjedt biomarkereket könnyű mérni, a napi rutin diagnosztikai vizsgálatok részei, ide tartozik a C-reaktív protein, fibrinogén és a D-dimer szint. Az újabb biomarkereket főleg klinikai vizsgálatokban alkalmazzuk, illetve nagyobb centrumokban mérhetőek, például neutrofil-limfocita arány (NLR), genetikai vizsgálatok, interleukin-6 szint, YKL-40 fehérje. A korábban felsorolt biológiai anyagokról már tudott, hogy emelkedett mennyiségük független összefüggést mutat a recidív iszkémiás epizódok előfordulásával és a rossz funkcionális kimenetellel stroke-on átesett betegek esetén.

2.3. Celulláris komponensek antiszedimentációja

Bogár és munkacsoportja 2000-ben publikálta, hogy a leukociták flotációja (felfelé történő mozgása) egy órás gravitációnak megfelelő szedimentáció során a teljes vérben, előre jelzi a bakterémia felléptét kritikus állapotú betegekben. Később publikálták, hogy a leukocita antiszedimentációs ráta (LAR) a post-stroke infekciók korai felismerését segíti elő és a posztoperatív komplikációkat is előre jelzi. A leukocita antiszedimentáció analógiájára munkacsoportunk a vérlemezkék mozgását figyelte meg egy órás szedimentáció alatt. Trombocita antiszedimentációs ráta (PAR) a vérlemezkék azon arányát mutatja, amik a véroszlop számtani közepétől felfelé mozognak az egy órás gravitációs szedimentáció során. A neutrofil granulociták aktivációját jól mutatja a neutrofil antiszedimentációs ráta (NAR).

2.4. Vérlemezke asszociált mikrovezikulumok

Perifériás vérben keringő mikrovezikulumok (MV-k) kissé sejt membránból származó partikulumok (átmérőjük: 0,1-1,0 mikrométer), megtalálhatók a likvorban, könnyben, nyálban, anyatejben, és a bronchoalveoláris mosófolyadékban is. Legnagyobb számban vérlemezke eredetű mikrovezikulumokat találunk a humán perifériás vérben, eredetüket számos sejtfelszíni marker jelenléte biztosítja, például CD42a (glikoprotein IX, GPIX) valamint a CD62P (P-szelektin) jelenléte. A CD42a expresszió kizárólag a vérlemezkék és a megakariociták felszínén fordul elő. A glikoprotein IB-IX-V komplex a vérlemezkék felszínén felel a von Willebrand faktorról való kapcsolódásért. A mikrovezikulumok számos biológiai funkcióval rendelkeznek, fontos szerepük van az antigén prezentációban és egyéb immunológiai válaszreakciókban, továbbá elősegítik a sejtek közötti kommunikációt azáltal, hogy lipideket, fehérjéket és genetikai anyagokat szállítanak a közeli vagy akár távoli helyekre is, ezáltal a célsejtek funkcióját modifikálni képesek. A vérlemezke eredetű mikrovezikulumok fontos biomarként funkcionálnak különféle kardio- és cerebrovaszkuláris betegségekben.

3. Hipotézis, célkitűzés

Vizsgálatunk során célul tűztük ki a stroke-on átesett betegeknél

- a perifériás vér alakos elemeinek vizsgálata, azok esetleges prediktor szerepe a rekurrens iszkémiás epizódok vonatkozásában
- hosszú távú kimenetelt előre jelző molekulák azonosítása
- a módosított vérlemezke funkciós teszt prediktív értékének összehasonlítása a konvencionális trombocita impedancia aggregometriai vizsgálatokkal

- különböző eredetű perifériásan keringő mikrovezikulumok összehasonlítása a stroke-on átesett betegek és az egészséges kontrollok között
- vérlemezkék és mikrovezikulumok korrelációjának vizsgálata antitrombotikumot szedő betegekben
- összefüggések feltárása a kezelés ellenére fennálló reziduális magas vérlemezke reaktivitás és a perifériásan keringő mikrovezikulumok között

4. Vizsgálati módszerek

4.1. Vizsgálat felépítése és a vizsgálati alanyok

A tézis alapját képező vizsgálat egy prospektív, obszervációs pilóta tanulmány volt. A vizsgálati protokollt és az etikai engedélyt a Pécsi Tudományegyetem, Regionális Kutatás Etikai Bizottsága hagyta jóvá (referencia szám: 6735), Nemzetközi Klinikai Vizsgálatok Regiszterben a vizsgálat azonosítószáma: NTC03679858. A beavatkozások az 1975-ben megfogalmazott Helsinki Deklaráció etikai ajánlásai alapján történtek. Írásos beleegyező nyilatkozat került aláíratásra a vizsgálatba bevont betegek és a kontroll személyek által is. Összesen 52 (átlag életkor 66 ± 8 év, ebből férfi: 31) antitrombotikus terápiában részesülő (clopidogrel 75mg/nap) stroke-on átesett személy került bevonásra prospektív módon a vizsgálatba, hogy meghatározzuk a terápia effektivitását és a módosított aggregometriai vizsgálat hasznát, acélból, hogy a magas rizikójú populációt időben ki tudjuk szűrni, ezzel megelőzván a recidív cerebrális iszkémiát. A betegek közül 18 főnél (átlag életkor 66 ± 8 év, ebből férfi: 12) vizsgáltuk a perifériás vérben a mikrovezikulumokat. A vizsgálatba beválogatott betegek mindegyike nagyér okklúzió okozta stroke-on esett át és rendszeresen járt kontroll vizsgálatra a PTE KK Neurológiai Klinika Járóbeteg Ambulanciáira, ahol a vérvételek történtek.

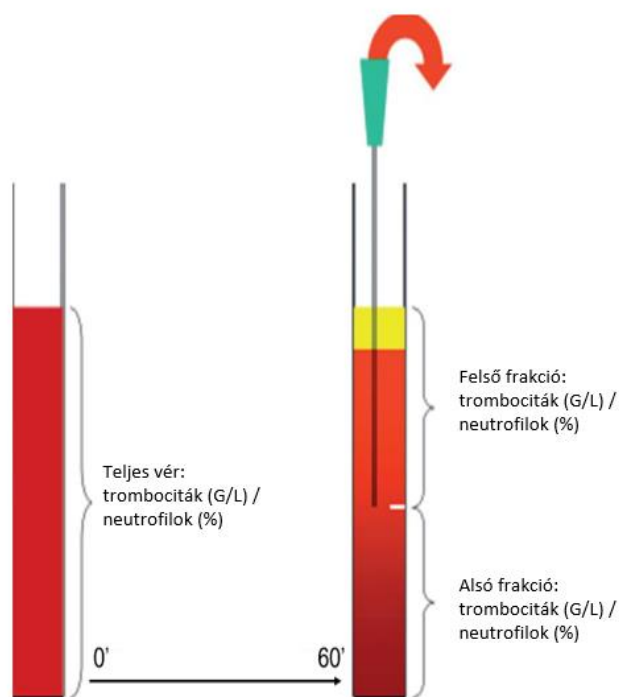
4.2. Mintagyűjtés

A vérvételeket a betegek gyógyszereszedési ritmusához időzítettük, a vér legalább az antitrombotikus gyógyszer bevitelét követően 2 órával került levételre. Az éhomi vérminták 21G-s kanülön keresztül lettek levéve a beteg és egészséges alanyoktól a könyök hajlati vénán keresztül rövid strangulációt követően zárt rendszerű vérvételi csövekbe. A levett vérmintákat sürgősséggel laboratóriumba szállítottuk, ahol feldolgozásuk a mintavételt követő egy órán belül megkezdődött.

4.3. Trombocita és neutrofil antiszedimentációs ráta

Munkacsoportunk egy módosított ülepitési technikát dolgozott ki a vérlemezkék és a neutrofil granulociták szedimentációs tulajdonságainak vizsgálatára. Westergreen szerinti egy órás gravitációnak megfelelő ülepitést követően a mintavételi csövet (EDTA és hirudin) a számtani közepénél megjelöltük, az attól felfelé lévő véroszlopot átpipettáztuk egy másik EDTA és hirudin tartalmú kémcsőbe, az így képzett aló és felső vérfrakcióból végeztük a további vizsgálatokat. A módszer vizuális ismertetése az **1. ábrán** látható. Teljes vérkép meghatározás, vérlemezke és neutrofil (%) szám került meghatározása a szedimentációs, szeparációs technikát követően a Sysmex XN 9000 integrál hematológiai analizátor segítségével. Ezt követően kiszámításra került a trombocita antiszedimentációs ráta (PAR; %), a leukocita antiszedimentációs ráta (LAR; %) és a neutrofil antiszedimentációs ráta (NAR; %). A számítás az alábbi képlet alapján történt:

$$\frac{\text{sejtszám (felső frakció)} - \text{sejtszám (alsó frakció)}}{\text{sejtszám (felső frakció)} + \text{sejtszám (alsó frakció)}} \times 100$$



1. ábra Gravitációs szedimentációs és szeparációs technika sematikus ábrája. Az alsó és felső vérfrakció képzése egy óra szedimentációt követően. Az ábrát Schrick D. készítette.

4.4. Vérlemezke funkciós vizsgálat

A vélemezke funkciós vizsgálatokat Multiplate® impedancia aggregométer segítségével végeztük a teljes vérből, a teljes vér egy órás szedimentációját követően képzett

alsó és felső, hirudinnal antikoagulált vér frakciókból. A vizsgálatot minden esetben a vérvételt követően 60 perccel végeztük el, agonistaként adenosin-difoszfátot (ADP, 6.5M) alkalmaztunk a clopidogrel hatásának vizsgálatára. Az aggregáció mértékére a görbe alatti területet használjuk (are under the curve, AUC). Az AUC-t az eszköz szoftvere kiszámolja, azáltal hogy az aggregációs egységet (AU) megszorozza az aggregációig eltelt idővel (min). ADP-teszt esetén a normál aggregáció értéke AUC: 53-220 között várható. A teljes vérből mért aggregáció mértéke alapján a clopidogrel kezelésben részesülő betegeket két csoportra osztottuk fel: AUC<53 esetén „reszpondereknek” neveztük el őket, míg AUC $\geq$ 53 esetén „low-reszponderként” deklaráltuk őket.

4.5. Minta előkészítés és a mikrovezikulumok mérése

Egy órás gravitácónak megfelelő szedimentációt követően az alsó és a felső frakcióban lévő citráttal antikoagulált vért szobahőmérsékleten, 2500xg-n, 20 percen keresztül centrifugáltuk. A szupernatánst egy új mérésre alkalmas csőbe helyeztük, majd 2500xg-n további 20 percig centrifugáltuk, hogy sejtmentes plazmát nyerjünk. A sejtmentes plazma felülúszóját Eppendorf csőbe helyeztük, majd folyékony nitrogénben -80°C-ra hűtöttük, a további mérések megkezdéséig. A jelöléshez kiválasztott CD markereket és azok celluláris eredetét, a fluoreszcens festék színét és a gyártó specifikációit az **1. táblázat** foglalja össze. Áramlási citometriás mérések és az eredmények analízise a Beckman-Coulter FC-511 áramlási citométer segítségével, a CXP szoftver használatával történtek. A mikrovezikulumok referencia kapuzásához a Biocytex Megamix gyöngyeit használtuk. Oldalról szóró (side scattered; SSC), előre szóró (forward scatter; FSC) és a fluoreszcens csatornákat logaritmikus skála szerint állítottuk be. A mikrovezikulumok kapuzásához használt mérettartomány 0,5 mikrométer volt. A kapuzott események, további, pontosabb meghatározásához annexin jelölést alkalmaztunk. Annexin V pozitív mikrovezikulumok fluoreszcens intenzitása az izotípus kontrollok felett volt. Ahhoz, hogy meghatározzuk a mikrovezikulumok számát, egy ismert koncentrációt (1×10^6 /mL) és 3 mikrométer átmérőjű mikrogyöngyöket használtunk, hogy biztosítani tudjuk az optimális jelölési koncentrációt.

CD marker	Sejt eredete	Fluoreszcens festék	Gyártó
CD62P (P szelektin)	Vérlemezke	PE	Beckman-Coulter
CD41 (GPIIb/IIIa)		Cy5	Beckman-Coulter
CD42a (GPIb/V/IX)		FITC	Becton-Dickinson
PAC1 (GPIIb/IIIa, fibrinogén kötő hely közelében)		FITC	Becton-Dickinson
CD31 (PECAM-1)	Endotélium sejt	PE	Becton-Dickinson
Annexin V	Foszfatidil-szerin	FITC, Cy5	Becton-Dickinson
Egér IgG1	Izotípus kontroll	FITC, PE, Cy5	Becton-Dickinson

1. táblázat A mikrovezikulumok mérése során CD markerek, azok eredete, fluoreszcens festék típusa és a gyártó jellemzői. Rövidítések: Cy5, Cychrome5; FITC, fluoreszcein izotiocianát; PE, fikoeritrin; Ig, immunoglobulin

4.6. Adatgyűjtés és statisztikai analízis

Társbetegségek, krónikusan szedett gyógyszererek és a dohányzási státusz minden egyénnél rögzítésre került. A vaszkuláris események incidenciáját a teljes vizsgálati populációban 36 hónapos utánkövetés során vizsgáltuk. Az akut koronária szindróma fennállását az aktuális szakmai irányelveknek megfelelően határoztuk meg. Az összes rekurrens cerebrális iszkémiás epizódot koponya képalkotó vizsgálattal igazoltuk.

Eredményeinket SPSS szofver segítségével elemeztük (IBM SPSS Statistics® 27.0). A folyamatos változók esetében mediánt, interkvartilis tartományt (vagy átlagot) és standard deviációt határoztunk meg. Kategorikus változók esetében gyakoriságot és százalékos arányt vizsgáltunk. A kategorikus változók összehasonlítására a különböző vizsgálati csoportokban a Student-t tesztet, Mann-Whitne U tesztet és az egy-karos ANOVA, valamint Kruskal-Wallis tesztet használtuk. A folyamatos változókat Fischer tesztek és χ^2 -próbával elemeztük. A korrelációkat Spearman korrelációs koefficiens meghatározásával jellemeztük. Bináris logisztikus regressziót végeztük, a független prediktorok vizsgálatára, a kezelés ellenére fennálló reziduális vérelemezke reaktivitás kimutatására. A p-értéket <0,05 tekintettük szignifikánsnak.

5. Eredmények

Összesen 52 post-stroke beteg került prospektív módon bevonása a vizsgálatunkba. Az összes beteg nagyér okklúzió okozta stroke-on esett át, melyet CT/MRI vizsgálattal igazoltak. 11 recidív iszkémiás epizód fordult elő (stroke n=5; aCS n=6) a 36 hónapos utánkövetés során. Az antiszedimentációs értékek közül egyedül a neutrofil antiszedimentációs ráta mutatott szignifikáns különbséget a recidív iszklémiát elszenvedő és az eseménytelen obszervációs periódussal rendelkező betegpopuláció között. Nem volt sziginikáns különbség a kiinduló vérkép paraméterekben, azonban az vérsejt-süllyedés tendenciózusan magasabb volt az iszkémiára hajlamos betegcsoportban.

Az $AUC_{\text{felső}}$ szignifikánsan magasabb volt a rekurrens iszkémiát elszenvedő egyének között, az eseménytelen populációban ez a tendencia nem volt megfigyelhető ($p=0.003$), az eredményeket a **2. táblázat** foglalja össze.

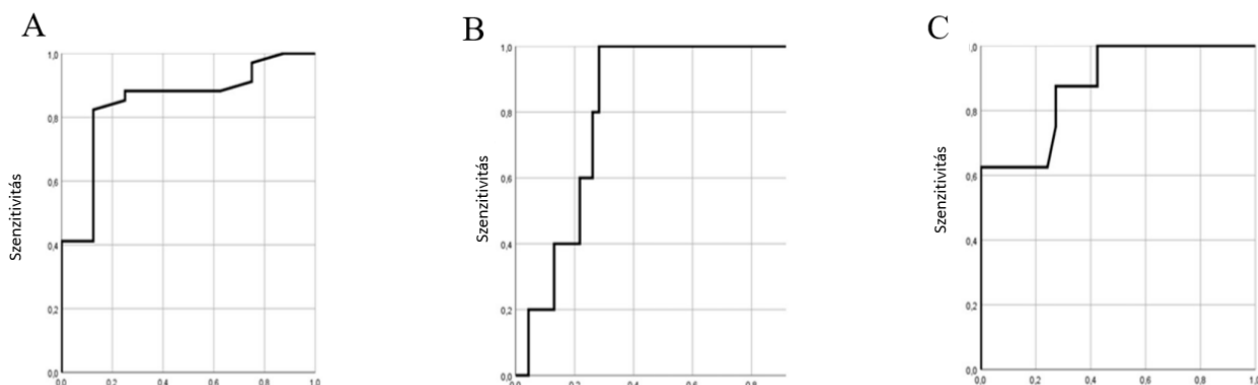
	Összes beteg n=52	Eseménytelen n=41	Stroke + ACS n=11	p-érték
AUC	40.5 (27.53.5)	40 (27-54)	42 (32.5-44)	0.866
$AUC_{\text{felső}}$	56 (22.5-76.5)	51.5 (19.5-77.5)	65 (42-75.5)	0.247
$AUC_{\text{alsó}}$	18 (13.5-22)	28 (14-34)	17 (13-20)	0.567

	Összes beteg n=52	Eseménytelen n=41	Rekurrens stroke n=5	p-érték
AUC	40.5 (27-53.5)	39 (27-53)	43 (42-44)	0.347
$AUC_{\text{felső}}$	56 (22.5-76.5)	49 (21-74)	77 (71-92)	0.020
$AUC_{\text{alsó}}$	18 (13.5-22)	18 (14-44)	17 (11-19)	0.763

2.táblázat Görbe alatti terület (AUC) a teljes vérben, egy órás szedimentációt követően képzett felső és alsó vérfrakciókban az összes betegben, összehasonlítva az eseménymentes utánkövetési periódust a recidív iszkémiás epizódokat elszenvedőkkel (kompozit vaszkuláris események: stroke+ACS, és csak rekurrens stroke) Rövidítések: ACS, akut koronária szindróma; AUC, görbe alatti terület

A **2. ábrán** a különféle változók ROC görbéje figyelhető meg, a recidív iszkémiás epizódok előre jelzésének vonatkozásában. Kohorsz vizsgálatunkban, a neutrofil antiszedimentációs ráta (NAR) $\geq 0,431$ vágó értékkel független rizikófaktornak tekintendő a kompozit rekurrens események előfordulását követően, szenzitivitása 82%, specificitása 88% volt a 36 hónapos utánkövetési periódusban (area: 0,847, $p=0,002$, 95%CI: 0,703-0,992) (**2A**). Az $AUC_{\text{felső}} \geq 70$ vágó értékkel a rekurrens iszkémiás epizódok előrejelzésében 80%-os szenzitivitással és 74%-os specificitással bírt az utánkövetés során (area: 0,813, $p=0,023$,

95%CI: 0,689-0,937) (**2B**). A legszofisztikáltabb előrejelzési valószínűséggel a két érték kombinációja (NAR + AUC_{felső}) rendelkezik (area: 0,881, p=0,001, 95%CI: 0,754-1,0) (**2C**).



2. ábra A változók ROC görbéje, amelyek előre jelzik a vaszkuláris történések ismétlődését 36-hónapos utánkövetési periódus során. A: neutrofil antiszedimentációs ráta (NAR), area=0,847, p=0,002, 95%CI 0,703-0,992; B: AUC_{felső}, area= 0,813, p=0,023, 95%CI 0,689-0,937, C: NAR és AUC_{felső} kombinált előre jelző valószínűsége, area:0,881, p=0,001, 95%CI 0,754-1,0

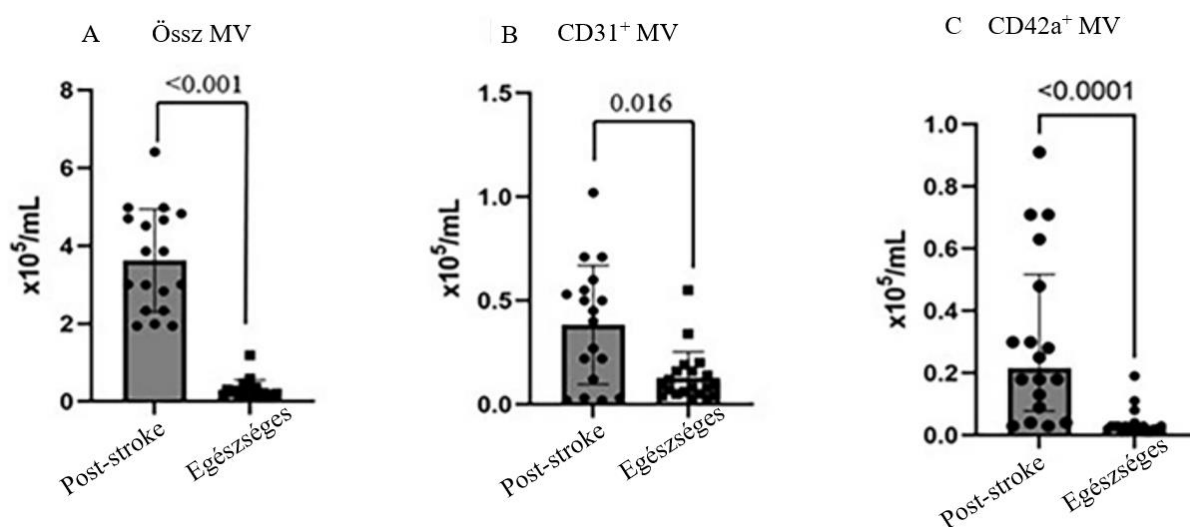
18 stroke-on átesett betegnél vizsgáltunk a perifériás vérben előforduló mikrovezikulumokat. Az eredményeket 20 egészséges kontrollal hasonlítottuk össze. A demográfiai és a kiinduló laboratóriumi paraméterek a különböző csoportokban a **3. táblázat** részletezi. A legfontosabb mikrovezikulum paramétereket a **3. ábrán** mutatjuk be.

A teljes vérből mért AUC és a trombocita aggregáció sebessége negatív korrelációt mutatott az alsó frakcióból mért mikrovezikulumok számával, egy órás ülepítést követően. Megjegyzendő, hogy szignifikáns negatív korreláció ($r=-0,801$, $p=0,005$) volt megfigyelhető az aggregáció sebességében a reszponderek esetében ($n=11$).

Az alsó frakcióban mérhető PAC-1⁺ mikrovezikulumok mennyisége pozitív korrelációt mutatott a neutrofil granulociták (%) arányával az alsó frakcióban egy órás szedimentáció után ($r=0,634$, $p=0,008$). Továbbá a CD42a⁺ mikrovezikulumok a felső frakcióból mérve szignifikáns pozitív korrelációt mutattak az alsó frakcióban lévő neutrofilok mennyiségével (%) ($r=0,652$, $p=0,006$). A fentebb ismertetett összefüggések nem voltak megfigyelhetők abban az esetben, amikor csak a teljes vér alakos elemeit, mikrovezikulumait vizsgáltuk.

	Post-stroke betegek n=18			Kontrollok n=20	p-érték
Életkor	65 (60-70)			57 (49-63)	0,078
Férfi/nő	12/6			10/10	0,298
MV ($\times 10^5/\text{ml}$)	teljes vér	felső frakció	alsó frakció	teljes vér	
Összes MV	3,43 (2,34-4,70)	1,79 (0,37-2,82)	1,53 (0,96-1,89)	0,22 (0,13-0,37)	<0,001
CD31 ⁺	0,43 (0,12-0,55)	0,25 (0,10-0,46)	0,07 (1,13-1,255)	0,08 (0,04-0,16)	0,016
CD42a ⁺	0,21 (0,09-0,48)	0,13 (0,07-0,32)	0,05 (0,02-0,10)	0,02 (0,01-0,03)	<0,001
CD41 ⁺	0,25 (0,13-0,56)	0,15 (0,10-0,53)	0,04 (0,03-0,24)	0,15 (0,09-0,25)	0,251
CD62P ⁺	0,48 (0,09-0,85)	0,26 (0,07-0,59)	0,15 (0,03-0,24)	0,17 (0,09-0,33)	0,105
PAC-1 ⁺	0,009 (0,009-0,03)	0,008 (0,007-0,02)	0,003 (0,002-0,007)	0,01 (0,009-0,02)	0,515

3. táblázat Demográfiai paraméterek, mikrovezikulumok jellemzői betegekben és egészségesekben. Rövidítések: MV, mikrovezikulum; CD, „cluster of differentiation”; PAC, prokaspáz aktivációs anyag



3. ábra A: Összes mikrovezikulum B: CD31⁺ mikrovezikulumok, C: CD42a⁺ mikrovezikulumok post-stroke betegekben és egészséges kontrollokban (Mann-Whitney teszt)

6. Diskusszió

Sem a leukocita antiszedimentációs ráta (LAR), sem a trombocita antiszedimentációs ráta (PAR) nem volt prediktív a recidív iszkémiás epizódok előre jelzésére stroke-on átesett betegek körében. Ennek háttérében állhat, hogy a vérlemezkék és a fehérvérsejtek főként az érelzáródást követő pár napban (akut fázisban) befolyásolják a betegség lefolyását, ahogy ezt korábban stroke-ot követő infekcióban és égett betegekben is leírták. Állatokon végzett kísérletek, valamint humán klinikai adatok is az aktivált perifériás alakos elemek fontosságát hangsúlyozzák a stroke-ot követő neuroinflammáció kialakulása során. Az aktivált fehérvérsejtek tartós jelenléte a szisztémás keringésben állandó kockázatot jelent a krónikus gyulladásban szenvedő (endoteliális diszfunkciót okozó) betegekben. A neutrofil granulociták fontos markerek lehetnek a stroke kimenetelének megbecslésére. A vizsgálatunkban a neutrofilok lefelé történő mozgása (szedimentációja, -NAR) volt megfigyelhető azon egyének között akik az utánkövetési periódusban kompozit vaszkuláris események elszenvedői voltak.

Az irodalomban számos adat rávilágít arra, hogy sok szív- és érrendszeri, jól együttműködő betegnél az antitrombotikus terápia ellenére perzisztáló reziduális magas vérlemezke reaktivitás van jelen. Bár több tanulmány is kimutatta, hogy az agyi iszkémia kiújulási valószínűségét a magas reziduális trombocita aktivitás növeli, az állapot rutin keretek közt történő szűrése jelenleg nem megoldott a neurológusok körében. Tehát több randomizált, kontrollált, multicentrikus tanulmányra van szükség, melyek figyelembe veszik azon változókat, melyek az állapot kialakulásáért tehetők felelőssé, például stroke altípus, etiológia, a vizsgálati protokollok technikai eltérései, interindividuális farmakogenetikai különbségek és a betegek viselkedése, terápia betartása. A rizikó stratifikáció, a trombocita funkciós vizsgálaton alapuló, személyre szabott gyógyszeres terápia csökkentheti az iszkémia kiújulásának arányát. Vizsgálatunkban a clopidogrelre adott alacsony válaszreakció Multiplate® mérések alapján a teljes vérből nem tudta előre jelezni a visszatérő stroke epizódokat. Azonban, a felső vérfrakcióból mért magasabb AUC vágóértékkel (≥ 70) a jövőbeni stroke epizódok új, független előrejelzőjeként jelent meg. Megfigyelésünk arra utal, hogy a vérlemezkék felfelé irányú mozgása összefüggésbe hozható a fokozott vérlemezke aktivitás következtében megnövekedett trombotikus hajlammal. Amikor a NAR és az $AUC_{\text{felső}}$ kombinációját használtuk a statisztikai modellben, a jövőbeni vaszkuláris események előre jelzési valószínűsége még pontosabb volt.

Wang és munkacsoportja megfigyelte, hogy a mikrovezikulák számának emelkedése szignifikánsan magasabb volt post-stroke betegekben a non-cerebrovaszkuláris kontrollokhoz

képest. Egy nemrégiben publikált metaanalízissel összehasonlítva azt találtuk, hogy a perifériás vérben keringő endotél eredetű (CD31⁺) és vérlemezke eredetű (CD42a⁺) mikrovezikulák száma szignifikánsan magasabb volt a post-stroke betegekben, mint az egészséges kontroll csoportban. Úgy véltük, hogy a vérlemezkék eredete és száma befolyásolhatja a clopidogrel kezelésre adott választ. Bár nem észleltünk szignifikáns összefüggést a trombocita funkciók teszt és a mikrovezikulák száma között, azonban negatív korrelációt fedeztünk fel az AUC_{teljesvér} és az alsó vérfrakcióban lévő mikrovezikulák száma között egy óras ülepitést követően. Hipotézisünket és eredményeinket Kafian és munkacsoportja által felfedezett eredmények is alátámasztják, miszerint a clopidogrel kezelés ellenére fennálló reziduális magas vérlemezke reaktivitás összefüggésbe hozható a perifériás vérben keringő sok mikrovezikulával. Ezt az állítást cáfolja Rosinska kutatócsoportja, akik aspirint szedő post-stroke betegekben nem találtak összefüggést a reziduális vérlemezke reaktivitás és a mikrovezikulák eredete, mennyisége között. Akut stroke betegekben a PAC-1⁺/CD61⁺, CD62P⁺/CD61⁺ és CD31⁺/CD61⁺ mikrovezikulák megnövekedett koncentrációját találták, ami a trombocita aggregáció gátló kezelés sikertelenségét jelezte elő. Továbbá, a mikrovezikulák mennyisége a perifériás vérben jól becsli a betegség súlyosságát, annak lefolyását és a prognózt. Vizsgálatunkban negatív korreláció volt megfigyelhető a trombocita aggregáció sebessége és a mikrovezikulák száma között az alsó vérfrakcióban egy óras szedimentációt követően. A szeparációs technika alkalmas lehet a jövőben a clopidogrelre jól és kevésbé, vagy nem reagáló egyének szűrésére, ezáltal a személyre szabott terápia lehetőségeinek megteremtésére. A neutrofilok és mikrovezikulák között tapasztalt összefüggés fontos lehet a betegség háttérében álló tromboinflammatorikus kaszkád feltérképezése során is. Michelson és munkacsoportja vérlemezke-neutrofil granulocita komplexeket azonosított a trombocita aktiváció előrejelzésére. Számos egyéb állat- és humán vizsgálat felismerte, hogy a neutrofilok és a vérlemezkék igen diverz biológiai funkcióval rendelkeznek, immunotrombózis kialakulásához vezethetnek.

7. Vizsgálataink limitáló tényezői

Eredményeink értékelése során fontos figyelembe venni számos limitáló tényezőt, melyek az alábbiak voltak:

- kis eset szám
- akut stroke betegek nem kerültek bevonásra a vizsgálatba
- rekurrens iszkémiás epizódok közé, csak a klinikailag szignifikáns akut koronária szindróma és cerebrális iszkémia (stroke, tranzient iszkémiás attack) került bevonásra, a

lakunáris, néma léziók nem voltak figyelembe véve (MRI vizsgálat nem készült minden betegről)

- mintavétel ideje és az index esemény között különböző idők teltek el

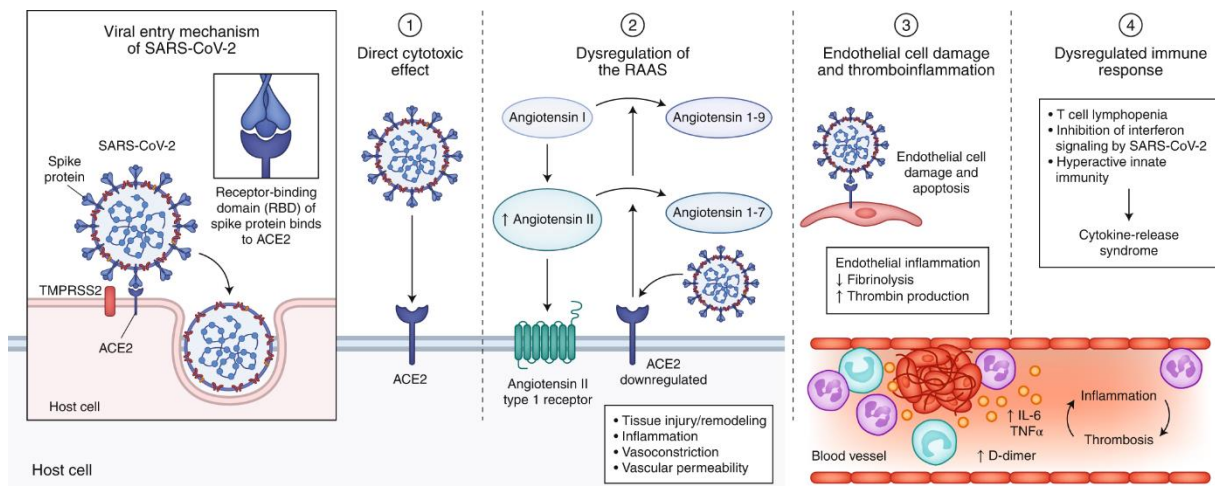
- csak clopidogrel monoterápiában részesülő egyének kerültek bevonásra a vizsgálatba

AKUT VASZKULÁRIS BETEGSÉG: COVID-19-HEZ TÁRSULÓ KOAGULÁCIÓS VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA

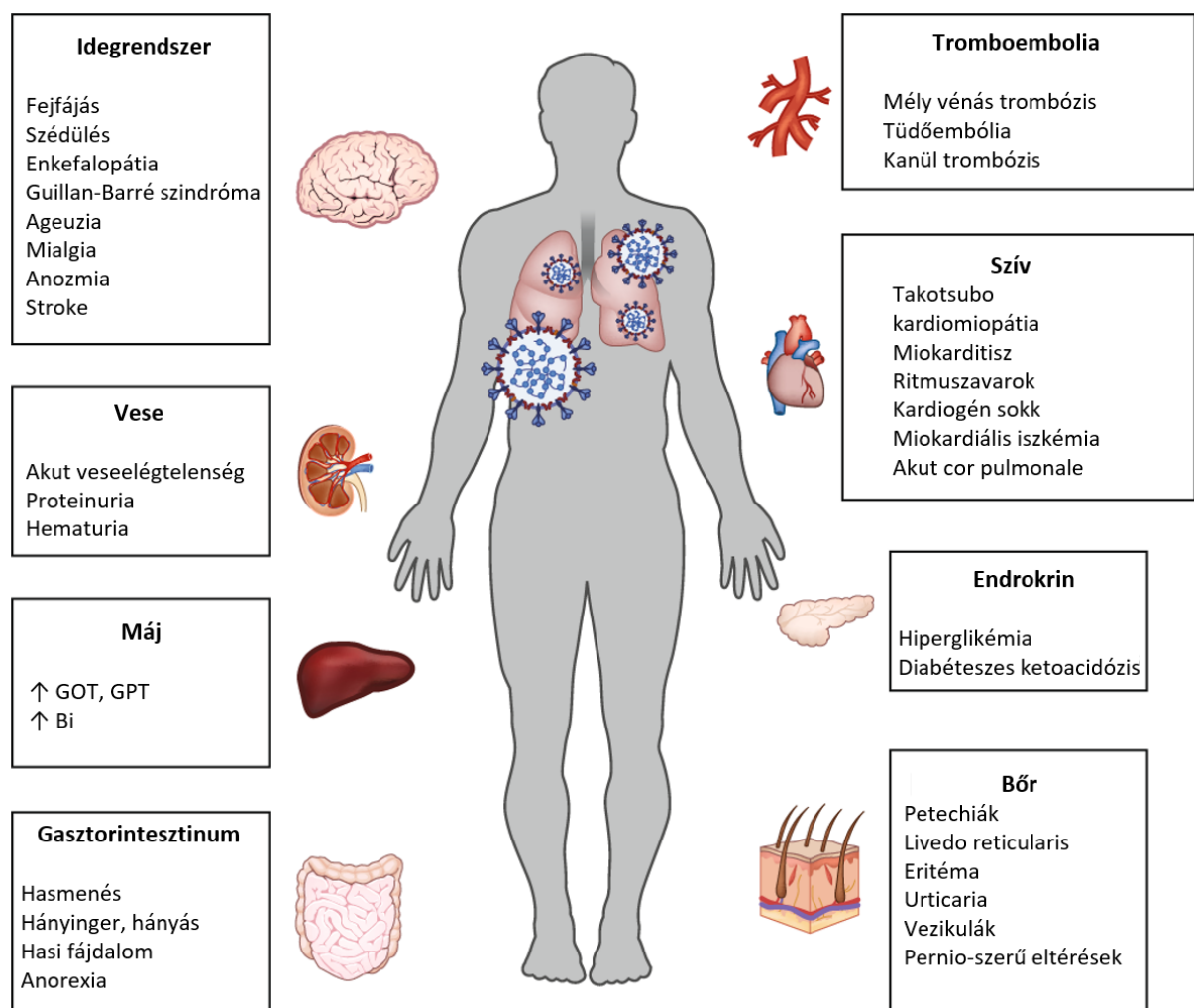
8. Bevezetés

2019. december 1-jén a Kínai Népköztársaságban, a Hubel tartományban található Vuhanban egy rendkívül fertőző légúti betegség jelentkezett, amelyet a SARS-CoV-2 vírus okozott, és számos ismeretlen okból kialakuló súlyos tüdőgyulladást jelentettek. 2020. március 11-én a WHO globális világjárványnak nyilvánította az új koronavírus okozta infekciót. A legfrissebb adatok szerint (2022. december) világszerte több mint 0,6 milliárd esetet diagnosztizáltak és több, mint 6 millió haláleset következett be a fertőzés miatt. Mindeközben, több mint 13 milliárd megelőző vakcinát adtak be az embereknek világszerte.

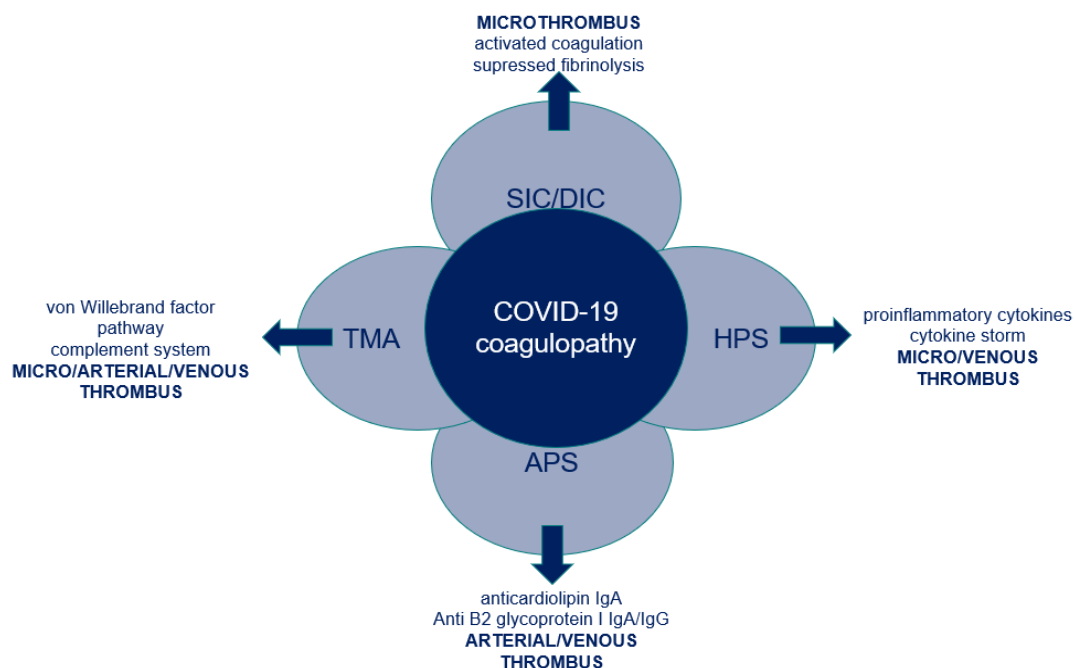
A betegség inkubációs ideje 5-6 naptól akár 14 napig is terjedhet, ezen tünetmentes időszak azonban rendkívül fertőző lehet. A betegség patofiziológiáját a **4. ábrán** foglaljuk össze. A diagnózis felállítása klinikai tünetek, laboratóriumi eredmények és radiológiai leletek alapján történik. Az infekció fennállását, a vírus genetikai anyagának kimutatásával, valós idejű polimeráz láncreakció (RT-PCR) révén, nazofaringeális kenetből, bronchoalveoláris mosófolyadékából lehet igazolni. Ezen túlmenően a COVID-19 antigén kimutatása a gyors diagnózis felállításban hasznos lehet. Jól ismert a vírus tüdő szövetben kifejtett hatása, tüdőgyulladás kialakulása, azonban a fertőzés tüdőn kívüli manifesztációiról sem szabad megfeledkeznünk. A betegség leggyakoribb extrapulmonális megnyilvánulásait az **5. ábrán** foglaljuk össze. Súlyos betegség esetén a többszervi elégtelenséget és a hiperkoagulábilis állapot fennállását az immunotrombotikus rendszer diszregulációja magyarázhatja. A COVID-19 egy olyan hiperkoagulábilis állapotot eredményez, amelyet COVID-19-hez kapcsolódó hemosztázis rendellenességnek neveznek (CAHA), az állapotnak egyelőre konszenzus definíciója nincs. A **6. ábra** a COVID-19 betegeknél észlelhető alvadási rendellenések átfedés-szerű szindrómáit mutatja be sematikusan.



4. ábra COVID-19 patofiziológiája. (1) vírus mediált direkt sejt károsítás a gazdasejtek ACE2 receptorain keresztül (2) renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) diszregulációja (3) endotélserülés és tromboinflammáció kialakulása (4) immunrendszer diszregulációja, amely T-sejt depléciónhoz vezet, proinflammatorikus citokinek produkciójának túlsúlya (legnagyobb arányban IL-6 és TNFα). Az ábrát Gupta és munkacsoportja publikálta korábban.



5. ábra COVID-19 extrapulmonális manifesztáció. Az ábrát eredetileg Gupta és munkacsoportja publikálta (angol nyelven)



6. ábra COVID-19 asszociált koagulopátia sematikus ábrája. A speciális klinikai tünetegyüttes több vaszkuláris betegség egymást átfedő kombinációjának tekinthető: hemofagocitózis szindróma (HPS), az antifoszfolipid szindróma (APS), trombotikus mikroangiopátia (TMA), sepszis indukálta koagulopátia (SIC), disszeminált intravaszkuláris koagulopátia (DIC) jellemzőit hordozza magában. Az ábrát Schrick D. készítette, Toshiaki és munkacsoportja által publikált „Unique characteristics of COVID-19 coagulopathy” című

9. Hipotézis és célkitűzések

COVID-19 extrapulmonális manifesztációi közül a tromboembóliás komplikációk, hemoreológiai és koagulációs kaszkád-beli változások voltak érdeklődésünk középpontjában. Vizsgálatunk során célul tűztük ki:

- hemosztázis zavarok speciális aspektusainak feltárása
- összefüggések azonosítása a hagyományos hemoreológiai és hemosztázis paraméterek között a mortalitás és a trombotikus szövődmények vonatkozásában
- vérlemezke reaktivitás változásainak kimutatása
- megváltozott fibrinolitikus válasz kimutatása
- személyre szabott antitrombotikus stratégiák kidolgozása

10. Módszer

10.1. Vizsgálati alanyok

A prospektív pilóta tanulmányunkat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (20783-5/2020/EÜIG). A vizsgálat egy multicentrikus, kollaboratív kutatás (Simmelweis Egyetem) részeként jött létre, a tézis alapját képező vizsgálati

eredményeket a pécsi kutatócsoport végezte. A beavatkozások az 1975-ben megfogalmazott Helsinki Deklaráció etikai ajánlásai alapján történtek. Írásos beleegyező nyilatkozatot írtak alá a betegek (vagy súlyos állapot esetén legközelebbi hozzátartozója) és a kontroll csoport tagjai is. 21 súlyos SARS-CoV-2 fertőzés miatt (PCR-al igazolt) hospitalizált beteg került bevonásra a vizsgálatba. A betegek mindegyike oxigén szupplementációra szorult (nazális nagy áramlású O₂ terápia, non-invazív lélegeztetésre, vagy invazív lélegeztetésre szorult). A betegek a Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Koronavírus Ellátó Központ, Intenzív Osztályán feküdtek. Minden beteg 100mg/nap aspirin és profilaktikus LMWH kezelésben részesült, az antitrombotikus-antikoaguláns profilaxis helyi protokollja alapján. A vizsgálatban részt vevő betegek reguláris NSAID-ot nem szedtek, szükség esetén paracetamolt kaptak (pl. láz esetén), az analgeszedációt egységesen propofol ($\pm$ midazolam) és opioid (sufentanil) adagolásával biztosítottuk. A kontroll csoportba 21 egészséges SARS-CoV-2 PCR negatív egészségügyi dolgozó került beválogatásra.

10.2. Vértkép, éretlen vérlemezke frakció (IPF) meghatározás, eritrocita szedimentációs ráta (ESR), hs-CRP, ferritin, IL-6 mérések

A teljes vértkép meghatározást, valamint a neutrofil granulociták számszerű mérését a Sysmex XN 9000 integrált, automata hematológiai analizátorral végeztük. A trombociták számát a fluoreszcens csatornán keresztül detektáltuk. Ezen a csatornán a vérlemezkek speciális intracelluláris jelölését végeztük fluoreszcens festék alkalmazásával. Alapja az áramlási citometria, ahol a méréshez előre szórt fényt (FSC), oldalsó szórt fényt (SSC) és fluoreszcens fényt (SFL) használtunk. A sejtek számlálását követően a magas fluoreszcenciát mutató vérlemezkéket szeparáltuk, így képezvén az éretlen trombocita frakciót (H-IPF). Az eritrocita szedimentációs ráta a vörösvértestek ülepedését vizsgálja egy órás szedimentáció során, a mérés végén a tiszta plazma jelenléte alapján olvasható le annak értéke (mm/h). Magas szenzitivitású C reaktív protein meghatározását a betegek szérumából Roche Cobas 6000 teljesen automata kémiai analizátorral végeztük. Ferritin és interleukin-6 szinteket Cobas e801 teljesen automata analizátorral mértük, mindkét mérés egy elektrokemilumineszcens immuno-assay (ECLIA) segítségével történt, ami in vitro kvalitatív mérésekhez használtunk.

10.3. Véralvadási vizsgálatok

10.3.1. Rutin és speciális alvadológiai mérések

A rutin hemosztázis paramétereit (aPTT, D-dimer, fibrinogén) az ACL-TOP-750 analízátor segítségével mértük. A „speciális” tesztek az ACL-TOP-500 készülék (automatán kapuzott immuno-assay) segítségével végeztük el. A von Willebrand faktor antigén (vWF:Ag) és a von Willebrand faktor ristocetin kofaktor aktivitás (vWF:Rco) kvalitatív meghatározása fontos az endoteliális károsodás kiumatásában. A plazminogén (fibrinolízisben kritikus szereppel bír) és az alfa₂-antiplazmin (fibrinolitikus rendszer természetes regulátora) méréséhez automata kromogén-assayt használtunk.

10.3.2. Trombocita funkciós vizsgálatok

Az aspirin terápia monitorozására hirudinnal antikoagulált vérből, a mintavételt követő egy órán belül impedancia aggregometriás vizsgálatot végeztünk (Multiplate[®], ASPI teszt: arachidonsavat adtunk a vérhez az alvadás aktivációjához). Egyéb trombocita funkciós vizsgálatainkat az alábbi reagensekkel végeztük: ADP (ADP-teszt), trombin receptor aktiváló peptid-6 (TRAP-teszt), ristocetin (RISTO-teszt). Tekintettel az univerzális küszöbértékek hiányára, az ASPI teszt normál aggregációs tartománya AUC 75-115U volt, ADP-teszthez AUC 94-156U, TRAP-teszthez AUC 94-156U, RISTO-teszthez AUC 90-201U lett hozzárendelve, a gyártó leírásai alapján. Korábbi tanulmányokban „reszpondernek” deklarálták az AUC <40 értéket, míg „low-reszpondernek” az AUC ≥40 feletti értékkel rendelkező egyéneket.

10.3.3. Viszkoelasztikus vizsgálatok

Viszkoelasztikus méréseinket ClotPro[®] készülékkel végeztük. A rendszer az aktív pipetta-hegy technológiával dolgozik, ami azt jelenti, hogy a pipettákban indítóreagens található, amely 340 mikroliter vérrel keveredik a felszívás során. A mérés során van egy tű, ami fix pozícióban rögzített, és egy tégely, amely mozog, a vért ebbe helyezzük. Az alvadás beindulásával párhuzamosan észlelhető mozgási amplitúdó csökkenést elektromosan lehet detektálni, ez képezi a tromboelasztikus görbéket. Minden COVID-19 betegnél és a kontroll populációban is egységesen, ugyanazokat a méréseket végeztük el, melyek az alábbiak voltak: EX-teszt (szöveti faktor által aktivált próba polibrénnel), IN-teszt (ellagsavval aktivált próba), FIB-teszt (szöveti faktor által aktivált próba, a vérlemezkék funkciója nélkül), ECA-teszt

(ekarinnal indított alvadás), és tPA-teszt (rekombinás szöveti faktor aktivátor anyag az extrinsic úton indítja be az alvadási kaszkádot). Minden vizsgálatnál az alábbi paraméterek kerültek rögzítésre: alvadási idő (CT), alvadék képződési idő (CFT), alfa szög (az alvadék képződés amplitúdója egy meghatározott időben), maximális alvadék szilárdság (MCF), maximális lízis (ML) és lízis idő (LT). A súlyos koronavírus fertőzés miatt intenzív osztályon kezelt betegeket két csoportra bontottuk a fibrinolízis során észlelt különbségek kapcsán. Definíciónk alapján, a fibrinolitikus válasz csökkent volt, ha a lízis ideje több mint 393 szekundum volt (a vágóérték képzésének alapjául az irodalomban korábban fellelhető cikkek szolgáltak).

10.4. Adatgyűjtés és statisztikai analízis

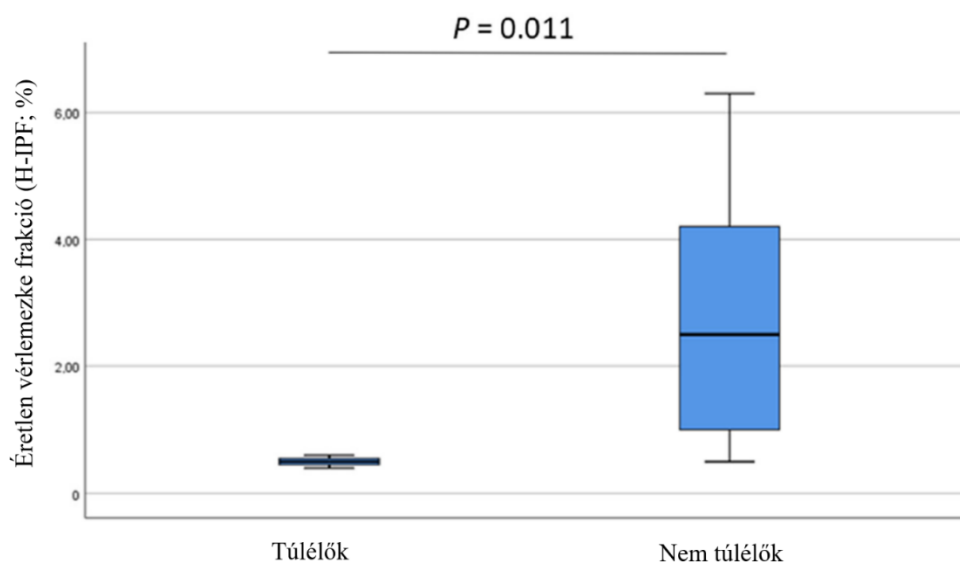
Komorbiditások, krónikusan szedett gyógyszerek és az aktuális terápiában alkalmazott gyógyhatású készítmények, teljes labor paraméterek és a szervpótló támogatások összességéről szóló adatokat gyűjtöttük össze a vizsgálatba beválogatott betegektől. A vaszkuláris események (akut koronária szindróma, iszkémiás stroke, tranzienis iszkémiás attack, tüdőembólia, mélyvénás trombózis) a betegpopulációban csak a hospitalizáció ideje alatt kerültek rögzítésre (tekintettel a magas mortalitásra további adatelemzéstől érdemi statisztikai különbség nem volt várható). Akut koronária szindrómát a jelenleg aktuális irányelveknek megfelelően definiáltuk (klinikum, EKG, nekroenzim kinetika). Agyi keringészavarok kimutatása klinikum függvényében CT-vel vagy MRI-vel történt. A vénás tromboembóliás események (pulmonális embólia, mélyvénás trombózis) a klinikai tünetek, laboratóriumi értékek és a radiológiai találatok alapján lettek diagnosztizálva.

Eredményeinket SPSS szofver segítségével elemeztük (IBM SPSS Statistics® 27.0). Kategorikus adatok (demográfia és klinikai faktorok) elemzésére χ^2 -próbát alkalmaztunk. A folyamatos, nem normál eloszlású adatokat a betegek és a kontroll csoport között Mann-Whitney tesztet használtuk össze. Ezzel szemben, a betegeknél az aspirin szedő és aspirin nem szedő csoportok közötti különbség feltárására egyirányú ANOVA-tesztet alkalmaztunk. A folytonos változók eloszlásának normalitás vizsgálatára Kolgomorov-Smirnov tesztet használtunk. A normál eloszlást mutató folyamatos változókat Student t-tesztet vizsgáltuk. A folytonos változókat medián, interkvartilis tartomány, átlag vagy standard hiba átlaggal jellemeztük. Korrelációs analízis során Spearman korrelációs koefficienssel számoltunk. A változók közötti összefüggéseket egy- és többváltozós lineáris regresszóval elemeztük, megfelelő béta értékekkel és 95%-os konfidencia intervallumokkal. Többváltozós logisztikus regressziót alkalmaztunk a csökkent fibrinolitikus válaszhoz társuló tényezők azonosítására. A p-értéket $<0,05$ tekintettük szignifikánsnak.

11. Eredmények

Prospektív, obszervációs, pilóta tanulmányunkba összesen 21 SARS-CoV-2 PCR pozitív beteg került bevonásra (átlag életkor: 69 év; IQR: 52–71; ebből férfi: 12). Kontroll csoportként életkorban, nemi arányokban megfeleltethető (átlagéletkor 67 év; IQR 63–69; ebből férfi: 11) 21 SARS-CoV-2 PCR negatív egészségügyi dolgozó szolgált. A betegek oxigén szupplementációt (nagy áramlású nazális oxigén terápia, non-invazív lélegeztetés, invazív ventiláció endotracheális tubuson keresztül), intenzív terápiás ellátást igényeltek. Nem meglepő módon, a beteg csoportban magasabb volt a vérsejt süllyedés, a D-dimer, von Willebrand faktor antigén szintje és a von Willebrand faktor ristocetin kofaktor aktivitás is magasabbnak bizonyult. A szérum ferritin és interleukin-6 szintek a normál tartomány felett voltak (ezt a két paramétert az egészségeseknél nem vizsgáltuk).

Az intenzív osztályt mindössze 3 beteg hagyta el élve, kiterjesztett intenzív terápiás ellátás és szervpótló kezelések ellenére 18 fő elhunyt. Az éretlen vérlemezke frakció (%) jelentős különbséget mutatott a túlélők és a nem túlélők között (2,5; 1,0–4,2 vs. 0,5; 0,45–0,55; $p = 0,011$), melyet a **7. ábrán** prezentálunk.



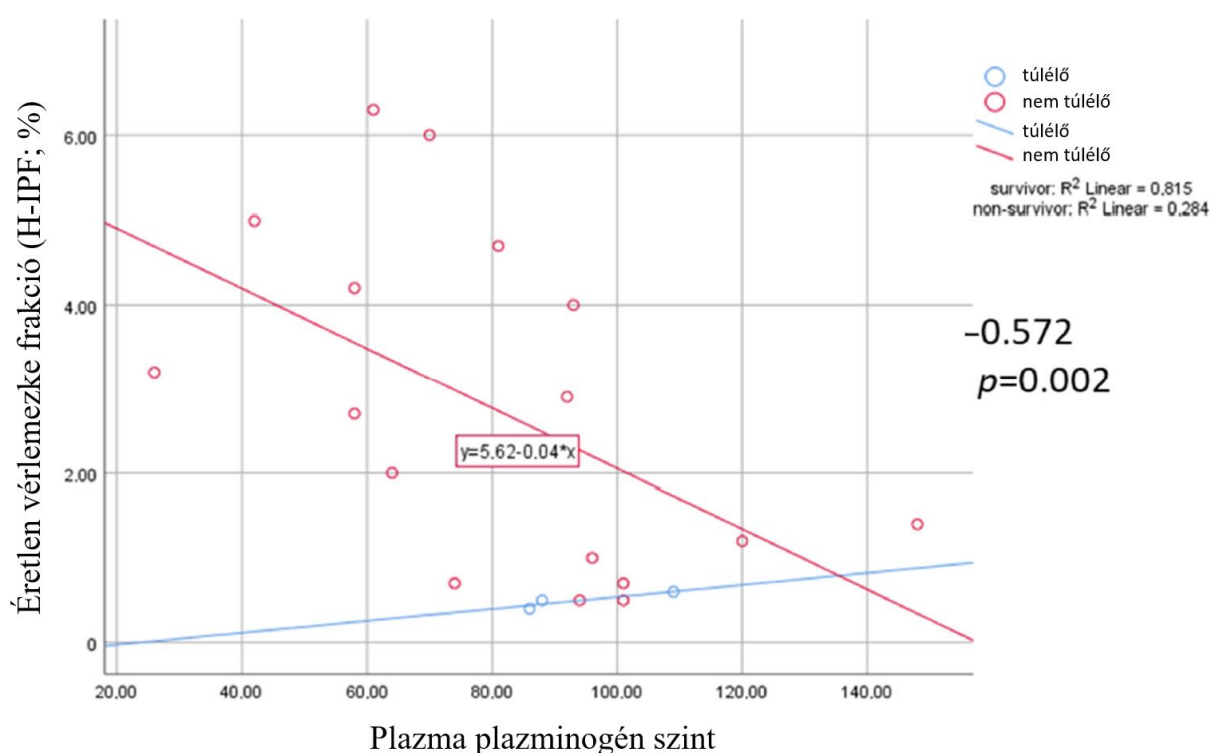
7. ábra Éretlen vérlemezke frakció (H-IPF; %) a túlélők és a nem túlélők alcsoportjában

Szignifikáns negatív korrelációt detektáltunk az éretlen vérlemezke frakció (H-IPF; %) és a plazma plazminogén (%) szintje között a nem túlélő egyének között (**8. ábra**).

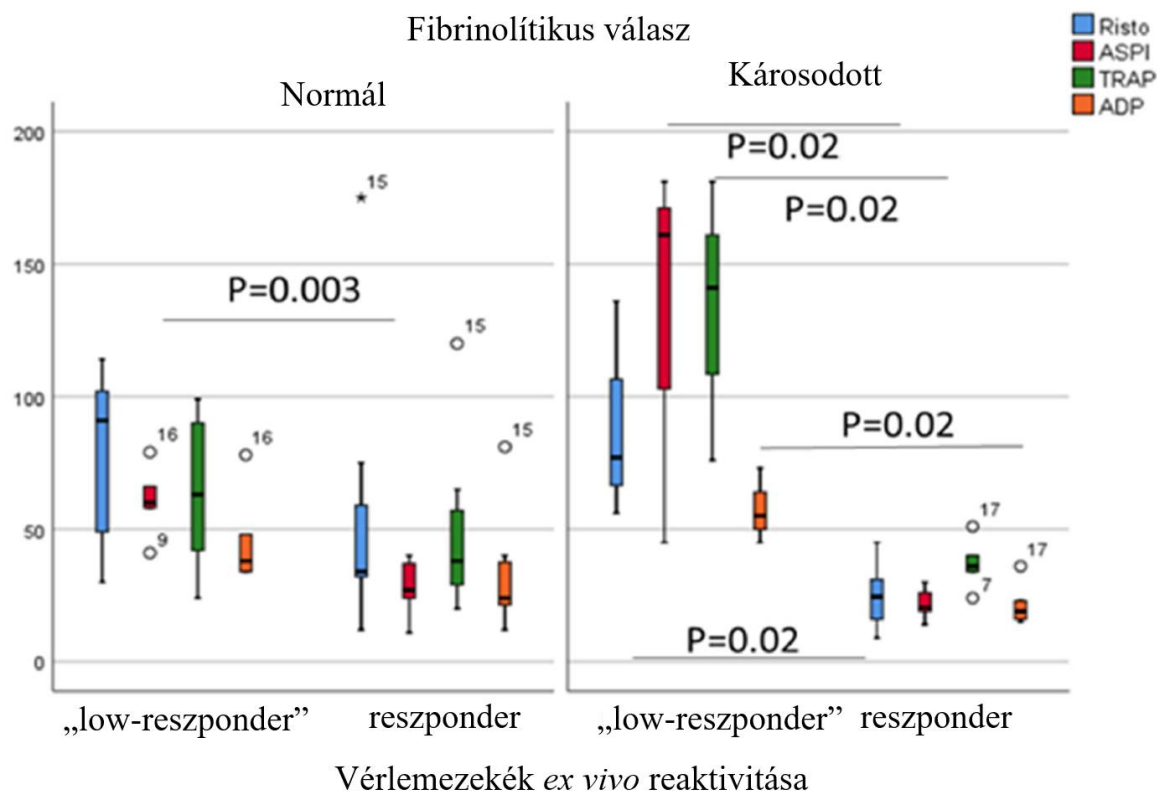
Aspirin monoterápia, vagy aspirin + LMWH (egységesen enoxaparin) együttes adása mellett, 8 betegnél alakult ki szimptomatikus tromboembólia a hospitalizáció ideje alatt. A betegeket az ex vivo vérlemezke reaktivitásuk alapján (Multiplate® impedancia aggregometria) két alcsoportra osztottuk. Aspirin terápia ellenére fennálló reziduális magas trombocita

reaktivitást (HAPR) észleltünk 8 betegnél, ASPI teszt esetén a vágóérték a HAPR státusz fennállására AUC >40 volt. A betegeket dichotomizáltuk a fibrinolitikus válaszuk alapján is (LT 393 szekundum alatt vagy felett), melyet összehasonlítottunk az aggregometriai mérési eredményeinkkel (ASPI-, Risto-, TRAP-, ADP teszt), ahol szignifikáns különbséget tapasztaltunk az aspirinre jól reagáló és kevésbé reagáló egyének között (egységesen, $p=0.024$). A fentebb részletezett eredményeket a **9.ábrán** foglaltuk össze.

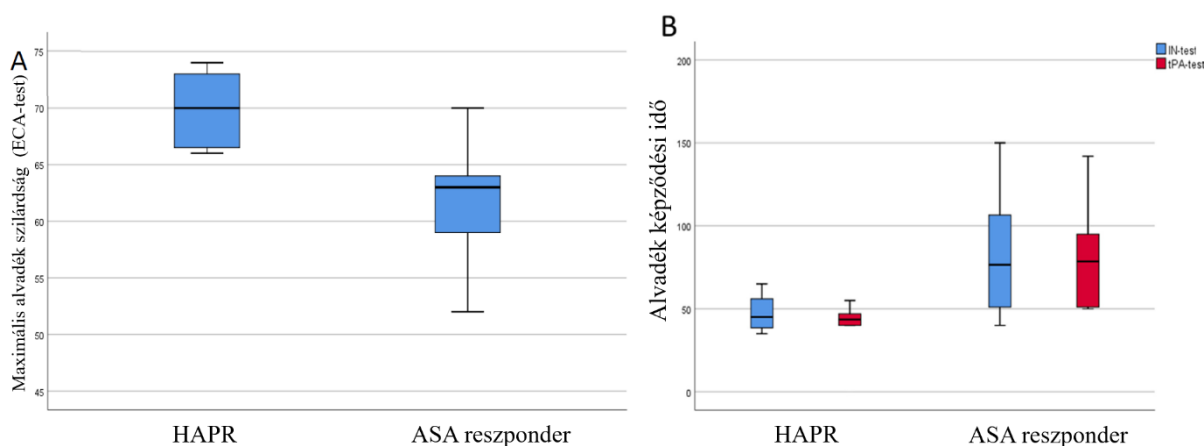
Maximális alvadék szilárdság (MCF) szignifikánsan magasabb volt (ECA-teszt esetén) a kezelés ellenére fennálló reziduális magas vérlemezke reaktivitással bíró embereknél ($n=8$), szemben az aspirinre jól reagáló betegcsoporttal ($n=13$), ezen eredmény azt mutatja, hogy az aggregáció gátló kezelés ellenére szilárd vérrögképződés alakulhat ki (**10.ábra**).



8. ábra Összefüggés az éretlen vérlemezke frakció (H-IPF; %) és a plazma plazminogén szintje között a túlélőkben (kék vonal) és a nem túlélőkben (piros vonal). Negatív korreláció volt megfigyelhető a nem túlélők alcsoportjában

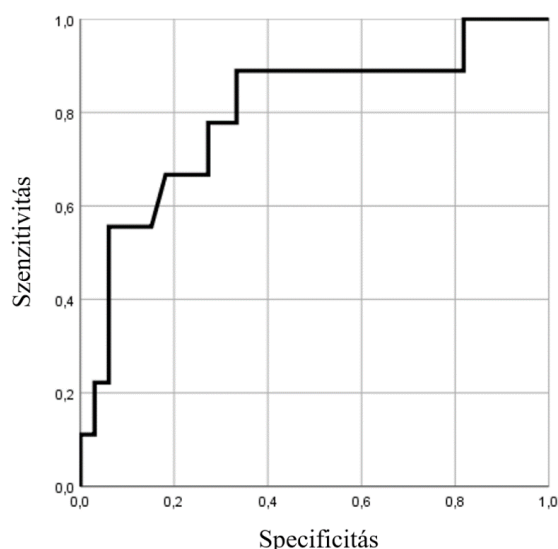


9. ábra Vérlemezke reaktivitás összehasonlítása a fibrinolítikus válasszal. A betegeket az aspirinre adott válaszuk alapján két alcsoportra bontottuk (aspirin „low-reszponderek” és „reszponderek”) (Mann-Whitney teszt)



10. ábra A: Maximális alvadék szilárdság (MCF) aspirin terápia ellenére fennálló reziduális magas trombocita reaktivitással bíró betegek és aspirinre jól reagáló (reszponder) betegek esetén ECA-teszt során (Mann-Whitney teszt). **B:** alvadék képződési idő (CFT) aspirin terápia ellenére fennálló reziduális magas trombocita reaktivitással bíró betegek és aspirinre jól reagáló (reszponder) betegek esetén IN- és tPA-tesztek esetén (Mann-Whitney teszt, $p=0,031$ és $p<0,001$)

Az alábbi, **11. ábrán** a plazma fibrinogén hipofibrinolízist előrejelző ROC (receivers operating characteristic) görbéje látható. A plazma fibrinogén szintje 3,86 g/l vágóértékkel (AUC of 0,800; 95% CI: 0,623-0,976; $p=0,006$), 78%-os szenzitivitással és 73%-os specificitással jelezte elő a fibrinolítikus válasz károsodását COVID-19 kritikus állapotú betegekben.



11. ábra Plazma fibrinogén szintje 78%-os szenzitivitással és 73%-os specifitással jelzi előre a hipofibrinolízist súlyos COVID-19 betegekben

12. Diszkusszió

A kis esetszám ellenére, a magasabb arányú fluoreszcens hiperintenzitást mutató éretlen vérlemezke frakció (H-IPF) előre jelezte a fatális kimenetelt súlyos koronavírus fertőzés esetén. Eredményeinket Welder és kutatócsoportja által végzett kutatás is alátámasztja, amelyben azt találták, hogy az éretlen vérlemezke frakció (IPF) prediktív lehet a hospitalizáció idejére, az intenzív terápiás ellátás igényére és a gépi lélegeztetés szükségességére vonatkozóan. Így az éretlen vérlemezke frakció meghatározása elősegítheti a kórházi anyag és humán erőforrások optimális allokációját a lehetőségekhez mérten a pandémia sújtotta területeken. Továbbá fontos megállapítás az is, hogy az éretlen trombocita frakció (IPF) összefüggést mutatott az alacsony plazminogén szinttel a nem túlélők csoportjában. Eredményeinket indirekt módon támogatja Bertolin és kutatócsoportja által, nemrégiben publikált tanulmány, amelyben leírták, hogy emelkedett plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1) aktivitás van jelen koronavírus fertőzés esetén, amely a plazminogén fokozott konzumpciójához, így annak alacsonyabb szintjéhez vezet.

A COVID-19 asszociált tromboembóliás rizikó fő tényezői közé tartozik az endoteliális diszfunkció (melyet az emelkedett von Willebrand faktor szint jól reprezentál), a gátolt fibrinolitikus működés (emelkedett PAI-1 aktivitás) és a diszregulált immunválasz (emelkedett CRP, IL-6, ferritin szint, ESR).

Az emelkedett von Willebrand faktor szint korrelál az endoteliális diszfunkció súlyosságával. A károsodott endotélium az ultranagy vWF multimerek szabaddá válását okozza, amelyek trombocita aktivációt, aggregációt, disszeminált koaguláció aktivációt

eredményezhetnek, ezáltal trombocita-leukocita aggregátumok alakulhatnak ki, mikrotrombusok képződnek, összességében a folyamat a vérlemezkék elhasználódásához vezethet, majd az éretlen trombociták perifériás vérben való megjelenését eredményezheti. Korábbi tanulmányokból ismert az, hogy COVID-19-ben jelentősen emelkedett vWF:Ag és vWF:Rco van jelen, amely a trombogenezis rizikóját fokozza. Statisztikai analízisünk során pozitív korrelációt észleltünk a vWF antigén szintje, az éretlen vérlemezkék aránya (H-IPF; %) és az aspirin ellenére fennálló reziduális magas trombocita reaktivitás között.

Kohorsz vizsgálatunkban ex vivo (impedancia aggregometriai vizsgálat) fokozott vérlemezke reaktivitási volt megfigyelhető (ASPI-, ADP-, Risto-, TRAP teszt esetében) a magasabb trombocita számmal bíró beteg populációban, valamint azokban az egyéneknél akiknél hipofibrinolitikus válasz (LT>393s) volt detektálható a viszkoelasztikus mérések során. Manne és munkatársa felfedezték, hogy ennek oka lehet a vérlemezke aktiváció során megnövekedett extracelluláris P-szelektin expresszió, ami a trombusképződés gyorsabb és fokozottabb terjedéséhez vezet, mind a fibrinogénen keresztül, mind a kollegénen keresztül induló alvadási kaszkád során. A trombocita aktiváció, aggregáció feltételezett koncepcióját Bachler és munkatársai által végzett kutatás eredményei is alátámasztották. Ezzel szemben Bertolin és kutatótársai alacsonyabb vérlemezke reaktivitást (ex vivo) figyeltek meg az aggregometriai méréseik során, az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva – mindezt annak ellenére tapasztalták, hogy a betegben a fibrinogén, a fibrin bomlástermékeinek a szintje, a plazminogén aktivátor inhibitor-1 szintje egyaránt magas volt és a tromboelasztometriás mérések is hiperkoagulabilitást mutattak.

Saját eredményeink alapján 21-ből 8 aspirint szedő betegnél tapasztunk fokozott vérlemezke reaktivitást az ASPI-teszt alapján. Viszkoelasztikus méréseink során, az ECA-tesztnél szignifikánsan nagyobb volt a kialakult alvadék szilárdsága (MCF) az aspirin kezelésre nem elég effektíven reagáló egyének között. IN- és TPA teszt során az alvadék képződési idő megrövidülése sejtette a vérlemezkék fokozott aktivitását az aggregáció gátló kezelés ellenére. Egy nagy eset számú, randomizált, kontrollált klinikai vizsgálat (RECOVERY) bebizonyította, hogy az aspirin kezelés nem javította a kórházban kezelt COVID-19 betegek túlélését. Nagyon fontos az aggregáció gátló kezelésre nem, vagy alacsony mértékben reagáló – magas tromboembóliás rizikóval bíró – betegek mielőbbi azonosítása. A rizikó stratifikációt követően lehet módunk a kezelési stratégián személyre szabottan változtatni, vagy alternatív prevenciók stratégiákat bevezetni (pl. PAI-1 antagonisták, szöveti plazminogén aktivátor, aktivált protein C, anti-P-szelektin monoklonális antitestek), ezáltal a COVID-19-hez társuló tromboembóliás szövődmények (melyek a mortalitás független rizikófaktorai) előfordulása csökkenthető.

Della-Morte és társai a plazminogént a fibrinolízis előfutáraként azonosítják, eredményeik alapján a plazminogén szint jelentősen alacsonyabb volt a nem túlélő betegekben, vizsgálatukban az alacsony plazminogén szint erősen korrelált a mortalitással. Kruse és munkatársai vizsgálataik során arra a következtetésre jutottak, hogy a plazminogén alacsonyabb szintje arra is utalhat, hogy az beépült a vérrögbe, azonban ineffektív volt a vérrög dezintegrációja, így abból felszabadulni nem tudott. Ennek oka az alfa₂-antiplazmin gátló hatásának köszönhető, amely a plazminnal szemben rezisztens trombusok képződését biztosítja, mindemellett a plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1) a szöveti plazminogén aktivátor (tPA) hatását blokkolja. E mechanizmusok nettó hatása a fibrinolízis leállítását eredményezi (az angol nomenklatura alapján „fibrinolysis shut down”), ami lízis rezisztens szisztémás mikrotrombusok kialakulásához vezet a különböző szervekben (különösen a tüdő kisereiben), valamint többszervi diszfunkcióhoz, többszervi elégtelenséghez is vezethet. A károsodott fibrinolitikus válasz független előre jelzőjeként a fibrinogént azonosítottuk (esélyhányadosa: 3,55, vágóértéke: 3,86 g/l).

A nem túlélő betegcsoportban csökkent aktivált parciális tromboplasztin időt (aPTT) mértünk. Vizsgálati eredményeinket, egy nemrégiben közzétett holland tanulmány is támogatja, amely a COVID-19-ben szenvedő intenzív terápiát igényelő betegeket értékelte. A kutatás a protrombin idő és az aktivált parciális tromboplasztin idő 3 szekundumnál hosszabb megnyúlását a tromboembóliás szövődmények független rizikófaktoraként igazolta. Saját vizsgálatunkban a tromboembóliás komplikációk csak a FIB-teszt során észlelt megrövidült alvadási idővel voltak összefüggésbe hozhatók, nem szignifikáns mértékben.

A D-dimer a térhálós fibrin lízisének bomlásterméke, a koagulációs és a fibrinolízis aktív voltát jelzi. Vizsgálatunkban az aspirinre kevésbé reagálók (ún. „low-responderek”) körében tPA-tesznél a lízis idő megnyúlását tapasztaltuk ($p=0,06$), azonban a D-dimer szintjében szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a két vizsgálati alcsoport között. Ezzel szemben nagyobb vizsgálatok deklarálták, hogy a D-dimer szint erős prediktora a betegség súlyosságának, mortalitásának. Zhang és munkacsoportja által írt tanulmányban a D-dimer szint független rizikófaktoraként szerepelt a COVID-19-ben szenvedő, hospitalizált betegek mortalitásában. Corrado és kollégái azt találták, hogy gyors ütemű D-dimer szint emelkedés volt megfigyelhető a nem túlélő egyének között. Vizsgálatunk csekély túlélési aránya miatt a halálozást függetlenül előre jelző biomarkereket nem sikerült azonosítanunk.

13. Limitáló tényezők

Eredményeink értékelése során fontos figyelembe venni számos limitáló tényezőt, melyek az alábbiak voltak:

- kis esetszám
- eredményeink újraértékelése szükséges egy nagyobb esetszámú vizsgálatban, különböző súlyosságú betegcsoportokban
- csak egy időpontban történt mintavétel, melyet hasznos lett volna több időpontban végezni, hogy a biomarkerek pontosabb kinetikáját láthassuk a kimenetellel összefüggésben
- sokkal rigidebb beválasztási és kizárási kritérium rendszert lett volna szükséges, ugyanis a diverz betegpopuláció korlátozza a kutatás általánosíthatóságát is

14. Új eredmények összefoglalása

14.1. Rekurrens cerebrovaszkuláris iszkémiás epizódokat előjelző új típusú biomarkerek

- a neutrofil antiszedimentációs ráta független előjelzőjének bizonyult a kompozit vaszkuláris eseményeknek clopidogrel szedő stroke-on átesett betegek 36 hónapos utánkövetése során

- a teljes vér egy órás szedimentációját követően, felső vérfrakcióból végzett elektromos impedancia aggregometriai vizsgálat ($AUC_{\text{felső}}$) előre jelezte az iszkémiás stroke újboli előfordulását clopidogrel szedő stroke-on átesett betegek 36 hónapos utánkövetése során

- sokkal pontosabb ROC analízis volt végezhető, amikor a NAR és az $AUC_{\text{felső}}$ -t együttesen vizsgáltuk a recidív iszkémia előrejelzésére

- a perifériásan keringő mikrovezikulumok teljes száma, valamint az endotél eredetű ($CD31^+$) és a vérlemezke eredetű ($CD42a^+$) mikrovezikulumok szignifikánsan magasabb volt a post-stroke betegekben összehasonlítva őket az életkorban egyező, egészséges kontroll csoporttal szemben

- pozitív korreláció volt megfigyelhető a vérlemezke eredetű mikrovezikulumok száma és az alsó vérfrakcióban lévő neutrofilok aránya között, mely egy szoros együttműködést feltételez a prokoaguláns mikrovezikulumok és a tromboinflammatorikus kaskád között, melyek a rekurrens iszkémiás epizódok rizikófaktorainak tekintendők

14.2. Új típusú biomarkerek a károsodott fibrinolitikus kimutatására súlyos COVID-19-ben

- könnyen mérhető, jól reprodukálható fibrinogén 3,55 esélyhányadossal a károsodott fibrinolízis független prediktorának tekintendő

15. Scientometria

Tudományos közlemények (MTMT alapján, 2022.12.31-én)

Összes: 6

Angol nyelvű folyóiratban megjelent: 4

Impakt faktorok (MTMT alapján, 2022.12.31-én)

Első szerző: 12.782

Kumulatív: 14.523

Publikációk listája

A tézis alapját képező, első szerzőként publikált tanulmányok

Schrack D, Ezer E, Tokes-Fuzesi M, Szapary L and Molnar T (2021) Novel Predictors of Future Vascular Events in Post-stroke Patients—A Pilot Study. *Front. Neurol.* 12:666994. doi: 10.3389/fneur.2021.666994 (Q1; IF: 5.581)

Schrack D, Molnár T, Tőkés-Füzesi M, Molnár A, Ezer E. Circulating Microvesicles in Convalescent Ischemic Stroke Patients: A Contributor to High-On-Treatment Residual Platelet Reactivity? *Front. Biosci. (Landmark Ed)* **2022**, 27(5), 158. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2705158> (Q2; IF (2021): 3.115)

Schrack D, Tőkés-Füzesi M, Réger B, Molnár T. Plasma Fibrinogen Independently Predicts Hypofibrinolysis in Severe COVID-19. *Metabolites*. 2021 Nov 30;11(12):826. doi: 10.3390/metabo11120826. PMID: 34940584; PMCID: PMC8708410. (Q2; IF: 5.581)

Egyéb publikációk

Ezer E, **Schrack 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 Microcirc.* 2019;73(2):359-369. doi: 10.3233/CH-190580. PMID: 31156147; PMCID: PMC6971826 (Q2; IF: 1.741)