

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Dr. Illési Ádám**

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

**Debreceni Egyetem**

**Laki Kálmán Doktori Iskola**

**Debrecen, 2024.**

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

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

**Dr. Illési Ádám**

**Témavezető: Dr. Szük Tibor István**



**Debreceni Egyetem**

**Laki Kálmán Doktori Iskola**

**Debrecen, 2024.**

# Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke</b> .....	5
<b>1. Bevezetés és irodalmi áttekintés</b> .....	9
1.1. Ischaemiás szívbetegség.....	9
1.1.1. Ischaemiás szívbetegség – patomechanizmus, hisztológia .....	10
1.2. Krónikus totális coronaria oclusio.....	11
1.2.1. A krónikus totális oclusio kezelése .....	12
1.3 Percutan coronaria interventio.....	14
1.3.1 A PCI rövid- és hosszútávú szövődményei.....	15
1.3.2. Percutan coronaria interventio krónikus totális oclusio kapcsán.....	17
1.4. Érsérülés kapcsán bekövetkező változások endothelsejteken és vérlemezkékben.....	19
1.5. A mikroRNS-ek szerepe.....	21
1.6. A vizsgálat megalapozottsága .....	22
<b>2. Célkitűzés</b> .....	24
<b>3. Betegek és módszerek</b> .....	25
3.1. A betegpopuláció.....	25
3.2. A vizsgálat menete .....	25
3.3. Coronaria interventio.....	27
3.4. A betegpopuláció felosztása.....	27
3.5. Laboratóriumi vizsgálatok.....	28
3.5.1. Felszíni P-szelektin expresszió.....	28
3.5.2. Solubilis adhézions fehérjék koncentrációinak meghatározása .....	28
3.5.3. Keringő mikroRNS-ek relatív expressziójának meghatározása .....	29
3.5.4. Trombingenerációs teszt .....	30
3.6. Statisztikai elemzés .....	30
<b>4. Eredmények</b> .....	32
4.1. Általános betegadatok .....	32
4.2. WE és DR technikák összehasonlítása endothel aktivációs markerek alapján .....	32
4.2.1. A CTO-PCI technikai vonatkozású eredményei .....	34
4.2.2. Endothel aktivációt jelző solubilis fehérje koncentrációk változása.....	34
4.2.3. Trombingenerációs tesztek eredményei .....	37
4.2.4. Regressziós analízis.....	39
4.2.5. A klinikai utánkövetés eredményei .....	40
4.3. Beavatkozások karakterisztikája szerint vizsgált aktivációs markerek .....	40
4.3.1. Thrombocyták felszíni P-szelektin expressziója .....	40

4.3.2. Solubilis P-szelektin koncentrációk .....	42
4.3.3. Keringő mikroRNS-ek relatív expressziójának meghatározása .....	43
<b>5. Megbeszélés</b> .....	<b>46</b>
5.1. WE és DR technikák összehasonlításából származó eredmények értelmezése .....	46
5.2. A beavatkozások karakterisztikája alapján kapott eredmények értelmezése .....	51
<b>6. Összegzés</b> .....	<b>58</b>
<b>7. Új tudományos megállapítások</b> .....	<b>60</b>
<b>8. Irodalomjegyzék</b> .....	<b>62</b>
<b>9. Kulcsszavak</b> .....	<b>72</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>73</b>
<b>11. Függelék</b> .....	<b>74</b>

## **Rövidítések jegyzéke**

ACEi – angiotenzin konvertáló enzim inhibitor

ACS – akut coronaria syndroma

ADP – adenzin-difoszfát

ADR – anterograde dissection and reentry

Ag - antigén

AMI – akut myocardialis infarktus

ARB – angiotenzin receptor blokkoló

ATP – adenzin-trifoszfát

AWE – anterograde wire escalation

BB – béta-blokkoló

BMS – bare metal stent

CABG – coronary artery bypass graft

CART – controlled antegrade and retrograde tracking

CCS – krónikus coronaria syndroma

CMECs – cardiac microvascular endothelial cells

CMR – cardiac magnetic resonance imaging

CRP – C-reaktív protein

CTO – krónikus totális occlusio

Cx – circumflex artery

DES – drug eluting stent

DM – diabetes mellitus

dNTP - deoxynucleotid

DR – dissection and reentry

ECM – extracelluláris mátrix

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

ETP – endogén trombin potenciál

ESC – European Society of Cardiology

FFR – fractional flow reserve

FGF – fibroblast növekedési faktor

GFR-EPI – becsült glomeruláris filtrációs ráta

GOT – glutamát-oxálacetát-transzamináz

GPT – glutamát-piruvát-transzamináz

guided-STAR – guided subintimal tracking and reentry

HDL-C – high density lipoprotein koleszterin

HgbA<sub>1</sub>C – hemoglobin A<sub>1</sub>C

ICAM-1 – intercellular adhesion molecule-1

IQR – interquartile range

ISR – in-stent restenosis

ISZB – ischaemiás szívbetegség

J-CTO score – japán krónikus totális occlusio score

LAD – left anterior descendent artery

LAST – limited antegrade subintimal tracking

LDL-C – low density lipoprotein koleszterin

LOCF – last observation carried forward

MACE – major adverse cardiovascular event

MI – myocardialis infarktus

miRNS, miR - mikroRNS

mRNS – messenger RNS

NLR – neutrophil to lymphocyte ratio

NO – nitrogén-monoxid

NSTEMI – nem ST elevációval járó myocardialis infarktus

PAR – proteáz aktivált receptor

PCI – percutan coronaria interventio

PET – pozitron emissziós tomográfia

PLR – platelet to lymphocyte ratio

PPP – platelet poor plasma

RCA – right coronary artery

rCART – reverse controlled antegrade and retrograde tracking

RDR – retrograde dissection and reentry

RDW – red cell distribution width

RT-qPCR – real time quantitative polimerase chain reaction

RWE – retrograde wire escalation

SD – subintimal dissection and reentry

SPECT – single photon emission computer tomography

ST – stent thrombosis

STAR – subintimal trancking and reentry

STEMI – ST elevációval járó myocardialis infarktus

TAG – thrombocyta aggregatio gátlás

TG - trombingeneráció

TIMI – Thrombolysis In Myocardial Infarction

TNF- $\alpha$  – tumor nekrozis faktor-  $\alpha$

ttPeak – time to peak

TVR – target vessel revascularization

TXA<sub>2</sub> – tromboxán A<sub>2</sub>

UTR – untranslated region

VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule-1

VEGF – vascular endothelial grow factor

vWF – von Willebrand faktor

WE – wire escalation

# 1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

## 1.1. Ischaemiás szívbetegség

Az ischaemiás szívbetegség (ISZB) különböző formáit az egyik legfőbb haláloki tényezőként tartják számon Magyarországon, és a világ egyéb fejlett országaiban egyaránt (1). Az ISZB a szívizomzat oxigén igényének és kínálatának reverzibilis megbomlását jelenti, amely leggyakrabban mellkasi fájdalom (angina pectoris) kialakulásával jár. A szív oxigénigényét négy tényező befolyásolja: a szívfrekvencia, az utóterhelés mértéke (szisztolés vérnyomás), a falfeszülés és a kontraktilitás. Bármely állapot, mely a szívizom oxigénigénye és kínálata közötti egyensúly felbomlásával jár, szívizom ischaemiához, mellkasi fájdalomhoz vezethet. Ezek között lehetnek extracardiális okok (hyperthyreosis, anaemia, hyperthermia, hypertonia), azonban az esetek jelentős részében a szívizomzat direkt vérellátási zavara, valamely nagy epicardialis ér atherosclerotikus szűkülete, elzáródása áll a tünetek hátterében. Legjellemzőbb tünet az eleinte csak fizikai terhelésre kialakuló retrosternalis mellkasi fájdalom, de gyakran jár verejtékezéssel, légszomjjal, nehézlégzéssel, epigastriális fájdalommal, hányinger-hányással. Prognosztika és az ellátás sürgőssége alapján megkülönböztetünk akut (ACS) és krónikus coronaria szindrómát (CCS). Az ACS-nak három különböző klinikai megjelenési formája lehet: instabil angina, ST-elevációval járó myocardialis infarktus (STEMI) és nem ST-elevációs myocardialis infarktus (NSTEMI). Mindhárom típus potenciálisan életet veszélyeztető kórkép és sürgős ellátást igényel. A krónikus coronaria szindróma elnevezés az Európai Kardiológiai Társaság (ESC) irányelveinek 2019-ben történő átdolgozása óta érvényes, a „krónikus” szó a kórállapot hosszú ideje való fennállását, progresszivitását hivatott hangsúlyozni (2). Ebbe a csoportba tartoznak azok a betegek, akiknél az ISZB bizonyított és stabil angina pectoris jellemzi a kórképet, de azok is, akik lezajlott myocardialis infarktust (MI) vagy revascularisatiót követő állapotban vannak (3).

### 1.1.1. Ischaemiás szívbetegség – patomechanizmus, hisztológia

Az ischaemiás szívbetegség 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. Népbetegségnek számít, a legtöbb fejlett ország egészségügyi ellátórendszerére komoly gazdasági terhet ró, hiszen a myocardialis és cerebralis infarktus, valamint a perifériás érbetegség az atherosclerosis leggyakoribb klinikai manifesztációi. Multifaktoriális betegség, kialakulásában genetikai és életmódbeli tényezők egyaránt részt vesznek. A családi előfordulás az egyik legfontosabb önálló rizikófaktor, de az életkor és a nem is jelentőséggel bír. Befolyásolható rizikófaktorok között az egyik legjelentősebb a hypercholesterinaemia, ezen belül is az emelkedett low density lipoprotein (LDL-C) és non-high density lipoprotein (non-HDL-C), valamint a csökkent HDL-C szintek. Az atherosclerosis másik fő rizikófaktor a hypertonia, de a dohányzás kóroki szerepe is bizonyítást nyert. A diabetes mellitus részben közvetlenül, részben a dyslipidaemia révén segíti az atherosclerosis kialakulását. További rizikófaktorok számíthatnak a gyulladás, a magasabb C-reaktív protein (CRP) szint, a hyperhomocysteinaemia, a metabolikus szindróma, emelkedett lipoprotein(a) szint, az obesitas, a mozgásszegény, stresszes életmód. A fentiek közül számos tényező (hypertonia, dohányfüst toxinjai, reaktív oxigéngyökök) endothelkárosító hatással bír, melynek következtében az artériafal krónikus gyulladásos válaszreakciója kezdődik meg. Eleinte az endothel sejtréteg morfológiailag ép, ám funkciójában károsodik: megnövekszik a sejtek permeabilitása, módosul a sejtek génexpressziója, fokozódik az adhézión molekulák expressziója (pl. VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1, ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, E-selectin) és így a leukocyták adhézioja. Ezt követően lipoproteinek halmozódnak fel az érfalban, majd monocyták adhézioja történik endothel sejtekhez. Ezek a monocyták migrálnak az érfal intima rétegébe, macrophagokká alakulnak, amelyek bekebelezik az ott felhalmozódott

koleszterinkristályokat és gyulladásoos citokineket, növekedési faktorokat kezdenek el kibocsátani. Ezek hatására simaizomsejtek bevándorlása és proliferációja, valamint extracelluláris mátrix (ECM) fokozott termelése kezdődik. Mindezen folyamatok eredményeként az ér lumenét szűkítő atheroscleroticus plakkok jelennek meg, melyek nyíróerők által kiváltott megrepedése thromboticus elzáródáshoz, míg az alattuk elhelyezkedő médiának nevezett réteg gyengítése révén aneurysma képződéshez vezethetnek. A plakkok gyakran göcos megjelenésűek, kialakulásuk lokalizációja nagyban függ a haemodinamikai viszonyoktól: a turbulens véráramlás (mely főleg az erek elágazásainál, szájadékainál jelentős) segíti a plakkok megjelenését az érfal egyes részeinél. Három fő komponens különböztetünk meg egy plakkon belül. Az első komponens a sejtes elemek teszik ki, ezek közt találunk simaizomsejteket, T-sejteket, macrophagokat. Második komponens az ECM sok elasztikus rosttal, kollagénnel. Harmadik összetevő az intra- és extracelluláris lipid, mely nagyrészt koleszterint és koleszterinésztereket jelent. A plakkok általában fibrosus sapkával borítottak, mely simaizomsejtekből és kollagénből áll. Ez alatt található a nekrotikus mag, amely elpusztult sejtek törmelékeit, lipidekkel teli macrophagokat, azaz habos sejteket, fibrint, szervült thrombusokat és koleszterinkristályokat tartalmaz. A plakkok változékony entitások – belsejükben sejtek degenerálódnak, elhalnak, az ECM anyagai lebontódnak és újraképződnek, meszesedés, kalcifikáció következik be. Az elváltozások széli részein gyakran megjelenik a kis erek proliferációja is, melyek kapcsolatban állhatnak az artériát ellátó vasa vasorumnak nevezett apró érhálózáttal, és amelyek mikrochannel-ként funkcionálhatnak egy totális occlusio esetén (4).

## 1.2. Krónikus totális coronaria occlusio

A krónikus epicardialis koszorúérbetegség egy megjelenési formája a krónikus totális occlusio (CTO), melyről akkor beszélünk, ha legalább három hónapja fennálló 100%-os elzáródást (Thrombolysis in Myocardial Infarction 0 flow) diagnosztizálunk valamely

epicardialis artérián (5). A diagnosztikus coronaria angiographián átesett betegek kb. 20%-át érinti (6). A diagnózis felállításakor sok esetben nem áll rendelkezésre korábbi angiográfiás lelet, így az elzáródás létrejöttének idejét általában csak becsülni tudjuk az első anginás tünetek megjelenése alapján, vagy az anamnézisben lévő korábbi, az adott ér ellátási területét érintő myocardialis infarktus időpontja alapján. A CTO patogenezeise kapcsán az esetek jelentős részében progresszív atherosclerosisról van szó, kisebb részben tünetmentes, vagy kezeletlen myocardialis infarktus áll az elzáródás hátterében (7). Míg egy akut, vagy közelmúltban lezajlott myocardialis infarktus esetén az elzáródást okozó thrombus viszonylag laza szerkezetű és kevésbé épül át fibroticusan, addig egy krónikusan, fokozatosan, hosszú idő alatt kialakuló occlusio nagyobb mennyiségű kollagénben gazdag fibroticus szövetet tartalmaz és nagyobb mértékben kalcifikálódik (8). Ezen megfigyelés befolyásolja a terápiás revascularisatiós kísérletek sikerarányát is (9).

Fontos megemlíteni, hogy ISZB, így CTO esetén is kollaterális erek képződése indulhat meg az ischaemiára adott válaszreakció részeként, amennyiben az adott coronaria elzáródása lassú ütemben, hosszú idő alatt alakul ki. Az érújdonképződés számos növekedési faktor által mediált folyamat, ilyen pl. a VEGF (vascular endothelial grow factor), FGF (fibroblast grow factor), angiopoetin 1 és 2. A VEGF termelődésének legfőbb induktora a hypoxia, az endothel sejtek proliferációját, migrációját fokozza, valamint elősegíti a nitrogén-monoxid (NO) termelődését is, mely vazodilatatív hatása révén hozzájárul az újonnan képződött érlumen kialakításához (10). A megfelelően fejlett kollaterális keringés kialakulásával az ischaemiás szívizomterület vérellátása egy bizonyos mértékig biztosított marad, mely elegendő arra, hogy az ér teljes okklúziója esetén is megvédje az izomszövetet az elhalástól, valamint percutan revascularisatiós kísérlet esetén alternatív megoldást kínálhat az elzáródás megnyitására.

#### 1.2.1. A krónikus totális occlusio kezelése

Mivel a CTO az epicardialis koszorúérbetegség egyik megjelenési formája, így a terápiája ugyanazokat az elemeket tartalmazza, mint az ISZB kezelése. Alapvető fontosságú az életmódbeli változtatások eszközlése: a dohányzás elhagyása, stressz kerülése, egészséges étkezés, testmozgás beépítése a mindennapokba, normál testsúly elérése. Társbetegségek esetén a rizikófaktorok kontrollja is esszenciális: hypertonia és diabetes mellitus esetén a betegség-specifikus célértékek elérése, valamint szűrővizsgálatok végzése. ISZB-s betegcsoportban szigorúbb célértékek vonatkoznak a koleszterinszintekre, a legújabb ajánlás 1,4 mmol / L alatt határozta meg az LDL-C célértékét (11). Az életmódbeli változtatások után második lépés az optimális gyógyszeres terápia alkalmazása. Az itt alkalmazott gyógyszerek két csoportra oszthatók, prognózist javító szerekre és tüneti szerekre. Előbbi csoportnak része a renin-angiotenzin rendszer gátlása, melynek révén megtartott baltamra-funkciójú, magas kockázatú betegekben csökkenthető a myocardialis infarktus és ischaemiás stroke kockázata (12). Szintén prognózist javító gyógyszer-csoport a statinok, melyek a máj koleszterinszintézisét gátolják, a 4S vizsgálat eredményei alapján hosszútávon javítják a túlélést coronariabetegek körében (13). A thrombocytáaggregáció gátló gyógyszerek szekunder prevenció esetén kedvezőek prognózis szempontjából, hiszen egy coronariabeteg esetén nagyobb az esélye annak, hogy vérelemezék thrombogén felszínnel érintkezzenek, ezáltal aktiválódnak és thrombus formálódjon. Tünetek kezelésére gyakran használatosak a rövid- és hosszú hatású nitrátkészítmények, béta-receptor blokkolók, kalcium-csatorna blokkolók, a frekvencia-csökkentésre használatos ivabradin, vagy az antianginás hatású trimetazidin, mely a myocardium metabolizmusára fejt ki kedvező hatást, ezáltal csökkentve az anginás tünetek előfordulásának gyakoriságát (14). Amennyiben az anamnézis és az elvégzett vizsgálatok alapján felmerül az ISZB lehetősége, az optimális gyógyszeres terápia felépítése után diagnosztikus coronaria angiográfiára kerülhet sor. A kontrasztanyaggal történő érfestés során derül ki, hogy az atherosclerosis milyen mértékben involválja a coronaria rendszert. 70%-nál

nagyobb vizuális diaméter stenosis esetén szignifikáns szűkületről beszélünk, valamint, ha egy stenosis 50%-nál nagyobb, és FFR (fractional flow reserve) teszt által igazolt a funkcionális jelentősége, szintén szignifikáns szűkületnek tekintjük. Jelentős coronaria stenosis esetén azok számától, mértékétől függően revascularisatióra kerül sor, mely kétféleképpen történhet: percutan coronaria intervencióval (PCI) vagy CABG műtéttel (coronary artery bypass graft). Nagy elemszámú megfigyeléses vizsgálatok rámutattak, hogy az elzáródás recanalizálása számos hosszútávú előnnyel és életminőségbeli javulással jár a betegek számára, ilyen például a megnövekedett hosszútávú túlélés (15), a megnövekedett terhelhetőség (16) és ejekciós frakció (17), a kamrai aritmiák gyakoriságának csökkenése (18). A revascularisatióknak azonban fontos feltétele, hogy az elzáródástól distalisan életképes szívizomszövet legyen, melyet Single-Photon Emission CT-vel (SPECT), dobutamin stressz echocardiographiával, szív MR-rel (CMR) és PET-tel (pozitron emissziós tomográfia) tudunk leggyakrabban igazolni (19). A revascularisatio legmegfelelőbb módjának kiválasztásakor a SYNTAX score lehet segítségünkre: ez a laesiók anatómiai jellegzetességeit figyelembe véve (teljes elzáródás jelenléte, kanyargós érlefutás, bifurkáció, thrombus-tartalom, kalcifikáció, a coronaria dominancia és a laesiók típusa, száma) segíti a döntést. Alacsony (<22) SYNTAX score esetén a PCI, míg a komplexebb, magasabb pontszámú esetekben a CABG-műtét az elsőként választandó (20). 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 (21).

### 1.3 Percutan coronaria interventio

Ezen beavatkozás bőrön keresztüli katéteres koszorúér intervenciót jelent. Az első ilyen kezelést 1977 szeptemberében végezték, ám ekkor még csak ballonos tágítás történt. A technika ezt követő nagymértékű fejlődése hozta el a stentnek nevezett speciális érprotézisek, fémhálók megjelenését, mely a szűkült koszorúérszakaszba implantálva biztosítja a vér áramlását. 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 stent implantálása. A beültetett fémhálók két alaptípusát különböztetjük meg. A PCI éra hajnalán eleinte az egyszerű fémstenteket (BMS, bare metal stent) használták, melyek viszonylag hamar, akár 1 hónap elteltével endothelizálódnak. Később ezeket a gyógyszerkibocsátó stentek (DES, drug eluting stent) váltották fel, melyek használatával az esetek nagy részében megelőzhető lett a túlzott mértékű endothelizáció, az úgynevezett neointima proliferáció, így hosszabb távon kevesebb restenosis okozta szövődmény alakult ki (22). Ezt követően megjelentek az új generációs DES-ek, melyek tejsav polimer vázba ágyazva tartalmazzák az endothelsejtek túlzott proliferációját gátló gyógyszereket, mely váz aztán biológiai degradáción megy keresztül, és lényegében egy BMS marad vissza. A legújabb fejlesztések eredménye a bioresorbable vascular scaffold, amely teljes mértékben egy felszívódó tejsav polimer váz, erre kerül fel a szintén tejsav polimerbe ágyazott citosztatikum. Az érintett érszakasz így kevésbé lesz thrombogén, majd idővel maga a stent is felszívódik és helyreáll az érfal integritása.

### 1.3.1 A PCI rövid- és hosszútávú szövődményei

Mint minden beavatkozásnak, a PCI-nak is lehetnek szövődményei. Kb. 0,4%-os gyakorisággal fordul elő valamilyen vascularis szövődmény a punkció helyén. Ez lehet haematoma kialakulása, pseudoaneurysma, esetleg arteriovenosus fistula (elsősorban femoralis behatolási kapu esetén) keletkezése. A koszorúereket érintő szövődmények kapcsán beszélhetünk az adott ér dissectiójáról, perforációjáról, thrombotikus elzáródásáról. Haemodinamikai státuszt érintő szövődmények is jelentkezhetnek, ezek általában vagotónia okozta bradycardia, hypotensio. Kontrasztanyag beadása ritkán allergiás reakciót, valamint a vesefunkció romlását,

kontrasztanyag indukálta nephropathiát okozhat. A stentelt érszakasszal kapcsolatban az egyik legfontosabb szövődmény a stent thrombosis (ST), ekkor a stent belsejében egy elzáródást okozó thrombus keletkezik, és akut myocardialis infarktus klinikai képében nyilvánul meg. Kialakulásának alapja, hogy az implantált stent egy érpályán belüli thrombogén felszín jelent, melyhez nagy affinitással tapadnak ki aktivált thrombocyták, occlusiv vérrögöt eredményezve. Ezen szövődmény megelőzésére kettős thrombocyta aggregáció gátló (TAG) kezelést szükséges indítani a stent implantációt követően. Kialakulásuk ideje alapján megkülönböztetünk akut (az első 24 órán belül), szubakut (24 óra – 30 nap), kései (30 nap – 12 hónap) és nagyon késői (12 hónapon túl) kialakuló ST-t. Gyakran a kettős TAG kezelés idő előtti elhagyása okozza ezt a szövődményt, de kialakulásában szerepet játszhatnak a beteg társbetegségei, a PCI technikai sajátosságai (pl. a stent széleinél létrejövő dissectio), a TAG gyógyszerek hatáserőssége, a stent paraméterei, illetve genetikai tényezők. A ST előfordulási gyakorisága kb. 0,8-2%, mortalitása (25-40%) viszont jóval meghaladja az atherosclerosis talaján kialakuló myocardialis infarktust, így egy klinikailag igen jelentős szövődményről van szó (22).

A stentelt érszakasszon, illetve annak 5mm-es környezetében kialakuló, legalább 50%-os átmérő csökkenés esetén in stent restenosisról (ISR) beszélünk. Ezen szövődmény rendszerint 2-6 hónappal a stent implantatio után alakul ki, és stabil angina pectoris képében jelentkezik. Kialakulásának oka a stent implantatio során keletkező endothelsérülésben, következményes gyulladásban, intimahyperplasiában keresendő, de a stent szuboptimális expansiója és malpozíciója is vezethet ISR-hoz. Egyéb tényezők, mint kis érátmérő, hosszú szűkület, diabetes mellitus, korábbi restenosis hajlamosíthatnak a szövődmény megjelenésére (22). Az egyszerű fémstent relatíve hamar integrálódik az érpálya környező szakaszaiba, endothelizációja akár 1 hónapon belül is befejeződhet, azonban használatuk mellett gyakoribb (akár 40%) az ISR előfordulása (23). A restenosis elleni kutatások eredményeként fejlesztették ki a

gyógyszerkibocsátó stenteket, melyek citotoxikus és citosztatikus anyagokat bocsátanak ki. Ezen anyagok (pl. sirolimus, everolimus, paclitaxel) az érfalba diffundálva gátolják az endothelsejtek túlzott proliferációját, megakadályozva ezzel az intima hiperpláziát és a következményes restenosiszt. Több tanulmány bizonyította, hogy a BMS implantationál tapasztalt restenosis-ráta DES használata esetén szignifikánsan alacsonyabb (24-26).

### 1.3.2. Percutan coronaria interventio krónikus totális oclusio kapcsán

CTO miatt végzett percutan interventio esetén a beavatkozás lényege ugyanaz, mint egy non-occlusiv szűkület esetén: a cél a laesio passzálása, ballonos tágítása, majd stent beültetése. Van azonban néhány lényeges különbség, amely döntően a krónikus elzáródás anatómiai sajátosságainak köszönhető. Az oclusio jobb vizualizációja érdekében gyakran retrográd kontrasztanyag töltésre is sor kerül, mely az arteria radialison kívül egy másik verőér punctióját is megköveteli. Minthogy az elzáródott érszakasz biológiailag aktív, a belsejében lejátszódó recanalisatio, neovascularisatio és különböző gyulladási folyamatok változatos összetételű és tulajdonságú laesiókat eredményeznek. Az elzáródás kialakulásának idejétől függően változhatnak az érintett érszakasz tulajdonságai: egy nem túl régi oclusio túlnyomórészt puha, magasabb lipid tartalmú, kevésbé fibrotikus és meszes, míg egy régebbi, egy évnél idősebb elzáródás denz, fibrotikus, nagymértékben kalcifikált területeket tartalmazhat kevesebb mikrocatornával (8). A laesio proximális részére önmagában jellemző a nagyobb mértékű kalcifikáció, míg a distalis sapka kevésbé ellenálló és könnyebben penetrálható a vezetődróttal. Az elzáródás hossza, valamint a proximális és distális csomópont alakja is jelentőséggel bír. A proximális sapka kúpos alakja lazább, kevésbé kalcifikált szövetet ígér több mikrocatornával, jelentősebb neovascularisatióval, míg tompa alakú sapka esetén nehezebb a CTO-ba való optimális belépési pontot találni, bár több irányból leképezve gyakran látható „dimple sign”,

azaz kis bemélyedés, amely potenciális mikroszatorna lehet, megkönnyítve a CTO vezetődróttal való passzálását (27). 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 (28). Mindezen anatómiai és szövettani sajátosságok révén a CTO kapcsán végzett percutan intervenciók sikeraránya elmarad a non-occlusiv stenosisok miatt végzett PCI sikerarányától (29), ennek is köszönhető, hogy a CTO-val diagnosztizált betegek kevesebb, mint 10%-a részesül percutan kezelésben (30). A fentebb részletezett okok miatt a non-occlusiv PCI során használatos vezetődrótok általában 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 kerül 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. Ekkor a proximális szakaszon ballonos tágítás kezdődik, az így kialakított kis térbe retrograd irányból próbál átszúrnival a vezetődróttal az intervenciót, amint ez megtörtént, ballonos tágítás és stent implantatio következik (31). Mindezek alapján a CTO-PCI négyféle

alapvető módozat szerint kivitelezhető, függően attól, hogy mely irányból történik meg az elzáródáson történő átjutás. Így megkülönböztetünk anterograde wire escalation (AWE), anterograde dissection and reentry (ADR), retrograde wire escalation (RWE) és retrograde dissection and reentry (RDR) technikákat, utóbbi csoportba tartozik az rCART eljárás. A beavatkozás komplexitása miatt a szövődményráta magasabb, mint egy non-occlusiv stenosis esetén (32). A passzálási technikák jellegzetességei révén némely veszélyes szövődmény nagyobb gyakorisággal jelentkezik, ilyen lehet például a coronaria dissectiója, perforatiója, kollaterálisok és oldalágak elzáródása. A hosszabb beavatkozás megnövekedett sugáridővel (bőrsérülés) és több felhasznált kontrasztanyaggal (nephropathia) jár.

#### 1.4. Érsérülés kapcsán bekövetkező változások endothelsejtekben és vérlemezkékben

Az endotheliumot az endothelsejtek monocelluláris rétege alkotja, az erek és nyirokerek belső falát béleli, így közvetlen kapcsolatban van a vérrel és nyirokfolyadékkal, valamint a benne keringő sejtekkel. Az érfal egyéb komponenseitől a lamina basalis választja el. Az endothelium számos funkcióval rendelkező, metabolikusan aktív szerv. Részt vesz az értónus és a permeabilitás szabályozásában, immunsejtek migrációjában, ezáltal különböző immunológiai folyamatokat befolyásol. Szerepet játszik a gyulladás kialakulásában és az angiogenesisben, valamint a véralvadási folyamatok egyik meghatározó tényezője. Az endothelium számos anyagot és faktort termel és bocsát a keringésbe, ennél fogva autocrin, paracrin és endocrin szervnek is tekinthető. Értágító, vasodilatator hatású, endothelsejtek által termelt anyag pl. a nitrogén-monoxid, prosztaciklin, bradykinin, míg érösszehúzó, vasoconstrictor hatással rendelkezik az endotelin, az angiotenzin II, tromboxán A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). 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 (VCAM-1, ICAM-1, von Willebrand faktor: vWF) gyulladásos sejtek 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. (33). 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 (34).

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 adhézios fehérjékkel érintkeznek, elindítva ezzel egy folyamatot, mely a vérlemezkék kitapadásához, aktiválódásához és aggregációjához vezet. Az alvadékképződés a thrombocyták kitapadásával indul. Megnövekedett nyíróerők hatására az ECM és endothelsejtek által termelt vWF konformációt vált, így képes lesz egyidejűleg kötődni a basalis membrán szabadabbá váló kollagéniéhez és a vérlemezkék GpIb-IX-V receptorához. A kollagén közvetlenül is kötődik a GpIa/IIa és GpVI receptorokhoz. A kitapadás folyamata közben megkezdődik a thrombocyták aktivációja is, amely alakváltozással és az  $\alpha$ - és  $\delta$ -granulumok tartalmának szekréciójával jár. Az  $\alpha$ -granulumokból P-szelektin (CD62P) adhézios fehérje kerül ki a vérlemezkék membránjára, valamint fibrinogén, fibronektin, V. és VIII. faktorok, thrombocytá 4-es faktor, thrombocytáeredetű növekedési faktor jut a keringésbe. A  $\delta$ -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 P2Y<sub>12</sub>

receptorhoz kapcsolódó ADP a nyugvó thrombocyták fontos aktivátora. Az aktivált vérlemezkék közben TXA<sub>2</sub>-t is szintetizálnak, mely szintén a környező thrombocyták aktiválásában vesz részt. Mindeközben alakváltozás is végbemegy: a sima korongból hosszú, hegyes membránnúlványokkal rendelkező gömb alakú vérlemezkék alakulnak ki, ez az újabb aggregatiót segíti, valamint megnövekedett felületet biztosít a további koagulációs faktorok interakciójához. Mindezen folyamatok a GpIIb/IIIa receptorok konformációváltozását is eredményezik, ezekhez vWF és fibrinogén is kötődik, így a thrombocyták összekapcsolódása és a thrombus stabilizálása is megkezdődik. Ezen történésekkel párhuzamosan a véralvadási folyamat harmadik összetevője, a koagulációs kaskád is aktiválódik, melynek végén trombin keletkezik, ez a thrombocyták felszínén lévő proteázaktivált receptort (PAR) aktiválja, további aggregatiót előidézve, valamint a fibrinogént fibrinné alakítva hozzájárul a véralvadék stabilizálásához (33,35).

### 1.5. A mikroRNS-ek szerepe

A mikroRNS-ek (miRNS, miR) 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, UTR (untranslated region) régiójához kapcsolódnak (36). Ennek eredménye rendszerint az adott fehérje szintézisének gátlása, de akár az mRNS degradációja is bekövetkezhet. Szerepük a sejtek fiziológiás működéséhez szükséges gének expressziójának poszttranszkripció szinten történő finomszabályozásában van (36). 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, mint például szív- és érrendszeri betegségek, autoimmun kórképek, daganatos megbetegedések (36, 37). A keringő miRNS-ek számos betegség laboratóriumi vizsgálatában alkalmas biomarkernek bizonyultak (38, 39). Minthogy a miRNS-

eket csak a múlt század végén fedezték fel, sokáig az is kérdéses volt, hogy a thrombocyták, mint sejtmaggal nem rendelkező entitások, hordozhatnak-e egyáltalán funkcionális RNS molekulákat és képesek lehetnek-e fehérjeszintézisre. A vérlemezkék érésük és megakaryocytákból való lefűződésük során azonban számos olyan sejtalkotóra tesznek szert (endoplazmatikus retikulum, riboszómák, mRNS-ek, miRNS-ek), amelyekkel *de novo* fehérjeszintézisre lehetnek képesek. Azóta már több mint 500 thrombocyta-miRNS-t azonosítottak. Ezek thrombocytaaktivációt elősegítő, és azt gátló fehérjék expresszióját is képesek regulálni (40), amelyből következik, hogy a thrombocyták miRNS profiljának változása a thrombocytákat érő ingerek hatására számottevően befolyásolhatja a vérlemezkeaktiváció mértékét (41). Simon és mtsai kutatásukban arra jutottak, hogy a miRNS-223 a legnagyobb mennyiségben expresszálandó thrombocyta-miRNS (42). A miRNS-223 a thrombocyták aktiválásában fontos szerepet játszó P2Y<sub>12</sub>-receptor expresszióját képes alulszabályozni (43). A miRNS-126 szintén befolyásolja a thrombocytaaktivációt, főleg a felszíni fehérjék expressziójának (beleértve a P2Y<sub>12</sub>-receptort) regulálásával (44), de endothelsejtek is expresszálják, az atherosclerosis folyamataiban is azonosították (45). Harris és mtsai vizsgálata alapján a miRNS-126 emelkedett szintje a VCAM-1 koncentrációjának csökkenését okozza (46). A miRNS-181b egy főleg endothelsejtek által expresszált miRNS, csökkent expresszióját Fejes és mtsai emelkedett VCAM-1 és E-szelektin szintekkel hozták összefüggésbe coronaria stentelés után (47), míg fokozott expressziója a trombin-indukált endothelsejt aktivációt gátolta egy másik kutatás eredményei alapján (48).

#### 1.6. A vizsgálat megalapozottsága

Ahogy az 1.3.2. fejezetben említésre került, a CTO-PCI esetenként komolyabb kihívás elé állítja az interventiós kardiológust, hiszen az occlusio vezetődróttal való penetrációja és a stent lejuttatása korántsem egyszerű feladat. A beavatkozás alatt szükség lehet a mikrokatéterek 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, és jelentősebb érfali, többek között endothel sérüléssel jár. Mindezek miatt a beavatkozás gyakran elhúzódik, az eszközökkel való manipuláció, a ballonos tágítás és stent implantatio miatt a vérlemezkek és a véralvadási kaszkád jelentős aktiválódása várható, melyek a beavatkozás rövid és hosszú távú hatékonyságát befolyásolhatják. A korai reocclusiók és thrombosis, illetve a késői restenosisok gyakorisága arányos lehet a fokozott thrombocyta aggregáció és endothel aktiváció hajlammal.

## 2. 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.

### 3. Betegek és módszerek

#### 3.1. A betegpopuláció

2019 januárja és 2020 szeptembere között 59 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. Alapvetően minden beteg gyógyszerelése tartalmazta a napi 100mg aszpirint, mely a korábban diagnosztizált coronaria betegség miatt került felírásra. A betegek egy része a CTO-PCI-t megelőző fél éven belül stent implantation esett át, így ők 100mg aszpirin + 75mg clopidogrel terápiával kerültek felvételre az elektív beavatkozás előtt. Azon betegek, akik mindössze 100mg aszpirint szedtek a beavatkozás előtt, 300mg clopidogrel telítő dózisban részesültek egy nappal a CTO-PCI előtt. Végsősoron, minden beteg ugyanazon az aszpirin + clopidogrel kettős thrombocyta aggregatio gátló kezeléson volt a beavatkozás reggelén, mikor az első vérvétel megtörtént. 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. Krónikus totalis occlusiónak tekintettük a coronarographiával igazolt, legalább 3 hónapja fennálló teljes elzáródást (TIMI flow 0). Az occlusio fennállásának időtartamát az első anginás panaszok megjelenése és anamnesztikus adatok alapján becsültük meg. Sikeres revascularisatióknak tekintettük azokat a beavatkozásokat, melyek után 30%-nál kisebb átmérőcsökkenés maradt vissza a kezelt érszakaszon és TIMI 3 áramlás állt helyre.

#### 3.2. A vizsgálat menete

A második fejezetben megfogalmazott célkitűzések megvalósítása érdekében betegeinktől három különböző időpontban vérmintákat gyűjtöttünk, amelyekből sejtaktivációs markerek mennyiségét határoztuk meg. 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. A perifériáról nyert vérminták felhasználásával mértük a thrombocyták felszíni P-szelektin expresszióját, a solubilis P-szelektin, 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 TG tesztet használtunk. Minden perifériás vénás vérvétel idején rögzítettük a rutin labordiagnosztikában használatos paramétereket. Az első vérvétel a beavatkozás előtt perifériás vénából történt, míg a második és harmadik mintavétel az intervenció 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. Minden alkalommal 3,2% Na-citrátot tartalmazó Vacutainer csőbe (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) került a levett vér. A thrombocyták felszíni P-szelektin expressziójának meghatározása után a teljes vért szobahőmérsékleten 15 percig, 1 500 g-n centrifugáltuk. Ezzel thrombocytaszegény plazmát (platelet poor plasma: PPP) nyertünk, amelyet -80 C°-on tároltunk további felhasználásig. A beavatkozás végén dokumentáltuk a beavatkozás módját (WE vagy DR) és időtartamát, a felhasznált heparin mennyiségét, a felhasznált CTO-drótok számát, az implantált stentek számát, típusát, méretét. A harmadik vérvétel időpontjában, melyre 3-6 hónappal később, a betegek ambuláns kontrollvizsgálatokor került sor, értékeltük a betegek klinikai állapotát, szubjektív panaszait. A betegek utánkötése ambuláns megjelenés vagy telefonos konzultáció útján történt. Az utánkötési 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.

Az utánkövetési idő alatt regisztráltuk a betegek klinikai állapotát, és panaszos, illetve panaszmentes kategóriába soroltuk őket. Panaszosnak tekintettük azokat a betegeket, akiknél az alábbi tünetek közül legalább egy fennállt: mellkasi fájdalom, fulladás, nehézlégzés, csökkent terhelhetőség.

### 3.3. Coronaria interventio

A beavatkozásokat két tapasztalt interventiós kardiológus végezte femoralis vagy radialis behatolási kapukat használva. Minden sikeres PCI DES implantációval végződött. A legtöbb esetben sirolimust vagy everolimust kibocsájtó stent került beültetésre, 1-1 esetben a stentek biolimus vagy zotarolimus bevonattal rendelkeztek.

### 3.4. A betegpopuláció felosztása

Kutatásunk két fő kérdés köré szerveződött. Elsőként a drót eszkalációs és dissectio-reentry technikával végzett beavatkozásokat hasonlítottuk össze az interventio után mérhető endothelsejt aktivációs markerek szempontjából. Ezután érdeklődésünk a beavatkozások karakterisztikája, és az ezekkel összefüggő sejtaktivációs markerek mennyiségi változása felé fordult. Ehhez a betegpopulációt további három szempont alapján csoportokra bontottuk. A WE vs DR összehasonlításán túl a japán CTO score (J-CTO score), a beavatkozás időtartama, és az implantált stentek összesített hossza alapján osztottuk fel populációnkat. A J-CTO pontrendszer a beavatkozás várható nehézségének, időtartamának becslésére hozták létre a következő szempontok alapján: az occlusio hossza, a proximális sapka tompa vagy kúpos alakja, az elzáródott érszakaszon legalább 45°-os kanyarulat, meszesedés jelenléte és korábbi sikertelen revascularizációs kísérlet (49). Ezek értékelésével könnyű, közepesen nehéz, nehéz

és nagyon nehéz (J-CTO score 0, 1, 2 és 3) beavatkozások jósolhatók. 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.

### 3.5. Laboratóriumi vizsgálatok

#### 3.5.1. Felszíni P-szelektin expresszió

A thrombocyták felszíni P-szelektin expressziójának mérése mindhárom vérvétel esetén a vérvétel idejétől számított 2 órán belül megtörtént. A teljes vérmintát 1%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk. A thrombocyták festéséhez CD42a FITC, CD62P és Platelet Control IgG1 antitesteket (Becton Dickinson) használtunk. Minden egyes vizsgálatkor 10 000 vérlemezket elemeztünk minden mintából FC 500 áramlási citométer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) segítségével.

#### 3.5.2. Solubilis adhézions fehérjék koncentrációinak meghatározása

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 percre, szobahőmérsékleten. A solubilis P-szelektin koncentrációk megállapításához Quantikine ELISA Human P-selectin/CD62P Immunoassay ELISA kitet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 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).

### 3.5.3. Keringő mikroRNS-ek relatív expressziójának meghatározása

Az extracelluláris miRNS-ek (miR-223, miR-181b, miR-126) relatív expresszióját perifériáról nyert plazmamintákból határoztuk meg. Miután a -80 C°-on tárolt mintákat kiolvasztottuk, 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 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 deoxynukleotid (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 (50).

#### 3.5.4. Trombingenerációs teszt

A trombingenerációs teszteket 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 $\mu$ L PPP és 20 $\mu$ L reagens került, mely a trombinképződés beindításához volt szükséges, és 1pM szöveti faktort és 4 $\mu$ M foszfolipidet tartalmazott. 10 perces, 37 °C-on való inkubálás után 20 $\mu$ 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 trombin 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 a time to peak-kel (ttPeak, a maximális trombinaktivitás elérésének ideje, min) jellemeztük. A méréseket a gyártó ajánlásainak megfelelően végeztük.

#### 3.6. 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 Chi<sup>2</sup>-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).

## 4. Eredmények

### 4.1. 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 jellemzőket és általános klinikai adatokat az 1. sz. táblázat tartalmazza. Ezekből kiolvasható, hogy a vizsgálatunkban részt vevő betegek egy idős, több társbetegséggel rendelkező betegpopulációt alkottak.

Életkor $\pm$ SD	61,78 $\pm$ 8,72
Férfiak, n (%)	30 (60)
Hypertonia az anamnézisben, n (%)	42 (84)
Hyperlipidaemia az anamnézisben, n (%)	48 (96)
Obesitas az anamnézisben, n (%)	45 (90)
AMI az anamnézisben, n (%)	22 (44)
DM az anamnézisben, n (%)	19 (38)
Átlagos J-CTO score $\pm$ SD	1,52 $\pm$ 0,95
ACEi / ARB, n (%)	44 (88)
BB, n (%)	45 (90)
Nitrát, n (%)	21 (42)
Statin, n (%)	42 (84)

1. táblázat. Főbb demográfiai és klinikai jellemzők a vizsgált betegpopulációban. Rövidítések: SD: standard deviáció, AMI: akut myocardialis infarktus, DM: diabetes mellitus, J-CTO score: japán chronic total occlusion score, ACEi: angiotenzin konvertáló enzim inhibitor, ARB: angiotenzin receptor blokkoló, BB: béta-blokkoló.

### 4.2. WE és DR technikák összehasonlítása endothel aktivációs markerek alapján

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 jellemzőit, valamint kiindulási, rutin diagnosztikában használatos laborparamétereit a 2. és 3. sz. táblázat hasonlítja össze. Ezek alapján megállapítható, hogy a két csoport homogénnek tekinthető, sem az anamnesztikus adatokban, sem pedig laborértékekben nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns különbség.

	<b>WE (n=29)</b>	<b>DR (n=21)</b>	<b>p-érték</b>
Életkor (évek) ± SD	61,45 ± 9,98	62,24 ± 6,79	0,883
Férfiak, n (%)	17 (58,6)	13 (61,9)	0,815
Hypertonia, n (%)	24 (82,8)	18 (85,7)	0,912
Hyperlipidaemia, n (%)	27 (93,1)	21 (100)	0,994
Obesitas, n (%)	26 (90)	19 (90)	0,924
AMI az anamnézisben, n (%)	15 (51,7)	7 (33,3)	0,196
DM az anamnézisben, n (%)	10 (34,5)	9 (42,9)	0,547
J-CTO score ± SD	1,31 ± 0,97	1,81 ± 0,87	0,086
ACEi / ARB, n (%)	27 (93,1)	17 (81)	0,223
BB, n (%)	26 (90)	19 (90,5)	0,999
Nitrát, n (%)	13 (44,8)	8 (42,1)	0,999
Statin, n (%)	25 (86,2)	17 (81)	0,706

2. táblázat: Főbb demográfiai és klinikai jellemzők összehasonlítása a drót eszkalációs és a dissectio-reentry technikával kezelt betegcsoportok esetén. Rövidítések: WE: wire escalation, DR: dissection and reentry, SD: standard deviáció, AMI: akut myocardialis infarktus, DM: diabetes mellitus, J-CTO score: japán chronic total occlusion score, ACEi: angiotenzin konvertáló enzim inhibitor, ARB: angiotenzin receptor blokkoló, BB: béta-blokkoló.

	<b>WE (n=29)</b>	<b>DR (n=21)</b>	<b>p-érték</b>
Fehérvérsejtszám (G/L) ± SD	7,8 ± 2,1	7,9 ± 1,7	0,783
Vörösvértestszám (T/L) ± SD	4,6 ± 0,5	4,7 ± 0,5	0,694
Hemoglobin (g/L) ± SD	139 ± 14	140 ± 15	0,898
RDW (%) ± SD	13,1 ± 1,1	<b>14,1 ± 2,1</b>	<b>0,046</b>
Thrombocytaszám (G/L) ± SD	229 ± 62	256 ± 101	0,118
Neutrophilszám (G/L) ± SD	4,7 ± 1,6	4,7 ± 1	0,814
Lymphocytaszám (G/L) ± SD	2,1 ± 0,8	2,3 ± 0,7	0,340
NLR ± SD	2,5 ± 1,2	2,2 ± 0,7	0,498
PLR ± SD	117,6 ± 40,5	116,6 ± 45,5	0,836
Kreatinin (µmol/L) ± SD	88 ± 29	85 ± 23	0,694
GFR-EPI (mL/min/1.73m <sup>2</sup> ) ± SD	73,8 ± 18,2	78,3 ± 14,2	0,699
GOT (U/L) ± SD	23,4 ± 10,3	24,7 ± 12,2	0,800
GPT (U/L) ± SD	29,5 ± 22,9	27,3 ± 14	0,871
CRP (mg/L) ± SD	6,9 ± 16,8	7,1 ± 14,3	0,157
HgbA <sub>1</sub> C (%) ± SD	6,3 ± 1,9	6,5 ± 1,3	0,111

3. táblázat: Rutin diagnosztikában használt laborparaméterek összehasonlítása a drót eszkalációs és dissectio-reentry technikával kezelt betegcsoportok esetén. Rövidítések: WE: wire escalation, DR: dissection and reentry, SD: standard deviáció, RDW: red cell distribution width, NLR: neutrophile-to-lymphocyte ratio, PLR: platelet to lymphocyte ratio, GFR-EPI: glomeruláris filtrációs ráta, GOT: glutamát-oxálacetát-transzamináz, GPT: glutamát-piruvát-transzamináz, CRP: C-reaktív protein, HgbA<sub>1</sub>C: hemoglobinA<sub>1</sub>C

#### 4.2.1. A CTO-PCI technikai vonatkozású eredményei

Elsőként mindig az intraluminalis, drót eszkalációs technikát kísérli meg az intervenciós kardiológus, ennek sikertelensége esetén tér át a subintimalis dissectió eljárásra. Ennek megfelelően a DR technika rendszerint több időt vesz igénybe, mint a WE, és az eszközigénye is magasabb, mint az intraluminalis megközelítésnek. A PCI technikai paramétereinek közötti különbségek a 4. számú táblázatban láthatóak.

	<b>WE (n=29)</b>	<b>DR (n=21)</b>	<b>p-érték</b>
CTO-drótok száma $\pm$ SD	1,46 $\pm$ 0,74	2,86 $\pm$ 1,28	<b>0,0001</b>
Implantált stentek száma $\pm$ SD	1,52 $\pm$ 0,63	2 $\pm$ 0,78	<b>0,030</b>
Össz stenthossz (mm) $\pm$ SD	44,54 $\pm$ 17,27	64,1 $\pm$ 22,13	<b>0,001</b>
Felhasznált heparin (IU) $\pm$ SD	10 857 $\pm$ 3288	10 595 $\pm$ 1786	0,645
A beavatkozás hossza (min) $\pm$ SD	96,1 $\pm$ 40,4	142,9 $\pm$ 52,7	<b>0,002</b>
Kezelt ér: LAD, n (%) $\pm$ SD	13 (44,8)	9 (42,9)	0,890
Kezelt ér: RCA, n (%) $\pm$ SD	12 (41,4)	10 (47,6)	0,661
Kezelt ér: Cx, n (%) $\pm$ SD	4 (13,8)	2 (9,5)	0,647

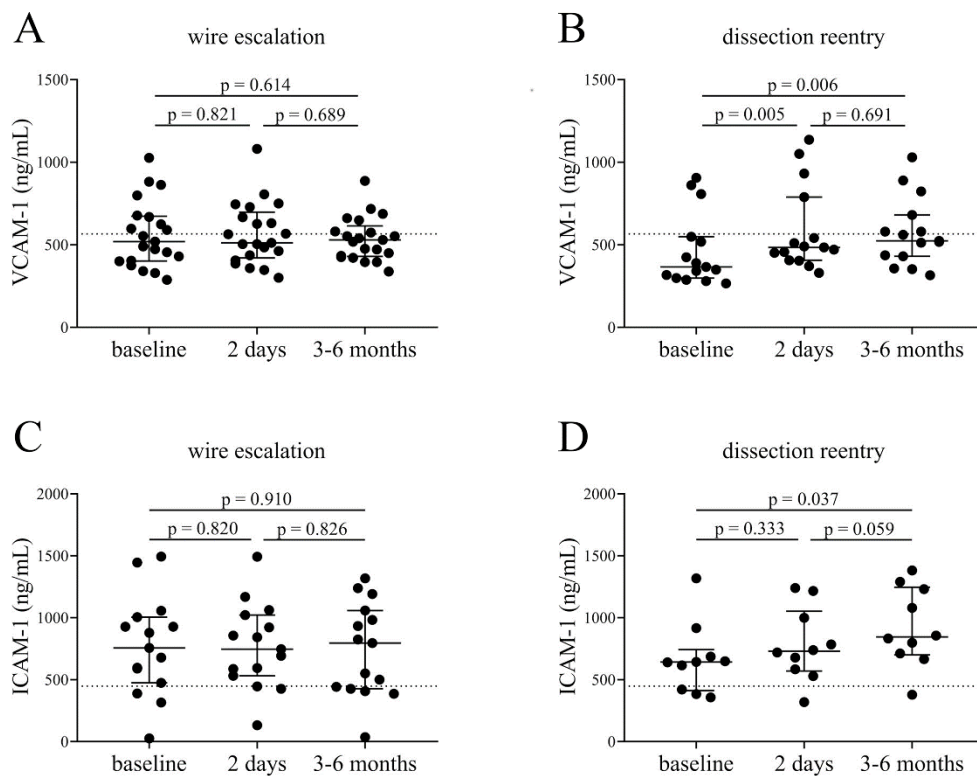
4. táblázat: A beavatkozás technikai paramétereinek összehasonlítása drót eszkalációs és dissectio-reentry technikával kezelt csoportok között. Rövidítések: WE: wire escalation, DR: dissection and reentry, SD: standard deviáció, CTO: chronic total occlusion, LAD: left anterior descendent artery, RCA: right coronary artery, Cx: circumflex artery.

#### 4.2.2. Endothel aktivációt jelző solubilis fehérje koncentrációk változása

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 (1. ábra A panel). Megjegyzendő, hogy a WE csoportba tartozó betegek több mint felénél eleve magasabb VCAM-1 eredményeket mértünk a preoperatív mintákban, mint az általunk meghatározott cut-off érték (566 ng/mL), ezen abnormálisan magas VCAM-1 szintek az utánkövetési idő alatt is perzisztáltak. 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 (1. ábra B panel).

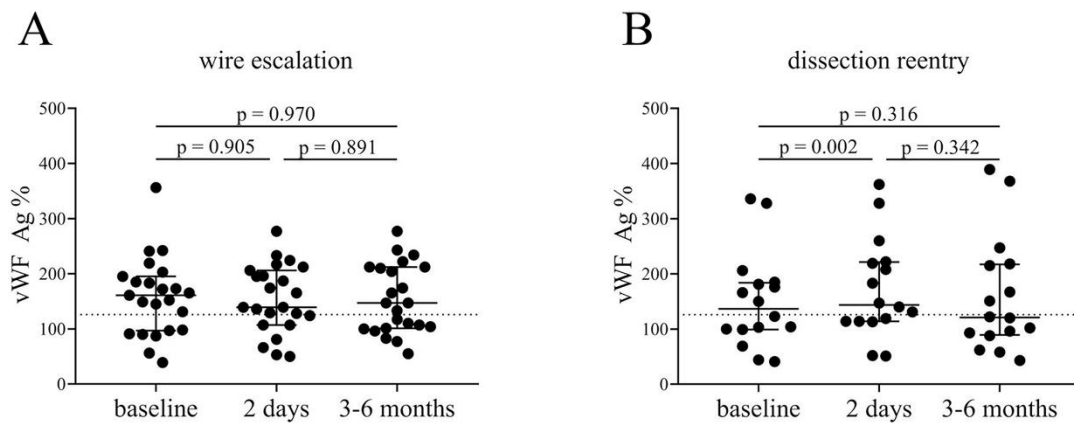
Hasonló eredményeket kaptunk az ICAM-1 koncentrációkat vizsgálva: a WE csoportban nem találtunk különbséget a vérvételi időpontok között (1. ábra C panel), míg a DR technikával kezelt betegek esetén szignifikáns koncentráció emelkedés látható a beavatkozás után 3-6 hónappal később levett vérmintákban a kiindulási értékekhez viszonyítva (844 [700–1246] ng/mL vs 642 [412–743] ng/mL,  $p = 0,037$ ), 1. ábra D panel).



1. ábra: VCAM-1 (A, B panel) és ICAM-1 koncentrációk (C, D panel) összehasonlítása a WE és DR technikával kezelt csoportokban. A mérések a beavatkozás előtt, 48 órával és 3-6 hónappal később nyert vérmintákból történtek. Rövidítések: VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1, ICAM-1: intercellular cell adhesion molecule-1. A pontozott vonal átlagos koncentrációt jelent egészséges egyénekben mérve.

Mértük az endothelsejt aktivitást jellemző vWF Ag mennyiségét is. A WE-kezelt csoportban nem találtunk szignifikáns különbséget a vérvételi időpontok között (2. ábra A panel), míg a

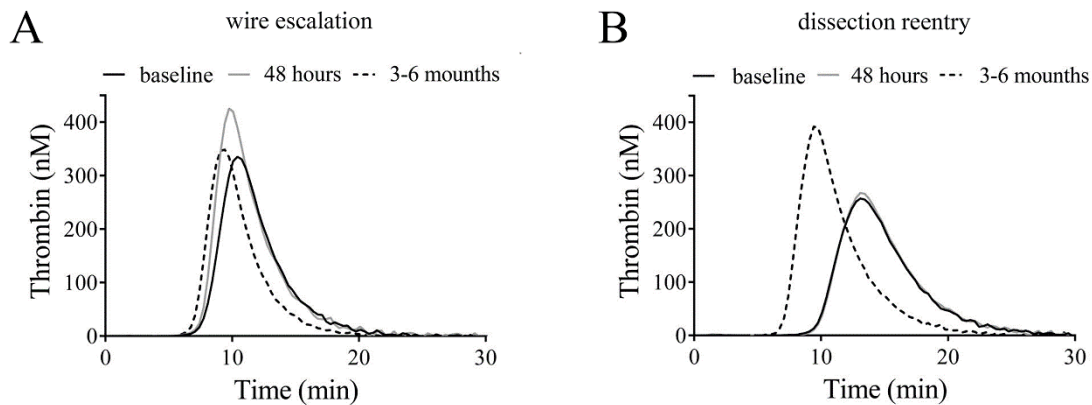
DR-kezelt betegek szignifikáns vWF Ag szint emelkedést mutattak 48 órával a beavatkozást követően (143,5 [114–221,3] % vs 136,5 [99,3–184] %,  $p = 0,002$ ) a kiindulási értékekhez képest (2. ábra B panel). Minthogy a vWF Ag mennyiségét befolyásolja a beteg AB0 vércsoportja (51), a 0-s és nem 0-s vércsoportú betegek Ag szintjét külön-külön elemeztük, azonban így is ugyanazokat az eredményeket kaptuk, így a betegpopuláció két alcsoportját (WE és DR) egyazon ábrán tüntettük fel.



2. ábra. vWF Ag szintek összehasonlítása a WE (A) és DR-kezelt (B) csoportokban. A mérések a beavatkozás előtt, 48 órával és 3-6 hónappal később nyert vérmintákból történtek. Rövidítések: vWF Ag: von Willebrand faktor antigén

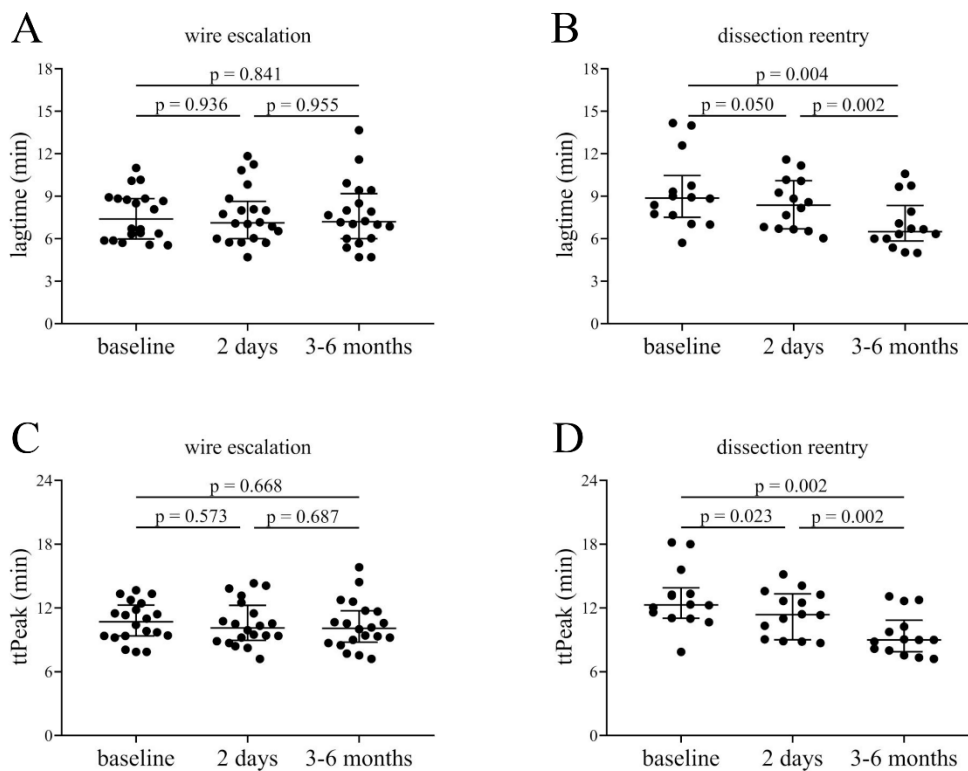
#### 4.2.3. Trombingenerációs tesztek eredményei

A koagulációs kaszkád aktivitásának jellemzésére TG tesztet végeztünk. A 3. ábrán két reprezentatív TG görbe látható egy WE és egy DR csoportból kiválasztott egyén vérmintája alapján.



3. ábra: A trombinképződés kinetikáját bemutató ábra egy WE- (A panel) és egy DR-kezelt beteg (B panel) esetén a beavatkozás előtt, 48 órával és 3-6 hónappal később.

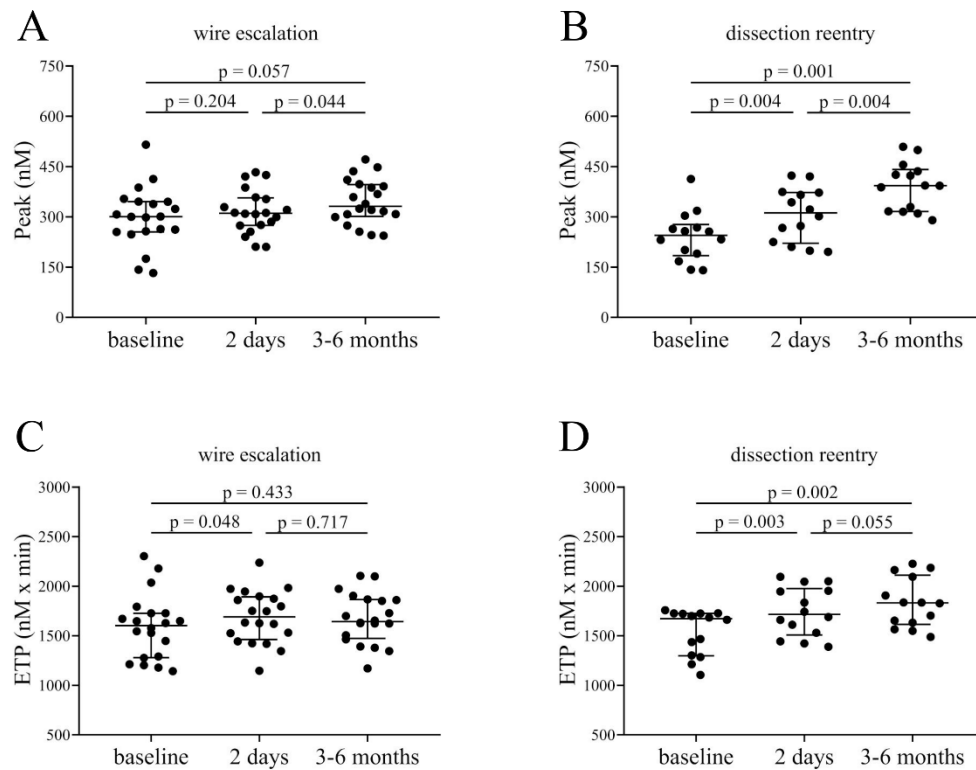
A WE kezelt csoportban nem találtunk szignifikáns különbségeket a késleltetési idő és ttPeak értékeit elemezve (4. ábra A és C panel). A DR csoportban azonban egy közel szignifikáns csökkenést (8,38 [6,7–10,1] min vs 8,88 [7,51–10,46] min,  $p = 0,05$ ) észleltünk a késleltetési időben 48 órával a beavatkozás 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 (4. ábra B panel). 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 (4. ábra D panel).



4. ábra: A trombinképződés kinetikáját jellemző paraméterek ábrázolása a WE és DR technikával kezelt betegcsoportokban. Az ábrán a késleltetési idő (A, B) és ttPeak (C, D) értékei láthatók a beavatkozás előtt, 48 órával és 3-6 hónappal később. Rövidítés: ttPeak: time to peak.

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 betegcsoportokban a vérvételi időpontok között (5. ábra A panel). 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 (5. ábra B panel). Az ETP-t vizsgálva a WE-kezelt betegek között 48 órával az intervenció után szignifikáns különbség mutatkozott ( $p = 0,048$ , 5. ábra C panel) 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 (5. ábra D panel).



5. ábra: A keletkezett trombin mennyiségét jellemző paraméterek ábrázolása a WE és DR technikával kezelt betegcsoportokban. Az ábrán a maximális trombinaktivitás (A, B) és az endogén trombin potenciál (C, D) értékei láthatók a beavatkozás előtti, 48 és 3-6 hónappal későbbi időpontokban. Rövidítés: ETP: endogenous thrombin potential

#### 4.2.4. 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. Megjegyzendő, hogy az implantált stentek hossza szoros kapcsolatban van a beavatkozás típusával, minthogy subintimalis dissectio-

reentry esetén általában hosszabb stenttel lehetséges csak lefedni a laesiót, mint az intraluminalis technika esetén.

#### 4.2.5. A klinikai utánkövetés eredményei

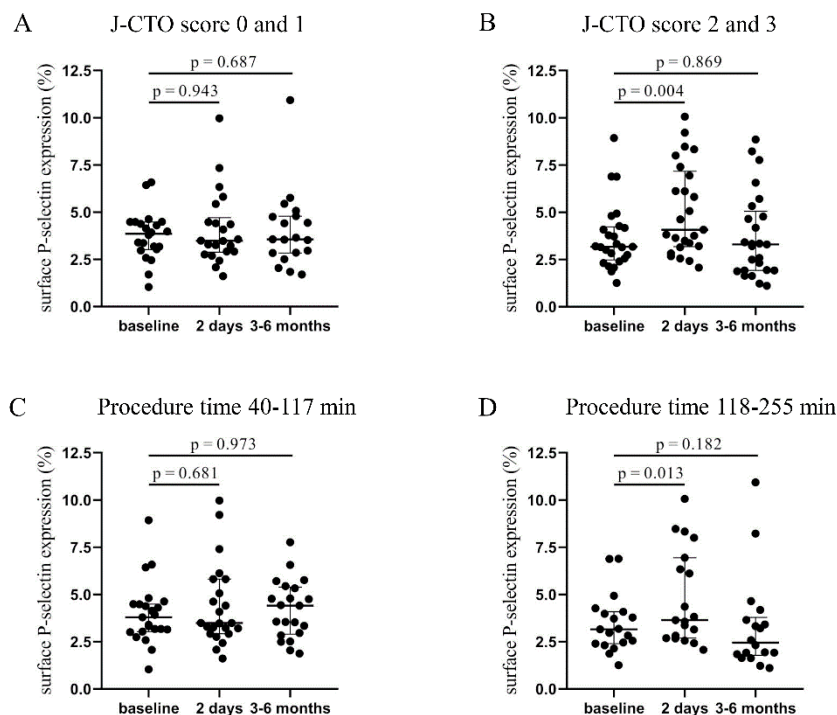
A medián 8,5 hónapos utánkövetési idő alatt mindössze egy esetben jelentkezett szövődmény, mely egy stent thrombosis volt 14 hónappal a beavatkozás után egy 69 éves férfi betegnél, akinek a CTO-ját a drót eszkalációs technikával sikerült megnyitni, így a WE-kezelt csoportban 3,44%-os szövődményrátát 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 ( $p = 0,865$ ).

#### 4.3. Beavatkozások karakterisztikája szerint vizsgált aktivációs markerek

A következőkben olyan szempontok alapján osztottuk két csoportra a betegpopulációt, melyek a beavatkozás megterhelő jellegéről nyújtanak információt. A WE vs DR összehasonlításon túl ilyen volt pl. az alacsony (0 vagy 1) és magas (2 vagy 3) J-CTO score, a beavatkozás rövidebb (40-117 min) és hosszabb (118-255 min) időtartama, valamint az implantált stentek összesített rövidebb (16-53 mm) vagy hosszabb (54-127 mm) mérete. A vizsgált markerek a thrombocyták felszíni P-szelektin expressziója, a solubilis P-szelektin koncentrációja, a miR-223, miR-181b és miR-126 relatív expressziója voltak.

##### 4.3.1. Thrombocyták felszíni P-szelektin expressziója

Az alacsony (0 vagy 1) J-CTO score-ral rendelkező betegek esetén nem találtunk szignifikáns különbséget a trombocyták felszíni P-szelektin expressziójában a vérvételi időpontok között (6. ábra A panel). 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-szelektin pozitivitást mértünk a kiindulási értékekhez viszonyítva (6. ábra B panel). A rövidebb időtartamú beavatkozásban részesülő betegek szintén nem mutattak különbséget a felszíni P-szelektin expresszióban a vérvételi időpontok között (6. ábra C panel), ám hosszabb beavatkozás esetén szignifikánsan magasabb P-szelektin pozitívitas 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 (6. ábra D panel). Az összesített stenthossz alapján történő felosztás esetén nem találtunk szignifikáns különbségeket a vérvételi időpontok között sem a rövidebb, sem a hosszabb stent implantatió átesett betegek között, ezt külön ábrán nem tüntetjük fel.

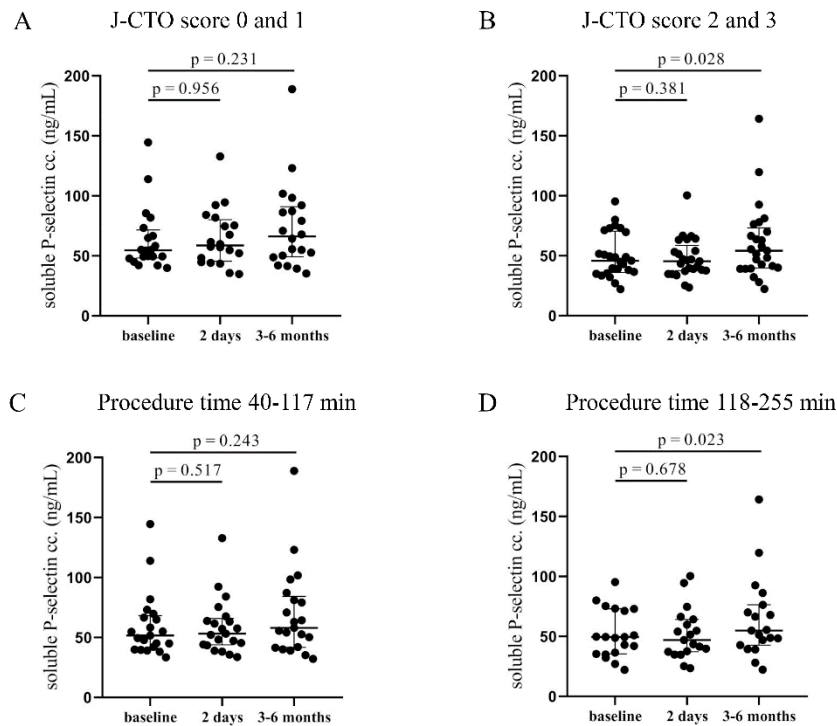


6. ábra: Thrombocyták felszíni P-szelektin expressziójának összehasonlítása alacsony (A) és magas (B) J-CTO score, valamint rövidebb (C) és hosszabb (D) beavatkozások esetén a PCI

előtt, valamint 48 órával és 3-6 hónappal később nyert vérminták vizsgálata alapján. Rövidítések: J-CTO score: japanese chronic total occlusion score, PCI: percutaneous coronary intervention

#### 4.3.2. Solubilis P-szelektin koncentrációk

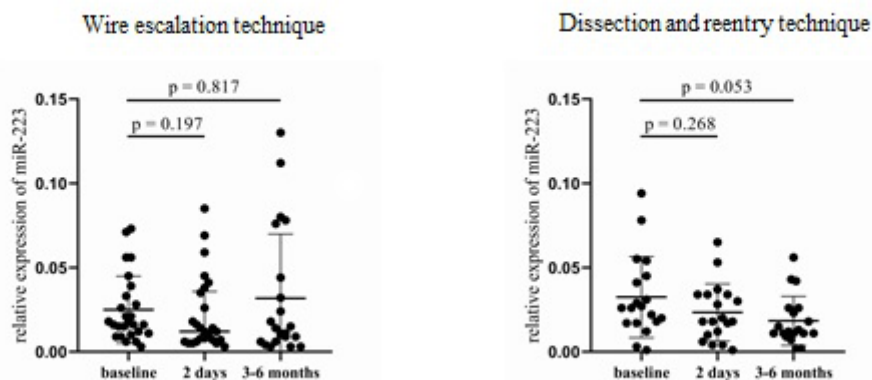
Az alacsony J-CTO score-ral rendelkező betegek esetén nem mutatkozott szignifikáns változás 2 nappal és 3-6 hónappal a PCI után a solubilis P-szelektin koncentrációk vonatkozásában a kiindulási értékekhez képest (7. ábra A panel), azonban magas J-CTO score esetén szignifikáns solubilis P-szelektin koncentráció 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 (7. ábra B panel). Ugyanígy, rövidebb beavatkozások kapcsán nem volt mérhető szignifikáns koncentráció változás (7. ábra C panel), azonban hosszabb intervenció esetén ugyancsak 3-6 hónappal a PCI után adódott szignifikáns solubilis P-szelektin 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 (7. ábra D panel). Az implantált stentek összesített hossza alapján létrehozott két alsóport nem mutatott különbséget a vérvételi időpontok között a solubilis P-szelektin koncentrációk tekintetében, külön ábrán ez utóbbit sem mutatjuk be.



7. ábra: Solubilis P-szelektin koncentrációk összehasonlítása alacsony (A) és magas (B) J-CTO score, valamint rövidebb (C) és hosszabb (D) beavatkozások esetén a PCI előtt, valamint 48 órával és 3-6 hónappal később nyert vérminták vizsgálata alapján. Rövidítések: J-CTO score: japanese chronic total occlusion score, PCI: percutaneous coronary intervention

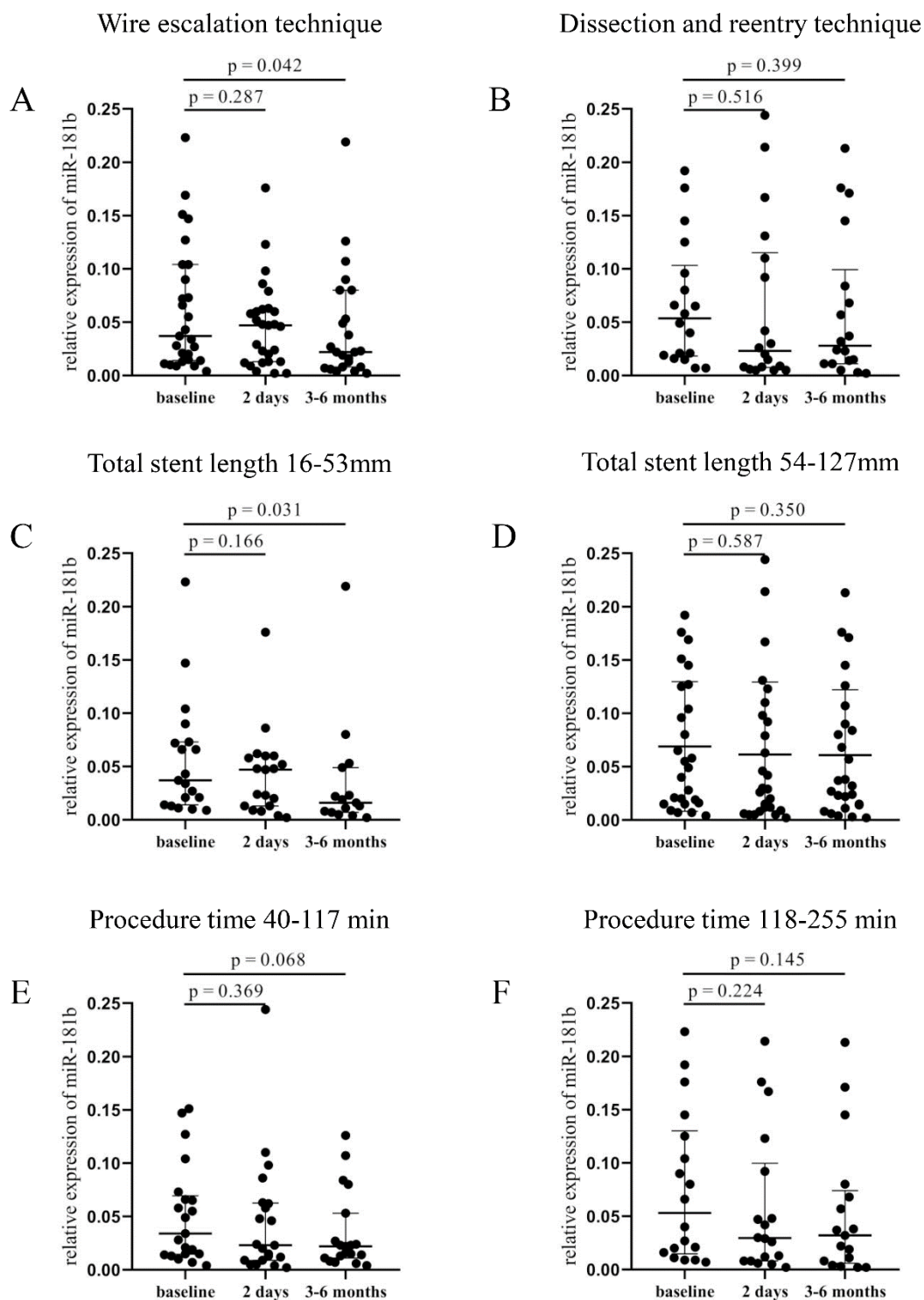
#### 4.3.3. Keringő mikroRNS-ek relatív expressziójának meghatározása

A drót eszkalációs technikával kezelt csoportban nem találtunk szignifikáns különbséget a mikroRNS-223 relatív expressziója kapcsán a vérvételi időpontok között (8. ábra A panel), míg a dissectio-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 (8. ábra B panel). 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 különbséget nem mutató paraméterekről nem mutatunk be ábrát.



8. ábra: MikroRNS-223 relatív expressziójának összehasonlítása a drót eszkáliciós (A) és dissectio-reentry (B) technikával kezelt betegek esetén a beavatkozás előtt, valamint 48 órával és 3-6 hónappal később nyert vérminták vizsgálata alapján

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 (9. ábra A panel), míg a DR-kezelt csoportban bár szintén megfigyelhető csökkenő tendencia, de ennek mértéke nem érte el a statisztikai szignifikancia határát (9. ábra B panel). 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 (9. ábra C panel), míg a hosszabb stent implantációban részesülő betegek csoportja nem mutatott különbséget a vérvételi időpontok között miR-181b tekintetében (9. ábra D panel). 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 (9. ábra E panel), míg a hosszabb időtartamú beavatkozás csoportjában nem mutatkozott különbség a miR-181b relatív expressziójában az intervenció előtti és utáni értékek között (9. ábra F panel).



9. ábra: A mikroRNS-181b relatív expressziójának összehasonlítása drót eszkalációs (A) és dissectio-reentry (B) technika, rövidebb (C) és hosszabb (D) stenthossz, valamint rövidebb (E) és hosszabb (F) időtartamú beavatkozás esetén a beavatkozás előtt, valamint 48 órával és 3-6 hónappal később nyert vérminták vizsgálata alapján.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. WE és DR technikák összehasonlításából származó eredmények értelmezése

A PCI éra kezdete óta számos tanulmány született arról, miként hat a percutan interventio és az ezzel együtt járó manipuláció, a ballonos tágítás és stent implantatio a vasculaturára, az endothelsejtekre, thrombocytákra és a véralvadási kaszkádra (52-57). 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. Minthogy a két alapvető CTO-PCI methodika, az intraluminalis drót eszkalációs és a subintimalis dissectio-reentry technika biztonságosságának összehasonlítása ezen kutatásnak is része volt, endothel- és thrombocytaaktivációs markerek laboratóriumi vizsgálatával megerősítve, lehetőségünk van a kimenetelre vonatkozó eredményeinket összevetni a nemzetközi irodalom ilyen irányultságú kutatásaival, azonban a biomarkerek mennyiségi összehasonlításából származó eredményeket csak ACS-en átesett és stabil anginás populációkon végzett vizsgálatok tükrében tudjuk értékelni.

Munk és mtsai 2010-ben publikálták vizsgálatukat, melyben 36, stabil angina pectorisban szenvedő, elektív PCI-n átesett beteg részvételével határozták meg különböző gyulladáso mediátorok plazmaszintjét PCI előtt és után (53). Ezen markerek között volt a VCAM-1 is, mely a mi kutatásunkban is szerepelt. A perifériás vérmintavételek a PCI előtt, PCI után közvetlenül, majd 3 és 24 órával, valamint 3 és 7 nappal később történtek. 3 nappal a beavatkozást követően szignifikánsan magasabb VCAM-1 plazma koncentrációt mértek, mely a 7. npra visszatért a kiindulási értékre (53). Szük és mtsai 2016-os tanulmányukban a VCAM-1 és ICAM-1 plazmaszinteket egyaránt meghatározták és hasonlították össze BMS és DES implantatióan átesett betegcsoportok között (54). Azon 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. Szintén fontos eredménye még a vizsgálatnak, hogy azon betegek, akiknél 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 (54). Jelen vizsgálatunkban a WE-technikával kezelt csoportban nem volt szignifikáns növekedés a VCAM-1 és ICAM-1 koncentrációkban a vérvételi időpontok között, míg a DR-technikával kivitelezett PCI esetén 48 órával később már szignifikáns mértékű koncentrációemelkedést tapasztaltunk a VCAM-1 esetében, amely 3-6 hónappal később is jelentősen emelkedett szinten maradt. Az ICAM-1 plazmaszinteket vizsgálva hasonló eredményt kaptunk a DR csoportban: bár már 48 órával a PCI után növekvő tendencia látható, a statisztikai szignifikancia határát 3-6 hónappal később érte el ez a koncentráció-növekmény. Megjegyzendő, hogy a kiindulási értékek VCAM-1 és ICAM-1 esetében is különbözőnek imponálnak a két különböző technikával kezelt betegcsoport között az 1. ábra paneljeit vizsgálva, azonban statisztikailag szignifikáns különbség egyik esetben sem volt (VCAM-1:  $p = 0,059$ ; ICAM-1:  $p = 0,420$ ). Minthogy a betegek adott csoportba sorolása a beavatkozás és a laesio karakterisztikájának függvénye volt és az első vérvétel után történt meg, nehéz megállapítani, mi okozhatta a kiindulási értékekben tapasztalt eltérést ezen solubilis fehérjék plazmakoncentrációinak esetében, azonban a szisztematikus koncentráció emelkedést a kiindulási eredményekhez képest csak a DR-csoportban láthatjuk, így valószínű, hogy a pre-PCI értékek különbözősége nem volt hatással eredményeinkre. Jin és mtsai sirolimust kibocsátó stent implantációja után bekövetkező késői ST és endothelialis dysfunctiót jellemző biomarkerek közötti összefüggéseket vizsgálták 2010-ben publikált tanulmányukban (58). Ezen kutatás 1 585, PCI-n átesett beteg bevonásával zajlott, ebből 813-an rendelkeztek kontroll angiographiás eredménnyel az utánkövetés alatt. Közülük került ki az a 41 páciens, akiknél angiographiával megerősített ST-t diagnosztizáltak. 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. Ezen paraméterek közül a vWF és a VCAM-1 koncentráció emelkedés függetlenül társult a késői ST kialakulásához multivariációs regressziós analízis alapján (58). A mi vizsgálatunkban mindösszesen egy 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. Boos és mtsai a vWF mennyiségét vizsgálták coronaria angiographián és PCI-n átesett betegeken (52). Ehhez vérvételek történtek a beavatkozás előtt, valamint 15 perccel és 24 órával utána. PCI esetén szignifikáns mértékű vWF szintemelkedést tapasztaltak a kiindulási értékekhez képest már a beavatkozást követő 15 perc elteltével, és ezen emelkedés 24 órával később is perzisztált. Azon betegek, akiknél diagnosztikus angiographia történt, nem mutattak jelentős mértékű változást a vWF tekintetében a beavatkozást követően (52). Más vizsgálatok a magas vWF szinteket a *de novo* kialakuló, valamint rekurrens myocardialis infarktus független prediktoraként azonosították stabil anginás betegeken (59, 60). Jelen vizsgálat a DR-technikával kezelt betegek csoportjában jutott hasonló eredményre: 2 nappal a beavatkozást követően szignifikánsan magasabb vWF szintet mértünk a pre-PCI értékekhez képest, és bár 3-6 hónappal később is magasabbak az értékek, a különbség ekkor már nem nevezhető statisztikailag jelentősnek. Ugyanakkor a WE-kezelt csoportban nem mutatkozott különbség a vérvételi időpontok között. Összességében elmondható, hogy azon betegek, akik CTO-ját a 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 halálózásra (61). Minthogy a TG tesztek elvégzésekor reagensünk nagyon alacsony koncentrációban tartalmazott szöveti faktort, a plazma minták TG potenciálja leginkább a beavatkozás által aktivált endothelsejtekből felszabaduló szöveti faktor mennyiségétől függött. A 4.2.3. fejezet soraiból egyértelmű, 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 eszkáliciós 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. A nemzetközi irodalomban fellelhető néhány tanulmány, amely a WE és DR technika biztonságosságának és kimenetelének rövid- és hosszútávú összehasonlításával foglalkozik. Godino és mtsai 355 olyan beteg bevonásával végeztek vizsgálatot, akik sikeres CTO-PCI-n estek át (62). Közülük 281 betegnél a WE, míg

74 esetben az ún. guided subintimal tracking and reentry (guided-STAR) technika segítségével sikerült passzálni a CTO-t. 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 (62). Azzalini és mtsai 924 beteg bevonásával hasonlították össze a WE, modern DR (CrossBoss, Stingray, rCART) és régebbi DR (LAST: limited antegrade subintimal tracking, STAR: subintimal tracking and reentry, CART: controlled antegrade and retrograde subintimal tracking) eljárásokat (63). A modern dissectiós technikákkal valamelyest enyhébb érsérüléssel kivitelezhető a subintimalis térbe való penetráció, valamint a valódi lumenbe történő visszatérés irányított módon zajlik, azonban használatuk optimális anatómiai feltételeket és nagy tapasztalatot igényel. A régebbi dissectiós technikák megfelelően formázott, erős tartású drót alkalmazásával vezetnek eredményre, használatuk egyszerűbb, azonban az okozott érsérülés valamivel kiterjedtebb. Azok a betegek, akik WE és modern DR kezelést kaptak, nem mutattak különbséget a TVR és MACE rátákban, azonban a régebbi dissectiós eljárással kezelt betegek körében a TVR, és így a MACE gyakorisága is (WE: 9.1 %, modern DR: 8.9 %, régebbi DR: 22.1 %,  $p < 0.001$ ) szignifikánsan magasabb lett (63). Rinfret és mtsai 2014-ben publikált tanulmányukban 187, sikeres CTO-PCI-n átesett beteg részvételével hasonlította össze a WE és modern DR technikák hosszútávú kimenetelét (64). Az esetek 56%-ában a WE, míg 44%-ban a modern DR technikák jelenetették a megoldást. 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 (64). Hasonló eredményre jutott Amsavelu kutatócsapata (65). Jelen vizsgálatban nem tudtunk szignifikáns különbséget igazolni a WE és DR-kezelt csoportok között MI, ST, a TVR előfordulása és halálozás tekintetében a medián 8,5 hónapos utánkövetési idő alatt. Az irodalmi

adatok 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 (66-68).

## 5.2. A beavatkozások karakterisztikája alapján kapott eredmények értelmezése

Ezidáig nem született olyan tanulmány, mely a thrombocyták aktiválódását vizsgálta volna krónikus totális coronaria occlusióban szenvedő betegek elektív percutan intervenciója kapcsán, a vérlemezkeaktivációval foglalkozó kutatások zöme szintén ACS-es és stabil anginás populációkra fókuszál. Jelen vizsgálatunkban áramlási citometriás mérésekkel szignifikáns mértékű thrombocytaaktivációt igazoltunk 2 nappal a CTO-PCI után, amennyiben az komplikált és hosszadalmas volt. A PCI éra kezdete után néhány évvel megjelentek az első kutatások, melyek a PCI thrombocytaaktivációra gyakorolt hatását fejtegették. Inoue és mtsai 1996-ban publikálták tanulmányukat, melyben 22, stabil anginában szenvedő, PCI-n átesett beteg thrombocytáinak felszíni P-szelektin expresszióját hasonlították össze a beavatkozás előtt és után, és azt találták, hogy PCI után szignifikáns mértékben megnő a P-szelektin pozitív thrombocyták aránya a beavatkozás előtti állapothoz képest (69). Ugyanebben a vizsgálatban a 10, coronaria angiographián (stent implantatio nélkül) áteső beteg nem mutatott szignifikáns változást a CD62-pozitív thrombocyták arányában a kiindulási eredményeikhez képest. Négy évvel később ugyanezen kutatócsoport 24-24, stabil anginában szenvedő beteget véletlenszerűen osztott ballonos angioplasztikával és stent implantációval kezelt csoportokba (70). A stentelt betegeknél a vérlemezke-kapcsolt felszíni P-szelektin transcárdialis gradiense (a sinus coronariusban és a periférián mért értékek különbsége) szignifikáns mértékben emelkedett közvetlenül a stent implantatio után, és ezen emelkedés a 48 órás obszervációs időszak alatt is perzisztált. A ballonos angioplasztikán átesett betegek esetében szintén tapasztalható volt szignifikáns transcárdialis gradiens emelkedés a felszíni P-szelektint illetően közvetlenül a PCI után, azonban jóval kisebb mértékű, és 24 óra elteltével már a kiindulási

értékre csökkent a gradiens (70). Megjegyzendő, hogy bár a vizsgálat résztvevői szintén kettős thrombocyta aggregatio gátló terápián (aszpirin + dipyridamol és aszpirin + ticlopidin) voltak a mintavételezések idején, ezeket a párosításokat már nem alkalmazzuk a mindennapi klinikai gyakorlatban stent implantatio utáni ST megelőzésére. Nagy és mtsai hasonló eredményre jutottak, amikor 25, szintén stabil anginában szenvedő, elektív PCI-n áteső beteg felszíni P-szelektin expresszióját hasonlították össze olyan betegek mintáival (n=20), akik diagnosztikus coronaria angiographián mentek át (57). A stentelt betegek esetén szignifikánsan magasabb arányban azonosítottak CD62-pozitív thrombocytákat 15 perccel a PCI-t követően, mint az angiográfián átesett társaiknál (57). Az Inouétól és Nagytól származó adatok egy irányba mutatnak jelen kutatásunk eredményeivel: röviddel a megterhelőbb, komplexebb, számottevő érsérüléssel járó beavatkozás után szignifikánsan nagyobb mértékű thrombocyta aktivációt detektáltunk.

Nagy kutatócsoportja több solubilis biomarker mennyiségi analízisét is elvégezte fentebb említett tanulmányukban, és nem találtak különbséget a stentelt és coronaria angiographián átesett betegek solubilis P-szelektin koncentrációi között (57). Inoue és mtsai solubilis P-szelektin koncentrációkat is vizsgáltak más egyéb keringő adhéziós fehérjével egyetemben (71). 25 olyan coronariabetegséggel élő beteget választottak ki, akik elektív PCI-n estek át, és megmérték számos adhéziós molekula koncentrációját a sinus coronariusból, valamint perifériás vénából nyert mintákban. Közvetlenül a stent implantatio után szignifikánsan magasabb solubilis P-szelektin koncentrációt mértek a sinus coronariusban a kiindulási értékekhez képest, sőt, a különbség tovább növekedett 24 és 48 órával később (71). A perifériás vénából nyert vérminták nem mutattak különbséget ugyanezen fehérje vizsgálatokor. A mi vizsgálatunkban kapott, solubilis P-szelektinre vonatkozó eredmények összhangban vannak a hasonló betegpopulációk kutatásából származó adatokkal: hosszadalmas, komplex beavatkozások után 3-6 hónappal szignifikánsan magasabb P-szelektin koncentrációt

detektáltunk a pre-PCI értékekhez képest. A magasabb J-CTO scoreral rendelkező betegek hosszú, komplikált, megterhelő beavatkozásban részesültek, az ilyen beavatkozásoknak pedig az érkárosító hatása is kifejezettebb. Ez a thrombocyták felszíni P-szelektin expressziójában is megnyilvánul: 48 órával a beavatkozás után észleltünk szignifikáns expresszió emelkedést a magas J-CTO pontszámú és hosszú intervención átesettek csoportjában, míg 3-6 hónappal később a felszíni P-szelektin expresszió már a kiindulási értékek közelében volt detektálható. A megterhelőbb beavatkozás nagyobb mennyiségű thrombocytá aktiválódását és adhézióját okozza. A vérlemezkék membránjához kötött P-szelektin a thrombocyták viszonylag rövid időn belül megtörténő eliminálódásával proteolitikus hasítás révén előbb solubilis formává változik, majd a keringésből is eltűnik, csökkentve a felszíni P-szelektin expressziót és eleinte növelve a solubilis forma koncentrációját. A 3-6 hónappal később mérhető magas solubilis P-szelektin koncentráció azonban már sokkal inkább az endothelsejteknek köszönhető, minthogy a P-szelektin féléletideje órás nagyságrendben mérhető (72). Ezzel magyarázható a beavatkozás után 3-6 hónappal mérhető szignifikánsan magasabb solubilis P-szelektin koncentráció és a kiindulási szintre csökkenő felszíni P-szelektin expresszió, hiszen a beavatkozás kapcsán aktiválódott vérlemezkék hónapokkal később már nincsenek a keringésben.

Habár a mikroRNS-ek biológiáját és cardiovascularis betegségekben betöltött potenciális szerepét számos tanulmány vizsgálta (73-75), kevés van ezek között, mely a PCI-val összefüggésben értékelte volna a mikroRNS-ek megváltozott expresszióját. Krónikus totális coronaria occlusióban szenvedő populáció kapcsán pedig 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 összehasonlításban találtunk említésre méltó eredményt: a WE-technikával kezelt betegcsoportban nem volt szignifikáns különbség a vérvételi időpontok között, míg a DR-kezelt betegek csoportjában egy közel szignifikáns relatív

expressziócsökkenést detektáltunk ( $p = 0,053$ ) 3-6 hónappal a beavatkozást követően, a kiindulási értékekhez viszonyítva. Egy 2009-es publikációban a miR-223-at a P2Y<sub>12</sub> receptort kódoló mRNS potenciális represszoraként azonosították (43). A subintimalis térbe való penetrációnak köszönhetően a DR-technika jellemzően nagyobb mértékű érsérüléssel jár. Az általunk megfigyelt csökkenő tendencia dissectio-reentry kezelés után összefüggésben lehet a Dai és mtsai által leírt eredményekkel (76). Kutatásukban a miR-223 angiogenesisben betöltött szerepét vizsgálták, amelyhez patkányokból nyert szív eredetű ischaemiás microvascularis endothelsejteket (cardiac microvascular endothelial cells: CMECs) használtak. Azt találták, hogy a miR-223 a RPS6KB1/hif-1 $\alpha$  jelátviteli útvonal befolyásolásával gátolja a CMECs migrációját és proliferációját, ezáltal gátolva ezen sejtek angiogenesisben betöltött szerepét (76). A miR-223 ezen angiogenesis gátló funkciója magyarázhatja a DR-kezelt csoportban megfigyelt közel szignifikáns mértékű relatív miR-223 expressziócsökkenést, minthogy kiterjedt érsérüléssel járó beavatkozások után aktívabbak a remodelációs és angiogenesis serkentő folyamatok.

A miR-181b relatív expressziójának analízise során kapott eredmények némileg ellentmondásosnak bizonyultak. Azon betegek esetén találtunk érdemi eltérést, akik egyszerűbb, rövidebb, kevésbé megterhelő beavatkozáson estek át. A WE-technikával kezelt és rövidebb stent implantációján átesett betegek szignifikánsan alacsonyabb relatív miR-181b expressziót mutattak 3-6 hónappal a beavatkozást követően a kiindulási értékekhez viszonyítva. Alacsony J-CTO score és rövidebb időtartamú beavatkozás esetén a miR-181b relatív expressziójának csökkentő tendenciáját észleltük, azonban ezen változások nem érték el a statisztikai szignifikancia határát. Minthogy a miR-181b a tumor nekrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) által indukált VCAM-1, ICAM-1 és E-selectin expressziót is képes szabályozni (77), ezen eredmények arra engednek minket következtetni, hogy a miR-181b relatív expressziója a CTO-PCI által okozott vascularis gyulladási reakció miatt csökkenhetett le. Ezt a feltevést a Fejes

és mtsai által végzett vizsgálat is erősíti: azoknál a betegeknél, ahol ISR-t (ami BMS implantatio esetén gyakrabban jelentkezik) regisztrálak az utánkövetési idő alatt, szignifikánsan alacsonyabb miR-181b relatív expressziót figyeltek meg (47). Ezen eredményeket coronaria eredetű endothelsejtek in vitro vizsgálatával nyerték, a PCI által kiváltott gyulladási folyamatokat a sejtek TNF- $\alpha$  kezelésével modellezték (47). Mindezen adatok, valamint Harris és mtsai eredményei (46) alapján a miR-126 esetén is relatív expressziócsökkenést vártunk a kiterjedtebb vasularis sérüléssel járó beavatkozások után, azonban nem találtunk szignifikáns különbséget ezen miR vizsgálata esetén a betegpopuláció egyik kategóriájában sem. A jelen vizsgálatban is elemzett mikroRNS-ek szintje rendszerint csökken azokban a folyamatokban, amelyek gyulladási reakcióval, valamint az endothelsejtek és vérlemezkék aktivációjával járnak (44, 48, 78). Ez a miR-223 esetében igazolódni látszott, azonban a miR-181b vizsgálatakor a várttal ellentétes eredmények születtek, míg a miR-126 relatív expressziója egyáltalán nem mutatott változást a vérvételi időpontok között egyik kategóriában sem. 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 thrombocytá aktivációra más mikroRNS-ek is hatással vannak, melyek vizsgálata nem képezte tanulmányunk részét.

Laboratóriumi méréseink eredményeire támaszkodva értékes következtetéseket vonhatunk le. Összegezve az adatokat, jól látszik, hogy hosszú ideig tartó, komplikált, megterhelő CTO-PCI esetén a beavatkozást követően rövid távon inkább a fokozott thrombocytá aktivációval, míg hosszú távon a fokozott endothelsejt aktivációval kell számolnunk, melyek a kiterjedt vasularis sérülés következményei lehetnek. A beavatkozás után nem sokkal detektálható megnövekedett thrombocytá aktiváció rövid távon ST kialakulását, míg a PCI után 3-6

hónappal később észlelhető fokozott endothelsejt aktiváció hosszú távon ISR kialakulását propagálhatja. Külön kiemelendő a DR-technikával kezelték körében észlelt emelkedett trombingenerációs potenciál, amely több paraméter esetén már 2 nappal a beavatkozás után, de még 3-6 hónappal később is látható. Mindez perzisztáló endothelsejt aktivációt jelez, amelyet a solubilis fehérjék emelkedett koncentrációja is megerősít, és amely hosszútávon szintén az ISR kialakulására prediszponál. A megfigyelt fokozott sejtaktiváció ellenére nem észleltünk magasabb szövődmenyrátát a hosszú, komplikált beavatkozások, így a DR-technika kapcsán sem, bár megjegyzendő, hogy az utánkövetési idő letelte után sem zárható ki szövődmények megjelenése. Abban az esetben, ha az adekvát, potens thrombocytá aggregatio gátló kezelés ellenére mechanikai faktor hiányában ST alakul ki, a szövődmény háttérében fokozott endothelsejt aktiváció állhat. A thrombocytá aktivációra vonatkozó eredményeink alapján hosszú, komplikált, megterhelő beavatkozások után a korai posztoperatív időszakban új típusú, potens thrombocytá aggregatio gátló szerek 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.

Vizsgálatunk rendelkezik néhány limitáló tényezővel. Az egyik legfontosabb ezek közül a relatíve alacsony esetszám, a betegek toborzása egyetlen centrumban történt. Az utánkövetési idő relatív rövidsége szintén limitációnak tekinthető, valószínű ezen tényező is hozzájárult az alacsony szövődmenyrátához. Minthogy a betegpopulációnak kevesebb, mint fele esett át kontroll coronaria angiographián, az ISR incidenciájának megítélése nem volt lehetséges, mely az endothelsejt aktivációra vonatkozó eredmények ismeretében talán az elsőként felmerülő kérdés a téma iránt érdeklődőkben. Tekintettel arra, hogy a clopidogrel metabolizmusa nagyban függ a CYP2C19 allélvariációktól (79), genotipikus és farmakogenetikai vizsgálatokkal pontosabb információt kaphattunk volna arról, hogy a röviddel a beavatkozás után mérhető

fokozott thrombocyta aktivációhoz milyen mértékben járul hozzá a clopidogrel non-responderitás, azonban ezen genetikai irányú vizsgálatok nem képezték kutatásunk részét.

## 6. Összegzés

Munkánk során krónikus totális coronaria occlusióban szenvedő betegek percutan intervenciója kapcsán kialakuló endothelsejt és thrombocyta aktivációt vizsgáltunk. Ehhez három különböző időpontban nyert vérmintából meghatároztuk a thrombocyták felszíni P-szelektin expresszióját, számos adhéziós 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 adhéziós 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 a következtetésre jutottunk, hogy a magas J-CTO score-ral rendelkező, hosszú beavatkozáson áteső betegek rövid távon szignifikánsan emelkedett thrombocytaaktivációt mutatnak, míg hosszútávon többnyire az endothelsejt aktiváció dominál, melyet a hónapokkal a beavatkozás után is perzisztáló emelkedett solubilis P-szelektin 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 thrombocyta 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.

## Summary

In present study we investigated endothelial cell and platelet activation in connection with percutaneous coronary intervention in patients suffering from chronic total coronary occlusion. For this purpose, the surface-bound P-selectin of platelets, the plasma concentration of soluble adhesion molecules, the relative expression of selected microRNAs, and the thrombin generation potential were determined from blood samples obtained at three different time points.

In the first part of our research, laboratory parameters of the WE- and DR-treated group were compared. Based on the tests, we confirmed that patients treated with the DR procedure show increased endothelial cell activity in long term, which is indicated by the increased plasma concentration of adhesion proteins and the increased thrombin generation potential as well.

In the second round, cell activation changes related to the characteristics of the intervention were analyzed. For this purpose, the members of the patient population were divided into two parts based on four criteria. We found, that patients with high J-CTO score who underwent prolonged, complex intervention show significantly increased platelet activation in short term, while in long term, endothelial cell activation mostly dominates, which is supported by the significantly elevated concentration of soluble P-selectin, that persists even months after the procedure. Data on the relative expression of selected microRNAs are somewhat contradictory, so they did not contribute to drawing conclusions from the research.

Our laboratory results indicate, that long-lasting, complex interventions with extensive vascular injury are associated with increased platelet activation and thus a higher ST risk in the early follow-up period, while the late postoperative period is characterized by remarkable endothelial cell activation, which may presumably also be responsible for late complications.

## 7. 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.

## **New scientific achievements**

1. In connection with the DR treatment of patients suffering from chronic total coronary occlusion, a significantly higher degree of endothelial cell activation can be measured months after the intervention than in case of using the wire escalation technique.
2. In the DR-treated patient group, all the four parameters of the thrombin generation test show an increased activity of the coagulation cascade both in short and long term after the intervention, in contrast to the patient group treated with the wire escalation technique.
3. Based on clinical data, the type of intervention (WE vs. DR) and the symptoms occurring during the follow-up period are independent of each other.
4. In case of high J-CTO score (2 or 3) and long intervention (118-255 min), a significantly higher platelet activation can be measured 2 days after the intervention than with a low (0 or 1) J-CTO score and short (40-117 min) type of intervention.
5. In case of high J-CTO score (2 or 3) and long intervention (118-255 min), a significantly higher level of endothelial cell activation can be measured months after the intervention than with a low (0 or 1) J-CTO score and short (40-117 min) type of intervention.

## 8. Irodalomjegyzék

1. World Health Organization (2018) Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. World Health Organization, Geneva, Switzerland.  
<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>
2. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020;41(3):407-477.
3. Csanádi Z, Czuriga D. A szív és a verőerek betegségei. Fejezet: Szük T, Barta J, Toma K, Kószegi Zs, Balogh L, Varga I, et al. *Iszkémiás szívbetegség*. Debreceni Egyetemi Kiadó; 2019. p. 111-129.
4. Kumar V, Abbas AK, Aster J, Robbins ST. A patológia alapjai. Fejezet: Mitchell RN. *Véredények*. Medicina Könyvkiadó Zrt; 2014. p. 383-426.
5. Tajti P, Brilakis ES. Chronic total occlusion percutaneous coronary intervention: evidence and controversies. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(2):e006732.
6. Fefer P, Knudtson ML, Cheema AN, Galbraith PD, Osherov AB, Yalonetsky S, et al. Current Perspectives on Coronary Chronic Total Occlusions. The Canadian Multicenter Chronic Total Occlusions Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(11):991-997.
7. Hoebbers LP, Claessen BE, Dangas GD, Ramunddal T, Mehran R, Henriques JPS. Contemporary overview and clinical perspectives of chronic total occlusions. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(8):458-469.
8. Srivatsa SS, Edwards WD, Boos CM, Grill DE, Sangiorgi GM, Garratt KN, et al. Histologic correlates of angiographic chronic total coronary artery occlusions: influence of occlusion

duration on neovascular channel patterns and intimal plaque composition. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(5):955-963.

9. Bell MR, Berger PB, Bresnahan JF, Reeder GS, Bailey KR, Holmes D Jr. Initial and long-term outcome of 354 patients after coronary balloon angioplasty of total coronary artery occlusions. *Circulation.* 1992;85(3):1003–1011.

10. Kumar V, Abbas AK, Aster J, Robbins ST. A patológia alapjai. Fejezet: Gyulladás és szöveti regeneráció. Medicina Könyvkiadó Zrt; 2014. p. 35-86.

11. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020;41(1):111-188.

12. Sleight P. The HOPE Study (Heart Outcomes Prevention Evaluation). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000;1(1):18-20.

13. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994;344(8934):1383–1389.

14. Merkely B, Becker D. Szív- és érgyógyászat. Fejezet: Becker D, Bárczi Gy, Merkely B: Ischaemiás szívbetegség. Semmelweis Kiadó; 2020. p. 241-286.

15. Toma A, Gick M, Minners J, Ferenc M, Valina C, Löffelhardt N, et al. Survival after percutaneous coronary intervention for chronic total occlusion, *Clin Res Cardiol.* 2016;105(11):921–929.

16. Rossello X, Pujadas S, Serra A, Bajo E, Carreras F, Barros A, et al. Assessment of inducible myocardial ischemia, quality of life, and functional status after successful percutaneous

revascularization in patients with chronic total coronary occlusion. *Am J Cardiol.* 2016;117(5):720-726.

17. Mashayekhi K, Neuser H, Kraus A, Zimmer M, Dalibor J, Akin I, et al. Successful percutaneous coronary intervention improves cardiopulmonary exercise capacity in patients with chronic total occlusions. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(8):1095-1096.

18. Di Marco A, Anguera I, Nombela-Franco L, Oloriz T, Teruel L, Manero MR, et al. Revascularization of coronary chronic total occlusions in an infarct-related artery and recurrence of ventricular arrhythmias among patients with secondary prevention implantable cardioverter defibrillator. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2021;97(1):E1-E11.

19. Löffler A, Kramer C. Myocardial viability testing to guide coronary revascularization. *Interv Cardiol Clin.* 2018;7(3):355-365.

20. Sianos G, Kappetein AP, Morel M, Morice MC, Colombo A, Dawkins K, et al. The SYNTAX score: an angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease, *EuroIntervention.* 2005;1(2):219–227.

21. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/ EACTS Guidelines on myocardial revascularization, *Eur Heart J.* 2019;40(2):87–165.

22. Merkely B, Becker D. Szív- és érgyógyászat. Fejezet: Jambrik Z, Merkely B, Molnár L, Ruzsa Z: Intervenció kardiológia. Semmelweis Kiadó; 2020. p. 287-323.

23. Mitra AK, Agrawal DK. In stent restenosis: bane of the stent era. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):232-239.

24. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O’Shaughnessy C, Mann JT, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2004;350(3):221-231.

25. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Hayashi EB, Perin M, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002;346(23):1773-1780.
26. Kastrati A, Dibra A, Mehilli J, Mayer S, Pinieck S, Pache J, et al. Predictive factors of restenosis after coronary implantation of sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation*. 2006;113(19):2293-2300.
27. Sumitsuji S, Inoue K, Ochiai M, Tsuchikane E, Ikeno F. Fundamental wire technique and current standard strategy of percutaneous intervention for chronic total occlusion with histopathological insights. *JACC Cardiovasc Interv*. 2011;4(9):941-951.
28. Di Mario C, Werner GS, Sianos G, Galassi AR, Büttner J, Dudek D, et al. European perspective in the recanalisation of Chronic Total Occlusions (CTO): consensus document from the EuroCTO Club. *EuroIntervention*. 2007;3(1):30-43.
29. Prasad A, Rihal CS, Lennon RJ, Wiste HJ, Singh M, Holmes DR Jr. Trends in outcomes after percutaneous coronary intervention for chronic total occlusions: a 25-year experience from the Mayo Clinic. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(15):1611-1618.
30. Jeroudi OM, Alomar ME, Michael TT, Sabbagh AE, Patel VG, Mogabgab O, et al. Prevalence and Management of Coronary Chronic Total Occlusions in a Tertiary Veterans Affairs Hospital. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2014;84(4):637-643.
31. Dash D. Retrograde Coronary Chronic Total Occlusion Intervention Using a Novel Reverse Controlled Antegrade and Retrograde Subintimal Tracking. *J Interv Cardiol*. 2016;29(1):70-74.
32. Brilakis ES, Banerjee S, Karpaliotis D, Lombardi WL, Tsai TT, Shunk KA, et al. Procedural outcomes of chronic total occlusion percutaneous coronary intervention: a report

from the NCDR (National Cardiovascular Data Registry). *JACC Cardiovasc Interv.* 2015;8(2):245-253.

33. Kumar V, Abbas AK, Aster J, Robbins ST. *A patológia alapjai*. Fejezet: Mitchell RN. Hemodinamikai rendellenességek, thromboemboliák és shock. Medicina Könyvkiadó Zrt; 2014. p. 387-114.

34. De Meyer GR, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;39(4):325-342.

35. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9060143.

36. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-297.

37. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer.* 2007;43(10):1529-1544.

38. Szilágyi B, Fejes Z, Póliska S, Pócsi M, Czimmerer Z, Patsalos A, et al. Reduced miR-26b Expression in Megakaryocytes and Platelets Contributes to Elevated Level of Platelet Activation Status in Sepsis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):866.

39. Szilágyi B, Fejes Z, Pócsi M, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Role of sepsis modulated circulating microRNAs. *EJIFCC.* 2019;30(2):128-145.

40. Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P. The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS One.* 2012;7(12):e50746.

41. Nagalla S, Shaw C, Kong X, Kondkar AA, Edelstein LC, Ma L, et al. Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity. *Blood.* 2011;117(19):5189-5197.

42. Simon LM, Edelstein LC, Nagalla S, Woodley AB, Chen ES, Kong X, et al. Human platelet microRNA-mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics. *Blood*. 2014;123(16):e37-e45.
43. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(9):961-966.
44. Kaudewitz D, Skroblin P, Bender LH, Barwari T, Willeit P, Pechlaner R, et al. Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function. *Circ Res*. 2016;118(3):420-432.
45. Qu M, Pan J, Wang L, Zhou P, Song Y, Wang S, et al. MicroRNA-126 Regulates Angiogenesis and Neurogenesis in a Mouse Model of Focal Cerebral Ischemia. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;16:15-25.
46. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1516-1521.
47. Fejes Z, Czimmerer Z, Szük T, Póliska S, Horváth A, Balogh E, et al. Endothelial cell activation is attenuated by everolimus via transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms after drug-eluting coronary stenting. *PLoS One*. 2018;13(6):e0197890.
48. Lin J, He S, Sun X, Franck G, Deng Y, Yang D, et al. MicroRNA-181b inhibits thrombin-mediated endothelial activation and arterial thrombosis by targeting caspase recruitment domain family member 10. *FASEB J*. 2016;30(9):3216-3226.
49. Morino Y, Abe M, Morimoto T, Kimura T, Hayashi Y, Muramatsu T, et al. Predicting Successful Guidewire Crossing Through Chronic Total Occlusion of Native Coronary Lesions Within 30 Minutes: The J-CTO (Multicenter CTO Registry in Japan) Score as a Difficulty Grading and Time Assessment Tool. *JACC Cardiovasc. Interv*. 2011;4(2):213–221.

50. Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E, et al. A Versatile Method to Design Stem-Loop Primer-Based Quantitative PCR Assays for Detecting Small Regulatory RNA Molecules. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e55168.
51. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood*. 1987;69(6):1691-1695.
52. Boos CJ, Balakrishnan B, Jessani S, Blann AD, Lip GY. Effects of percutaneous coronary intervention on peripheral venous blood circulating endothelial cells and plasma indices of endothelial damage/dysfunction. *Chest*. 2007;132(6):1920-1926.
53. Munk PS, Breland UM, Aukrust P, Skadberg O, Ueland T, Larsen AI. Inflammatory response to percutaneous coronary intervention in stable coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;31(1):92-98.
54. Szük T, Fejes Z, Debreceni IB, Kerényi A, Édes I, Kappelmayer J, et al. Integrity® bare-metal coronary stent-induced platelet and endothelial cell activation results in a higher risk of restenosis compared to Xience® everolimus-eluting stents in stable angina patients. *Platelets*. 2016;27(5):410-419.
55. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84(7):2068-2101.
56. McNair ED, Wells CR, Qureshi AM, Basran R, Pearce C, Orvold J, et al. Soluble receptors for advanced glycation end products (sRAGE) as a predictor of restenosis following percutaneous coronary intervention. *Clin Cardiol*. 2010;33(11):678-685.
57. Nagy B Jr, Szuk T, Debreceni IB, Kappelmayer J. Platelet-derived microparticle levels are significantly elevated in patients treated by elective stenting compared to subjects with diagnostic catheterization alone. *Platelets*. 2010;21(2):147-151.

58. Jin C, Lu L, Zhu ZB, Zhang RY, Zhang Q, Du R, et al. Increased serum vWF and sVCAM-1 levels are associated with late or very late angiographic stent thrombosis after sirolimus-eluting stent implantation. *Coron Artery Dis.* 2010;21(5):273-277.
59. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med.* 1995;332(10):635-641.
60. Jansson JH, Nilsson TK, Johnson O. von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J.* 1991;66(5):351-355.
61. Attanasio M, Marcucci R, Gori AM, Paniccia R, Valente S, Balzi D, et al. Residual thrombin potential predicts cardiovascular death in acute coronary syndrome patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res.* 2016;147:52-57.
62. Godino C, Latib A, Economou FI, Al-Lamee R, Ielasi A, Bassanelli G, et al. Coronary chronic total occlusions: mid-term comparison of clinical outcome following the use of the guided-STAR technique and conventional anterograde approaches. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2012;79(1):20-27.
63. Azzalini L, Dautov R, Brilakis ES, Ojeda S, Benincasa S, Bellini B, et al. Impact of crossing strategy on midterm outcomes following percutaneous revascularisation of coronary chronic total occlusions. *EuroIntervention.* 2017;13(8):978-985.
64. Rinfret S, Ribeiro HB, Nguyen CM, Nombela-Franco L, Ureña M, Rodés-Cabau J. Dissection and re-entry techniques and longer-term outcomes following successful percutaneous coronary intervention of chronic total occlusion. *Am J Cardiol.* 2014;114(9):1354-1360.

65. Amsavelu S, Christakopoulos GE, Karatasakis A, Patel K, Rangan BV, Stetler J, et al. Impact of Crossing Strategy on Intermediate-term Outcomes After Chronic Total Occlusion Percutaneous Coronary Intervention. *Can J Cardiol*. 2016;32(10):1239.e1-1239.e7.
66. Colombo A, Mikhail GW, Michev I, Iakovou I, Airolidi F, Chieffo A, et al. Treating chronic total occlusions using subintimal tracking and reentry: the STAR technique. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005;64(4):407-412.
67. Carlino M, Godino C, Latib A, Moses JW, Colombo A. Subintimal tracking and re-entry technique with contrast guidance: a safer approach [published correction appears in *Catheter Cardiovasc Interv*. 2009 Jan 1;73(1):127]. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2008;72(6):790-796.
68. Valenti R, Vergara R, Migliorini A, Parodi G, Carrabba N, Cerisano G, et al. Predictors of reocclusion after successful drug-eluting stent-supported percutaneous coronary intervention of chronic total occlusion. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(5):545-550.
69. Inoue T, Hoshi K, Fujito T, Sakai Y, Morooka S, Sohma R. Early detection of platelet activation after coronary angioplasty. *Coron Artery Dis*. 1996;7(7):529-534.
70. Inoue T, Sohma R, Miyazaki T, Iwasaki Y, Yaguchi I, Morooka S. Comparison of activation process of platelets and neutrophils after coronary stent implantation versus balloon angioplasty for stable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2000;86(10):1057-1062.
71. Inoue T, Hoshi K, Yaguchi I, Iwasaki Y, Takayanagi K, Morooka S. Serum levels of circulating adhesion molecules after coronary angioplasty. *Cardiology*. 1999;91(4):236-242.
72. Panicker SR, Mehta-D'souza P, Zhang N, Klopocki AG, Shao B, McEver RP. Circulating soluble P-selectin must dimerize to promote inflammation and coagulation in mice. *Blood*. 2017;130(2):181-191.

73. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(7):1073-1084.
74. Colpaert RMW, Calore M. MicroRNAs in Cardiac Diseases. *Cells.* 2019;8(7):737.
75. Laggerbauer B, Engelhardt S. MicroRNAs as therapeutic targets in cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2022;132(11):e159179.
76. Dai GH, Ma PZ, Song XB, Liu N, Zhang T, Wu B. MicroRNA-223-3p inhibits the angiogenesis of ischemic cardiac microvascular endothelial cells via affecting RPS6KB1/hif-1a signal pathway. *PLoS One.* 2014;9(10):e108468.
77. Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, et al. MicroRNA-181b regulates NF- $\kappa$ B-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest.* 2012;122(6):1973-1990.
78. Qu MJ, Pan JJ, Shi XJ, Zhang ZJ, Tang YH, Yang GY. MicroRNA-126 is a prospective target for vascular disease. *Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2018;5,10.
79. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2009;360(4):363-375.

## **9. Kulcsszavak**

krónikus totális coronaria oclusio, coronaria interventio, endothelsejt aktiváció, thrombocyta aktiváció, trombingeneráció, mikroRNS, biomarker

Keywords: chronic total coronary occlusion, coronary intervention, endothelial cell activation, platelet activation, thrombin generation, microRNA, biomarker

## 10. 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.

## 11. Függelék

Az *in vitro* kísérletek tervezése Bekéné Dr. Debreceni Ildikó, Dr. Fejes Zsolt és Dr. Nagy Béla segítségével történt. A trombingenerációs teszt elvégzése és a von Willebrand faktor szintek meghatározása Bekéné Dr. Debreceni Ildikó által történt. A felszíni P-selectin expressziójának, a solubilis fehérjék koncentrációjának, a mikroRNS-ek relatív expressziójának meghatározása saját munka, melyekben Dr. Fejes Zsolt, Pócsi Marianna és Szilágyi Bernadett nyújtott segítséget. Az eredmények értékelése, az adatok elemzése saját munka, melyben Prof. Dr. Kappelmayer János, Dr. Szük Tibor, Dr. Nagy Béla, Dr. Fejes Zsolt és Bekéné Dr. Debreceni Ildikó nyújtottak segítséget. A statisztikai elemzésben Hodosi Katalin működött közre.

1. Dr. Illési Ádám publikációs listája 2023. december 18-i adatok alapján.

2. Illési Á, Debreceni IB, Fejes Z, Nagy B Jr, Hodosi K, Kappelmayer J, Csanádi Z, Szük TI. Effect of invasive therapeutic coronary interventions on endothelial cell activation and thrombin generation in patients with chronic total coronary occlusion. *Thromb Res.* 2022;217:64-72. doi:10.1016/j.thromres.2022.07.010. PMID: 35908382.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény

3. Illési Á, Fejes Z, Pócsi M, Debreceni IB, Hodosi K, Nagy B Jr, Kappelmayer J, Csanádi Z, Kőszegi Z, Szük TI. Technically Challenging Percutaneous Interventions of Chronic Total Occlusions Are Associated with Enhanced Platelet Activation. *J Clin Med.* 2023;12(21):6829. doi:10.3390/jcm12216829. PMID: 37959293.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény



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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.12.18.

