

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Invazív terápiás beavatkozások hatása az endothel- és
thrombocyta aktivációra krónikus totális coronaria oclusióban
szenvedő betegekben**

Dr. Illési Ádám

Témavezető: Dr. Szük Tibor István



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2024.

**Invazív terápiás beavatkozások hatása az endothel- és thrombocyta
aktivációra krónikus totális coronaria occlusióban szenvedő betegekben**

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

Írta: Dr. Illési Ádám okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szük Tibor István, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Kerekes György Ferenc, PhD
Dr. Ruzsa Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, MTA doktora
tagok: Dr. Kerekes György Ferenc, PhD
Dr. Ruzsa Zoltán, PhD
Dr. Lőrincz István, PhD
Dr. Tar Balázs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület, 2024. augusztus 27., 10:00.

Bevezetés és irodalmi áttekintés

1. A krónikus totális coronaria occlusio

A krónikus totális occlusio (CTO) az ischaemiás szívbetegség (ISZB) egy megjelenési formája, melyről akkor beszélünk, ha legalább három hónapja fennálló 100%-os elzáródást (Thrombolysis in Myocardial Infarction 0 flow) diagnosztizálunk valamely epicardialis artérián. A diagnosztikus coronaria angiographián átesett betegek kb. 20%-át érinti. Az ISZB alapvetően a szívizomzat oxigén igényének és kínálatának reverzibilis megbomlását jelenti, melynek kialakulásában az atherosclerosis folyamata a meghatározó. Ezen patológiai entitásra jellemző, hogy az ér lumenébe atheroscleroticus plakkok, intimalaesiók türemkednek, melyek az ér lumenét szűkítik, így akadályozzák a vér áramlását. Ennek legjellemzőbb tünete az eleinte csak fizikai terhelésre kialakuló retrosternalis mellkasi fájdalom, de gyakran jár verejtékezéssel, légszomjjal, nehézlégzéssel, epigastriális fájdalommal, hányinger-hányással.

2. A krónikus totális occlusio kezelése

Mivel a CTO az ISZB egyik megjelenési formája, így a terápiája ugyanazokat az elemeket tartalmazza, mint az ISZB kezelése. Alapvető fontosságúak az életmódbeli változtatások. Társbetegségek esetén a rizikófaktorok kontrollja is esszenciális. Az életmódbeli változtatások után második lépés az optimális gyógyszeres terápia alkalmazása, melyből kiemelendő a thrombocyta aggregatio gátlók csoportja. Ezen szerek szekunder prevenció esetén kedvezőek a prognózis szempontjából, hiszen egy coronariabeteg esetén nagyobb az esélye annak, hogy vérlemezkék thrombogén felszínnel érintkezzenek, ezáltal aktiválódjanak és thrombus formálódjon. Amennyiben felmerül az ISZB lehetősége, az optimális gyógyszeres terápia felépítése után diagnosztikus coronaria angiographiára kerülhet sor. A kontrasztanyaggal történő érfestés során derül ki, hogy az atherosclerosis milyen mértékben involválja a coronaria rendszert. Jelentős stenosis esetén azok számától, mértékétől függően revascularisatióra kerül

sor, mely kétféleképpen történhet: percutan coronaria intervencióval (PCI) vagy CABG műtéttel (coronary artery bypass graft). A revascularisatio legmegfelelőbb módjának kiválasztásakor a SYNTAX score lehet segítségünkre: ez a laesiók anatómiai jellegzetességeit figyelembe véve segíti a döntést. A jelenleg érvényes, az ESC által 2018-ban kiadott myocardium revascularisatióra vonatkozó ajánlás szerint a CTO percutan recanalizálása IIa osztályú, B típusú evidencia alapján javasolt.

3. A percutan coronaria intervencio CTO esetén

Ezen beavatkozás bőrön keresztüli katéteres koszorúér intervenciót jelent. A behatolási kapu általában az arteria radialis, bár CTO-k recanalizálása során általában arteria femoralis punkciójára is sor kerül. Ezt követően a műanyag hüvely (sheath) Seldinger-technikával történő felvezetése következik. A vezetőkatéter coronariaszájadékhoz való pozicionálása után egy speciális vezetődrótot (guidewire) juttatnak a koszorúérbe, a tágítani kívánt szűkületen áthaladva. Rendszerint egy ballonos előtágítás után történik a stentnek nevezett fémháló implantálása. A CTO-k revascularisatiója kapcsán is ezekből épülnek fel a beavatkozás lépései, van azonban néhány lényeges különbség, amely döntően a krónikus elzáródás anatómiai sajátosságainak köszönhető. Minthogy az elzáródott érszakasz biológiailag aktív, a belsejében lejátszódó recanalisatio, neovascularisatio és különböző gyulladásos folyamatok változatos összetételű és tulajdonságú laesiókat eredményeznek. Az elzáródás kialakulásának idejétől függően változhatnak az érintett érszakasz tulajdonságai: egy nem túl régi occlusio túlnyomórészt puha, magasabb lipid tartalmú, kevésbé fibrotikus és meszes, míg egy régebbi, egy évnél idősebb elzáródás denz, fibrotikus, nagymértékben kalcifikált területeket tartalmazhat kevesebb mikrocatornával. Az elzáródott érszakasz hossza az egyik legjelentősebb tényező a CTO-PCI kimenetelére vonatkozóan: a 20 mm-nél hosszabb laesio erős prediktornak bizonyult az elzáródáson való sikertelen átjutást illetően. Mindezen anatómiai és szövettani sajátosságok révén a CTO kapcsán végzett percutan intervenciók sikeraránya

elmarad a non-occlusiv stenosisok miatt végzett PCI sikerarányától. A fentebb részletezett okok miatt a non-occlusiv PCI során használatos vezetődrótok nem megfelelőek. A CTO-PCI-ra fejlesztették ki a speciális, merevebb, hegyesebb vezetődrótokat, és az ezeknek támasztékot adó mikrokatótereket, melyek segítségével eredményesebben lehet átjutni az elzáródáson.

CTO-PCI esetén többféle technika alkalmazható, melyek két nagy csoportra oszthatók. Az egyik leggyakrabban használt eljárás az anterograd irányból, a proximális sapka felől történő megközelítés, míg a másik csoportba a retrograd technika tartozik, ennek során egy collateralis érszakasz felől közelíthető meg a krónikusan elzáródott érszakasz distalis része. Mindkét eljárás kétféleképpen valósítható meg: egyik az drót eszkalációs (wire escalation, WE) technika, amelynek során az ér lumenén belül történik meg a laesio megoldása. A másik csoportba a subintimális dissectio – reentry (DR) eljárások tartoznak, ekkor a laesiót az érfal intimája alá behatolva kerülik meg, majd vezetik vissza a drótot az ér lumenébe. Ennek során a ballonos tágítás és stent deponálás is a subintimalis térben történik. Retrograd technika esetén legtöbbször a reverse controlled antegrade and retrograde tracking (rCART) technika használatos, melynek során anterograd és retrograd irányból is megkezdődik a CTO body-n való átjutási kísérlet.

4. Érsérülés kapcsán bekövetkező változások endothelsejtekben

Az endotheliumot az endothelsejtek monocelluláris rétege alkotja, az erek és nyirokerek belső falát béleli. Az endothelium számos anyagot és faktort termel, bocsát a keringésbe. Értágító, vasodilatator hatású, endothelsejtek által termelt anyag pl. a nitrogén-monoxid (NO), prostacyclin, bradykinin, míg érösszehúzó, vasoconstrictor hatással rendelkezik az endothelin, az angiotenzin II, tromboxán A₂ (TXA₂). Ezen faktorok a thrombocytaaktivációra is hatással vannak, a vasodilatatiót kiváltó anyagok általában gátolják, míg a vasoconstrictiót okozó faktorok serkentik az aktiválódást. Az endothelsejtek által termelt adhesiós molekulák gyulladásosejtek kitapadását és migrációját segítik. A normál haemostasis fenntartásában is

közreműködik az endothelium pro- és antikoaguláns anyagok termelésével. A prokoaguláns faktorokat sérülés kapcsán termeli az endothelium és a thrombocytáaktiváció elősegítése irányába hatnak, míg az antikoaguláns faktorok gátolják a thrombocyták aktiválódását, aggregációját, és segítik a fibrinolízist. Élettani körülmények között az egymással ellentétes hatású faktorok termelődése és lebomlása egyensúlyban van, ám fizikai, kémiai, immunológiai, mechanikai (pl. az érfal sérülése) és egyéb ingerek hatására az endothelium sérül, endothel diszfunkció alakulhat ki, mely az említett egyensúly felborulásával, ezáltal fokozott thrombosis rizikóval jár.

5. Érsérülés kapcsán bekövetkező változások thrombocytákban

A thrombocyták megakaryocytákból leszakadó, majd a keringésbe kerülő apró, sejtmag nélküli fragmentumok. Elsődleges szerepük a vérzéscsillapításban van: vérrögöt képezve eltömeszelik az érsérülés helyét, majd felületet biztosítanak a véralvadás további folyamataihoz. Atheroscleroticus plakk rupturája és egyéb érsérülés esetén a thrombocyták az ECM alkotóelemeivel, és adhéziós fehérjékkel érintkeznek, elindítva ezzel egy folyamatot, mely a vérlemezkék kitapadásához, aktiválódásához és aggregációjához vezet. Az alvadékképződés a thrombocyták kitapadásával indul, melynek folyamata közben megkezdődik a thrombocyták aktivációja is, amely az α - és δ -granulumok tartalmának szekréciónak jár. Az α -granulumokból P-selectin (CD62P) adhéziós fehérje kerül ki a vérlemezkék membránjára, valamint fibrinogén, fibronektin, V. és VIII. faktorok, thrombocytá 4-es faktor, thrombocytáeredetű növekedési faktor jut a keringésbe. A δ -granulumok adenzin-difoszfátot (ADP), adenzin-trifoszfátot (ATP), adrenalint, szerotonint, hisztamint és ionizált kalciumot tartalmaznak. Ezek közül a kalcium és az ADP kitüntetett jelentőséggel bír, hiszen a kalcium több alvadási faktor aktiválódásához szükséges, míg a P2Y₁₂ receptorhoz kapcsolódó ADP a nyugvó thrombocyták fontos aktivátora. Az aktivált vérlemezkék közben TXA₂-t is szintetizálnak, mely szintén a környező thrombocyták aktiválásában vesz részt. Ezen

történésekkel párhuzamosan a véralvadási folyamat harmadik összetevője, a koagulációs kaszkád is aktiválódik, melynek végén trombin keletkezik, ez a thrombocyták felszínén lévő proteázaktivált receptort (PAR) aktiválja, további aggregációt előidézve, valamint a fibrinogént fibrinné alakítva hozzájárul a véralvadék stabilizálásához.

6. A mikroRNS-ek szerepe

A mikroRNS-ek (miRNS) rövid, általában 18-25 nukleotidból álló RNS molekulák, melyek fehérjét ugyan nem kódolnak, viszont egyes messenger RNS-ek (mRNS) transzlációját befolyásolják azáltal, hogy a cél-mRNS molekula 3' nem kódoló régiójához kapcsolódnak. Ennek eredménye rendszerint az adott fehérje szintézisének gátlása, de akár az mRNS degradációja is bekövetkezhet. Szerepük a sejtek fiziológias működéséhez szükséges gének expressziójának poszttranszkripciós szinten történő finomszabályozásában van. Egy miRNS akár több száz mRNS szabályozásában is részt vehet, míg egy gént akár több tucat miRNS is regulálhat. A miRNS-ek a különböző szövetekben különböző mértékben expresszálódnak, megváltozott kifejeződésüknek pedig számos betegség kialakulásában lehet szerepe. A miRNS-223 például a thrombocyták aktiválásában fontos szerepet játszó P2Y₁₂-receptor expresszióját képes alulszabályozni. A miRNS-126 szintén befolyásolja a thrombocytaaktivációt, főleg a felszíni fehérjék expressziójának (beleértve a P2Y₁₂-receptort) regulálásával, de endothelsejtek is expresszálják, az atherosclerosis folyamataiban is azonosították. Harris és mtsai vizsgálata alapján a miRNS-126 emelkedett szintje a VCAM-1 koncentrációjának csökkenését okozza. A miRNS-181b egy főleg endothelsejtek által expresszált miRNS, csökkent expresszióját Fejes és mtsai emelkedett VCAM-1 és E-selectin szintekkel hozták összefüggésbe coronaria stentelés után, míg fokozott expressziója a trombin-indukált endothelsejt aktivációt gátolta egy másik kutatás eredményei alapján. A keringő miRNS-ek számos betegség laboratóriumi vizsgálatában alkalmas biomarkernek bizonyultak.

7. A vizsgálat megalapozottsága

A CTO-PCI esetenként komolyabb kihívás elé állítja az interventiós kardiológust, hiszen az occlusio dróttal való penetrációja és a stent lejuttatása korántsem egyszerű feladat. A beavatkozás alatt szükség lehet a mikrokatóterek és CTO-drótok cseréjére is. A meszes laesio dróttal való passzálása után a legkisebb, első tágító ballon megfelelő lokalizációba való jutattása gyakran problémás. Retrograd megközelítés esetén a collateralisokon való átjutás időigényes, ahogy a megfelelő supportot adó guiding pozíció elérése is. Reentry technika esetén a valódi lumenbe való visszatérés szintén hosszadalmas lehet. Mindezek miatt a beavatkozás gyakran elhúzódik, az eszközökkel való manipuláció, a ballonos tágítás és stent implantatio miatt a vérlemezék és a véralvadási kaskád jelentős aktiválódása várható, melyek a beavatkozás rövid és hosszú távú hatékonyságát befolyásolhatják. A korai reocclusiók és stent thrombosis (ST), illetve a késői restenosisok gyakorisága arányos lehet a fokozott thrombocyta aggregáció és endothel aktiváció hajlammal.

Célkitűzés

Vizsgálataink célja a különböző technikákkal elvégzett CTO-beavatkozások során mérhető thrombocyta- és endothelaktiváció mérése és összehasonlítása különböző thrombocyta- és endothelaktivációs markerek meghatározásával és a véralvadási folyamatok szerepének vizsgálata a korai és késői komplikációkban.

Célkitűzésünk megvalósításához két főbb részre bontottuk kutatásunkat: első részében a két alapvető CTO-PCI technika (WE és DR) sejtaktiváló hatását kívántuk összehasonlítani bizonyos endothelsejt aktivációs markerek mennyiségi meghatározásával és trombingenerációs (TG) teszt elvégzésével, ezen vizsgálatokat klinikai utánkövetéses adatokkal egészítettük ki, hogy a beavatkozások biztonságosságát meg tudjuk ítélni.

Kutatásunk második részében a beavatkozások karakterisztikájával, technikai paramétereivel összefüggő aktivációs markerek mennyiségi változásaival foglalkoztunk. Ezek megállapításához thrombocytaaktivációs vizsgálatokat, valamint néhány szelektált mikroRNS relatív expressziójának meghatározását végeztük el.

Betegek és módszerek

1. A betegpopuláció

2019 januárja és 2020 szeptembere között 65 olyan beteget vontunk be a vizsgálatba konszekutív módon a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Kardiológiai és Szívsebészeti Klinikáján, akik elektív CTO-PCI miatt kerültek felvételre. A beválasztási kritériumok között szerepelt a betöltött 18. életév, a coronarographiával igazolt CTO, az elzáródástól distalisan életképes szívizomszövet megléte, a beavatkozás előtt fennálló kettős thrombocyta aggregatio gátló kezelés, valamint a beteg írásos tájékoztatott beleegyezése. Kizárásra kerültek azok a betegek, akiknél a revascularisatiós kísérlet sikertelen volt, valamint súlyos, életet veszélyeztető szövődmény lépett fel a beavatkozás alatt. Szintén kizárási kritérium volt a zajló acut coronaria syndroma, aktív malignus betegség és a terhesség. Chronicus totalis occlusiónak tekintettük a coronarographiával igazolt, legalább 3 hónapja fennálló teljes elzáródást (TIMI flow 0). Sikeresnek tekintettük azokat a beavatkozásokat, melyek után 30%-nál kisebb átmérőcsökkenés maradt vissza a kezelt érszakaszon és TIMI 3 áramlás állt helyre.

2. A vizsgálat leírása

Elsőként a betegek tájékoztatása és a beleegyező nyilatkozatok aláírása történt meg. Ezt követően a betegek anamnesztikus adatai (beleértve az aktuális gyógyszeres terápiát), klinikai paraméterei, vércsoportjai kerültek rögzítésre. Betegeinktől három különböző időpontban vérmintákat gyűjtöttünk, amelyekből sejtaktivációs markerek mennyiségét határoztuk meg. A perifériáról nyert vérminták felhasználásával mértük a thrombocyták felszíni P-selectin expresszióját, a solubilis P-selectin, solubilis VCAM-1, solubilis ICAM-1 és vWF antigén (Ag) koncentrációját, valamint a mikroRNS-223, -181b és -126 relatív expresszióját. A véralvadási folyamatok szerepének megítéléséhez trombingenerációs tesztet használtunk. Az első vérvétel a beavatkozás előtt perifériás vénából történt, míg a második és harmadik mintavétel az

interventio után 48 órával és 3-6 hónappal később szintén perifériás vénából történt. A második és harmadik vérmintából meghatározott aktivációs markerek mennyiségét mindig a kiindulási mintákban mért eredményekkel hasonlítottuk össze valamennyi betegcsoport esetében. A harmadik vérvétel időpontjában, melyre 3-6 hónappal később, a betegek ambuláns kontrollvizsgálatakor került sor, értékeltük a betegek klinikai állapotát, szubjektív panaszait. Az utánkövetési idő alatt dokumentáltuk a súlyos, nemkívánatos cardiovascularis események (MACE: major adverse cardiovascular event) gyakoriságát. Ezen klinikai végpont a stroke, myocardialis infarctus, halálozás és a kezelt éren végzett ismételt beavatkozások (TVR: target vessel revascularization) gyakoriságából tevődött össze. A beavatkozások karakterisztikája, és az ezekkel összefüggő sejtaktivációs markerek mennyiségi változása közötti összefüggések feltárásához a betegpopulációt 4 szempont alapján csoportokra bontottuk. A WE vs DR összehasonlításon túl japán CTO score (J-CTO score), a beavatkozás hossza, és az implantált stentek összesített hossza alapján osztottuk fel populációnkat. A betegeket alacsony (J-CTO score 0 vagy 1, n=24) és magas pontszámú (J-CTO score 2 vagy 3, n=26) csoportokba soroltuk. A beavatkozás hossza alapján rövidebb (40-117 perc, n=24) és hosszabb (118-255 perc, n=20) intervenciókat különböztettünk meg, míg az összesített stenthossz szerint szintén rövidebb (16-53 mm, n=22) és hosszabb (54-127 mm, n=28) csoportokat alakítottunk ki.

3. Laboratóriumi vizsgálatok

A thrombocyták felszíni P-selectin expressziójának teljes vérmintából történt, ezt 1%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk. A thrombocyták festéséhez CD42a FITC, CD62P és Platelet Control IgG1 antitesteket (Becton Dickinson) használtunk. Minden egyes vizsgálatkor 10 000 vérlemezkét elemeztünk minden mintából FC 500 áramlási citométer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) segítségével.

A solubilis fehérjék koncentrációit enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) vizsgálat segítségével határoztuk meg. Ehhez a fagyasztott plazma mintákat kiolvasztásuk után tovább

centrifugáltuk 10 000 g-n 1 percig, szobahőmérsékleten. A solubilis P-selectin koncentrációk megállapításához Quantikine ELISA Human P-selectin/CD62P Immunoassay ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) kitet használtunk a gyártó ajánlásainak megfelelően. A solubilis VCAM-1 koncentrációkat Quantikine ELISA Human VCAM-1/CD106 Immunoassay ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével, míg a solubilis ICAM-1 koncentrációkat sICAM1 ELISA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) felhasználásával határoztuk meg. A plazma vWF Ag szinteket immunoturbidimetriás módszer segítségével állapítottuk meg (BCS XP, Siemens, Munich, Németország).

Az extracelluláris miRNS-ek (miR-223, miR-181b, miR-126) relatív expresszióját perifériáról nyert plazmamintákból határoztuk meg. Miután a -80 °C-on tárolt mintákat kiolvastottuk, az ELISA vizsgálathoz hasonlóan szintén 10 000 g-n történő, egy perces centrifugálás következett szobahőmérsékleten. A sejtmentes szupernatánsból 400 µL-t különítettünk el, amelybe 5 pmol mirVana cel-miR-39 mimic (Ambion, Austin, TX, USA) spike-in control került. Ehhez a referencia génhez viszonyítottuk később a plazmában mérhető mikroRNS-ek expresszióját. A keringő mikroRNS-eket ezután miRNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. Ezután mikroRNS-specifikus stem-loop reverz transzkriptáz (500nM, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) és TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Vilnius, Litvánia) alkalmazásával az izolált RNS-ek cDNS-sé történő átírása következett a gyártó előírásainak megfelelően. A mikroRNS-ek quantifikálása RT-qPCR-ral (real-time quantitative polymerase chain reaction) történt, amelyhez univerzális reverz primert (100 µM, Integrated DNA Technologies), mikroRNS-specifikus forward primert (100 µM, Integrated DNA Technologies), Universal Probe Library #21-es próbát (10 µM, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország), Taq DNS polymeráz enzimet (5 U/µL, Thermo Scientific, Vilnius, Litvánia) és deoxynucleotid (dNTP) mixet (2,5 mM, Thermo Scientific) használtunk. Minden mérés triplikátumban történt QuantStudio 12K Flex qPCR készülék

(Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével. Az eredmények normalizálásához a már említett cel-miR-39 referencia gén expresszióját is meghatároztuk minden mintában ugyanezen qPCR módszer felhasználásával. Az oligonukleotidokat és az RT-qPCR vizsgálatot a Czimmerer és munkatársai által kifejlesztett szoftver (version 3.4) segítségével terveztük meg.

A trombingenerációs tesztek a betegek thrombocytaszegény plazmáiból végeztük, amelyet citrátos vér kétlépeses centrifugálásával nyertünk. Először 1 500 g-n 15 percig, majd 10 000 g-n 10 percig centrifugáltuk a plazma mintákat szobahőmérsékleten. A plate minden üregébe 80 μ L PPP és 20 μ L reagens került, mely a trombinképződés beindításához volt szükséges, és 1pM szöveti faktort és 4 μ M foszfolipidet tartalmazott. 10 perces, 37 °C-on való inkubálás után 20 μ L FluCa (fluorogén szubsztrát és kalcium puffer) hozzáadásával indult el a trombinképződés. A képződött trombin mérésére Fluoroskan Ascent FL fluorimétert és Thrombinoscope szoftvert (Thrombinoscope BV, Maastricht, Hollandia) használtunk. A fluoreszcens jelet a készülék regisztrálta, és trombingenerációs görbével jellemezte a reakció kinetikáját. A képződött trombin mennyiségi leírására a thrombin peak-t (a legmagasabb trombinkoncentráció, nM) és az endogén trombin potenciált (ETP: endogenous thrombin potential: a görbe alatti terület, nM x min) használtuk, míg a trombinképződés kinetikáját a késleltetési idővel (lagtime, min) és time to peak-kel (ttPeak, a maximális trombinaktivitás elérésének ideje, min) jellemeztük. A méréseket a gyártó ajánlásainak megfelelően végeztük.

4. Statisztikai elemzés

A statisztikai számítások elvégzéséhez SPSS szoftvert (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0., Armonk, NY, USA) használtunk. Az eredmények ábrázolása GraphPad Prism program (Version 8.0.1., San Diego, CA, USA) segítségével történt. Az adatsorok normalitását Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük. A normál eloszlású folyamatos változókat átlag \pm szórás (standard deviation, SD), míg a nem normál eloszlásúakat medián és interquartilis

tartomány (IQR) formátumban tüntettük fel. A populáció különböző alcsoportjainak összehasonlítását Mann-Whitney U vagy Wilcoxon teszt alkalmazásával végeztük. Az utánkövetés során nyert, klinikai állapotra vonatkozó kategorikus adatokat Chi²-teszt segítségével értékeltük. Az interventio típusa (WE vagy DR) és a változók közötti összefüggéseket lineáris regressziós analízis segítségével tártuk fel. Az eredményeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a p értéke < 0,05. Azon betegeknél, akiknél a harmadik laboratóriumi mérés eredménye hiányzott (n = 4), a hiányzó adatokat az utolsó ismert számértékkel helyettesítettük (last observation carried forward: LOCF).

Eredmények

1. Általános betegadatok

59 beteget válogattunk be a vizsgálatba, közülük 50 esetben (84,7%) történt sikeres intervenció. Az 50 beteg átlagéletkora $61,78 \pm 8,72$ év, közülük 60% férfi. A medián utánkövetési idő 8,5 hónap volt. A demográfiai jellemzőkből és általános klinikai adatokból kiolvasható, hogy a vizsgálatunkban részt vevő betegek egy idős, több társbetegséggel rendelkező betegpopulációt alkottak. A sikeres revascularisation átesett 50 betegből 29 esetben (58%) a drót eszkalációs, míg 21 esetben (42%) a subintimalis dissectio technika vezetett eredményre. A két alcsoport általános jellemzői, valamint kiindulási, rutin diagnosztikában használatos laborparaméterei alapján megállapíthatottuk, hogy a két csoport homogénnek tekinthető, sem az anamnesztikus adatokban, sem pedig laborértékekben nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns különbség.

2. WE és DR technikák összehasonlítása

2.1. Endothel aktivációs markerek

A drót eszkalációs technikával kezelt betegcsoportban nem találtunk szignifikáns különbségeket a VCAM-1 koncentrációkat vizsgálva sem a beavatkozás után 48 órával, sem a 3-6 hónappal később levett vérmintákban a kiindulási értékekhez hasonlítva. A dissectio-reentry eljárással kezelt csoportban azonban szignifikáns VCAM-1 koncentráció emelkedést tapasztaltunk mind a beavatkozás után 48 órával (484 [406–789] ng/mL vs 366 [299–548] ng/mL, $p = 0,005$), mind pedig a 3-6 hónappal később (523 [430–681] ng/mL vs 366 [299–548] ng/mL, $p = 0,006$) nyert vérmintákban a preoperatív eredményekhez képest.

Hasonló eredményeket kaptunk az ICAM-1 koncentrációkat vizsgálva: a WE csoportban nem találtunk különbséget a vérvételi időpontok között, míg a DR technikával kezelt betegek esetén szignifikáns koncentráció emelkedés látható a beavatkozás után 3-6 hónappal később levett

vérmintákban a kiindulási értékekhez viszonyítva (844 [700–1246] ng/mL vs 642 [412–743] ng/mL, $p = 0,037$).

Mértük az endothelsejt aktivitást jellemző vWF Ag mennyiségét is. A WE-kezelt csoportban nem találtunk szignifikáns különbséget a vérvételi időpontok között, míg a DR-kezelt betegek szignifikáns vWF Ag szint emelkedést mutattak 48 órával a beavatkozást követően (143,5 [114–221,3] % vs 136,5 [99,3–184] %, $p = 0,002$) a kiindulási értékekhez képest. Minthogy a vWF Ag mennyiségét befolyásolja a beteg ABO vércsoportja, a 0-s és nem 0-s vércsoportú betegek Ag szintjét külön-külön elemeztük, azonban így is ugyanezen az eredményeket kaptuk.

2.2. Trombingenerációs tesztek eredményei

A WE kezelt csoportban nem találtunk szignifikáns különbségeket a késleltetési idő és ttPeak értékeit elemezve. A DR csoportban azonban egy közel szignifikáns csökkenést (8,38 [6,7–10,1] min vs 8,88 [7,51–10,46] min, $p = 0,05$) észleltünk a késleltetési időben 48 órával a beavatkozás után a kiindulási értékekhez viszonyítva, azonban 3-6 hónappal a PCI után ugyanezen különbség már szignifikánssá vált (6,5 [5,84–8,35] min vs 8,88 [7,51–10,46] min, $p = 0,004$), szintén a preoperatív eredményekhez képest. Ugyanígy, a DR-kezelt betegek szignifikáns különbséget mutattak a ttPeak paramétert vizsgálva: mind a PCI után 48 órával (11,42 [9,05–13,26] min vs 12,26 [11,05–13,33] min, $p = 0,023$), mind pedig a 3-6 hónappal később (9 [8,0–10,26] min vs 12,26 [11,05–13,33] min, $p = 0,002$) nyert vérmintákban szignifikáns csökkenés mutatkozott a pre-PCI értékekhez képest.

A keletkezett trombin mennyiségi paramétereit vizsgálva a kinetikát jellemző mutatók eredményeivel egybevágó értékeket kaptunk. A trombin peak esetén nem találtunk szignifikáns különbséget a WE technikával kezelt betegcsoportban a vérvételi időpontok között. Azon betegek körében, akik CTO-ját a dissectio-reentry eljárással sikerült megnyitni, szignifikánsan nagyobb mennyiségű trombin képződését tapasztaltuk a beavatkozás után 48 órával (312 [221–

372] nM vs 244 [184–277] nM, $p = 0,004$), ez a különbség pedig még hangsúlyosabbá vált a PCI után 3-6 hónappal később (393 [316–441] nM vs 244 [184–277] nM, $p = 0,001$), a kiindulási értékekhez viszonyítva. Az ETP-t vizsgálva a WE-kezelt betegek között 48 órával az intervenció után szignifikáns különbség mutatkozott ($p = 0,048$) a pre-PCI értékekhez képest, azonban a DR csoportban ennél jelentősebb különbségeket találtunk. Szignifikáns különbség adódott a 48 órás és kiindulási értékek között ($p = 0,003$), mely eltérés tovább nőtt 3-6 hónappal később ($p = 0,002$) szintén a kiindulási eredményekhez viszonyítva.

2.3. Regressziós analízis

Lineáris regressziós analízissel bizonyítottuk, hogy a beavatkozás után 3-6 hónappal kialakuló szignifikáns különbségek a VCAM-1 ($p = 0,005$), késleltetési idő ($p = 0,001$), ttPeak ($p < 0,001$) és ETP ($p = 0,015$) esetén a beavatkozás típusával függenek össze, míg a PCI után 48 órával megfigyelhető szignifikáns változások az ETP ($p = 0,049$) és a vWF Ag ($p = 0,021$) kapcsán az összesített stenthosszal állnak összefüggésben.

2.4. A klinikai utánkövetés eredményei

A medián 8,5 hónapos utánkövetési idő alatt mindössze egy esetben jelentkezett szövődmény, mely egy stent thrombosis volt 14 hónappal a beavatkozás után egy 69 éves férfi betegnél, akinek a CTO-ját a drót eszkalációs technikával sikerült megnyitni, így a WE-kezelt csoportban 3,44%-os szövődményrátát regisztráltunk, míg a DR-csoportban szövődmény nem volt. Halálozás egyik csoportban sem történt az utánkövetési idő alatt. A WE-csoportban 3 esetben történt TVR (10,3%), míg a DR csoportban ez az arány 4,8%, ennek megfelelően a MACE-ráta is ugyanígy alakult, különbség a két csoport közt nem volt ($p = 0,473$). A klinikai állapotra vonatkozó adatokat elemezve arra a következtetésre jutottunk, hogy a két változó, azaz a beavatkozás típusa és a panaszok megjelenése az utánkövetési idő alatt egymástól független volt ($p = 0,865$)

3. Beavatkozások karakterisztikája szerint vizsgált aktivációs markerek

3.1 Thrombocyták felszíni P-selectin expressziója

Az alacsony (0 vagy 1) J-CTO score-ral rendelkező betegek esetén nem találtunk szignifikáns különbséget a thrombocyták felszíni P-selectin expressziójában a vérvételi időpontok között. A magas (2 vagy 3) J-CTO score esetén 2 nappal a beavatkozás után szignifikánsan magasabb (4,07 [3,18–7,17] % vs. 3,17 [2,48–4,22] %, $p = 0,004$) P-selectin pozitivitást mértünk a kiindulási értékekhez viszonyítva. A rövidebb időtartamú beavatkozásban részesülő betegek szintén nem mutattak különbséget a felszíni P-selectin expresszióban a vérvételi időpontok között, ám hosszabb beavatkozás esetén szignifikánsan magasabb P-selectin pozitivitás igazolódott (3,64 [2,69–6,94] % vs. 3,16 [2,4–4,08] %, $p = 0,013$) 2 nappal a PCI után, a kiindulási eredményekhez képest. Az összesített stenthossz alapján történő felosztás esetén nem találtunk szignifikáns különbségeket a vérvételi időpontok között sem a rövidebb, sem a hosszabb stent implantációban átesett betegek között.

3.2. Solubilis P-selectin koncentrációk

Az alacsony J-CTO score-ral rendelkező betegek esetén nem mutatkozott szignifikáns változás 2 nappal és 3-6 hónappal a PCI után a solubilis P-selectin koncentrációk vonatkozásában a kiindulási értékekhez képest, azonban magas J-CTO score esetén szignifikáns solubilis P-selectin koncentráció emelkedést (54,2 [39,7–73,2] ng/mL vs. 45,8 [36–70,1] ng/mL, $p = 0,028$) tapasztaltunk 3-6 hónappal a beavatkozást követően a kiindulási eredményekhez viszonyítva. Ugyanígy, rövidebb beavatkozások kapcsán nem volt mérhető szignifikáns koncentráció változás, azonban hosszabb intervenció esetén ugyancsak 3-6 hónappal a PCI után adódott szignifikáns solubilis P-selectin koncentráció emelkedés (54,8 [42,8–76,4] ng/mL vs. 49,5 [35,4–73] ng/mL, $p = 0,023$) a kiindulási értékekhez képest. Az implantált stentek összesített

hossza alapján létrehozott két alcsoport nem mutatott különbséget a vérvételi időpontok között a solubilis P-selectin koncentrációk tekintetében.

3.3. Keringő mikroRNS-ek relatív expressziójának meghatározása

A drót eszkáliciós technikával kezelt csoportban nem találtunk szignifikáns különbséget a mikroRNS-223 relatív expressziója kapcsán a vérvételi időpontok között, míg a dissection-reentry eljárással kezelt betegek közel szignifikáns relatív expresszió csökkenést mutattak (0,012 [0,011–0,026] vs. 0,026 [0,017–0,045], $p = 0,053$) 3-6 hónappal a beavatkozás után, a pre-PCI értékekhez képest. A J-CTO score, az implantált stentek összesített hossza, valamint a beavatkozás időtartama szerinti kategóriákban nem mutatkozott szignifikáns különbség a vérvételi időpontok között a relatív miR-223 expresszióban. Ugyanez elmondható a miR-126-ról is, egyik csoportbontás esetén sem találtunk lényeges különbséget a relatív miR-126 expresszióban. A keringő miR-181b esetén szignifikánsan alacsonyabb relatív expressziót (0,023 [0,009–0,073] vs. 0,04 [0,014–0,104], $p = 0,042$) mértünk a WE csoportban 3-6 hónappal a beavatkozás után a PCI előtti értékekhez képest, míg a DR-kezelt csoportban bár szintén megfigyelhető csökkenő tendencia, de ennek mértéke nem érte el a statisztikai szignifikancia határát. A rövidebb stenthosszal rendelkező betegek szintén szignifikánsan alacsonyabb (0,016 [0,007–0,049] vs. 0,037 [0,014–0,073], $p = 0,031$) miR-181b expressziót mutattak 3-6 hónappal a PCI után a kiindulási eredményekhez viszonyítva, míg a hosszabb stent implantációban részesülő betegek csoportja nem mutatott különbséget a vérvételi időpontok között miR-181b tekintetében. A rövidebb időtartamú beavatkozáson átesett betegek körében közel szignifikáns relatív miR-181b expresszió csökkenést (0,022 [0,011–0,053] vs. 0,034 [0,015–0,07], $p = 0,068$) tudunk csak igazolni szintén 3-6 hónappal a PCI után, míg a hosszabb időtartamú beavatkozás csoportjában nem mutatkozott különbség a miR-181b relatív expressziójában az interventio előtti és utáni értékek között.

Megbeszélés

A PCI éra kezdete óta számos tanulmány született arról, miként hat a percutan interventio és az ezzel együtt járó ballonos tágítás és stent implantatio a vasculaturára, az endothelsejtekre, thrombocytákra és a véralvadási kaszkádra. A legtöbb ilyen vizsgálat acut coronaria syndromán átesett, valamint stabil ischaemiás szívbetegséggel élő populáció kapcsán járta körbe a témát, azonban krónikus totális coronaria occlusióban szenvedő betegek csoportjával meglehetősen kevés tanulmány foglalkozik, így a biomarkerek mennyiségi összehasonlításából származó eredményeket csak ACS-en átesett és stabil anginás populációkon végzett vizsgálatok tükrében tudjuk értékelni.

1. A WE és DR technikával kezelt betegcsoportok összehasonlítása

Ebben az összehasonlításban elsőként az endothelsejt aktivációs markerek mennyiségi meghatározását és összehasonlítását végeztük. Azt találtuk, hogy míg a WE-kezelt betegek esetén nem volt különbség a vérvételi időpontok között, addig a dissectio-reentry technikával kezelt betegek csoportja szignifikánsan magasabb VCAM-1 és ICAM-1 koncentrációt mutatott 3-6 hónappal a beavatkozás után, a kiindulási értékekhez viszonyítva. A VCAM-1 esetén a szignifikáns mértékű koncentráció emelkedés már 2 nappal a PCI után megfigyelhető volt. Egy 2010-ben készült vizsgálatban, melyben stabil anginában szenvedő, elektív PCI-n átesett betegpopulációt vizsgáltak, az interventio után 3 nappal szignifikánsan magasabb VCAM-1 koncentrációt mértek, mely a 7. napra visszatért a kiindulási szintre. Egy másik, 2016-os tanulmányban BMS és DES implantation átesett betegcsoportokat hasonlítottak össze. Azok a betegek, akik BMS-t kaptak, szignifikáns mértékben emelkedett VCAM-1 koncentrációt mutattak 24 órával a PCI után, míg DES beültetés esetén az emelkedés nem volt szignifikáns. Azon betegek, akikben az utánkövetés során in-stent restenosis alakult ki, már 1 hónappal a beavatkozás után szignifikánsan magasabb ICAM-1 plazmaszintet mutattak a restenosis nélküli betegekkel összehasonlítva. Jin és mtsai sirolimust kibocsátó stent implantatioja után

bekövetkező késői ST és endothelialis dysfunciót jellemző biomarkerek közötti összefüggéseket vizsgáltak. 41 főnél regisztráltak ST-t, az ő eredményeiket egy 82 főből álló, kor, nem és coronaria laesio szerint illesztett kontroll betegpopuláció értékeihez hasonlították. A vWF, VCAM-1 és ICAM-1 esetén szignifikánsan magasabb koncentrációt mértek a ST-n átesett betegeknél a kontroll csoporthoz képest. A mi vizsgálatunkban mindösszesen 1 alkalommal igazolódott ST a WE-kezelt csoportban, így messzemenő következtetéseket nem tudunk levonni a szövődmények kialakulása és a biomarker szintek között lévő összefüggésekről. Habár a DR technikával kezelt betegek szignifikánsan magasabb VCAM-1, ICAM-1 és vWF szintet mutattak vizsgálatunkban, mint a WE csoport betegei, egy esetben sem alakult ki szövődmény az utánkövetési idő alatt. Összességében elmondható, hogy azon betegek, akik CTO-ját a kiterjedtebb érsérüléssel járó dissectio-reentry technikával sikerült passzálni, nagyobb mértékű változást mutattak az endothelsejt aktivációt jellemző biomarkerek vonatkozásában, mint akiknek laesióját intraluminalis technikával lehetett megnyitni.

Tudomásunk szerint jelen vizsgálat az első, amely CTO-ban szenvedő betegek kapcsán a plazma trombingenerációs potenciálját vizsgálja elektív PCI után. Attanasio és mtsai 2016-ban publikált tanulmánya szerint azok az ACS-betegek, akik PCI és stent implantatio után reziduális trombingenerációs aktivitással rendelkeznek, szignifikánsan nagyobb a kockázatuk a hosszútávú cardiovascularis halálra. A kapott TG értékek alapján feltűnő, hogy az eredmények egy irányba mutatnak: számottevő különbségek a TG paraméterekben a DR-csoportban, míg a WE-technikával kezelt betegek között ugyanezen paraméterek nem, vagy nem jelentősen változtak. A DR-csoport 48 órás plazma mintáinak vizsgálatából kiderült, hogy a kiindulási értékekhez képest a TG hamarabb kezdődött és magasabb maximális trombinkoncentrációval járt, mely az ETP magasabb értékeiben is megmutatkozott. Ezen változások 3-6 hónappal a PCI után is perzisztáltak, sőt, a különbség mértéke statisztikailag jelentősebb lett. Összehasonlításképp, a drót eszkalációs technikával kezelt betegek ugyanezen

eltéréseket nem mutatták. A TG tesztek eredményei arra engednek minket következtetni, hogy a DR-technika a nagyobb érkárosító hatása révén, fokozott endothelsejt aktiváción keresztül hozzájárulhat a thrombusképződéshez, ami thrombotikus szövődmények kialakulásához vezethet. Mindezek ellenére nem mutatkozott különbség a korai és késői szövődményrátaban a WE- és DR-kezelt csoportok között, úgy tűnik, a kettős thrombocyta aggregatio gátló kezelés eredményesen ellensúlyozta a DR-csoportban észlelt magasabb thrombosis rizikót, amely elsősorban az erőteljes vWF aktivitásban és a TG tesztek eredményeiben tükröződik vissza.

Vizsgálatunk tárgyát képezte a két különböző CTO passzálási technika biztonságosságának összehasonlítása is. Minthogy szövődményt csak 1 esetben, a WE csoportban regisztráltunk (feltehetően az alacsony esetszám és rövid utánkövetési idő miatt), a két technika biztonságosságát jelen tanulmányban megítélni nem tudtuk. A nemzetközi irodalomban azonban rendelkezésre állnak ugyanezen kérdéskört boncolgató vizsgálatok. Godino és mtsai sikeres CTO-PCI-n átesett betegek bevonásával végeztek vizsgálatot, melyben a WE és a guided subintimal tracking and reentry (guided-STAR) technikát hasonlították össze. A periprocedurális MI, ST, és cardiovascularis mortalitás tekintetében nem találtak különbséget a két betegcsoport között, azonban a restenosis incidenciája szignifikánsan magasabbnak bizonyult a guided-STAR eljárással kezelték körében, a restenosis független prediktoraként pedig az implantált stentek hosszát azonosították. Azzalini és mtsai a WE, modern DR és régebbi DR eljárásokat hasonlították össze. Azok a betegek, akik WE és modern DR kezelést kaptak, nem mutattak különbséget a TVR és MACE rátákban, azonban a régebbi dissectió eljárással kezelt betegek körében a TVR, és így a MACE gyakorisága is szignifikánsan magasabb lett. Rinfret tanulmányában a MACE gyakorisága nem különbözött szignifikáns mértékben a két betegcsoportot összehasonlítva, és multivariáns analízissel igazolták, hogy a DR-technika önmagában nincs hatással a hosszútávú kimenetelre. Az irodalmi adatok tehát némileg ellentmondásos képet festenek a két technika hosszútávú biztonságosságáról, azonban

úgy tűnik, a régebbi, kiterjedtebb érsérülést okozó extenzív dissectio-reentry technikák nagyobb valószínűséggel vezethetnek restenosis kialakulásához.

2. Beavatkozások karakterisztikája szerint vizsgált aktivációs markerek

A kutatás ezen részében a thrombocyták felszíni P-selectin expresszióját, a plazma solubilis P-selectin koncentrációját, valamint a mikroRNS-223, -181b és -126 relatív expresszióját vizsgáltuk. Jelen vizsgálatunkban áramlási citometriás mérésekkel szignifikáns mértékű thrombocytaktivációt igazoltunk 2 nappal a CTO-PCI után, amennyiben az komplikált és hosszadalmas volt. A percutan intervenciók elterjedése után több tanulmány is megjelent a PCI thrombocytaktivációra gyakorolt hatásairól. Az ilyen vizsgálatokban rendszerint diagnosztikus coronaria angiographián, valamint stent implantation átesett betegek thrombocytáinak felszíni P-selectin expresszióját hasonlították össze. Inoue vizsgálatában azt találták, hogy PCI után szignifikáns mértékben megnő a P-selectin pozitív thrombocyták aránya a beavatkozás előtti állapothoz képest. Nagy és mtsai tanulmányában a stentelt betegek esetén szignifikánsan magasabb arányban azonosítottak CD62-pozitív thrombocytákat 15 perccel a PCI-t követően, mint az angiográfián átesett társaiknál. A nemzetközi irodalomból származó adatok egy irányba mutatnak jelen kutatásunk eredményeivel: röviddel a megterhelőbb, komplexebb, számottevő érsérüléssel járó beavatkozás után szignifikánsan nagyobb mértékű thrombocyt aktivációt detektáltunk.

Fent nevezett kutatók munkacsoportja a solubilis P-selectin koncentrációját is megmérte kutatásukban. Nagy és mtsai nem találtak különbséget a stentelt és coronaria angiographián átesett betegek solubilis P-selectin koncentrációi között, míg Inoue és mtsai közvetlenül a stent implantatio után szignifikánsan magasabb solubilis P-selectin koncentrációt mértek a sinus coronariusban a kiindulási értékekhez képest. A mi vizsgálatunkban kapott, solubilis P-selectinre vonatkozó eredmények összhangban vannak a hasonló kutatásokból származó adatokkal: hosszadalmas, komplex beavatkozások után 3-6 hónappal szignifikánsan magasabb

P-selectin koncentrációt detektáltunk a pre-PCI értékekhez képest. A magasabb J-CTO scorerral rendelkező betegek hosszú, komplikált, megterhelő beavatkozásban részesültek, az ilyen beavatkozásoknak az érkárosító hatása is kifejezettebb. Ez a thrombocyták felszíni P-selectin expressziójában is megnyilvánult. A megterhelőbb beavatkozás nagyobb mennyiségű thrombocytá aktiválódását okozza. A vérlemezkékhez kötött P-selectin a thrombocyták viszonylag rövid időn belül megtörténő eliminálódásával előbb solubilis formává változik, majd a keringésből is eltűnik, csökkentve a felszíni P-selectin expressziót és eleinte növelve a solubilis forma koncentrációját. A 3-6 hónappal később mérhető magas solubilis P-selectin koncentráció azonban már sokkal inkább az endothelsejteknek köszönhető. Ezzel magyarázható a beavatkozás után 3-6 hónappal mérhető szignifikánsan magasabb solubilis P-selectin koncentráció és a kiindulási szintre csökkenő felszíni P-selectin expresszió, hiszen a PCI kapcsán aktiválódott vérlemezkék hónapokkal később már nincsenek a keringésben.

Habár a mikroRNS-ek biológiáját és cardiovascularis betegségekben betöltött potenciális szerepét számos tanulmány vizsgálta, krónikus totális coronaria occlusióban szenvedő populáció kapcsán nem született még olyan vizsgálat, mely mikroRNS-ek analízisét is involválta volna. Jelen kutatásunkban a miR-223, miR-181b és miR-126 relatív expresszióját határoztuk meg *cel-miR-39* referencia gén alkalmazásával. A miR-223 esetén mindössze a WE vs DR betegcsoportok összehasonlításában találtunk említésre méltó eredményt: DR-kezelt betegek csoportjában közel szignifikáns relatív expressziócsökkenést detektáltunk ($p = 0,053$) 3-6 hónappal a beavatkozást követően, a pre-PCI adatokhoz viszonyítva. Dai és mtsai által végzett állatkísérletes kutatás a miR-223 angiogenezist gátló szerepét azonosította, a miR-223 ezen szerepe magyarázhatja a DR-kezelt csoportban megfigyelt közel szignifikáns mértékű relatív miR-223 expressziócsökkenést, minthogy kiterjedt érsérüléssel járó beavatkozások után aktívabbak a remodellációs és angiogenezist serkentő folyamatok. A miR-126 vizsgálatakor nem születtek szignifikáns különbségek a betegcsoportok és vérvételi időpontok között, míg a

miR-181b esetén ellentmondásos adatokat kaptunk. Azon betegek esetén találtunk expressziócsökkenést, akik egyszerűbb, rövidebb, kevésbé megterhelő beavatkozáson estek át. A jelen vizsgálatban is elemzett mikroRNS-ek szintje rendszerint csökken azokban a folyamatokban, amelyek gyulladáshoz vezetnek, valamint az endothelsejtek és vérlemezkék aktivációjával járnak. Ez mindössze a miR-223 esetében látszott igazolódni. Minthogy egy adott mRNS több tucat mikroRNS finomhangolása által szabályozott, és a vizsgált mikroRNS-ek is több target modifikálásában vesznek részt, ezért a várakozásokkal ellentétes eredmények arra engednek következtetni, hogy a miR-181b és miR-126 az eddig azonosítottakon túl más folyamatok szabályozásában is részt vesznek, valamint, hogy a szóban forgó endothelsejt és thrombocyták aktivációjára más mikroRNS-ek is hatással vannak, melyek vizsgálata nem képezte tanulmányunk részét.

Összegezve az adatokat, jól látszik, hogy hosszú ideig tartó, komplikált, megterhelő CTO-PCI esetén a beavatkozást követően rövid távon inkább a fokozott thrombocyták aktivációjával, míg hosszú távon a fokozott endothelsejt aktivációval kell számolnunk, melyek a kiterjedt vasculáris sérülés következményei lehetnek. A beavatkozás után nem sokkal detektálható megnövekedett thrombocyták aktiváció rövid távon stent thrombosis kialakulását, míg a PCI után 3-6 hónappal később észlelhető fokozott endothelsejt aktiváció hosszú távon in-stent restenosis kialakulását propagálhatja. A megfigyelt fokozott sejtaktiváció ellenére nem észleltünk magasabb szövődményráta a hosszú, komplikált beavatkozások, így a DR-technika kapcsán sem. A thrombocyták aktivációjára vonatkozó eredményeink alapján hosszú, komplikált, megterhelő beavatkozások után a korai posztoperatív időszakban új típusú, potenciálisan thrombocyták aggregációját gátló szerekek adása megfontolandó. A késői utánkövetési időszakban bekövetkező szövődményekért feltehetőleg a fokozott endothelsejt aktiváció a felelős, így vizsgálatunk rámutat az endothelsejt aktiváció gyengítését, gátlását célzó kutatások fontosságára, szükségességére.

Összegzés

Munkánk során krónikus totális coronaria occlusióban szenvedő betegek percutan intervenciója kapcsán kialakuló endothelsejt és thrombocytá aktivációt vizsgáltunk. Ehhez három különböző időpontban nyert vérmintából meghatároztuk a thrombocyták felszíni P-selectin expresszióját, számos adhézis fehérje plazmakoncentrációját, egyes mikroRNS-ek relatív expresszióját, valamint a véralvadást jellemző trombingenerációs potenciált.

Kutatásunk első részében a WE- és DR-technikával kezelt betegek laboreredményeit hasonlítottuk össze. A vizsgálatok alapján igazoltuk, hogy a dissectiós eljárással kezelt betegek hosszútávon fokozott endothelsejt aktivitást mutatnak, melyet az adhézis fehérjék emelkedett plazmakoncentrációja és a megnövekedett trombingenerációs potenciál jelez.

Kutatásunk második felében a beavatkozások karakterisztikájával összefüggő sejtaktivációs változásokat térképeztük fel. Ehhez négy szempont alapján két részre osztottuk a betegpopuláció tagjait. Arra jutottunk, hogy a magas J-CTO score-ral rendelkező, hosszú beavatkozáson áteső betegek rövid távon szignifikánsan emelkedett thrombocytáaktivációt mutatnak, hosszútávon többnyire az endothelsejt aktiváció dominál, melyet a hónapokkal a beavatkozás után is perzisztáló emelkedett solubilis P-selectin koncentráció is alátámaszt. Az egyes mikroRNS-ek relatív expressziójára vonatkozó adatok némileg ellentmondásosak, így nem járultak hozzá a kutatásból származó következtetések levonásához.

Laboratóriumi eredményeink arra utalnak, hogy a hosszú ideig tartó, összetett, kiterjedt érsérüléssel járó beavatkozások fokozott thrombocytá aktivációval és így magasabb ST rizikóval járnak a korai utánkövetési periódusban, míg a késői posztoperatív időszakot markáns endothelsejt aktiváció jellemzi, mely feltehetően a késői szövődményekért is felelős lehet.

Új tudományos megállapítások

1. Krónikus totális coronaria occlusióban szenvedő betegek DR kezelése kapcsán szignifikánsan nagyobb mértékű endothelsejt aktiváció mérhető hónapokkal a beavatkozás után, mint drót eszkalációs technika alkalmazása esetén.
2. A DR-kezelt betegcsoportban a trombingenerációs teszt mind a négy paramétere a koagulációs kaszkád fokozott aktivitását mutatja a beavatkozás után rövid és hosszú távon is, ellentétben a drót eszkalációs technikával kezelt betegcsoporttal.
3. Klinikai adatok alapján a beavatkozás típusa (WE vs. DR) és az utánkövetési idő során jelentkező panaszok egymástól függetlenek.
4. Magas J-CTO score (2 vagy 3) és hosszú beavatkozás (118-255 min) esetén 2 nappal a beavatkozás után szignifikánsan magasabb thrombocyta aktiváció mérhető, mint alacsony (0 vagy 1) J-CTO score és rövid (40-117 min) interventio esetén.
5. Magas J-CTO score (2 vagy 3) és hosszú beavatkozás (118-255 min) esetén hónapokkal a beavatkozás után szignifikánsan nagyobb mértékű endothelsejt aktiváció mérhető, mint alacsony (0 vagy 1) J-CTO score és rövid (40-117 min) interventio esetén.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Szük Tibor István** adjunktus úrnak, aki PhD tanulmányaim kezdete óta segítette tudományos gondolkodásom, klinikai kardiológiai szemléletmódom kialakulását. Segítséget nyújtott a kutatás megtervezésében, az eredmények értékelésében és a disszertáció elkészítésében.

Köszönettel tartozom **Dr. Csanádi Zoltán** professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy doktori tanulmányaimat a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Kardiológiai és Szívsebészeti Klinikáján végezzem.

Köszönöm **Dr. Kappelmayer János** professzor úrnak, hogy kutatásunk kísérletes részét a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetében végezhettem. Köszönöm Professzor Úrnak, hogy biztosította a szükséges eszközöket, valamint szakmai és tudományos útmutatásait, melyekkel hozzájárult kutatásunk színvonalas kivitelezéséhez.

Hálával tartozom továbbá **Bekéné Dr. Debreceni Ildikónak, Dr. Nagy Bélának és Dr. Fejes Zsoltnak**, hogy hozzájárultak a laboratóriumi vizsgálatok helyes kivitelezéséhez szükséges ismeretanyag elsajátításához, valamint, hogy tanácsaikkal, szakmai hozzáértésükkel segítették a tanulmány létrejöttét.

Külön köszönöm **Pócsi Mariannának, Szilágyi Bernadettnek**, és a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársainak, hogy szükség esetén rendelkezésemre álltak, gyors segítséget nyújtottak, és ezzel hozzájárultak a kutatás létrejöttéhez. Köszönöm továbbá a Kardiológiai és Szívsebészeti Klinika szakdolgozóinak a premedikációban és mintavételezésben nyújtott segítségüket. Köszönöm **Hodosi Katalin** statisztikai elemzésben nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni **családomnak** a munkám során nyújtott támogatást és biztatást.



Nyilvántartási szám: DEENK/541/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Illési Ádám
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Illési, Á.**, Fejes, Z., Pócsi, M., Bekéné Debreceni, I., Hódosi, K., Nagy, B. J., Kappelmayer, J., Kőszegi, Z., Csanádi, Z., Szűk, T.: Technically Challenging Percutaneous Interventions of Chronic Total Occlusions Are Associated with Enhanced Platelet Activation. *J Clin Med.* 12 (21), 1-14, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12216829>
IF: 3.9 (2022)
2. **Illési, Á.**, Bekéné Debreceni, I., Fejes, Z., Nagy, B. J., Hódosi, K., Kappelmayer, J., Csanádi, Z., Szűk, T.: Effect of invasive therapeutic coronary interventions on endothelial cell activation and thrombin generation in patients with chronic total coronary occlusion. *Thromb. Res.* 217, 64-72, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2022.07.010>
IF: 7.5

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,4

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,4**

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

Debrecen, 2023.12.18.

