A perkután koronária intervenció szisztémás és endothelre gyakorolt hatásai

A keringő endothelsejtek elemzése iszkémiás szívbetegségben

Doktori értekezés

Dr. Vargová Katarína

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Préda István, egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Járai Zoltán, PhD, Med. Habil
Dr. Rónaszéki Aladár, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. de Châtel Rudolf, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Medvegy Mihály, PhD
Osztályvezető főorvos
Dr. Mohácsi Attila, PhD, Főorvos

Budapest
2010

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke 4

2. Bevezetés 6

2.1. Endothel fiziológiás és patofiziológiás működése 7
2.1.1. Az értónus szabályozása 8
2.1 2. A trombotikus folyamatok szabályozása 10
2.1.3. Adhéziós molekulák 11

2.2. Endothel diszfunkció és ateroszklerózis 12
2.2.1. Az endothel diszfunkció rizikó faktorai 13
2.2.2. Ateroszklerotikus plakk 14
2.2.3. Az endothel funkció elemzése 16

2. 3. Keringő endothelsejtek 17
2.3.1. Az endothel integritás elvesztésének kórélettani háttere 17
2.3.2. Keringő endothelsejtek kvalitatív és kvantitatív meghatározása 19
2.3.3 Keringő endothelsejtek és kardiovaszkuláris betegség 21

2.4. Perkután koronária intervenció 22
2.4.1. Perkután koronária intervenció, resztenózis és stent-trombózis 22
2.4.2. Perkután koronária intervenció és a reperfúziós folyamatok 24
2.4.3. Perkután koronária intervenció szisztémás hatásai 25

3. Célkitűzések 27

4. Betegcsoportok, klinikai vizsgálatok terve és laboratóriumi módszerek 29

4.1. Betegcsoportok 29
4.1.1. Perkután koronária intervenció endothelre gyakorolt hatása akut és stabil koronáriaér betegekben 29
4.1.2. Endothel funkciót befolyásoló tényezők elemzése iszkémiás 30
szívbetegégben 30
4.1.3. Oxidatív stressz és az oxidatív DNS károsodás elemzése perkután koronária intervención átesett akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben 31

4.2. Laboratóriumi vizsgálati módszerek 32
4.2.1. A keringő CD146+ endothelsejtek izolálása és az endotheliális eredetük igazolása immunhisztokémia segítségével 32
4.2.2. A keringő endothelsejtszám meghatározása 32
4.2.3. Plazma/ szérum markerek meghatározása ELISA segítségével 34

4.3. Statisztikai analízis 36

5. Eredmények 38

5.1. Az izolált keringő CD146+ endothelsejtek endotheliális eredetének igazolása immunhisztokémia segítségével 38

5.2. Perkután koronária intervenció endothelre gyakorolt hatása akut és stabil koronáriaér betegekben 40
5.2.1. Demográfiai adatok 40
5.2.2. Perkután koronária intervenció CEC számra gyakorolt hatása 43
5.2.3. Perkután koronária intervenció vWF plazma szintre gyakorolt hatása 44
5.2.4. Perkután koronária intervenció sICAM-1 plazma szintre gyakorolt hatása 46

5.2.5. Endothel és miokardiális sérülés közötti korreláció 47

5.3. Endothelt befolyásoló tényezők elemzése iszkémiás szívbetegégben..... 48
5.3.1. Demográfiai adatok 48
5.3.2. Keringő endothel sejtszám és a kardiovaszkuláris kockázati tényezők 50
5.3.3. Keringő endothel sejtszám és a kardiovaszkuláris terápia 50
5.3.4. CEC szám és az egyéb endotheliális és gyulladásos paraméterek..... 53

5.4. Oxidatív stressz és az oxidatív DNS károsodás elemzése perkután koronária intervención átesett akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben..... 54
5.4.1. Demográfiai adatok 54
5.4.2. Az oxidatív stressz mértékének meghatározása plazma hidrogénperoxid szint elemzésével perkután koronária intervenció után 56
5.4.3. Az oxidatív stressz okozta DNS károsodás elemzése perkután koronária intervenciót követően a szérum 8OHdG szint követésével 57

6. Megbeszélés..... 59

6.1. Invazív koronária beavatkozás endothelre gyakorolt hatásai iszkémiás szívbetegség stabil, illetve akut formájában..... 59
6.1.1. Endotheliális paraméterek kiindulási értékei iszkémiás szívbetegség stabil és akut formájában 59
Keringő endothelsejtszám 59
Plazma vWF 60
Plazma sICAM- 1 61

6.1.2. Endotheliális markerek kinetikája stabil angina pectorisban invazív koronária beavatkozást követően 61
Keringő endothelsejtszám..... 61
Plazma vWF 62
Plazma sICAM-1 62
6.1.3. Endotheliális markerek kinetikája heveny miokardiális infarktusban invazív koronária beavatkozást követően 63
Keringő endothelsejtszám..... 63
Plazma vWF 64
Plazma sICAM-1 64

6.1.4. Az endothel sérülés és a miokardiális nekrózis kiterjedésének mértéke..... 65
közötti összefüggés elemzése 65

6.2. A gyógyszeres kezelés CEC számra és egyéb markerekre gyakorolt hatása..... 66

iszkémiás szívbetegség stabil formájában 66

6.3. Oxidatív stressz és DNS károsodás elemzése perkután koronária intervención átesett akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben..... 68
Hidrogénperoxid..... 68
8- OHdG 69

7. Következtetések..... 770

Összefoglalás 72

Summary..... 74

Irodalomjegyzék..... 76

Saját publikációk jegyzéke..... 89

Köszönetnyilvánítás 91

1. Rövidítések jegyzéke

ACE - angiotenzin konvertáló enzim

ADP - adenozindifoszfát

ADMA – aszimmetrikus dimetilarginin

AGE's – advanced glycation endproducts, glikált végtermékek

BNP - agyi nátriureticus protein

BMS – bare metal stent, fémstent

cAMP – ciklikus adenozinmonofoszfát

cGMP- ciklikus guanozinmonofoszfát

CEC – circulating endothelial cell, keringő endothelsejt

CK - kreatinkináz

CRP - C - reaktív protein

DES – drug- eluted stent, gyógyszerkibocsátó stent

ECE - endothelin – konvertáló enzim

ECM - extracelluláris mátrix

EDHF - endotheliális hiperpolarizáló faktor

eNOS - endotheliális nitrogénmonoxidszintáz

EPC - endotheliális progenitorsejt

ET-1 - endothelin- 1

FGF - fibroblaszt növekedési faktor

FMD – flow- mediated dilation, áramlás mediálta dilatáció

GM- CSF-1 - granulocita- makrofág kolónia stimuláló faktor

ICAM - intercelluláris adhéziós molekula

IL-1 - interleukin-1

IL-6 - interleukin-6

IMT - intima - media vastagság

INF - interferon

LDH - laktátdehidrogenáz

LDL - alacsony-denzitású lipoprotein

L-NMMA - L-NG-mono-metilarginin

L-NAME - L-nitroargininmetilészter

LOX-1 - lektin-szerű oxidált alacsony - denzitású lipoprotein receptor 1

MACE – major adverz kardiovaszkuláris esemény

NO - nitrogénmonoxid

MCP - 1 - monocita kemoattraktáns protein

M-CSF - makrofág kolónia stimuláló faktor

MMP-2 - mátrix metalloproteináz –2

MMP-9 - mátrix metalloproteináz –9

PAI-1 - plazminogén aktivátor inhibítor

PAR-1 - proteáz aktiválta receptor – 1

PARP-1 – poli (ADP-ribóz) polimeráz

PCI - perkután koronária intervenció

PGI_2 – prosztaciklin

PDGF - trombocita derivált növekedési faktor

PECAM – trombocita – endothél sejtadhéziós molekula

PPP - platetel - poor plasma, thrombocitaszegény plazma

PTCA - perkután koronária intervenció

SDF – stromal derived factor

SOD - superoxiddiszmutáz

STEMI - ST – elevációs miokardiális infarktus

TIMP - szöveti metalloproteináz inhibítor

TFPI - szöveti faktor inhibítor

TF - szöveti faktor

TGF - transzformáló növekedési faktor

tPA - szöveti plazminogén aktivátor

TNF - tumor nekrózis faktor

TXA_2 - thromboxán A2

VCAM-1 - vaszkuláris sejtadhéziós molekula

VEGF - vaszkuláris endotheliális növekedési faktor

VLDL - nagyon alacsony denzitású lipoprotein

vWF - von Willebrand faktor

2. Bevezetés

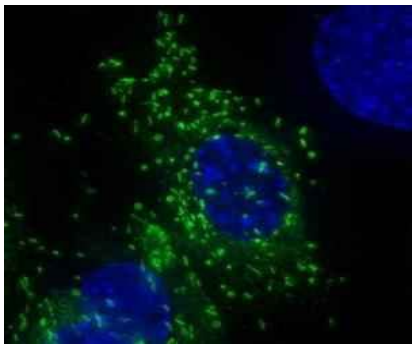
A humán ateroszklerózis és a következményes iszkémiás szívbetegség kialakulásában az endothel diszfunkció és az endothel integritásának elvesztése döntő szerepet játszik. Az endothel funkció károsodásával induló aterogenézis a jelenlegi elméletek szerint lassú gyulladásos folyamat, mely során oxidatív stressz, számos sejtadhéziós molekula, ligand és citokin fokozott expressziója figyelhető meg (Libby és mtsai 2002, Falk 2006). Mindezen tényezők jelenléte ateroszklerotikus plakk kialakulásához vezet, amely a klinikumban többek között stabil angina pectoris, illetve plakk ruptura és okkluzív trombus következményeként létrejövő akut koronária szindróma képében manifesztálódhat (Naghavi 2003, Falk 2006).

A sztenotikus, illetve okkludált koronáriaér rekanalizációja, valamint az áramlás mielőbbi helyreállítása döntő a miokardium irreverzibilis iszkémiás károsodásának csökkentése szempontjából. A koszorúérben való áramlás helyreállításának eszköztárba néhány éve bekerült perkután koronária intervenció (PCI) az endothelt is érintő élettani hatásairól azonban jelenleg kevés humán adat áll rendelkezésre. Jelen munkában elsősorban a PCI endotheliális markerekre - kiemelt fontossággal a keringő endothelsejtek számára - gyakorolt hatásait vizsgáltuk az ateroszklerotikus szívbetegség stabil és akut klinikai formáiban. Emellett, mivel korábbbi irodalmi adatok a heveny miokardiális infarktus kapcsán elinduló reperfúziós folyamatoknak fontos szerepet tulajdonítanak, másodlagos célunk a PCI –t követő szisztémás oxidatív stressz, valamint a reperfúziós károsodás mértékének felmérése volt. A fenti kérdéseket különálló klinikai vizsgálatok segítségével tanulmányoztuk.

Az elméleti háttér áttekintésében először az endothelsejtek működésében szerepet játszó tényezőket, az endothelialis integritás fenntartásának mechanizmusait ismertetjük. Ezt követően leírjuk az endothel diszfunkció kialakulásának menetét, majd ismertetjük az érfalból levált, vérben keringő endothelsejtek - mint direkt endotheliális markerek - szerepét fiziológiás és patológiás folyamatokban. Végül a perkután koronária intervenció eddig ismert - elsősorban gyulladásos paraméterekre gyakorolt - hatásait mutatjuk be.

2.1. Endothel fiziológiás és patofiziológiás működése

Az endothel önálló szerv, melyet az endothelsejtek monocellularis rétege alkot (1. ábra). Korábbi irodalmi adatok alapján az endotheliumot kizárólag a keringő vér és a szövetek közötti határrétegnek gondolták (Cines és mtsai. 1998, Michiels 2003), több évtizedes kutatások eredményei azonban bizonyították, hogy az endothelium egy dinamikus, metabolikusan rendkívül aktív, számos funkcióval rendelkező szerv. Elsőként 1976-ben Moncada és munkatársai figyeltek fel az endothelium értónus szabályozásában betöltött központi szerepére (Moncada 1976), Furchgott és Zawadzki 1980-ban nyúl aorta szöveti preparátumokat felhasználva az endothelsejtek acetilkolin és az endothelium termelte relaxációs faktor mediálta érfal relaxációban való szerepüket írták le (Furchgott 1980).



1. ábra: Endothelsejtek *(kék: sejtmag, zöld: Weibel-Palade testekben lévő von Willebrand faktor) Fotó: Ponnambalam S., University of Leeds, Faculty of Biological Sciences. www.fbs.leeds.ac.uk*

Felnőtt egyénben az endothel súlya 1.0-1.5 kg, 1 -6 × 10^{13} sejtből áll (Lüscher 1997, Cines és mtsai. 1998). Fiziológiás állapotban transzport funkcióval rendelkezik, antiadhezív tulajdonságaival meggátolja a keringő sejtek érfalhoz történő kitapadását, antiaggregáns, antitrombotikus és fibrinolitikus felületet biztosít. Autokrin, és parakrin funkciójával olyan molekulák termeléséért felelős, melyek az érfal működésében és az immunológiai folyamatokban meghatározó szerepet töltenek be (Lüscher 1997, Cines és mtsai. 1998, Michiels 2003).

2.1.1. Az értónus szabályozása

Az endothelsejtek alapvető funkciója az érfal tónusának szabályozása. Az előállított nitrogén monoxid és a prosztaciklin vazodilatációt, míg az endothelin-1, a tromboxán A_2 és a vérlemezke aktiváló faktor vazokonsztrikciót vállt ki (Cines 1998, Michiels 2003).

Nitrogén monoxid (NO). A nitrogén monoxid az endothelsejtek által kontinuálisan kisebb mennyiségben termelt, az L-arginin oxidációja során, NO-szintetáz enzim (eNOS) segítségével keletkező szabadgyök. A reakcióban tetrahidrobiopterin – mint kofaktor – is részt vesz. Az érfal simaizomsejtjeiben a guanilátcikláz enzim aktivációja, emelkedett intracelluláris ciklikus guanosine-monofoszfát (cGMP) révén csökkenti a kalcium szintet, így érfal relaxációt eredményez (Denninger 1999, Michiels 2003). Irodalmi adatok alapján több NO-szintetáz izoforma ismert. Az eNOS (III. típus) elsősorban az endothelsejtekben található konstitutív enzim forma; kontinuálisan kisebb mennyiségű nitrogén monoxidot termel trombin, ADP, bradikinin, katecholaminok, illetve a nyíró erő hatására. Az nNOS (I. típus), mint neuronális konstitutív forma, a központi idegrendszerben neurotransmitterként szereplő NO-t termeli (Lüscher 1997, Cines 1998, Michielis 2003). Az iNOS (II. típus) az endothelsejtekben, az érfal simaizomsejtjeiben, és makrofágokban egyaránt megtalálható. Induktív enzimformáról van szó, melynek expresszióját elsősorban a gyulladásos folyamatokban résztvevő mediátorok serkentik, mint a citokinek, az endotoxin, az interleukin-1 alfa és a tumor nekrózis faktor (TNF) (Cines 1998, Michielis 2003). Az NO az áramlás mediálta vazodilatációt autoregulációs mechanizmus által szabályozza. Az NO- indukált, endothel-dependens vasodilatio L-arginin analógokkal – mint pl. L-NG-mono-metilarginin (L-NMMA), ill. L-nitroargininmetilészter (L-NAME), és ADMA (asszimetrikus dimetilarginin) – gátolható (Michielis 2003). L-arginin analógok vazokonsztrikciót okoznak, intrakoronárias alkalmazásuk során markánsan csökkentik a koronária-áramlást, valamint az a. brachialisba bejuttatva növelik a vaszkuláris perifériás rezisztenciát (Cines 1998). Az érfal tónus szabályozásán kívül a NO csökkenti a trombociták és a leukociták endothelhez való adhézióját, antiaggregáns tulajdonsággal bír (Cines 1998, Michielis 2003).

A prosztaciklin (PGI_2) az endothelsejtekben arachidonsavból számos humorális és hemodinamikai tényző hatására keletkezik ciklooxigenáz enzim által. Hasonlóan a nitrogén monoxidhoz, vazodilatációt vált ki, valamint trombocita aggregációt gátló tulajdonságokkal bír; az endothelsejtekben és a trombocitákban az adenylátcikláz aktivációja révén növeli a ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) szintet. Feltételezhető, hogy a prosztaciklin szintézise az endothelsejtekben nem folyamatos, ezt az ADP, a bradikinin, illetve a hipoxia serkentik (Cines 1998).

Endothelial hyperpolarizing faktor (EDHF) az endothel által termelt endogén vazodilatáns, amely az érfalban lévő simaizom sejtek relaxációját a sejtmembrán kálium ionok permeabilitásának növelésével éri el (Feletou 2009, Cines 1998).

Endothelin - 1 (ET-1) Az endothelin-1 inaktív pre-endothelin-1 (big endothelin) prekurzorból létrejövő peptid. Az aktív molekula létrejöttét az endothelin-konvertáló enzim (ECE) segíti elő. Az endothelin-1 alacsonyabb koncentrációkban vazodilatációt vált ki, magasabb koncentrációkban azonban erőteljes vazokonsztrikciót hoz létre (Lüscher 1997). Mindemmellett, nem elhanyagolható az ET-1 simaizomsejtekre való mitogén és proliferatív hatása sem (Lüscher 1997, Cines 1998). Irodalmi adatok alapján jelenleg két endothelin receptor típus ismert: az ETA és az ETB-receptor. Az endothelsejteken csak az ETB-receptorok találhatóak, melyek részben a NO és a prosztaciklin termelésében vesznek részt (Cines 1998, Michielis 2003).

Angiotenzin II vazokonsztriktor, a simaizomsejtekre mitogén és proliferatív hatással bíró molekula. Az angiotenzin I-ből az angiotenzin-konvertáló proteolitikus enzim (ACE) hozza létre, melyet az endothelsejtek termelnek és a felszínükön expresszálnak (Luscher 1997, Michielis 2003).

Bradikinin az endothelsejtek felszínén lévő specifikus receptorokhoz kötődve képes az NO termelését növelni és vazodilatációt vált ki. Fontos megjegyezni, hogy a bradikinin lokális koncentrációit az ACE szabályozza, ugyanis ezen enzim nem csak az angiotenzin II létrehozásáért, hanem a bradikinin lebomlásáért is felelős (Lüscher 1997). További vazokonsztrikciós és trombocita aggregációt serkentő molekulák közé tartoznak a tromboxán A_2 (TXA_2) és a prostaglandinok (pl. PGH_2). Ezen molekulákat az endothelsejtek termelik, illetve nagyobb mennyiségben (elsősorban a TXA_2) a vérlemezkékben is megtalálhatók (Lüscher 1997).

2.1 2. A trombotikus folyamatok szabályozása

Az endothelium a trombotikus folyamatok helyszíne. Fiziológiás állapotban antikoaguláns és fibrinolitikus felszínt képez.

Antikoaguláns faktorok. Az endothel szöveti faktor inhibítort (TFPI), protein C-t, protein S-t kötő receptort és trombomodulint termel. Az utóbbi a trombint megkötve képes aktiválni a protein C-t, mely az Va és VIIIa faktor inaktiválásában elengedhetetlen (Cines 1998).

Prokoaguláns faktorok. Prokoaguláns mechanizmusok közül fő lépésnek a szöveti faktor (TF) szintézise tekinthető. A TF a Xa faktor aktivációja által az extrinsic úton bekövetkező véralvadási kaszkád aktivációjáért felelős. Ép állapotban az endothelium nem termel TF-t, azonban az érsérülés hatására, valamint ateroszklerotikus plakk jelenlétekor az expressziója fokozódik (Marmur és mtsai. 1996). Kimutatták, hogy a lipopoliszacharid, IL-1, TNF illetve a CD40 ligand képes az endothelsejtekben történő szöveti faktor expresszióját fokozni (Libby 2008). Az endothelsejtek prokoaguláns receptorai közé sorolható a trombin receptor – az úgynevezett proteáz - aktivált receptor-1 (PAR1). A PAR-1 receptorhoz történt trombin kötődéset követően az endothelsejtekben számos protrombotikus (TF) és antitrombotikus (PAI-1, NO, PGI2) hatású molekula expressziója megváltozik (Cines 1998, Michielis 2003). A trombotikus folyamatok elengedhetetlen résztvevője az endothelsejtek Weibel – Palade testeiben tárolt von Willebrand faktor is (Cines 1998, Michielis 2003).

Fibrinoltikus és antifibrinolitikus faktorok. A fibrinolitikus folyamatokban az endothelium által szintetizált szöveti plazminogén aktivátor (tPA) döntő fontosságúnak számít. Az endothelsejtek azonban az antifibrinolitikus aktivitású plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) is képesek előállítani (Cines 1998, Michielis 2003).

Az endothelsejtek által termelt, pro-, ill. antitrombotikus faktorokat az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat: Endothelsejtek által termelt, pro-, ill. antitrombotikus faktorok

	Antitrombotikus hatás	**Protrombotikus hatás**
Endothel által termelt faktorok	TFPI Thrombomodulin	Szöveti faktor (tissue factor) Thrombin receptor Protein C/APC receptor
Trombocita által is termelt faktorok	PGI_2 NO ADP-ase	vWF
Fibrinolitikus faktorok	t-PA u-PA	PAI-1
Vazomotorikus faktorok	NO PGI_2	TxA_2 Endothelin-1

Rövidítések: PGI_2 - prosztaciklin; TFPI- tissue factor pathway inhibitor; APC - aktivált protein C; t-PA - szövetiplazminogén aktivátor; u-PA, urokinase plazminogén aktivátor; PAI - plazminogén aktivátor inhibítor; TxA_2 tromboxán A_2.

2.1.3. Adhéziós molekulák

Az endothel számos olyan sejtfelszíni molekulát termel, melyek a vérben keringő sejtek adhézióját segítik elő. Érfalsérülés, illetve gyulladásos folyamatok során a keringő leukociták és trombociták az endothelium specifikus régióihoz képesek kötődni. A vérben keringő leukociták kemotaktikus inger hatására több lépésben – gördülés, adhézió, szétterülés, diapedesis - az interendotheliális réseken jutnak el a subendotheliális térbe. A gördülés és az endotheliumhoz való kitapadás elsősorban a posztkapilláris venulák szakaszán történik, ahol a nyíróerő alacsony (Michiels 2003, Alon és mtsai. 1997). Ezen folyamatban a szelektinek vesznek rész. Az E- szelektin az aktivált endothelsejtek felszínén található, emellett az endothelsejtek granulumjaiból trombin hatására P-szelektin szabadul fel (Ross 1999, Michiels 2003, Libby 2005). A leukociták az endothel felszínen lassú gördülő mozgást végeznek, mely az említett szelektin receptorok és ligandjaik közötti kapcsolat során valósul meg. A lelassult gördülő leukociták a következő lépésben szétterülnek, az endothelsejteken lévő ICAM-1 és ICAM-2 adhéziós molekulákkal lépnek interakcióba. A diapedesis folyamatában

egyaránt döntő a sejtek felszínén lévő β1 és β2 integrin és a PECAM-1 (platelet endothelial adhesion molecule-1) adhéziós molekula is (Michiels 2003, Libby 2005).

Az artériák elágazásai hemodinamikai szempontból kitüntetett helyek, mivel ezen lokalizációkban a lamináris áramlás csökkent, ugyanakkor az örvényáramlás (turbulencia) fokozott. Az ilyen helyeken az endothelsejtek felszínén adhéziós molekulák fokozott expressziója figyelhető meg, amelyek a monociták és a T-limfociták adhézióért, migrációért és akkumulációért felelősek (Grabowski 1995, Michiels 2003, Libby 2005). A monociták és a T-sejtek endotheliumhoz történő kötődése – mint az ateroszklerotikus lézió egy korai, de jellegzetes mozzanata – tehát az adhéziós molekulák fokozott expressziója miatt elsősorban a változó nyíró erőket és turbulenciát mutató helyeken történik meg.

2.2. Endothel diszfunkció és ateroszklerózis

Az endothel diszfunkció során az érfal normális homeostasis fenntartásában szerepet játszó mechanizmusainak kóros működése figyelhető meg. Az endothel permeabilitása, valamint a leukociták és trombociták endothelhez történő adhéziója fokozott, emellett, az endothel antikoaguláns sajátossága a prokoaguláns irányba tolódik el (Libby 2002, Libby 2008, Falk 2006). Az endothel diszfunkció kialakulásában olyan ismert kardiovaszkuláris kockázati tényezők jutnak szerephez, mint a hipertónia, a hiperlipidémia, az inzulin rezisztencia, a diabetes mellitus, és a dohányzás. Az utóbbi évtizedek során számos ateroszklerózis elmélet született, melyek alapján ennek kialakulásában, illetve progressziójában az oxidatív stressz, a hiperlipidémia, a módosult lipoproteinek (pl. oxidált LDL molekula), az emelkedett homocisztein szint, az autoimmun folyamatok, ill. bizonyos patogén ágensek (pl. *C. pneumoniae, H. pylori*) vehetnek részt (Libby 2008, Falk 2006).

Tekintettel arra, hogy az endothel diszfunkció és az ateroszklerózis kialakulásában és progressziójában számos tényező vesz részt, valamint a tudományos eredmények mennyisége meghaladja e munka terjedelmét, a továbbiakban csupán a legfontosabb faktorokat kívánom bemutatni.

2.2.1. Az endothel diszfunkció rizikó faktorai

Az endothel diszfunkció során a parakrin és az autokrin hatású vazoaktív mediátorok termelése és összetétele kedvezőtlen irányba változik. *A nitrogén monoxid szintje csökken*; ennek hátterében az elégtelen NO szintézis (csökkent L-arginin szint, csökkent eNOS aktivitás), illetve a felszaporodtt reaktív oxigén szabadgyökök által mediált fokozott NO lebomlás áll. Végeredményként csökken a NO-dependens vazodilatáció, és az egyensúly a vazokonsztrikció felé tolódik el (Lüscher 1997, Kadirvelu 2002, Willerson 2003).

Endothel diszfunkcióban, illetve ateroszklerózis során *emelkedett endothelin-1* plazmaszintet figyeltek meg. Ennek hátterében az ateroszklerotikus léziókban talált magas ECE enzim aktivitás állhat (Willerson 2003).

Az *angiotenzin II* patofiziológiás szerepét elsősorban hipertónia és krónikus szívelégtelenség kialakulásában és progressziójában írták le. Emellett kimutatták, hogy a hipertónias patkányokban az endothel diszfunkció kialakulásának egyik fontos szereplője. Emelkedett koncentrációkban a NAD(P)H-oxidase enzim aktivitását serkenti, így fokozott oxidatív stressz állapotot eredményez (Mallat 2000, Prasad 2002, Willerson 2003).

Az oxidatív stressz az endothel diszfunkció és az ateroszklerózis kialakulásának kritikus mozzanata. Hipertóniaban, diabetes mellitusban, hiperlipidémiában, illetve dohányosoknál a mértéke negatívan korrelál az endothel dependens vazodilatációval (Prasad 2002, Willerson 2003). Emellett kimutatták, hogy az oxidatív stressz során keletkezett szabadgyökök az endothelsejtek apoptózisát, majd az érfalból való leválásukat eredményezhetik (Mallat 2000).

Hiperglikémia, hyperinzulinémia által kiváltott endothel károsodásnak fontos résztvevői a glikált végtermékek – advanced glycation end-products (AGEs). Az AGEs által fokozott oxidatív stressz, az IL-6, a CRP, az MCP-1 és a VCAM-1 plazma szintek emelkedéssel járó proinflammatórikus állapot endothel diszfunkció kialakulásához járul hozzá (Arcaro 2002).

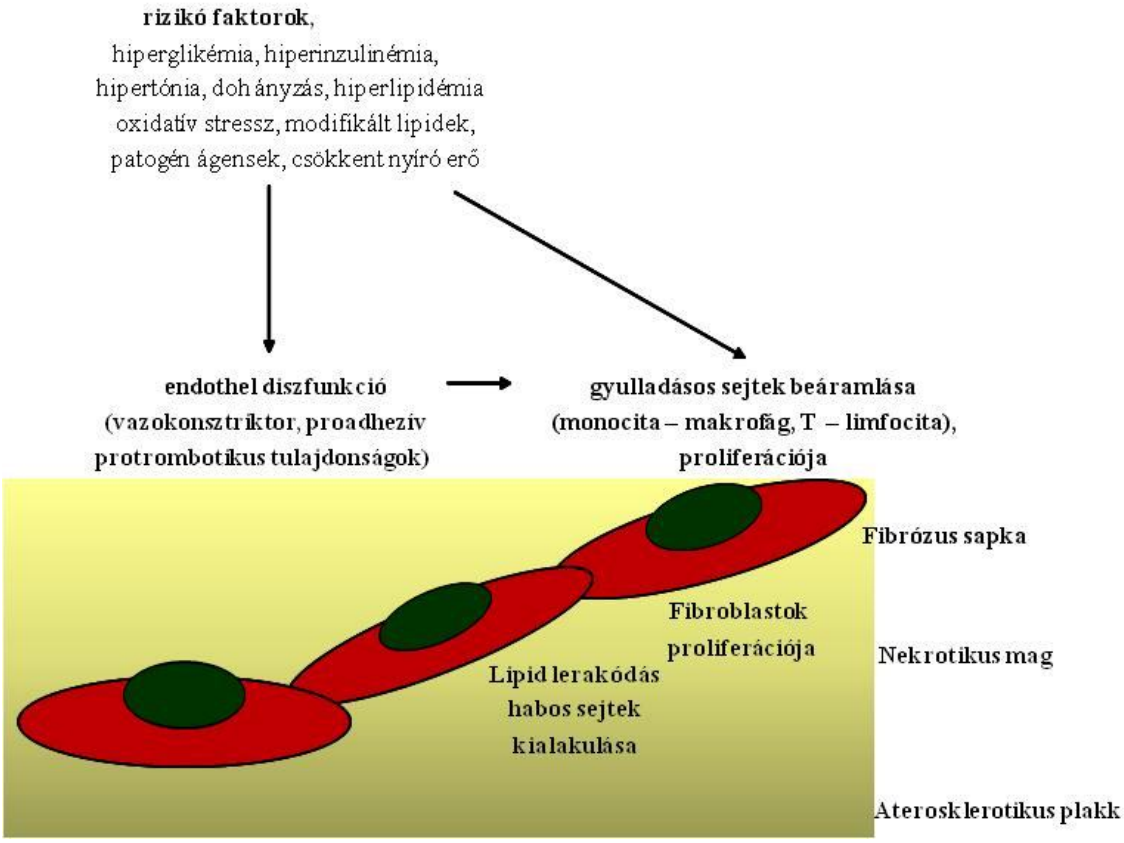
2.2.2. Ateroszklerotikus plakk

Az endothel diszfunkció során megfigyelhető fokozott endothel permeabilitás következményes lipoprotein (LDL,VLDL) beáramlást okoz. A leukocitákból felszabaduló reaktív szabadgyökök a lipoproteineket citotoxikus lipidperoxidokká alakítják át. Az oxidált LDL molekula kemotaktikus tulajdonsága révén további limfocita és monocita migrációt, valamint fokozott citokin termelést vált ki. Emellett, az oxidált atherogen tulajdonságú lipidek az endothelsejtek apoptózisát és az érfalból való leválását indukálhatják (Mallat 2000, Virmani 2005, Libby 2008). Az endothel dominálóan protrombotikus tulajdonsága miatt fokozott trombocita adhézió és aktiváció figyelhető meg. Az endothelsejtek proadhezív fenotípust vesznek fel, fokozódik az E-selektin, ICAM-1 és VCAM-1 molekulák expressziója, mely elősegíti a további limfocita és a monocita adhéziót. Az intimába belépett monociták makrofágokká átalakulva scavanger receptoruk által (pl. LOX-1) modifikált (ox-LDL) lipoproteineket vesznek fel (Falk 2006, Virmani 2005, Libby 2008). A növekedési faktorok a simaizomsejt proliferációt és az intimába történő vándorlást serkentik. A mononukleáris-, valamint a simaizomsejtek migrációja és proliferációja a már kialakult lézió további strukturális átalakulását eredményezi; az ilyen, a lézió lumen felőli oldalán kialakult fibrózus réteg „fibrous cap”, és alatta elhelyezkedő a koleszterin észterekben és szöveti faktorokban gazdag, nekroticus képlékeny mag, „*core*” az előrehaladott, vagy összetett léziót képezi (Falk 2006, Virmani 2005). Az ateroszklerotikus lézió további progressziója számos humorális faktoroktól (M-CSF, GM-CSF) függ. Gyulladásos fehérjék (CRP, IL-6), citokinek (CD40, CD40L), növekedési faktorok (FGF, VEGF), metalloproteinázok (MMP-2, MMP-9) és más hidrolitikus enzimek meghatározó jellegűek úgy a gyulladásos válasz, és a sejtkárosodás, mind a reparációs folyamatok, azaz a plakk fejlődése szempontjából (Falk 2006, Libby 2008) (2. ábra).

Azon esetek során, amikor az ateroszklerotikus plakk strukturái nem képesek tovább kompenzálni a falfeszülést, az endothelsejtek folytonossága megszakad, a subendotheliális mátrix komponensei a keringő trombocitákkal és a vér összetevőivel érintkezésbe kerülnek, így a plakk felszínén az ér lumenébe törő trombocitadús trombus alakul ki, teljes/ill. subtotális koronária okklúziót eredményezve (Falk 2006, Libby

2008). Az ateroszklerotikus plakk nekrotikus magjának instabillá válásában az endothelsejtek apoptózisa, az érfalból való leválásuk, a gyulladásos folyamatok progressziója és a különböző extracellularis matrix lebontását elősegítő enzimek aktivitás fokozódása döntő szerepet tölt be. Klinikai jelentősége, hogy az intrakoronárias plakk ruptúra következményeként akut koronária szindróma következhet be, akár fatális kimenetellel.

Mivel az endothel diszfunkció és a koronária ateroszklerózis következményeként kialakult iszkémiás szívbetegség, valamint annak akut trombotikus szövődményei jelenleg Magyarországon vezető halálokként szerepelnek, az endothelsejtek aterotrombózisban betöltött szerepének bővebb ismerete a további kezelési stratégia és a prognózis felállítás lényeges mozzanatát képezi.



2. ábra. Az ateroszklerotikus plakk kialakulásának és progressziójának folyamata

2.2.3. Az endothel funkció elemzése

Az endothel funkció meghatározásához a klinikai gyakorlatban fiziológiás, illetve farmakológiai tényezők hatására létrejövő vazodilatáció mértéke használható fel. Az alkalmazott teszttől függően a kialakult vazodilatáció lehet az endothel működéstől függő – endothel dependens, vagy független – endothel independens. Az endothel dependens vazodilatációt a receptorokon ható anyagok (pl. acetilkolin, bradikinin) és az endothelre ható nyíró erő váltják ki (Moens és mtsai. 2005). Endothel-independens vazodilatációt az olyan exogén nitrogén monoxid donorok, illetve közvetlenül a simaizomsejtre ható szerek eredményezik, mint például a nitroglicerin, a nitroprusszid, vagy a papaverin (Moens és mtsai. 2005).

Az endothel diszfunkció felmérésére klinikumban leggyakrabban az artéria brachialis áramlásfüggő vazodilatációnak (flow - mediated vasodilation, FMD) vizsgálatát alkalmazzuk. Idősebb egyéneknél, kardiovaszkuláris rizikófaktorok jelenlétében, endothel diszfunkció, illetve ateroszklerózis során az FMD értéke csökken (Moens és mtsai. 2005). Kevésbé elterjedt lézer-Doppler vizsgálat elsősorban a mikrocirkuláció állapotáról adhat bővebb információt (Turner és mtsai. 2008).

A carotis Doppler vizsgálat segítségével meghatározott carotis intima - media vastagság (intima – media thickness, IMT) több tanulmány szerint pozitívan korrelál a koronáriaér ateroszklerózis jelenlétével, valamint prediktív értéke lehet a kardiovaszkuláris mortalitás, illetve morbiditás előrejelzésében (DeGroot és mtsai. 2008). Az endothel integritás/ reendothelizáció elemzésére, illetve az ateroszklerózis jelenlétének kimutatására az intravaszkuláris ultrahang kiemelt fontosságú, invazivitása, és költségessége miatt azonban csak kevés helyen kivitelezhető (Kastelein 2008).

Az endothel funkcionális és organikus eltérései számos szolubilis gyulladásos marker (pl. CRP, interleukinek, heat- shock proteinek), adhéziós molekula (pl. ICAM-1, E- szelektin, P-szelektin, VCAM-1), növekedési faktor (pl. VEGF, PDGF, angiopoietin) és endothel által termelt molekula (pl. endothelin-1, PAI-I, tPA, vWF) szintjének meghatározásával követhetők. Emellett egyes molekulák, fehérjék (pl. a C-reaktív protein - CRP) klinikai értéke a kardiovaszkuláris rizikóval való összefüggésből adódik (Naghavi és mtsai. 2003).

Vizsgálatainkban több, az ateroszklerózisban szerephez jutó molekula plazma szintjét határoztuk meg, hogy pontosabban kövessük a PCI-t követő szisztémás, illetve endotheliális választ. A keringő endothelsejtszám, mint direkt endothelialis marker meghatározásának klinikai jelentőségére az alábbiakban térünk ki.

2. 3. Keringő endothelsejtek

A vérben keringő endothelsejtek (CEC) jelenlétét több mint harminc évvel ezelőtt írták le. Mivel a munkánk jelentős részét a keringő endothelsejtek elemzése teszi ki kardiovaszkuláris betegekben, így külön fejezetben az endothelium strukturális integritásában és az endothelsejt leválásban szerepet játszó mechanizmusokról, valamint a keringő endothelsejtek klinikai jelentőségéről részletesebben számolunk be.

2.3.1. Az endothel integritás elvesztésének kórélettani háttere

Az endothel önálló szerv, melyet az endothelsejtek monocellularis rétege alkot. Számos funkcióval rendelkezik, vazoaktív anyagok által az értónust szabályozza, antitrombotikus, antikoaguláns és fibrinolitikus felületet biztosít (*lásd 2.1. fejezet*). Az endothel fiziológiás működésének egyik feltétele az integritásának fenntartása, melyet az endothelsejtek, illetve az endothel – subendotheliális matrix (extracelluláris mátrix – ECM) közötti interrakciók, a növekedési faktorok, és az érfalra ható nyíró erő biztosítják. Bizonyos kóros folyamatok (pl. ateroszklerotikus plakk ruptúra) során az endothel integritása megszakad, az endothelsejtek az érfalból leválnak és a keringésbe kerülnek.

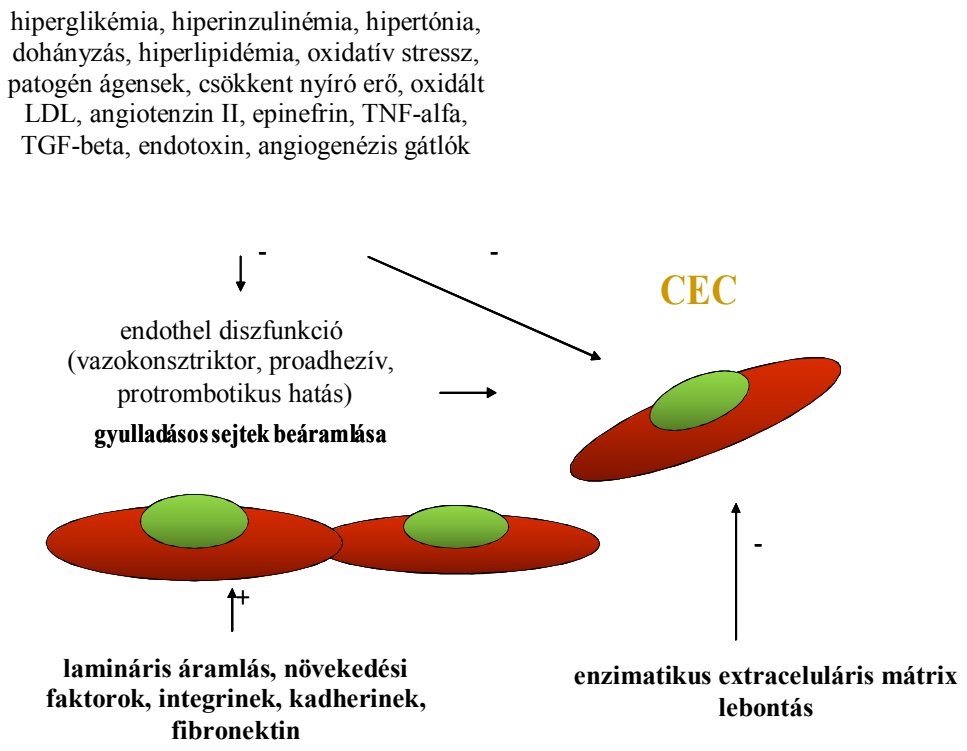
Talán az egyik legfontosabb endothelsejt leváláshoz vezető tényező az *integrin receptorok által közvetített túlélési jel elmaradása*. Az endothelsejtek felszínén található integrinek a bazális membrán, illetve az extracelluláris mátrixban elhelyezkedő fibronektint, illetve kollagént kötő receptorok. Ezek közül az *α5β1 és az αvβ3* integrinek alapvető funkciót töltenek be az endothel integritás fenntartásában. Az ECM – αvβ3 integrin interrakció csökkenti a proapoptotikus p53, a Bax és a p21 fehérjék expresszióját, emellett fontos szerepe van a TNF-alfa, valamint az INF-gamma indukálta endothelsejt leválásban is. In vitro megfigyelés alapján ugyanis ezen mediátorok hatására az αvβ3 integrin dependens, mátrixhoz való endothelsejt adhézió

erősen csökken (Mallat 2000, Rössing 2001, Tesfamariam 2007). Az endothel integritás fenntartásában szerepet játszó adhéziós molekulák közül az endothelsejtek felszínén levő VE-kadherin, illetve ehhez kapcsolódó intracelluláris kateninek emelhetők ki (Mallat 2000, Rössing 2001).

Korábbi kutatások igazolták, hogy az *extracelluláris mátrix enzimatikus lebontása* – úgynevezett pericelluláris proteolízis – ugyancsak endothel sejt leváláshoz vezethet. A pericelluláris proteolízis során a polimorfonukleáris leukocitákból, monocitákból és T-limfocitákból felszabaduló extracelluláris proteázok (pl. elasztáz, katepsin G, granzimek) az ECM komponenseit kisebb fragmentumokra bontják. Az ilyen szolubilis peptid fragmentumok képesek a fibronektinhez való endothelsejt adhéziót csökkenteni, és ezzel apoptózist válthatnak ki. A PAI-1 és a magas molekulasúlyú kininogen hasonló képességgel rendelkezik (Mallat 2000, Rössing 2001, Tesfamariam 2007). Az extracelluláris mátrix labontásában a *mátrix metalloproteinázoknak* (MMP) is fontos szerep tulajdonítható. Az ateroszklerotikus plakk progressziója során, illetve plakk rupturát követően emelkedett MMP-2 és MMP-9 szintek mellett csökkent metalloproteináz-1 szöveti inhibitor aktivitást figyeltek meg (Mallat 2000, Tesfamariam 2007, Murakami 2009). Ezen enzimek aktivitására a fennálló oxidatív stressz során az endothelsejtek, a makrofágok és a simaizomsejtek által termelt oxidatív szabad gyökök gyakorolnak hatást. Kimutatták, hogy a hidrogénperoxid, illetve a peroxinitrit jelentős mértékben serkenti az MMP-2 aktivitást, emellett csökkenti az endothelsejtek felszínén lévő α5β1 integrin mátrix ligandjához való affinitást, endothelsejt levallást eredményezve (Mallat 2000, Tesfamariam 2007, Murakami 2009).

A VEGF, az angiopoietin-1 és a fibroblaszt növekedési faktor túlélési faktornaknak számítanak. Fokozott nitrogénmonixid termelés és kaspáz-3 gátlása révén anti- apoptoticus tulajdonsággal bír az endothelsejtekre kifejtett nyíró erő is (Mallat 2000, Rössing 2001, Tesfamariam 2007).

Az egyes endothelintegritást befolyásoló tényezők a 3. ábrán láthatók.



3.. ábra: Endothel integritást befolyásoló tényezők

+ - pozitív tényezők, - negatív tényezők

2. 3. 2. Keringő endothelsejtek kvalitatív és kvantitatív meghatározása

Bouvier és Hladovec az 1970-es évek elején ismétlődő centrifugálásos ciklusokat követően anukleáris endothel eredetű fragmentumokat izoláltak trombocitadús plazmából (Hladovec és mtsai. 1978). A fenti módszer segítségével állatkísérletekben homocisztein intravénás beadását követően, illetve humán vizsgálatok során akut miokardiális infarktusban emelkedett endothelsejtfragmentum számot találtak (Hladovec és mtsai. 1978).

Mivel az első tudományos publikációk megjelenését követően a keringő endothelsejtek részletes elemzése került előtérbe, a kezdetben alkalmazott egyszerű, nem specifikus eljárások mellett korszerűbb metodika kifejlesztésére volt szükség.

Első lépésként a vér centrifugálása után a nyert sejtek endotheliális eredetét von Willebrand faktor immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazolták. Ismert azonban, hogy a von Willebrand faktor a trombociták granulumjaiban is megtalálható, valamint

intracelluláris elhelyezkedéséből kifolyólag csak a sejtmembrán permeabilizálását követően közelíthető meg - az így elvégzett vizsgálat időigényes. A cél tehát egy megbízható endothel specifikus, sejtmembránon elhelyezkedő antigén elleni antitest kifejlesztése volt. A későbbiekben két munkacsoport (Sbarbati és mtsai. 1991, George és mtsai. 1992) egymástól függetlenül számolt be endotheliális membrán antigén elleni antitestekről (HEC-19 és az *anti-CD-146*), majd erre alapozva a későbbiekben a vérben keringő endothelsejtek izolálására alkalmas immunomágneses metodika került leírásra (Mutin és mtsai. 1999, *lásd a 4.2. fejezetet*). Az immunomágneses metodikával izolált endothelsejtek számát Nageotte számlálókamrában, akridinnarancs (a cytoplazmatikus RNS specifikus festésére alkalmas), vagy propidiumjodid festést (az életképtelen sejtek membránján átdiffundáló, a nukleáris DNS jelölésére alkalmazható festék) követően fluoreszcens mikroszkóp alatt határozták meg. Az utóbbi években az izolált sejtek jelöléséhez Ulex Europeus lectin-1 antitestet használtak fel (Woywodt és mtsai. 2006).

A keringő endothelsejtszám minden esetben vénás vérből került meghatározásra, mivel a korábbi vizsgálatok során nem találtak szignifikáns különbséget az artériás és a vénás vérben meghatározott CEC sejtszám között (Woywodt és mtsai. 2006).

A vérben keringő endothel sejtszám meghatározására alkalmazott immunomágneses metodika alternatíváját az áramlási citometria képezi. Mivel ezen eljárás jelenleg kevésbe standardizált, valamint az eredmények interpretálása nehézségekbe ütközhet elsősorban az alacsony sejtszám miatt, kevésbé használt.

Korábbi vizsgálatok eredményei kimutatták, hogy az egészséges egyénekben talált keringő endothelsejtek száma alacsony (0-2/ ml). Különböző kóros állapotokban ezen sejtek száma nő, reflektálva az endothel sérülés mértékére (Woywodt és mtsai. 2002, Blann és mtsai. 2005).

Emelkedett keringő endothelsejtszámot vasculitisben (aortoarteritis 58/ ml), szisztémás lupus erythematosusban (32-89/ml) (Woywodt és mtsai. 2003), Kawasaki betegségben (7,3-31,0/ml) (Nakatani és mtsai. 2003), Rickettsia fertőzésekben (0-88/ml) (George és mtsai. 1993), sarlósejtes anémiában (1-66/ml) (Solovey és mtsai. 1998), tumoros betegekben (179-438/ml) (Mancuso és mtsai. 2001), szepszisben (16,1/ ml) (Mutunga és mtsai. 2001), illetve 2. típusú diabetes mellitusban (McClung és mtsai. 2005) írtak le.

Több esetben a magas keringő endothelsejtszám mellet más szérum marker szintje - mint pl. a vWF, az IL-6, vagy a BNP - szintén emelkedett volt (Makin és mtsai. 2004, Lee és mtsai. 2005, Lee és mtsai. 2006, Chong és mtsai. 2004).

2. 3. 3. Keringő endothelsejtek és a kardiovaszkuláris betegségek

A vérben keringő endothelsejt fragmentumok jelenlétére már a ’70-es években figyeltek rá (Hladovec és mtsai. 1978). Az első elemző publikáció az iszkémiás szívbetegekben talált keringő endothelsejtek számáról a 90. évek végén jelent meg. Mutin és mtsai. stabil és instabil angina pectorisban, illetve *thrombolízissel kezelt* akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben határozták meg a CEC számot, valamint vizsgálták az izolált sejtekben zajló apoptotikus folyamatokat. Vizsgálataik során azt találták, hogy akut miokardiális infarktusban a vérben keringő endothelsejtek száma magasabb volt az instabil anginában szenvedő betegekhez képest, és a maximumot 18-24 óra múlva érte el. Stabil angina pectorisban szenvedő betegekben nem találtak vérben keringő endothelsejteket, ezen betegeken elvégzett terheléses vizsgálat alatt és közvetlenül utána azonban a CEC szám csekély emelkedést mutatott (Mutin és mtsai. 1999*)*.

A vérben keringő endothelsejtszám meghatározása klinikai jelentőséggel bírhat elsősorban akut miokardiális iszkémia során. Korábbi irodalmi adatok szerint ugyanis akut koronária szindrómában szenvedő betegek vérében talált emelkedett CEC számnak prediktív értéke lehet a 30 napon, valamint 1 éven belül bekövetkezett kardiovaszkuláris esemény, illetve kardiovaszkuláris halálozás becslésében (Lee és mtsai. 2005).

Non-ST-elevációval járó akut koronária szindrómák korai felismerése, a betegek helyes kardiovaszkuláris rizikóbecslése és megfelelő terápia alkalmazása döntő a betegség prognózisa szempontjából. Quilici és mtsai. non- ST- elevációval járó akut koronária szindrómában szenvedő betegeket elemezve emelkedett CEC számot találtak. Emellett kimutatták, hogy a betegek egy részénél a vérben keringő

endothelsejtek száma már akkor is emelkedett volt, amikor a troponin értékek még negatívak voltak (Quilici és mtsai. 2004).

A CEC számot, a vWF és a BNP plazma szintjét, valamint az áramlás-mediált vazodilatáció mértékét krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegekben is vizsgálták (Chong és mtsai. 2004). A keringő endothelsejtek száma és az áramlás - mediált vazodilatáció között inverz korrelációt találtak, valamint ezen betegeknél az emelkedett keringő endothelsejtszám mellet magasabb vWF és BNP plazma volt megfigyelhető (Chong és mtsai. 2004). Az emelkedett keringő endothelsejt szám, és a csökkent flow-mediált vazodilatáció krónikus szívelégtelenségeben szenvedő egyéneknél jól jelzi az endothel diszfunkció jelenlétét.

Krónikusan pitvarfibrilláló betegeket elemezve azt találták, hogy a CEC szám elsősorban azon betegeknél volt magasabb, akik korábban stroke-n estek át (Freestone és mtsai. 2005).

Emelkedett keringő endothelsejtszámot perifériás érbetegségben (Makin és mtsai. 2004), és krónikus vénás elégtelenségben (Janssens és mtsai.1999) is igazoltak.

A ballonos perkután koronária tágítás (PTCA) endothelre gyakorolt direkt hatásait korábban George és mtsai. elemezték stabil angina pectorisban szenvedő betegekben. Kimutatták, hogy közvetlenül a beavatkozás után a vérben keringő endothelsejtek száma emelkedést mutat (George és mtsai. 1992). Mindemellett, átfogó vizsgálatra nem került sor, így a primer, illetve az elektív perkután koronária intervenció endothelre gyakorolt direkt hatása alapjában tisztázatlan maradt.

2.4. Perkután koronária intervenció

2.4.1. Perkután koronária intervenció, resztenózis és stent-trombózis

A perkután koronária intervenció és az intrakoronárias stentek megjelenése forradalmi áttörést jelentett az iszkémiás szívbetegség kezelésében. Az elektív perkután koronária intervenció az iszkémiás szívbetegség stabil formájában alkalmazandó szignifikáns koszorúér szűkület esetén, amikor fémstent (bare metal stent, BMS), illetve

gyógyszerkibocsátó stent (drug eluted stent, DES) kerül beültetésre. Akut koronária szindróma során a jelenlegi irányelvek szerint az okkludált koszorúér rekanalizációjára a PCI az elsőként választandó eljárás, azaz a korábban kiterjedten alkalmazott szisztémás thrombolízis jelentős mértékben háttérbe szorult (Silber és mtsai. 2005).

Számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy a perkután koronária intervenció pozitív irányban befolyásolja a beteg klinikai állapotát, csökkenti a kardiovaszkuláris morbiditást, és mortalitást (Silber és mtsai 2005). Mindemellett, az évek során gyűjtött tapasztalatok alapján a PCI-t követően resztenózis, illetve stent - trombózis léphet fel (Lüscher és mtsai. 2007).

A stent beültetést követő *resztenózis* kialakulásáért a fokozott intima proliferáció tehető felelőssé. E folyamatokban számos sejtes elem vesz részt, melyek közül kiemelendők az endothel, a simaizomsejtek, a fibroblasztok, a monociták, illetve a makrofágok. A stentelt koszorúérben a fenti sejttípusokból felszabaduló citokinek, kemokinek, növekedési faktorok, és egyéb gyulladásos mediátorok hatására az érfalban lévő simaizomsejtek proliferációja indul meg. Az adventitia és a media felöl differenciálatlan simaizomsejtek migrálnak a sérült intima felé, létrehozva a resztenózis kialakulásáért felelős neointimaréteget (Virmani 1999, Lüscher és mtsai. 2007). A gyógyszerbevonatú (pl. sirolimus, illetve paclitaxel) stentek kifejlesztése a resztenózis előfordulásának csökkentését eredményezte, mindemellett azonban aggályok merültek fel, ugyanis a DES beültetésen átesett betegekben akár fatális szövődményekkel járó akut (24 órán belül), szubakut (24 óra - 30 nap), illetve késői (360 napon túl) *stent-trombózis* gyakrabban fordult elő (Lüscher és mtsai. 2007, Finn 2007).

A stent beültetést követő reendothelizációt elsősorban állat modellekben vizsgálták. Az eredmények nem konzisztensek, ugyanis míg sertésekben a stent 7 nap alatt reendothelizálódott, addig nyulakban e folyamat 21-28 napot vett igénybe. Humán vizsgálatok alapján a koronária fémstent endothelizációja 2-3 héten belül figyelhető meg, a gyógyszerkibocsátó stentek esetén ez jelentős késéssel megy végbe. A reendothelizációs folyamatokban a csontvelő eredetű CD34+ progenitor sejtek (EPC) mellett a mobilizációért felelős faktorok (VEGF, SDF-1), és az integrin család több tagja vesz részt (Tanaka 2009). Mivel az eddigi ismeretünk az ős-, illetve progenitor sejtekről, valamint a stentek reendothelizációjában szerepet játszó faktorokról csekély, a

jövőben ezek részleteseb megismerése további klinikai és experimentális vizsgálatokat igényel.

2.4.2. Perkután koronária intervenció és a reperfúziós folyamatok

Akut miokardiális iszkémia során az okkludált koszorúérben való áramlás mielőbbi helyreállítása döntő a további iszkémiás károsodás megelőzése szempontjából. A PCI-t követő reperfúzió során azonban további, úgynevezett „reperfúziós" károsodás jöhet létre, mely hátterében elsősorban a fokozott oxidatív stressz során felszabaduló reaktív oxigén (pl. a superoxid anion, ill. a *hidrogénperoxid*) és nitrogén (peroxinitrit, nitrogén dioxid) szabad gyökök tehetők felelőssé (Moens és mtsai. 2005). A reperfúzió során - a reaktív szabad gyökök hatására - kardiomiocita és endothel károsodás, a leukociták endothelhez való fokozott adhéziója és transendotheliális migrációja, számos gyulladásos marker felszabadulása, valamint végeredményként a károsodott sejtek apoptózisa/ ill. nekrózisa figyelhető meg (Maxwell és mtsai. 1997, Piper és mtsai. 2003).

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a miokardiális iszkémia és reperfúzió során a korai szabadgyökök képződése és a DNS sérülése poli-ADP ribóz polimeráz-1 (PARP-1) enzim hiperaktivációjához vezet, és ezzel energetikai deficitet, gyulladásos mediátorok termelését, adhéziós molekulák fokozott expresszióját és végül endothel, valamint miokardium károsodást hoz létre. Ennek megfelelően, állatkísérletes modellek alapján a poli-ADP ribóz polimeráz-1 farmakológiai gátlása csökkentheti a globális iszkémia és reperfúzió alatt kialakult miokardiális és endothel diszfunkciót (Kirkland és mtsai 1994, Piconi és mtsai. 2004). A miokardiális iszkémia és ezt követő reperfúzió során a PARP-1 enzim a keringő leukocitákban is aktiválódik (Murthy és mtsai 2004). A keringő leukociták PARP-1 aktivitása érzékeny markerként szolgálhat a miokardiális iszkémia kapcsán kialakuló szöveti oxidatív károsodásnak, ezzel módot adva a miokardiumot érő oxidatív stressz és következményes PARP-1 aktiváció mértékének becslésésre.

A fenti irodalmi adatokra támaszkodva a miokardiális iszkémiát és a reperfúziót kísérő oxidatív stresszt vizsgáltuk akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben.

Munkánk során az oxidatív stressz (hidrogénperoxid) és az oxidatív sejt (DNS) károsodás markerei (8 – hidroxi-deoxiguanozin) mellett a perifériás leukocitákban történő PARP-1 aktivációját elemeztük PCI-t követő reperfúzió során. Tekintettel arra, hogy a perifériás leukocitákban történő PARP-1 aktivációjának vizsgálata egy másik doktori disszertáció alaptárgyát képezi (Horváth E. 2008), a közös eredményekből a továbbiakban a PCI-t követő reperfúziós folyamatok plazma markerekre gyakorolt hatásait mutatjuk be.

2.4.3. Perkután koronária intervenció szisztémás hatásai

Számos korábbi vizsgálat igazolta a perkután koronária intervenció hatékonyságát stabil, illetve akut iszkémiás szívbetegekben, az eljárás klinikai jelentősége vitathatatlan. Az utóbbi években azonban egyre több irodalmi adat utal a PCI-t követő szisztémás gyulladásos válasz jelenlétére, amely a hsCRP, illetve az IL-6 szérum szintekkel nyomon követhető. Almagor és mtsai. szignifikáns CRP emelkedést írtak le stabil, valamint akut koronária szindrómás betegekben perkután koronária intervenciót követően (Almagor és mtsai. 2003). Aggarwall és munkacsoportja akut koronária szindrómában szenvedő betegeket vizsgálva a PCI-t követően 1 óra múlva szignifikáns IL-6 szint emelkedést tapasztalt (Aggarwall és mtsai. 2003). Hasonló megfigyelést tettek Rebeiz és mtsai., akik PCI-t követő C- reaktív protein, IL-6 és monocita kemoattraktáns protein (MCP)-1 emelkedést írtak le, amely a sirolimus bevonatú stent esetén kifejezettebb volt (Rebeiz és mtsai. 2009).

Akut gyulladásos válasz mellett néhány publikáció a perkután koronária intervenció egyéb markerekre gyakorolt közvetlen hatásról számolt be. Aström és mtsi. miokardiális infarktusban szenvedő PCI-on átesett betegeket vizsgálva azt találták, hogy míg a CRP, az IL-6, a mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9), és a tumor nekrózis faktor-alfa emelkedett, addig az antioxidáns tulajdonságú malondialdehyd szintje jelentősen csökkent (Aström és mtsai. 2007). Más eredmények alapján azonban stabil anginában, illetve miokardiális infarktusban elvégzett PCI nem gyakorolt szignifikáns hatást sem az MMP-9, sem a metalloproteináz szöveti inhibítor (TIMP-1, TIMP - 2) plazma szintekre (Furenes és mtsai. 2009).

Amint a fenti eredmények felsorolásából látható, a perkután koronária intervenció endothelre gyakorolt direkt hatásairól igen kevés adat állt rendelkezésre. Tekintettel erre, a keringő endothelsejt számot – mint az endothel sérülése direkt markerét – egyéb szolubilis markerek mellett arra a célra használtuk fel, hogy a perkután koronária intervenció endothelre kifejtett hatásait elemezzük.

3. Célkitűzések

Elsődleges célunk a perkután koronária intervenció endothelre gyakorolt hatásainak vizsgálata, illetve a koronária intervenciót követő szisztémás oxidatív stressz és a reperfúziós károsodás mértékének felmérése volt. További célunk volt az ismert kardiovaszkuláris kockázati tényezők és a kardiovaszkuláris farmakoterápia endothelre gyakorolt hatásainak tanulmányozása.

Vizsgálati célkitűzéseink az alábbi pontokban foglalhatók össze:

1. Az endothel sérülés jelenléte a keringő endothelsejtszámmal jól követhető. Vizsgálataink során az endothel károsodás mértékét elsősorban a keringő endothel sejtszámmal – mint direkt markerrel - szerettük volna tisztázni, ezért elsődleges célunk ezen sejtek izolálására alkalmas, standardizált és reprodukálható metodika kidolgozása volt.

2. Számos adat áll rendelkezésre az invazív koronária intervenciót követő szisztémás gyulladásos válasz jelenlétéről, azonban a koronarográfia, illetve az invazív koronária beavatkozás endothelre gyakorolt direkt hatása kevésbé ismert. Felmerül a feltételezés, hogy a koronária intervenció (akár mechanikus manipuláció révén) endothel sérülést okozhat, e célból a kutatómunkánk ezen részében az iszkémiás szívbetegség stabil, illetve akut formájában történt invazív koronária beavatkozás endothelre gyakorolt hatásait vizsgáltuk elsősorban a keringő endothelsejtszám segítségével.

3. Ismert, hogy a kardiovaszkuláris kockázati tényezők jelenléte endothel diszfunkciót, illetve az endothel integritásának elvesztését válthatja ki, elindítva az ateroszklerózis folyamatát. Vizsgálataink további részében arra kerestük a választ, hogy koronarográfiával igazolt iszkémiás szívbetegekben az endothelt – és elsősorban a keringő endothelsejtszámot, mint az endothel sérülés direkt markerét - önmagában hogyan befolyásolják a széles körben elfogadott kardiovaszkuláris kockázati tényezők és a kardiovaszkuláris farmakoterápia.

4. Az iszkémiás miokardiumban történő áramlás mielőbbi helyreállítása döntő a további iszkémiás károsodás kivédése tekintetében. Korábbi kutatások eredményei azonban igazolták, hogy az okkludált koronária rekanalizációját követően is további „reperfúziós” károsodás jöhet létre, mely hátterében elsősorban a fokozott oxidatív stressz áll. Mivel az előbbivel kapcsolatban korlátozott számú humán adat áll rendelkezésre, vizsgálataink ezen részében az akut miokardiális infarktusban elvégzett perkután koronária intervenciót kísérő oxidatív stressz és a reperfúziós károsodás mértékét kívántuk elemezni szolubilis markerek segítségével.

A fenti pontokban összefoglalt kérdések megválaszolása céljából három különálló klinikai vizsgálatot végeztünk.

4. Betegcsoportok, klinikai vizsgálatok terve és laboratóriumi módszerek

4.1. Betegcsoportok

Minden vizsgálati protokollt az Intézeti, valamint az ETT Kutatásetikai Bizottsága engedélyezett. Betegeink a bevonás előtt a vizsgálatban történő részvételhez írásos beleegyezésüket adták.

4.1.1. Perkután koronária intervenció endothelre gyakorolt hatása akut és stabil koronáriaér betegekben

A vizsgálatba 74 invazív koronária beavatkozás céljából érkező kardiovaszkuláris beteget vontunk be, majd a betegeket három csoportba osztottuk.

a.) STEMI csoport: Az első betegcsoportot 28 akut ST – elevációs miokardiális infarktussal (STEMI) érkező, sürgősséggel felvett beteg képezte. STEMI *kritériumok közé tartoztak*: a.) a perzisztáló mellkasi fájdalom (> 20 perc), b.) az EKG-n ST-segment eleváció (≥2 mm), c.) biomarker (troponin, CK, CK-MB) pozitivitás. Minden betegnél standard gyógyszeres terápia - aszpirin, clopidogrel, heparin, GPIIbIIIa receptor gátló, sztatin – mellett perkután koronária intervenció és szövődménymenetes fémstent (BMS) beültetés történt; az okkludált koronáriaér rekanalizációja minden esetben sikeres volt.

b.) SA/ PCI csoport: A második betegcsoportot olyan 23 stabil angina pectorisban szenvedő (korábban pozitív terheléses vizsgálat, illetve pozitív szívizomscintigráfia) beteg alkotta, akiknél szignifikáns koronária sztenózis miatt perkután koronária intervencióra (és fémstent beültetésre) került sor.

c.) SA/ coron csoport: A harmadik betegcsoportba 23 csak koronarográfián átesett iszkémiás szívbeteg tartozott, PCI nem történt. Ezen betegpopulációban a koronarográfia nem-szignifikáns koronáriaér szűkületet, illetve háromérbetegséget igazolt. Negatív koronarogrammal rendelkező betegeket a vizsgálatból kizártunk.

A bevont betegek részletes demográfiai és egyéb biológiai paraméterei az 5.2.1. fejezetben találhatóak.

A vizsgálat rövid klinikai terve: A CEC szám, a von Willebrand faktor (vWF) és a szolubilis intercelluláris adhéziós molekula (sICAM-1) plazma szintje került meghatározásra a beteg felvételekor, majd a PCI-t követően 30 perc, 24 óra és 96 óra múlva. A harmadik betegcsoportban – ahol csak koronarográfia történt - a fenti parmétereket a beteg felvételekor, majd az invazív beavatkozást követően 30 perc és 24 óra múlva határoztuk meg.

4.1.2. Endothel funkciót befolyásoló tényezők elemzése iszkémiás szívbetegégben

A második vizsgálatba 80, olyan *stabil angina pectorisban* szenvedő beteget vontunk be, akiknél a koronarográfia szignifikáns koronáriaér szűkületet igazolt.

Minden betegnél *az invazív koronária intervenció előtt* a CEC szám, az E - szelektin – mind endotheliális markerek, a szolubilis CD40L, valamint a gyulladásos markerek (hs – CRP, IL-6) kerültek meghatározásra. Minden betegtől részletes anamnézist vettünk fel kardiovaszkuláris rizikó faktoraikkal kapcsolatban. A bevont betegek részletes demográfiai és egyéb biológiai paraméterei az 5.3.1. fejezetben találhatóak.
A vizsgálat során a CEC számot 18 önként jelentkező egészséges, gyógyszert rendszeresen nem szedő egyénnél (11 nő, 7 férfi, átlag életkor: 34,5 év) is meghatároztuk.

Mindkét fenti vizsgálatban a kizáró tényezők közé tartoztak az anamnézisben szereplő krónikus veseelégtelenség, a májelégtelenség, az autoimmun betegségek, és a malignitás. Emellett kizárásra kerültek azon ST- elevációs miokardiális infarktusban szenvedő betegek is, akiknél kardiogén sokk miatt intraaorticus balloonpumpa behelyezése vállt szükségessé.

4.1.3. Oxidatív stressz és az oxidatív DNS károsodás elemzése perkután koronária intervención átesett akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben

Ezen vizsgálatunkban 30 iszkémiás szívbetegségben szenvedő, koronarográfia, illetve elektív/ vagy primer perkután koronária intervenció céljából érkező beteget elemeztünk. A betegeket három csoportba osztottuk, a b.) és c.) csoport betegei kontroll alanyokként szerepeltek.

a.) **STEMI csoport:** Az első betegcsoportot 15 akut ST – elevációs miokardiális infarktussal érkező, sürgősséggel felvett beteg alkotta.

b.) **SA/ PCI csoport:** A második betegcsoportot 9 olyan stabil angina pectorisban szenvedő beteg alkotta, akiknél szignifikáns koronária sztenózis miatt perkután koronária intervencióra (és fémstent beültetésre) került sor.

c.) **SA/ coron csoport:** A harmadik betegcsoportba 6 olyan iszkémiás szívbeteg tartozott, akiknél PCI-ra nem került sor. Minden betegnél a koronarográfia pozitív volt.

A bevont betegek részletes demográfiai és egyéb biológiai paraméterei az 5.4.1. fejezetben találhatóak.

A vizsgálat rövid klinikai terve: A plazma hidrogénperoxid szint, valamint a 8-hidroxi-deoxiguanozin szérum szintje a STEMI csoportban négy alkalommal került meghatározásra: az invazív kardiológiai beavatkozás előtt, majd 15 perc, 24 és 96 óra múlva; az SA/PCI és az SA/coron csoportban a beavatkozás előtt, majd 15 perc múlva

4.2. Laboratóriumi vizsgálati módszerek

4.2.1. A keringő CD146+ endothelsejtek izolálása és az endotheliális eredetük igazolása immunhisztokémia segítségével

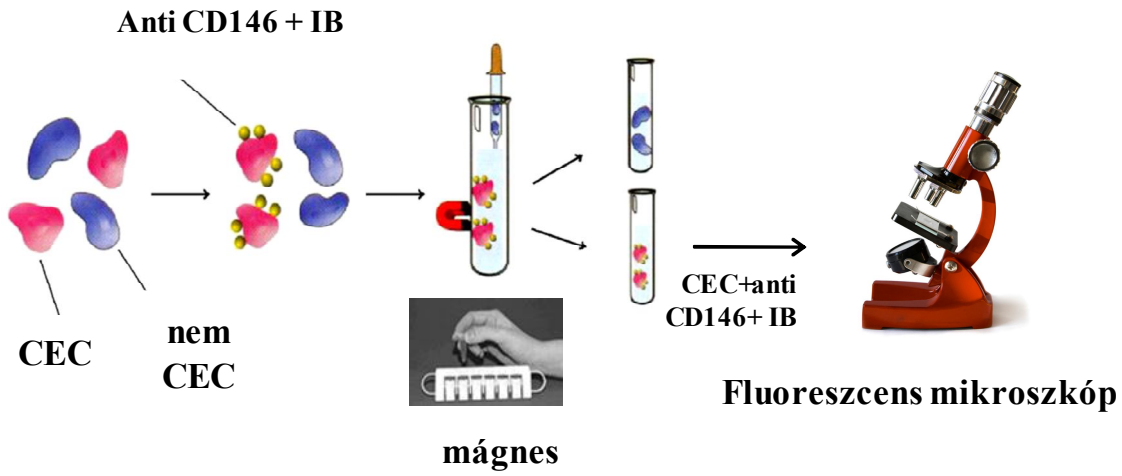
A vérben keringő endothelsejteket v. cubitalisból levett vérből izoláltuk immunomágneses metodika segítségével (Mutin és mtsai. 1999). A 4.5 µm átmérőjű immunomágneses gyöngyöket (Dynal, Norvégia) - melyek felszíneihez anti-egér IgG antitest kötődik – egér anti-humán CD146 antitesttel (S-Endo1) (Biocytex, Franciaország) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán át, majd a felesleges szabad antitestet izoláló mágnes (Dynal, Norvégia) és 0.1% marha szérum albumin (BSA) - PBS oldat segítségével, mosással távolítottuk el. Ily módon előállított anti-humán CD146 – antitesttel bevont immunomágneses gyöngyökből 100 µl- t adtunk minden 1 ml vénás vérhez. Egy órás szobahőmérsékleten történt inkubálást, majd mosást követően (izoláló mágnes (Dynal, Norvégia), 0.1 % PBS-BSA oldat) az izolált sejtek endotheliális eredetének bizonytására további immunhistokémiai vizsgálatokat végeztünk.

A fent említett metodikával előállított sejtszuszpenziót 4 %-os paraformaldehidben (1 ml, 10 perc inkubáció) (Reanal) fixáltuk, majd a sejtmembránt 0.2 %-os Triton–X (1 ml, 15 perc inkubáció) (Reanal) oldat segítségével permeabilizáltuk. A non – specifikus kötőhelyeket 1 ml 1 %-os PBS/BSA oldattal blokkoltuk, majd a sejteket nyúl anti–humán von Willebrand faktor antitesttel (DAKO, Belgium) inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Mosást követően a sejteket másodlagos anti- nyúl Alexa Fluor 466 (Invitrogen, USA) fluorescens antitesttel inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A sejteket fluorescens mikroszkóp alatt elemeztük (Nikon, USA).

4.2.2. A keringő endothelsejtszám meghatározása

A vérben keringő endothelsejtszám meghatározáshoz összesen 8 ml (két 4 ml-es EDTA-s vérvételi cső) vénás vért vettünk le a v. cubitalisból. A keringő endothelsejteket a fent részletezett immunomágneses metodika segítségével izoláltuk.

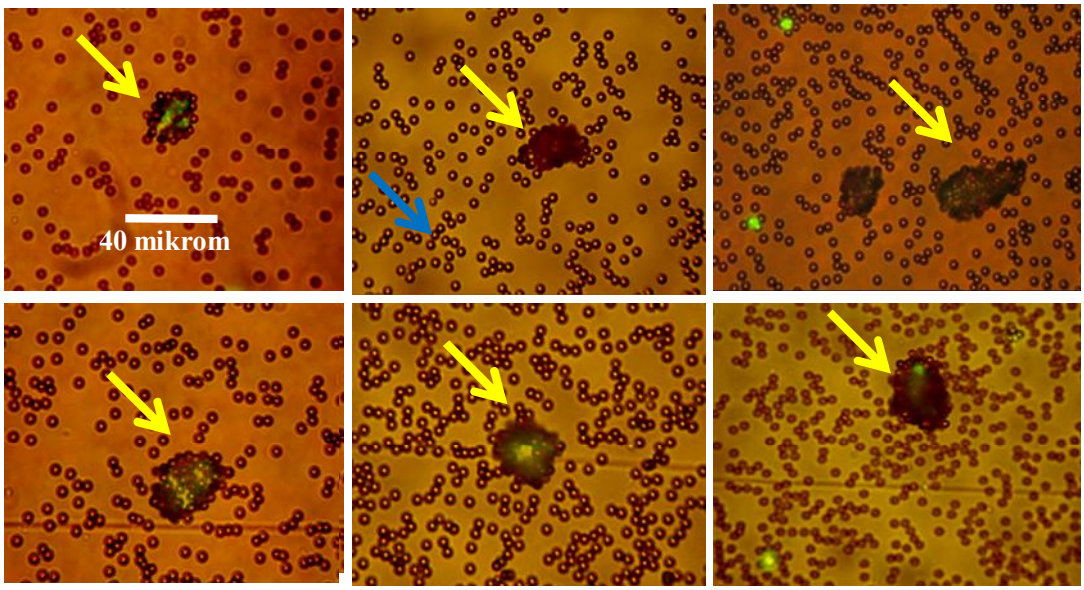
Röviden, a 4.5 µm átmérőjű immunomágneses gyöngyöket (Dynal, Norvégia) - melyek felszíneihez anti-egér IgG antitest kötődik – egér anti-humán CD146 antitesttel (S-Endo1) (Biocytex, Franciaország) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán át, majd izoláló mágnes (Dynal, Norvégia) és 0.1% marha szérum albumin (BSA)- PBS oldat segítségével a felesleges antitestet mosással eltávolítottuk. Ily módon előállított anti-human CD146 – antitesttel bevont immunomágneses gyöngyökből minden 1 ml vérhez 100 µl- t adtunk. Egy órás szobahőmérsékleten történt inkubálást, majd mosást követően (mágnes, 0.1 % PBS-BSA oldat) az izolált sejteket 5 µg/ml koncentrációjú akridinnaranccsal (Sigma, USA) festettük. Az immunmágneses metodika alapjait a 4. ábra mutatja be.



4. ábra: CEC izolálásra alkalmazott immunomágneses metodika alapjai.

A perifériás vért anti-CD 146 antitestet hordozó immunmágneses gyöngyökkel (ang. immunomagnetic beads – IB) inkubáljuk. A vérben lévő CD- 146 antigént hordozó endothelsejtek az immunmágneses gyöngyöket kötve mágneses szeparátor segítségével izolálhatóvá válnak. Az izolált endothelsejtek fluoreszcens festést követően fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgálhatók.

Az izolált sejtek számát fluorescens mikroszkóp alatt, Nageotte számlálókamrában vizsgáltuk. Csak 30-50 µm hosszú, típusos morfológiával rendelkező, minimum 10 immunmágneses gyöngyöt kötő sejtek számát határoztuk meg. Az összsejtszámot 1 ml vérmennyiségre számítva adtuk meg. Az izolált sejtek mikroszkópos képe az 5. ábrán látható.



5. ábra: Izolált keringő CD146+ endothelsejtek. *Az ábrán az izolált endothelsejtek láthatók akridinnarancs festést követően mikroszkóp alatt*
sárga nyíl- CEC, kék nyíl – immunmágneses gyöngy

4.2.3. Plazma/ szérum markerek meghatározása ELISA segítségével

A plazma hidrogénperoxid, a von Willebrand faktor, a szolubilis ICAM-1, a CD40 L és az IL-6 szinteket trombocitaszegény (PPP) plazmából határoztuk meg ELISA módszer segítségével. A v. cubitalisból citrátos, illetve EDTA csőbe történt vérvételt követően a vért 10 percig 3000 rpm-en centrifugáltunk, majd az így elkészített citrátos, illetve EDTA PPP-t az analízisig -80ºC –on tároltuk.

A 8OHdG szinteket, a sE- szelektint és a hsCRP-t szérumból határoztuk meg ELISA módszer, illetve immunoturbidimetria segítségével. A v. cubitalisból történt

vérvételt követően a vért 10 percig 3000 rpm-en centrifugáltunk, majd az így elkészített szérumot az analízisig 80ºC –on tároltuk.

Plazma hidrogénperoxid szint meghatározás: A plazma hidrogénperoxid szintet előregyártott EIA teszt segítségével határoztuk meg (OxyStat assay, Biomedica Gruppe, Wien, Austria). Az eredményeket Anthos 2010 ELISA Reader (Biochrom, United Kingdom) készülékkel olvastuk le 450 nm-en. A mérés alsó értéke 7 µmol/l volt.

8 – hidroxi-deoxiguanozin (8OHdG)szint meghatározás: A 8OHdG szérumból határoztuk meg előregyártott ELISA kit (Gentaur, Brussels, Belgium) segítségével. A mintákat a méréshez a gyártó által javasolt filtrációs módszerrel készítettük elő.

Plazma von Willebrand faktor szint meghatározás: A 96 lyukú ELISA plate-re (Greiner, Germany) 200µl / lyuk 1: 500-hoz higított nyúl – anti humán von Willebrand faktor antitestet (DAKO, Denmark) helyeztünk fel. Negyvennyolc órás inkubálást (+ 4 ºC –on) követően a felesleges, szabad antitestet eltávolítottuk, majd a non – specifikus kötőhelyeket 200 µl/ lyuk 1 %-os PBS/BSA oldattal gátoltuk. Egy órás, szobahőmérsékleten történt inkubálást követően a platet PBS – 10% Tween – 80 oldat segítségével mostuk, majd 200 µl / lyuk citrátos plazmát (minden mintát 1: 40 és 1: 160 hígításban) helyeztünk fel. Két órás, szobahőmérsékleten történt inkubálást, majd háromszoros PBS - 10% Tween – 80 oldattal történt mosást követően 200 µl/ lyuk 1: 4000 -hez higított peroxidáz – konjugált nyúl anti – humán von Willebrand faktor antitestet (DAKO, Dánia) adtunk, majd 2 órán át + 4 ºC –on inkubáltuk. Ismételt mosást követően (PBS - 10% Tween – 80) a plate-re 200 µl/ lyuk kromogén szubstrátot (25 ml citrát – foszfát puffer, 10 mg orto-fenilén–diamin, 2,5 µl hidrogénperoxid) helyeztünk fel, majd a reakciót 15 perc sötétben történt inkubálás után 50 µl / lyuk 4 M –s kénsavval állítottuk le. Standard görbe elkészítéséhez egészséges egyénekből előállított, poolozott 1: 20, 1: 40, 1: 80, 1: 160, 1: 320, 1: 640, 1: 1280 és 1: 2560 higított citrátos plazmát használtunk fel. Az eredményeket Anthos 2010 ELISA Reader (Biochrom, Egyesült Királyság) készülékkel 492 nm-en olvastuk le.

Plazma sICAM-1 szint meghatározás: Az sICAM-1 szinteket előregyártott ELISA kit (R&D Systems, California, USA) segítségével határoztuk meg. A méréshez 1: 20- hoz higított citrátos plazmát használtunk fel. Az eredményeket Anthos 2010 ELISA Reader (Biochrom, Egyesült Királyság) készülékkel olvastuk le 450 nm-en. A mérés alsó értékhatára 0.35 ng/ ml volt.

Plazma E-szelektin szint meghatározás: A szolubilis E-szelektin szinteket előregyártott ELISA kit (R&D Systems, California, USA) segítségével határoztuk meg. A méréshez 1: 20- hoz higított szérumot használtunk fel. Az eredményeket Anthos 2010 ELISA Reader (Biochrom, Egyesült Királyság) készülékkel olvastuk le 450 nm-en. A mérés alsó értékhatára 0. 1 ng/ml volt.

Plazma sCD40L szint meghatározás: A szolubilis CD40L szinteket sCD40L ELISA kit (R&D Systems, California, USA) segítségével határoztuk meg. A méréshez 1: 5 – höz higított EDTA plazmát használtunk, a kiértékelés Anthos 2010 ELISA Reader (Biochrom, Egyesült Királyság) készülék segítségével történt 450 nm-en. A mérés alsó határértéke 4. 2 pg/ml volt.

Plazma IL-6 szint meghatározás: Az IL-6 szinteket citrátos plazmából határoztuk meg IL-6 immunoassay ELISA kittel (R&D Systems Inc, USA), a kiértékelés Anthos 2010 ELISA Reader (Biochrom, Egyesült Királyság) készülék segítségével történt 450 nm-en. A mérés alsó határértértéke 0. 7 pg/ml volt.

Szérum hsCRP szint meghatározás: Magas szenzitivitású C-reactive protein szérum koncentrációját immunoturbidimetria (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) által határoztuk meg. A mérés alsó határértéke 0. 124 ng/ml volt.

4.3. Statisztikai analízis

A demográfiai adatok átlag ± standard deviáció (SD), illetve szám (n) és százalék (%) formájában vannak feltüntetve. A statisztikai analízis során nemparaméteres teszteket használtunk. A CEC szám, a plazma vWF, az sICAM-1, a sCD40L, a sE-szelektin, a hsCRP és az IL-6 értékek medián (M), valamint interkvartilis terjedelem (interquartile

range -IQR) formájában vannak feltüntetve. A hidrogénperoxid és a 8OHdG átlag és SEM (standard error of the mean) formájában vannak feltüntetve.

Betegcsoportok közötti különbségeket a Kruskal - Wallis ANOVA, illetve a Mann-Whitney tesz segítségével határoztuk meg ($p < 0.05$ értéket fogadtunk el szignifikáns különbségnek).

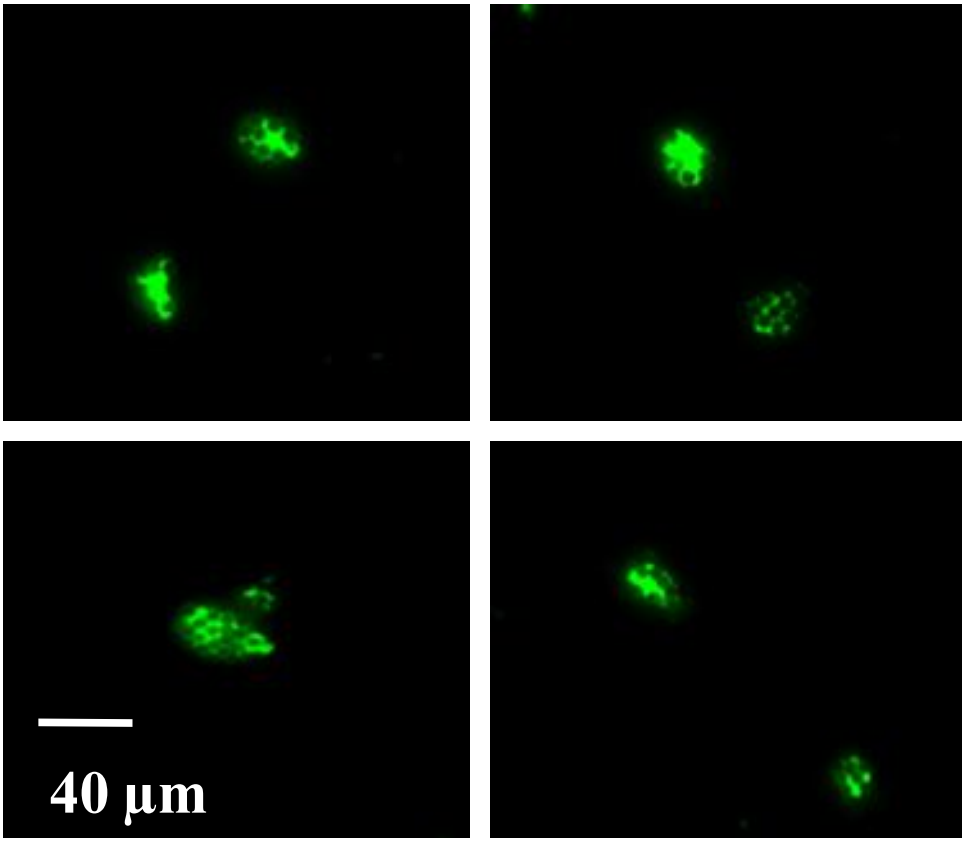
Friedman ANOVA-t, illetve Wilcoxon próbát alkalmaztunk a dependens változók közti különbségek meghatározásához ($p <0. 05$ értéket fogadtunk el szignifikáns különbségnek).

Az ismert paraméterek közötti összefüggés vizsgálatához Spearman korrelációs analízist használtunk ($p <0. 05$ értéket fogadtunk el szignifikáns különbségnek). Az egyes paraméterek (kvantitatív, illetve kvalitatív) közötti összefüggést regressziós modellekkel vizsgáltuk. Az elemzéseket Statistica 7.0 software-el (Stat Soft. Inc., Tulsa, USA) végeztük el.

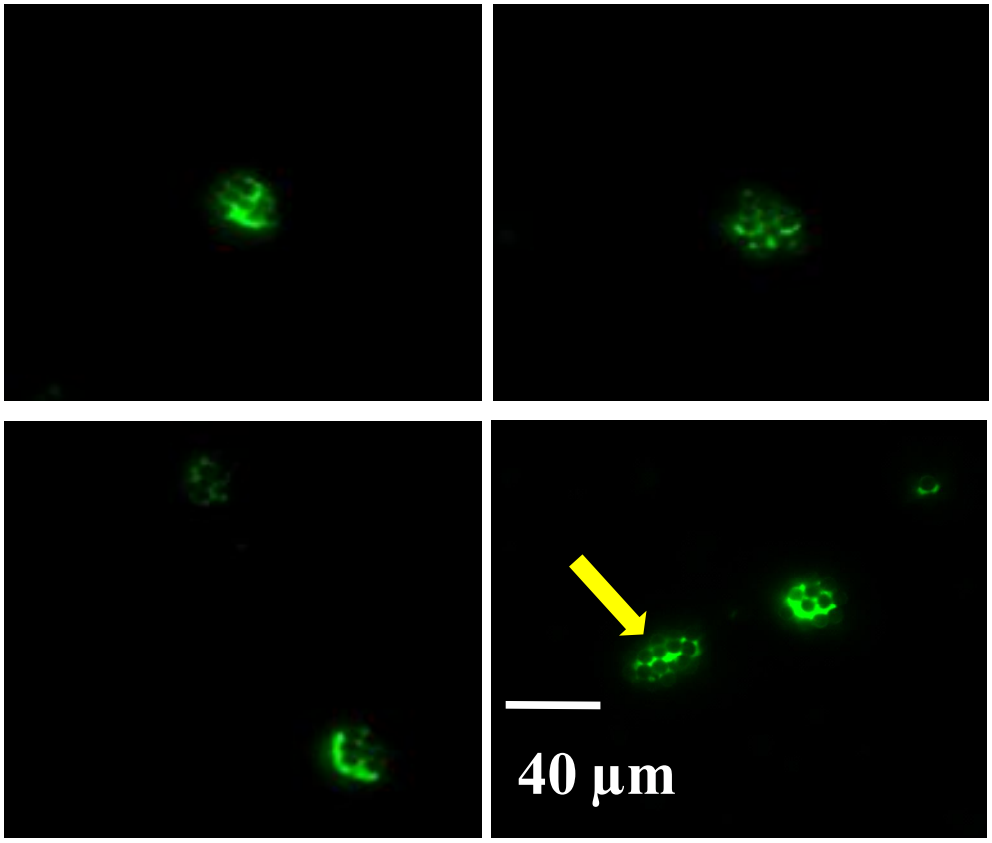
5. Eredmények

5.1. Az izolált keringő CD146+ endothelsejtek endotheliális eredetének igazolása immunhisztokémia segítségével

Az izolált CD146+ endothelsejtek eredetét a Weibel- Palade testekben található von Willebrand faktor immunhisztokémiai festés segítségével igazoltuk (6. és 7. ábra). Az endothelsejtek vérből történő izolálásának, valamint immunhisztokémiai vizsgálatának részletes leírása a 4.2.1 fejezetben található.



6. ábra: Izolált CD146+ endothelsejtek von Willebrand faktor immunhisztokémiai festést követően (Alexa Fluor 466)



7. ábra. Izolált CD146+ endothelsejtek von Willebrand faktor immunhisztokémiai festést követően (Alexa Fluor 466): *Az ábra az izolált CD146+ endothelsejteket, illetve fragmentumokat mutatja, von Willebrand festést követően (Alexa Fluor 466) fluoreszcens mikroszkóp alatt (Nikon, USA). A sejtek felszínén a CD146 antigénhez kötött immunmágneses gyöngyök (4.5 µm)(sárga nyíl) is jól láthatók.*

5.2. Perkután koronária intervenció endothelre gyakorolt hatása akut és stabil koronáriaér betegekben

5.2.1. Demográfiai adatok

Életkor, illetve az ismert kardiovaszkuláris kockázati tényezők - hipertónia, 2. típusú diabetes mellitus, hiperlipidémia - előfordulása tekintetében a vizsgált csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget. A STEMI csoportban szignifikánsan kevesebb betegnél szerepelt korábbi miokardiális infarktus az anamnézisben, valamint egy betegnél sem végeztek korábban koronária intervenciót. Emellett, a kardiovaszkuláris kockázati tényezők ellenére a STEMI betegcsoportban szignifikánsan kevesebb beteg részesült korábbi nitrát, ACE- gátló, béta- blokkoló, illetve sztatin kezelésben, egyetlen beteg sem szedett aszpirint, vagy clopidogrelt (lásd 2. tábl.).

A STEMI betegek 75 %-ában a perkután koronária intervencióra a mellkasi fájdalom jelentkezésétől számított 3-6 órán belül került sor. A STEMI csoportban szignifikánsan több koronáriaér okklúzió/ beteg volt megfigyelhető (STEMI: 1.25 ± 0.12, *vs.* SA/ PCI: 0.17 ± 0.28, SA/coron: 0.43 ± 0.65, $p< 0.01$). A PCI során behelyezett átlag stentek száma (STEMI: 1.48 ± 0.29, vs. SA/ PCI: 1.65 ±0.21, $p= 0.54$), illetve a behelyezett átlag stent hossza (STEMI: 26.63 ± 8.11 mm *vs.* SA/ PCI: 23.7 ± 8.47 mm, $p= 0.89$) mindkét csoportban hasonló volt (lásd 2. tábl.).

Biokémiai paramétereket tekintve, STEMI és SA/PCI csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget a szérum lipid értékekben. Szignifikánsan magasabb CK, CK-MB, és LDH szinteket találtunk akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben (lásd 3. tábl.).

2. tábl.: Vizsgált betegcsoportok demográfiai adatai

	STEMI (*n* = 28)	**SA /PCI (*n* = 23)**	**SA/ coron (*n* = 23)**
Életkor, átlag± SD, évek	64.55 ± 3.93	59.4 ± 10.5	60.8 ± 10.5
Férfi/Nő, *n (%)*	17 (60)/11 (40)	16 (69.5)/7 (30.5)	15 (65.2)/8 (34.8)
BMI, átlag ± SD, kg/m^2	24.23 ± 0.75	29.8 ± 3.78	29.1 ± 3.42
Kockázati tényezők, *n* (%)			
Dohányzás, *n* (%)	11 (40)	6 (26.1)	7 (30.3)
Hipertónia, *n* (%)	18 (64)	17 (73.9)	20 (86.9)
Diabetes mellitus, *n* (%)	12 (42)	12 (52.1)	8 (34.7)
Hiperlipidémia, *n* (%)	12 (42)	9 (39.1)	9 (39.1)
Korábbi AMI, *n* (%)	4 (14.2)*	11 (47.8)	8 (34.7)
Korábbi PCI, *n* (%)	0*	11 (47.8)	10 (43.4)
Felvételi gyógyszerek			
Nitrát, *n* (%)	3 (10) *	8 (34.7)	7 (30.4)
Béta- blokkoló, *n* (%)	8 (28)*	19 (82.6)	20 (86.9)
ACE - gátló, *n* (%)	10 (35) *	19 (82.6)	15 (65.2)
Kalcium- csatorna blokkoló, *n* (%)	2 (7)	2 (8.7)	3 (13)
Trombocita – gátló kezelés, *n* (%)			
Aszpirin	0 *	21 (91.3)	18 (78.2)
Clopidogrel	0 *	5 (21.7)	2 (8.6)
Sztatin, *n* (%)	3 (16) 0 *	13 (56.5)	16 (69.6)
PAD/inzulin, *n* (%)	2 (7)/2 (7)	5 (21.7)/2 (8.7)	3 (13)/1 (4.3)
Koronarográfia			
Átlag sztenózis szám/ beteg	2.0 ± 0.32	2.04 ± 0.97	1.96 ± 1.14
Átlag oklúzió szám/ beteg	1.25 ± 0.12*	0.17 ± 0.28	0.43 ± 0.65
Implantált stent szám/ beteg	1.48 ± 0.29	1.65 ± 0.21	
Átlag stent hossz (mm)	26.63 ± 8.11	23.7 ± 8.47	
Esemény – ballon idő[a]			
<3 óra, *n* (%)	3 (10)		
3–6 óra, *n* (%)	21 (75) *		
>6 óra, *n* (%)	4 (14)		

Az értékek átlag ± SD, illetve szám (n) és százalék (%) formájában vannak feltüntetve

Rövidítések: *SD - standard deviáció; AMI - akut miokardiális infarktus; PCI - perkután koronária intervenció.* [a] *A mellkasi fájdalom kezdete és a PCI között eltelt idő*

[*] *$p < 0.05$, azaz a különbség szignifikáns mind a STEMI vs. SA/PCI mind a STEMI vs. SA/coron csoportok között*

3. tábl.: Laboratóriumi értékek

	STEMI			SA/ PCI (24 óra)
	Pre-PCI	**Post-PCI**	**24 óra**	
CK, átlag ± SD (U/l)	238.6 ± 78.3	2614.8 ± 1102.3[*]	1102.9 ± 521.42[*]	124 ± 58.6[#]
CKMB, átlag ± SD (U/l)	49.8 ± 23.1	463.51 ± 225.9[*]	129.6 ± 56.6[*]	–
LDH, átlag ± SD (U/l)	400.1 ± 94.3	–	1355 ± 528.4[*]	252.9 ± 35.4[#]
Koleszterin, átlag ± SD (mmol/l)	5.28 ± 1.7	–	4.87 ± 0.88	4.16 ± 1.7
Triglicerid, átlag ± SD (mmol/l)	1.91 ± 1.02	–	2.01 ± 1.69	2.12 ± 0.85
Vércukor, átlag ± SD (mmol/l)	10.09 ± 1.65	–	7.42 ± 2.52[*]	6.8 ± 2.36
GOT, átlag ± SD (U/l)	38.13 ± 9.84	–	165.31 ± 47.25[*]	20.9 ± 5.8[#]
GPT, átlag ± SD (U/l)	25.4 ± 4.31	–	52.5 ± 7.61[*]	22.9 ± 11.5[#]
Kreatinin, átlag ±SD (umol/1)	85.52 ± 17.82	–	81.2 ± 23.25	84.8 ± 35.5
Leukocita, átlag ± SD (10^9 l^{-1})	10.75 ± 2.48	–	11.77 ± 3.04	7.7 ± 1.6[#]
Trombocita, átlag ± S.D. (10^9 l^{-1})	239.95 ± 38.4		229.89 ± 42.5	228.1 ± 34.2

Az értékek átlag ± SD, illetve szám (n) és százalék (%) formájában vannak feltüntetve

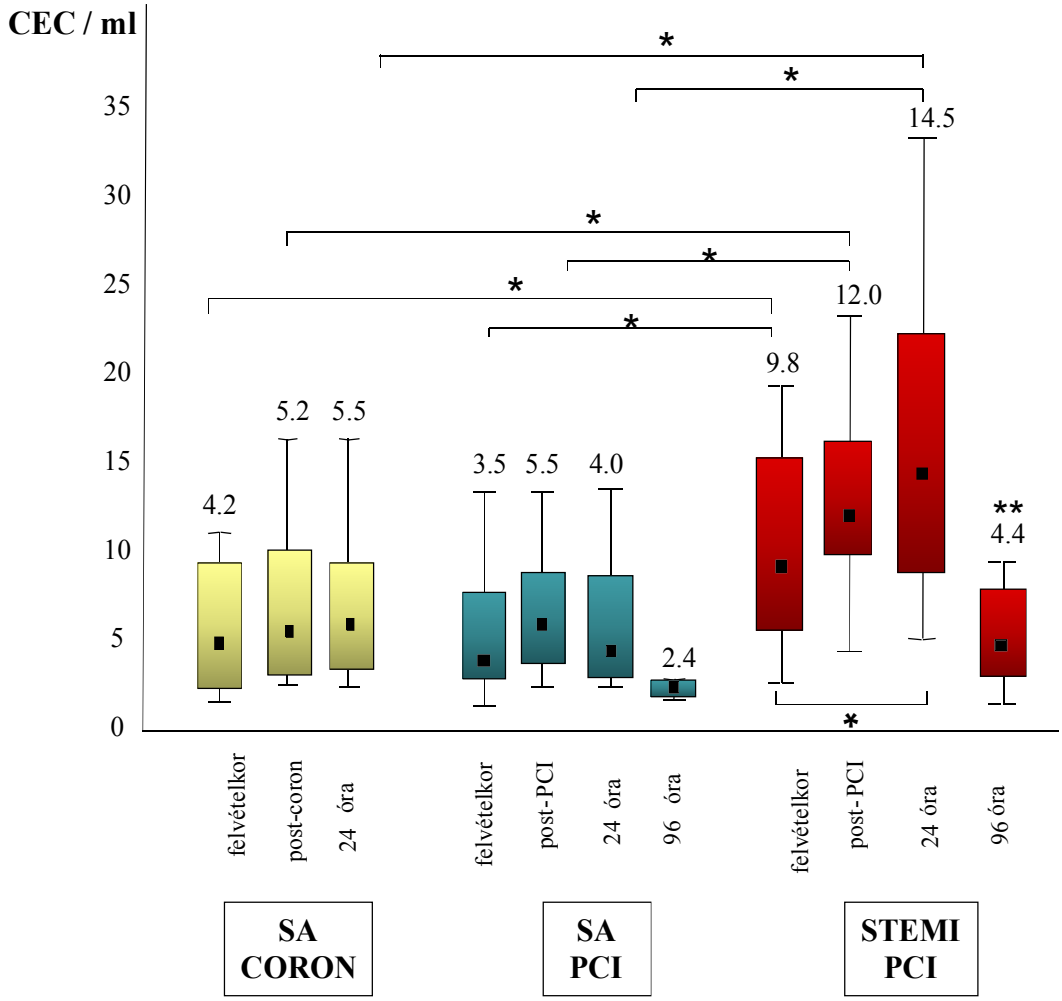
Rövidítések: *SD - standard deviáció, CK - kreatinkináz; LDH – laktátdehidrogenáz*
** p < 0.05 (STEMI csoporton belül) - a különbség szignifikáns*
 # p < 0.05 (STEMI és SA /PCI között, 24 órás értékek) - a különbség szignifikáns

5.2.2. Perkután koronária intervenció CEC számra gyakorolt hatása

A STEMI- ben szenvedő betegekben szignifikánsan magasabb CEC számot találtunk a stabil anginában szenvedő betegekhez képest (medián (M): 9.8/ml, interkvartilis terjedelem (IQR): 5.7-15.0/ml *vs*. SA/ PCI: M: 3.5/ml, IQR: 2,5- 7.3/ml, SA/ coron: M: 4.2/ml, IQR: 2.4-9.8/ ml, p=0.019) (8. ábra).

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a stabil anginás betegekben elvégzett koronarográfia, illetve az elektív PCI nem szignifikáns CEC szám emelkedést eredményezett (8. ábra). Ezzel szemben, a STEMI csoportban a PCI-t követően 24 órával szignifikáns CEC szám emelkedés (M: 14.5/ml, IQR: 8.0-21.5/ml, p=0.036) volt megfigyelhető (8. ábra).

A perkután koronária intervenciót követően 96 óra múlva CEC szám csökkenés volt tapasztalható, mely a STEMI betegek esetén szignifikáns (p< 0.01) volt (8. ábra).



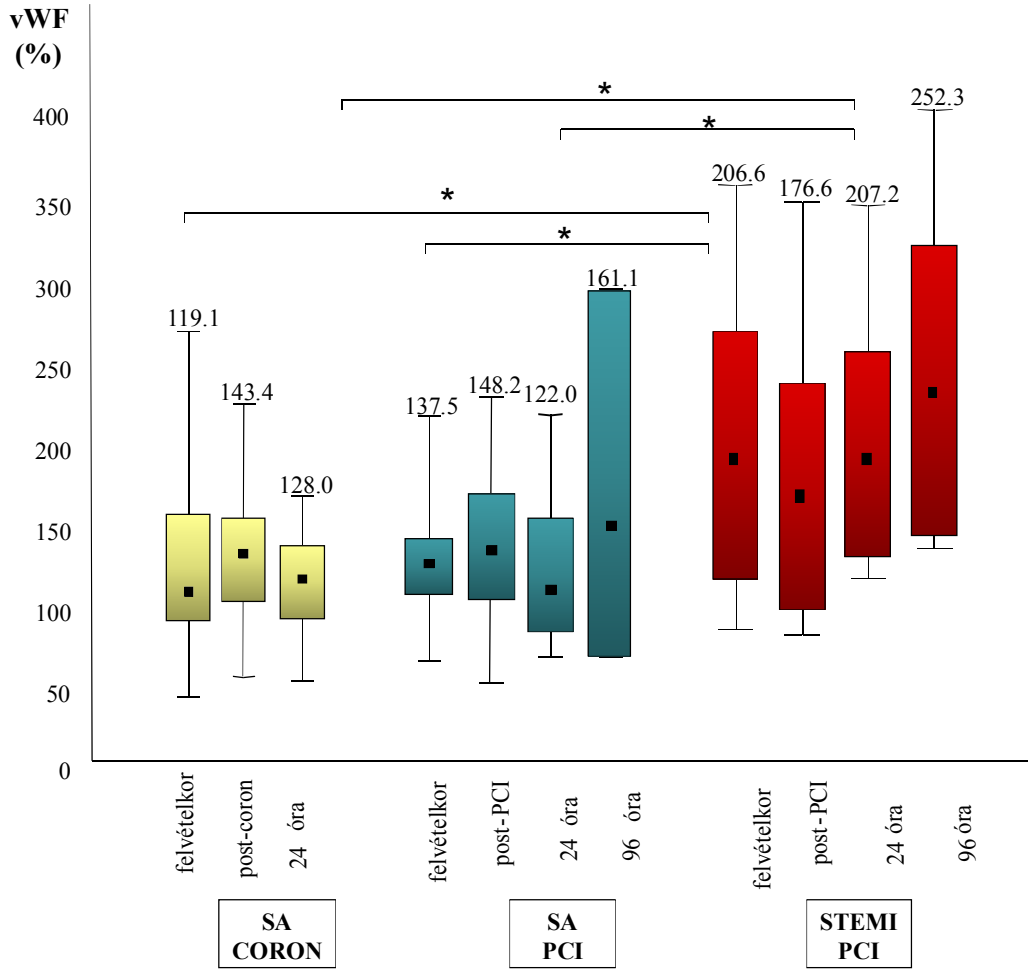
8. ábra: CEC szám időbeli változása stabil angina pectorisban, illetve STEMI-ben invazív koronária beavatkozást követően

* p< 0.05, ** p< 0.01 - a különbség szignifikáns

5.2.3. Perkután koronária intervenció vWF plazma szintre gyakorolt hatása

STEMI csoportban szignifikánsan magasabb felvételi vWF plazma szinteket találtunk a stabil anginás betegekhez képest (M: 206.6%, IQR: 128.3%-289.48% *vs*. SA/ PCI: M: 137.5 %, IQR: 117.8- 150.1 %, SA/ coron: M: 119.1 %, IQR: 100.1- 167 %,

p=0.046) (9. ábra). Az iszkémiás szívbetegség stabil formájában a koronarográfia, illetve az elektív PCI nem szignifikáns plazma vWF emelkedést eredményezett (9. ábra). STEMI csoportban közvetlenül a PCI után nem szignifikáns vWF szint csökkenés volt tapasztalható. A vonWillebrand faktor plazma szintje a perkután koronária intervencióban részesült akut és stabil betegekben a maximum értékeket a PCI-t követően 96 órával érte el (9. ábra).

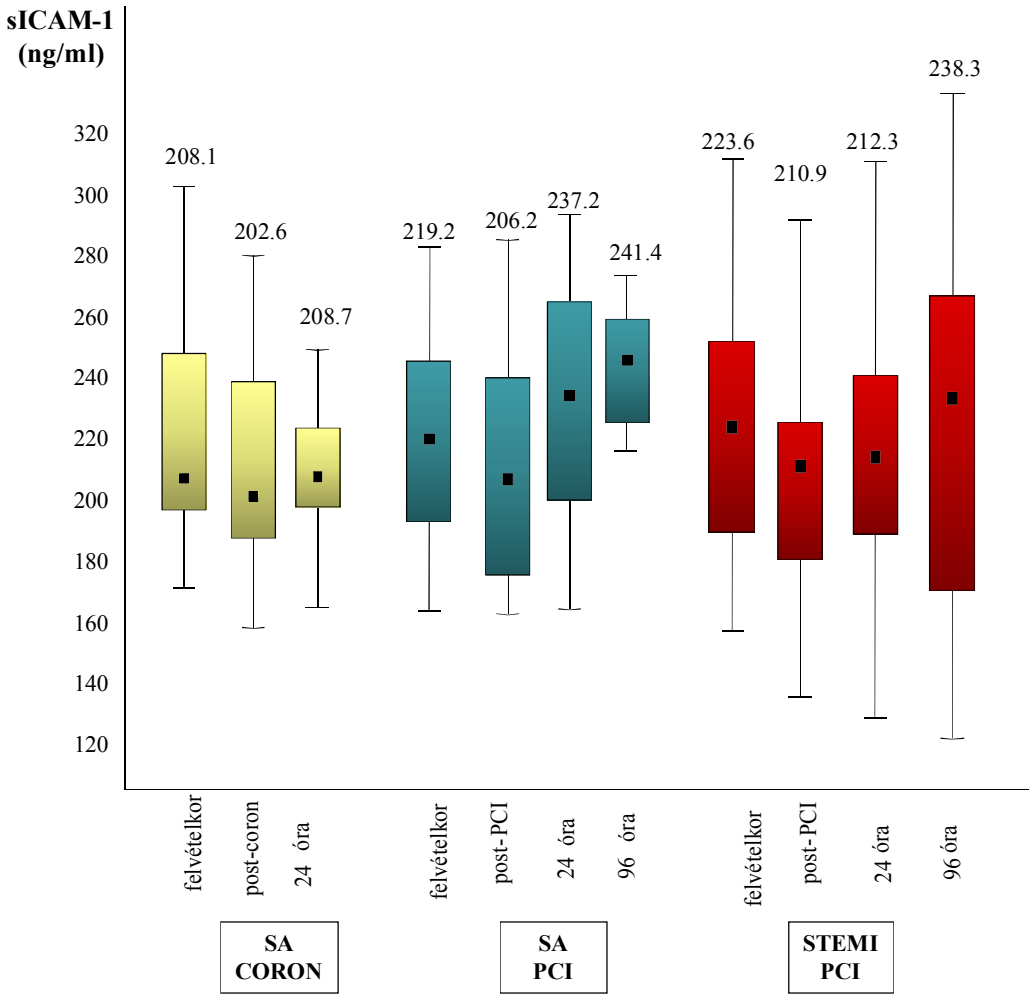


9. ábra: Plazma vWF időbeli változása stabil angina pectorisban, illetve STEMI-ben invazív koronária beavatkozást követően

** p< 0.05 - a különbség szignifikáns*

5.2.4. Perkután koronária intervenció sICAM-1 plazma szintre gyakorolt hatása

A felvételi sICAM-1 plazma szintek hasonlóak voltak STEMI-ben, illetve stabil angina pectorisban szenvedő betegekben (M: 223.6 ng/ml, IQR: 186.8-253.3 ng/ml *vs.* SA/ PCI: M: 219.2 ng/ml, IQR: 192.1-244.8 ng/ml, SA/ coron: M: 208.1 ng/ml, IQR:197.8-249 ng/ml, p>0.05). A perkután koronária intervenció, illetve az akut miokardiális iszkémia az sICAM-1 plazma szintekre nem gyakorolt szignifikáns hatást (10. ábra).



10. ábra: Plazma sICAM-1 időbeli változása stabil angina pectorisban, illetve STEMI-ben invazív koronária beavatkozást követően

5.2.5. Endothel és miokardiális sérülés közötti korreláció

A felvételi CEC szám STEMI-ben szenvedő betegek esetén szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a post- PCI, 24 órás és 96 órás CEC értékekkel ($r=0.91$, $r=0.63$, $r=0.63$, $p< 0.05$).

A stabil angina csoportban a felvételi CEC szám ugyancsak pozitívan korrelált a post-PCI és a 48 órás CEC számmal ($r=0.73$, $r=0.64$, $p< 0.05$).

A STEMI csoportban, szignifikáns pozitív korreláció volt kimutatható ($r= 0.51$, $p< 0.05$) a felvételi CKMB értékek és a 24 órás CEC szám között. Az CEC szám és a plazma vWF között szignifikáns korrelációt nem találtunk.

5.3. Endothelt befolyásoló tényezők elemzése iszkémiás szívbetegégben

5.3.1. Demográfiai adatok

A vizsgálati csoportot 80, angiográfiával igazolt szignifikáns koronáriaér betegségben szenvedő egyén alkotta. Felvételkor a betegek 25%-a aktív dohányos volt, 81.3% hipertóniaban, 36.3% 2. típusú diabetes mellitusban és 47.5% hiperlipidémiaban szenvedett. Harminc beteg (37.5 %) korábban PCI-ban részesült (átlag idő az utolsó PCI-tól 11.4 ± 5.7 hónap), 34 (42.5%) beteg anamnesiseben korábbi miokardiális infarktus szerepelt. A betegek korábbi gyógyszeres kezelését illetően, a betegek több mint 70 % -a ACE-gátlót, béta- blokkolót, sztatint, illetve aszpirint szedett. Emellett, a betegek 34 %-a a korábbi PCI és stent beültetés miatt minimum 1 hónapig clopidogrel kezelésben részesült (75 mg/ nap).

A vizsgált betegcsoport demográfiai adatait a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: Stabil angina betegcsoport demográfiai adatai

	Stabil angina pectoris (n=80)
Életkor, átlag ± SD, év	62.5 ± 9.4
Férfi / Nő, n (%)	50 (62.5%) / 30 (37.5%)
Body mass index, mean ± SD,(kg.m-$^{2)}$	27.4 ± 4.3
Kockázati tényezők	
Aktív dohányzó, n (%)	20 (25%)
Hypertonia, n (%)	65 (81.3%)
Diabetes mellitus, n (%)	29 (36.3%)
Hyperlipidaemia, n (%)	38 (47.5%)
Systoles vérnyomás (mmHg)	136 ± 18.1
Diastoles vérnyomás (mmHg)	83.2 ± 15.6
Triglicerid (mmol / L)	2.19 ± 1.1
Koleszterin (mmol / L)	4.74 ± 1.32
Glükóz (mmol / L)	5.72 ± 2.1
Korábbi PCI, n (%)	30 (37.5%)
Korábbi AMI, n (%)	34 (42.5%)
Korábbi CABG, n (%)	7 (8.7%)
ACI stenosis, n (%)	19 (23.7%)
Gyógyszeres kezelés felvételkor:	
Aszpirin, n (%)	67 (83.7%)
Clopidogrel, n (%)	27 (34%)
ACE- gátló, n (%)	61 (76.3%)
Béta- blokkoló, n (%)	64 (80%)
Kalcium csatorna blokkoló, n (%)	25 (31.2%)
Nitrát, n (%)	26 (32.5%)
Sztatin, n (%)	59 (73.7%)
PAD / inzulin, n (%)	17 (21.3%) / 6 (7.5%)
Coronarographia eredmények:	
Átlag coronaria ér stenosis szám/ beteg	2.49 ± 1.5
Átlag coronaria ér occlusio/ beteg	0.41 ± 0.8
CEC/ ml	4.8 (3.5 - 10.4)
sE- selectin (ng/ml)	1.35 (1.04 - 1.7)
sCD40L (pg/ml)	123.3 (88.8 – 198.8)
hsCRP (g/l)	3.76 (1.7 – 7.7)
IL-6 (pg/ml)	4.9 (1.4 – 4.5)

Az értékek átlag ± SD, illetve szám (n) és százalék (%) formájában vannak feltüntetve

Rövidítések: *SD - standard deviáció; AMI - akut miokardiális infarktus; PCI - perkután koronária intervenció.*

5.3.2. Keringő endothelsejtszám és a kardiovaszkuláris kockázati tényezők

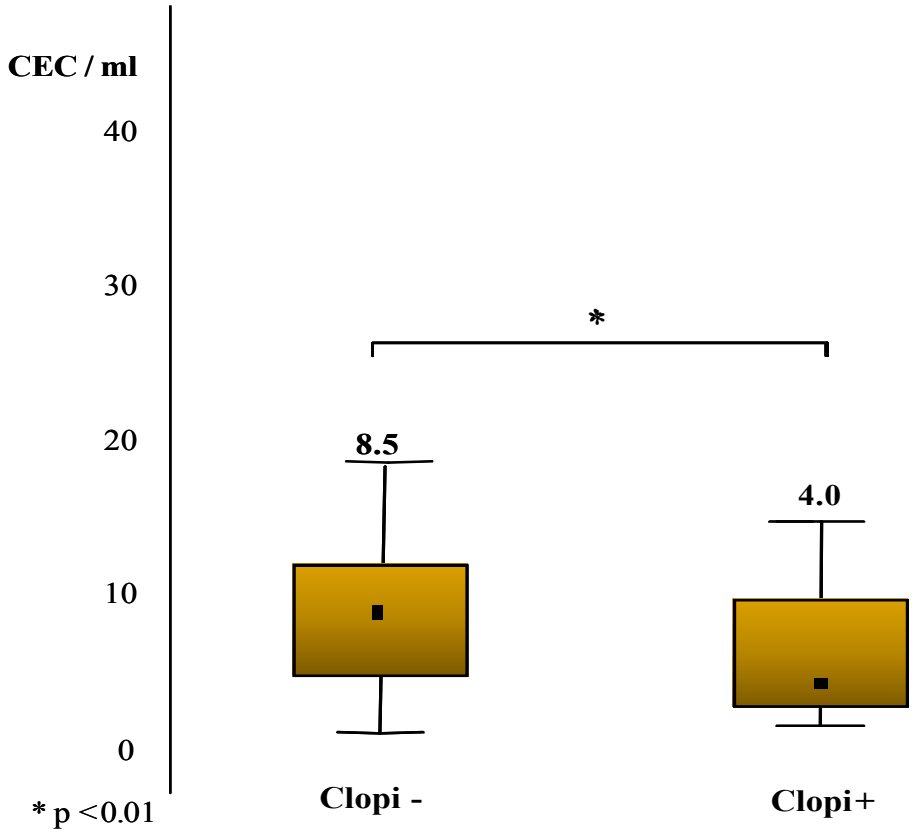
Az izolált keringő endothelsejtek száma a vizsgált betegpopulációban szignifikánsan magasabb volt az egészséges egyénekhez (n=18) képest (M: 4.8 / ml, IQR: 3.5- 10.4 / ml, *vs.* 1.6 / ml, IQR: 0 – 3.8 / ml, p = 0.036).

Páronkénti statisztikai összehasonlítás során (Mann-Whitney) az egyes kockázati tényezők CEC számra gyakorolt hatását vizsgálva hipertónia, 2. típusú diabetes mellitus, hiperlipidémia, illetve dohányzás esetén magasabb CEC számot találtunk, bár statisztikailag szignifikáns különbség nem volt kimutatható (hipertónia p= 0.26, 2. típusú diabetes mellitus p = 0.3, hiperlipidémia p= 0.8, aktív dohányzás p= 0.23). A felsorolt ismert rizikófatorokat általános regressziós modellbe építve a keringő endothelsejtszám tekintetében egyik sem bizonyult meghatározó tényezőnek.

5.3.3. Keringő endothelsejtszám és a kardiovaszkuláris terápia

A gyógyszeres kezelést illetően, az aszpirin (p = 0.64), az ACE - gátló (p = 0.81), a béta - blokkoló (p = 0.58), a kalcium antagonista (p = 0.52), a sztatin (p= 0.077) sem a nitrát (p= 0.42) nem gyakoroltak szignifikáns hatást a CEC számra.

Ezzel szemben, a korábban PCI - on átesett, clopidogrelt szedő betegek esetén (CLO+) szignifikánsan alacsonyabb CEC számot találtunk (M: 4.0/ ml, IQR: 2.5-9.5/ ml vs. M: 8.5 / ml, IQR: 4.5 - 11.6 / ml, p < 0.01) (11. ábra). Az egyéb befolyásoló faktorok (hipertónia, 2. típusú diabetes mellitus, ACE - gátló, kalcium antagonista, sztatin) hatásának kizárására többváltozós regressziós modelt készítettünk, mely során a felsorolt tényezők közül a clopidogrel szedése CEC számra gyakorolt hatása változatlanul szignifikáns maradt (beta (β): 0.269, p=0.026).



11. ábra: CEC szám clopidogrel szedő (+) , illetve nem szedő (-) betegekben

** p< 0.01 - a különbség szignifikáns*

A CLO+ csoportot a clopidogrel szedés időtartalma alapján tovább osztva (< 6 hónap és 6-12 hónap), a clopidogrelt 6 hónapnál tovább szedő betegekben alacsonyabb CEC szám volt tapasztalható (*< 6 hónap* M: 4.0, IQR: 2.6 – 14 / ml, n= 16*, > 6 hónap* M: 2.7, IQR: 2.16 – 8.0/ ml, n = 11, p= 0.369).

Clopidogrelt szedő (CLO+) és nem szedő (CLO-) betegek karakterisztikája a 5. táblázatban van feltüntetve. A CLO+ csoportban alacsonyabb CD40L plazma szinteket találtunk a CLO- csoporthoz képest (M: 110. 6 pg / ml, IQR: 81. 0 – 148. 5 pg / ml vs. M: 150. 5 pg /ml, IQR: 100. 2 – 231. 8 pg / ml, p = 0.12).

5. tábl.: Clopidogrel szedő és nem szedő betegcsoport karakterisztikája

	CLO + (n=27)	CLO - (n=53)	p
Életkor, évek (átlag ± SD)	59.8 ± 8.8	62.4 ± 10.3	0.35
BMI, átlag± SD, (kg.m2)	29.4 ± 3.5	27.8 ± 4.4	0.23
Dohányzás, n (%)	7 (26)	13 (24,5)	0.91
Hypertonia, n (%)	22 (81.5)	43 (81.1)	0.94
Hyperlipidaemia, n (%)	13 (48.1)	25 (47.2)	0.96
Diabetes mellitus, n (%)	9 (33.3)	20 (37.7)	0.79
Systoles vérnyomás érték, átlag ± SD (Hgmm)	135.8± 15.4	137.8 ± 16.2	0.67
Diastoles vérnyomás érték, átlag ± SD (Hgmm)	82.4 ± 9.7	83.6± 13.5	0.8
Koleszterin (mmol/l)	4.4± 1.39	4.9 ± 1.3	0.38
Triglicerid (mmol/l)	1.58 ± 0.64	2.23 ± 2.2	0.27
Vércukor (mmol/l)	5.9 ± 2.2	5.6 ± 1.72	0.92
Aszpirin, n(%)	26 (96.3)	41 (77.3)	0.52
ACE-gátló, n(%)	23 (85.2)	38 (71.6)	0.62
Béta- blokkoló, n(%)	24 (88.9)	40 (75.5)	0.66
Kalcium- csatorna antagonista, n(%)	6 (22.2)	19 (35.9)	0.36
Nitrát, n(%)	12 (44.4)	14 (26.4)	0.25
Sztatin, n(%)	24 (88.8)	35 (66)	0.41
CEC / ml	4.0 (2.5-9.5)	8.5. (4.5-11.6)	**< 0.01**
sCD40L (pg/ ml)	110.6 (81 – 148.5)	150.5 (100.2 – 231.8)	0.12
sE-selectin (ng/ml)	1.36 (0.89 – 1.87)	1.34 (1.1 – 1.7)	0.51
sIL-6 (pg/ml)	3.46 (1.49 – 4.52)	2.15 (1.5 – 4.8)	0.64
hsCRP (g/l)	4.95 (1.06 – 7.69)	3.9 (2.3 – 12.1)	0.65

Az értékek átlag ± SD, illetve szám (n) és százalék (%) formájában vannak feltüntetve

Rövidítések: *SD - standard deviáció; AMI - akut miokardiális infarktus; PCI - perkután koronária intervenció*

* $p < 0.05$

5.3.4. CEC szám és az egyéb endotheliális és gyulladásos paraméterek

A CEC szám, valamint a sE- szelektin, a sCD40L, illetve a gyulladásos paraméterek között nem találtunk szignifikáns korrelációt. Ahogyan az várható, pozitív korreláció volt kimutatható a hsCRP és az IL-6 plazma értékek között ($r = 0.815$, $p < 0.05$).

5.4. Oxidatív stressz és az oxidatív DNS károsodás elemzése perkután koronária intervención átesett akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben

5.4.1. Demográfiai adatok

Az ismert kardiovaszkuláris kockázati tényezők - hipertónia, 2. típusú diabetes mellitus, hiperlipidémia, aktív dohányzás - előfordulása tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között (lásd 6. tábl.).

Átlag koronáriaér szűkület/beteg számban nem volt szignifikáns különbség. A STEMI csoportban szignifikánsan több koronáriaér okklúzió/beteg volt megfigyelhető (STEMI: 1.06 ± 0.1, *vs.* SA/ PCI: 0.11 ± 0.21, SA/coron: 0.6 ± 0.24, $p< 0.05$). A PCI során behelyezett stentek átlaga (STEMI: 1.53 ± 0.27, vs. SA/ PCI: 1.33 ±0.26, p= 0.28) mindkét csoportban hasonló volt (lásd 6. tábl.).

6. táblázat: A vizsgált betegcsoportok demográfiai adatai

	Akut STEMI	**Koronarográfia**	**Elektív PCI**
n	15	6	9
Életkor, év (átlag ± SD)	68.13 ± 2.93	57.0 ± 2.47	61.22 ± 3.6
Nem, férfi/nő (n)	9/6	2/4	5/4
BMI, kg/m^2 (átlag ± SD)	28.11 ± 0.86	30.83 ± 1.32	30.3 ± 1.28
Kockázati tényezők			
Családi anamnézis (ISZB), n (%)	6 (40)	4 (66)	4 (66)
Aktív dohányzás, n (%)	7 (46.7)	5 (83)	9 (100)
Hipertónia, n (%)	15 (100)	4 (66)	7 (77)
Diabetes mellitus, n (%)	5 (33)	2 (33)	4 (44)
Angina 1–6 napon belül, n (%)	4 (26.7)	4 (66)	6 (66)
Korábbi PCI , n (%)	0	1 (16)	8 (88)
Esemény – ballon idő [a]			
<3 h, n (%)	3 (20)		
3–6 h, n (%)	8 (53.3)		

	Akut STEMI	Koronarográfia	Elektív PCI
>6 h, n (%)	4 (26.6)		
Koronarográfia eredményei			
LM sztenózis/okklúzió, n (%)	3/0	1/0	1/0
LAD sztenózis/okklúzió, n (%)	9/4	3/1	7/1
RCA sztenózis/okklúzió, n (%)	2/10	2/2	6/0
LCx sztenózis/okklúzió, n (%)	8/1	2/0	2/0
R. diagonalis sztenózis/okklúzió, n (%)	6/0	1/0	2/0
RRV sztenózis/okklúzió	1/1	0/0	0/0
OM sztenózis/okklúzió	6/0	0/0	1/0
Koronária sztenózisok száma/beteg (átlag ± SD)	2.27 ± 0.32	1.8 ± 0.58	2.11 ± 0.2
Koronária okklúzió száma/ beteg (átlag ± SD)	1.06 ± 0.1*	0.6 ± 0.24	0.11
Impl. stentek száma/ beteg (átlag ± SD)	1.53 ± 0.27	—	1.33 ± 0.26
Komplikációk, n, (%)			
Pitvari flutter/fibrilláció	2 (13.3)	—	—
VT/ VF (átlag ± SD)	4 (26.6)	—	—
AV blokk	3 (20)	—	—
Ideiglenes PM terápia	2 (13.3)	—	—
Kardiogén sokk	3 (20)	—	—
IABP	2 (13.3)	—	—
Gasztrointesztinális/femorális vérzés	4 (26.6)	—	—
Exitus	2 (13.3)	—	—

Az értékek átlag ± SD, illetve szám (n), százalék (%) formájában vannak feltüntetve.

** p< 0.0.5*

[a] *A mellkasi fájdalom kezdete és a PCI között eltelt idő*

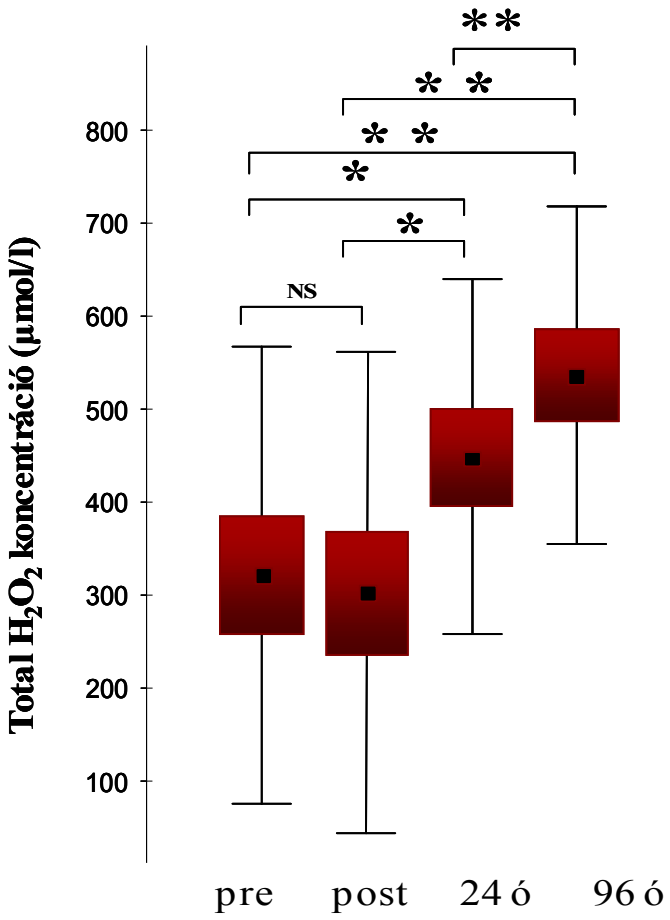
Rövidítések *PCI – perkután koronária intervenció; LM- főtörzs; LAD – ramus descendens anterior; RCA – jobb koronáriaér, LCx – bal circumflexa, ; RRV – jobb*

retroventricularis ág; OM, obtus marginalis; TIMI, thrombolysis in myocardial infarction; IABP, intraaortikus ballon pumpa, PM – pacemaker, VT/ VF- kamrai tachykardia/ kamrafibrilláció.

5.4.2. Az oxidatív stressz mértékének meghatározása plazma hidrogénperoxid szint elemzésével perkután koronária intervenció után

A felvételi hidrogénperoxid szint stabil angina és STEMI csoport között nem különbözött szignifikánsan (416±64 μM/l vs. 332.8 ± 52 μM/l, p= 0.21). A STEMI csoportban, közvetelenül a PCI után nem találtunk plazma hidrogénperoxid szint emelkedést; ellenben szignifikáns ($p< 0.05$) hidrogénperoxid szint emelkedés a reperfúziót követően 24, és 96 óra múlva volt megfigyelhető (12. ábra).

Stabil angina pectorisban a hidrogénperoxid plazma szintje közvetlenül a koronarográfia (pre: 420 ± 90 μM/l vs. post: 431 ± 104 μM/l, p=0.32), illetve az elektív PCI után (pre: 381 ± 70 μM/l vs. post: 372 ± 82 μM/l, p= 0.43) nem mutatott változást.

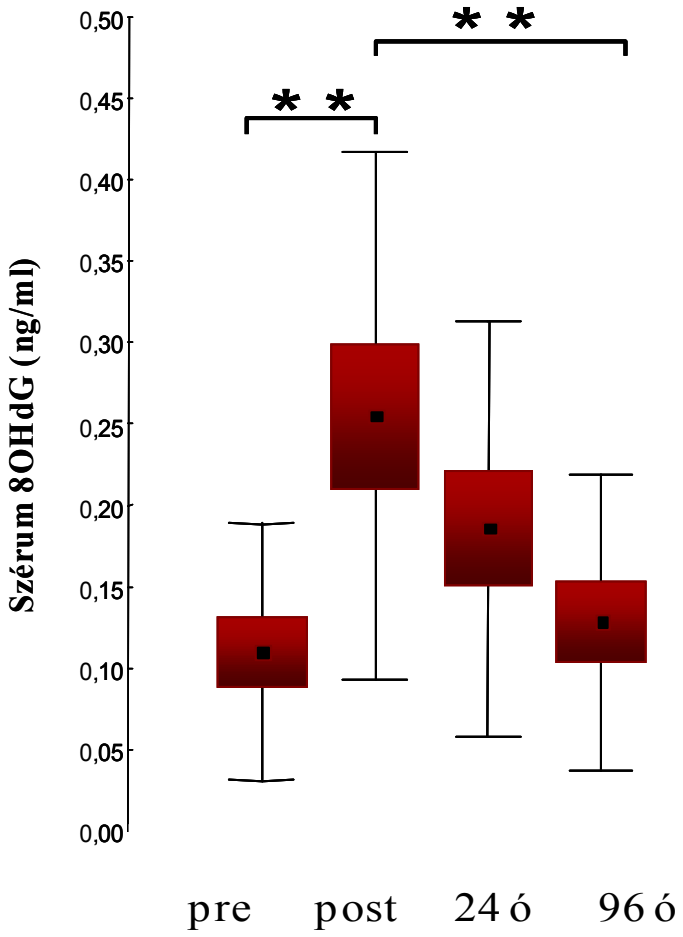


12. ábra: Hidrogénperoxid plazma szintjének időbeli változása STEMI-ben szenvedő betegekben perkután koronária intervenciót követően * p< 0.05, ** p< 0.005 - a különbség szignifikáns.

5.4.3. Az oxidatív stressz okozta DNS károsodás elemzése perkután koronária intervenciót követően a szérum 8OHdG szint követésével

Felvételi 8OHdG szintje a STEMI betegekben (0.132 ± 0.02 ng/ml) nem különbözött szignifikánsan a stabil angina csoportban (0.183 ± 0.05 ng/ ml) mért értékektől.
STEMI-ben végzett PCI-t követően szignifikáns szérum 8OHdG szint emelkedést figyeltünk meg közvetlenül a beavatkozás után (p< 0.005), majd 24 és 96 óra múlva szignifikáns csökkenés volt tapasztalható (p<0.005) (13. ábra). Stabil angina

pectorisban elvégzett koronarográfia (0.153 ± 0.031 ng/ ml vs. 0.12 ± 0.022 ng/ ml, p= 0.45), illetve az elektív PCI (0.21 ± 0.041 ng/ ml vs. 0.16 ± 0.023 ng/ ml, p= 0.38) nem befolyásolta a 8OHdG szérum szinteket.



13. ábra: 8OHdG szérum szintjének időbeli változása STEMI-ben szenvedő betegekben perkután koronária intervenciót követően

* p< 0.05, ** p< 0.005 - a különbség szignifikáns

6. Megbeszélés

6.1. Invazív koronária beavatkozás endothelre gyakorolt hatásai iszkémiás szívbetegség stabil, illetve akut formájában

6.1.1. Endotheliális paraméterek kiindulási értékei iszkémiás szívbetegség stabil és akut formájában

Keringő endothelsejtszám

Számos korábbi vizsgálat igazolta a koronária ateroszklerózis hátterében álló lassú gyulladásos folyamat jelenlétét (Libby 2002, Falk 2006) (*lásd 2. fejezet*). Az egyes gyulladásos sejtes elemek (monociták, makrofágok, T-limfociták) mellett *az endothel* szerepe sem elhanyagolható, ugyanis az endothel diszfunkció, illetve az endothel integritás elvesztése következményes aterotrombotikus komplikációk (akut koronária szindróma) képében jelentkezhet. Következőképpen, az endothel sérülés mértékének direkt markerekkel történő meghatározása elsősorban a betegek további kardiovaszkuláris kockázatát tekintve klinikai jelentőséggel bír.

Az utóbbi évek során az érfalról levált, perifériás vérből izolálható endothelsejtek - mint az endothel sérülés direkt markerei – kerültek előtérbe. Egészséges egyénekben 0-2 endothelsejt található 1 ml vérben (Erdbruegger és mtsai. 2006, Boos és mtsai. 2006) (*lásd 2.3. fejezet*). Vizsgálataink során stabil angina pectorisban a beteg felvételekor szignifikánsan magasabb CEC számot figyeltünk meg az egészséges egyénekhez képest. A CEC szám emelkedés hátterében az ismert kardiovaszkuláris kockázati tényezők hatására létrejövő szisztémás endothel károsodás állhat. Ezt alátámasztja, hogy vizsgálatainkban nem szignifikánsan emelkedett endothel sejtszámot találtunk hipertóniában, 2. típusú diabetes mellitusban, hiperlipidémiában szenvedő, illetve aktívan dohányzó betegekben. A fenti összefüggés egyértelmű bizonyításához azonban a jövőben nagyobb esetszámú tanulmányok szükségesek.

Akut ST - elevációval járó (teljes koszorúér okklúzió esetén) miokardiális infarktusban szenvedő betegekben - a korábbi irodalmi adatokhoz hasonlóan (Mutin és mtsai. 1999, Lee és mtsai. 2005, *lásd 2. fejezet*) - szignifikánsan magasabb felvételi CEC számot találtunk a stabil angina csoporthoz képest. Feltételezhető, hogy az akut

miokardiális iszkémia során létrejött szignifikáns CEC szám emelkedés hátterében lokális, illetve szisztémás endothel károsodás állhat. Míg a lokális, koszorúérben történt endothelsejt leválás plakk ruptúra következményeként jöhet létre, addig a szisztémás endothel sérülés kilakulásáért a fokozott gyulladásos és aterotrombotikus folyamatok tehetők felelőssé.

A fenti megfigyelések klinikai relevanciával bírnak, ugyanis a keringő endothel sejtszám nem csak az endothel sérülés jelenlétét, hanem annak súlyosságát is jelzi. Magas CEC szám kedvezőtlen kardiovaszkuláris prognosztikai tényezőként szerepelhet, mivel jelentős endothel sérülés esetén a későbbi trombotikus komplikációk (akut, illetve subakut stent trombózis elsősorban DES beültetés után) előfordulásának kockázata fokozott lehet. Az utóbbira akut miokardiális infarktust elszenvedett betegpopulációt elemezve a jelenleg zajló klinikai vizsgálatban keressük a választ.

Plazma VonWillebrand faktor

A vonWillebrand factor (vWF) a trombociták felszínén található GPIb és GPIIb/IIIa receptor extracelluláris mátrixhoz (kollagén) történő adhéziót biztosítja (Lip és mtsai. 1997, Spiel és mtsai. 2008). Mivel igazolták, hogy a plazmában található vWF faktor predominánsan endothelsejt eredetű, számos vizsgálatban endothel diszfunkció/ ill. károsodás markereként használták fel. Hasonlóan a saját eredményeinkhez, korábbi irodalmi adatok szerint a vWF plazma szintje az iszkémiás szívbetegség különböző formáiban emelkedett (Rumley és mtsai. 1999, Morange és mtsai. 2004, Spiel és mtsai. 2008).

Vizsgálatunk során a stabil angina csoporthoz képest szignifikánsan magasabb vWF plazma szinteket találtunk STEMI-ben szenvedő betegekben. Ez is arra utal, hogy az akut miokardiális iszkémia során endothel sérülés jön létre, mely a magas CEC szám mellett a vWF szint emelkedésével jól követhető. Magas vWF plazma szint elsősorban akut miokardiális infarktuson átesett betegek esetén nagyobb kardiovaszkuláris kockázatot és rosszabb prognózist jelent (Sakai és mtsai. 2000).

Plazma sICAM- 1

A leukociták endothelhez történő adhéziója és transmigrációja - melyet az aktivált, diszfunkcionális endothelsejteken fokozottan expresszált adhéziós molekulák biztosítják - már az ateroszklerózis korai stádiumában megfigyelhető. Az intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) az ateroszklerózisban résztvevő számos sejt felszínén megtalálható, szolubilis formában a plazmában van jelen. Korábban publikált vizsgálatok során emelkedett sICAM-1 szinteket írtak le iszkémiás szívbetegségben, az eredmények azonban nem konzisztensek. Míg Zeitler és munkacsoportja stabil angina pectorisban emelkedett sICAM-1 értékeket talált (Zeitler és mtsai. 1997), addig mások (Rifai és mtsai. 1999, Saku és mtsai. 1999) az egészséges egyénekhez képest nem észleltek szignifikáns különbséget. Hasonlóképp, egymástól eltérő megfigyeléseket tettek akut koronária szindrómában szenvedő betegekben. Néhány korábbi vizsgálatban szignifikáns sICAM-1 emelkedést figyeltek az iszkémiás szívbetegség akut formáiban (Kaikita és mtsi. 1997, Ogawa és mtsi. 1999), mások azonban nem találtak eltérést instabil és stabil koronáriabetegség között (Haught és mtsi. 1996).

Jelen vizsgálatainkban a stabil angina pectoris és az akut koronária szindróma között az sICAM-1 plazma szintek között nem találtunk szignifikáns különbséget. Ez a megfigyelést azt jelentheti, hogy az sICAM-1 plazma szintje elsősorban az endothel krónikus aktivációját és az ateroszklerotikus folymatok jelenlétét jelzi.

6.1.2. Endotheliális markerek kinetikája stabil angina pectorisban invazív koronária beavatkozást követően

CEC szám

Számos klinikai vizsgálat számolt be az invazív koronária intervenciót követő szisztémás gyulladásos válasz jelenlétéről, mely egyes gyulladásos fehérjék (CRP, IL-6) és egyéb szolubilis molekulák (MCP-1) emelkedésével jár (Goldberg és mtsai. 2003, Rebeiz és mtsai. 2009). Mindemellett, a koronarográfia endothelre gyakorolt direkt hatása kevésbé volt ismert. A legtöbb keringő endothelsejtszámot elemző vizsgálatokból ugyanis a koronária intervenciót igénylő iszkémiás szívbeteget kizárták

(Mutin és mtsai. 1999), arra hivatkozva, hogy az invazív beavatkozás (mechanikus manipuláció, illetve kontrasztanyag hatása révén) eleve nagymértékű endothel sérülést és következményes endothelsejt leválást okozhat (Georg és mtsai. 1992). Mivel a PCI direkt endothelre gyakorolt hatása nem volt tisztázott, vizsgálataink nagyobb részében ezen kérdés megválaszolására törekedtünk.

A korábbi elképzelésekkel ellentétben, vizsgálatunk során sem a koronarográfia, sem a stent beültetéssel járó perkután koronária intervenció nem okozott szignifikáns keringő endothelsejtszám emelkedést. Így a fentiek alapján elmondható, hogy a koronária manipulációk endothelre gyakorolt szisztémás hatása csekély.

Boos és mtsai. 2007 decemberében (már a jelen disszertációban szereplő eredmények elfogadását követően) szintén közölték a perkután koronária stent beültetés endothelre gyakorolt hatását stabil angina pectorisban. Eredményeik alapján a koronarográfia nem gyakorolt szignifikáns hatást az endotheliális markerekre (CEC szám, vWF, sE-selectin). Ezzel szemben PCI után 15 perccel, illetve 24 órával szignifikanciát elérő CEC, vWF és sE-selectin emelkedést figyeltek meg. Habár az esetszám és a talált sejtszámok hasonlóak, a különböző eredmények hátterében eltérő statisztikai módszer használata állhat, ugyanis a szerzők parametrikus páros t-tesztet használtak.

vWF

Az irodalmi adatokkal egyetértésben, a CEC számhoz hasonlóan a vWF szint nem szignifikáns emelkedést mutatott mind koronarográfia, mind PCI után.

sICAM-1 szintek

Érdekes módon, a sICAM-1 plazma szintje a koronarográfiát, illetve a PCI-t követően csökkenő tendenciát mutatott. A jelenség hátterében az ICAM-1felhasználása állhat.

6.1.3. Endotheliális markerek kinetikája heveny miokardiális infarktusban invazív koronária beavatkozást követően

CEC szám

Heveny miokardiális infarktus során az okkludált koszorúér rekanalizációt követő reperfúziós folyamatok endothel károsodást okozhatnak (Moens és mtsai. 2005). Korábban *trombolízissel kezelt* akut koronáriaér betegeket vizsgálva szignifikánsan emelkedett CEC számot írtak le, mely az akut eseményt követő 24 óra múlva érte el a maximumot, majd 96 óra múlva csökkent (Mutin és mtsai. 1999). Lee és mtsai. akut koronária szindróma során ugyancsak szignifikánsan magasabb CEC számot, vWF és IL-6 plazma szinteket figyeltek meg a beteg felvételekor, valamint ezt követően 48 óra múlva. Fontos megjegyeznük, hogy a vizsgálatban olyan betegek vettek részt, akiknél a PCI-ra csak 48 óra elteltével, a vérvétel után került sor (Lee és mtsai. 2006).

Mivel napjainkban az akut miokardiális infarktus kezelésében az invazív koronária beavatkozás a választandó terápia, elsődleges célunk az endothel sérülés kinetikájának és mértékének meghatározása volt STEMI-ben szenvedő PCI-ban részesülő betegekben. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy közvetlenül a PCI után a CEC szám emelkedik, a szignifikáns maximumot a beavatkozást követően 24 óra múlva éri el, majd a negyedik napon csökkenés tapasztalható. Ennek hátterében a koronária intervenció hatása mellett a plakk ruptúra és a miokardiális iszkémiához, majd reperfúzióhoz társuló szisztémás folyamatok állhatnak. Ismert ugyanis, hogy STEMI-ben komplex oxidatív és akut gyulladásos folyamatok zajlanak, melyek az endothelre károsító hatást fejtenek ki. Ezt igazolhatja a saját megfigyelésünk, miszerint már a kiindulási endothelsejtszám is STEMI-ben szenvedő betegekben szignifikánsan magasabb a stabil angina csoporthoz képest. Másrészt, a beavatkozást követően a CEC szám tovább emelkedik és a maximumot 24 óra múlva éri el. Végül, egy korábbi vizsgálat (Mutin és mtsai. 1999) is alátámasztja elképzelésünket, ugyanis hasonló CEC kinetikát írtak le fibrinolízissel kezelt miokardiális infarktusban szenvedő betegekben.

Mindezek mellett, a trombolízissel kezelt, illetve csak koronarográfian átesett akut miokardiális infarktusban szenvedő betegek vizsgálata további segítséget nyújthat a PCI endothelre gyakorolt direkt hatásának elemzésében.

von Willebrand faktor

A legtöbb irodalmi adat szerint a von Willebrand faktor plazma szintje akut koronária szindrómában szignifikánsan emelkedik, jelezve az akut aterotrombotikus esemény jelenlétét (Sakai és mtsai. 2000, Spiel és mtsai. 2008). Korábbi vizsgálatok kiderítették, hogy a vWF plazma szintje az alkalmazott kezeléstől -trombolízis/ vagy perkután koronária intervenció - függően STEMI betegek esetén eltérő időbeli változást mutat. Míg a trombolízissel kezelt betegekben a vWF plazma szintje gyakorlatilag nem változik a kiinduló értékekhez képest, addig a „rescue" PCI - on (trombolízis, majd PCI) átesett betegek esetén a vWF szintje szignifikánsan emelkedik és a maximum értékeket az ötödik napon éri el (Soskin és mtsai. 1994). Egy korábbi vizsgálat során primer perkután koronária intervención átesett akut koronária szindromás betegeket elemezve a vWF plazma szintje a maximum értékeket 72 - 96 óra múlva érte el (Sakai és mtsai. 2000).

Általunk elvégzett vizsgálatban a vWF plazma szintje a fentiekhez hasonló kinetikát mutatott, ugyanakkor a STEMI betegekben közvetlenül a perkután koronária intervenció után vWF csökkenést tapasztaltunk. A megfigyelésünk hátterében az endothel sérülés helyén (plakk ruptúra, PCI okozta sérülés) kialakult egyidejű trombocita aktivációból, és trombus képződésből adódó rapid vWF kiáramlás és felhasználás állhat. Ezen feltételezést a korábban közölt adatok megerősítik, melyek szerint a koronária trombus miokardiális infarktusban szenvedő betegekben fibrin, trombocita és szöveti faktor mellett nagy mennyiségű von Willebrand faktort tartalmaz (Yamashita és mtsai. 2006).

sICAM-1

Az sICAM-1 szintek a stabil anginában is megfigyelt kinetikát és hasonló értékeket mutattak, jelezve, hogy ez a paraméter nem érzékeny markere a zajló akut atherotrombotikus folyamatoknak.

6.1.4. Az endothel sérülés és a miokardiális nekrózis kiterjedésének mértéke közötti összefüggés elemzése

Vizsgálatunk során STEMI betegeket elemezve a felvételi CKMB és a 24 órás CEC értékek között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk.

Megfigyelésünk alapján, az okkludált koszorúér mielőbbi rekanalizációja döntő fontosságú az iszkémiás és a reperfúziós károsodás következményeinek csökkentésére a miokardium és az endothel esetében egyaránt. Napjainkban a sztatinok, a béta-blokkolók, és az ACE - gátlók korai bevezetése mellett új terápiás lehetőségek nyílhatnak meg pl. reperfúziós károsodásért felelős poly-ADP-ribose-polymerase-1 enzim farmakológiai gátlásával (Moens és mtsai. 2005).

6.2. A gyógyszeres kezelés CEC számra és egyéb markerekre gyakorolt hatása iszkémiás szívbetegség stabil formájában

A megfelelő személyre szabott „tailored" farmakoterápia mérsékelheti az ateroszklerotikus folyamatok progresszióját. Számos experimentális és klinikai vizsgálat felvetette a sztatinok, az ACE-gátlók és a kalcium antagonisták antiateroszklerotikus hatását. Az ACE-gátló, illetve a kalcium - antagonista kezelés hatására jelentősen javul az áramlás okozta vazodilatáció, csökkent az adhéziós molekulák, a gyulladásos fehérjék plazma szintje és az oxidatív stressz mértéke. Atorvastatin, illetve rosuvastatin adása mellett elvégzett intravascularis ultrahang vizsgálatok során szignifikáns ateroszklerotikus plakk regressziót dokumentáltak (Karha 2005, Hirajama és mtsai 2009). Vizsgálatainkban az aszpirin, az ACE -gátló, a béta-blokkoló, a kalcium antagonista, a nitrát, illetve a sztatin szedése nem gyakoroltak szignifikáns hatást a CEC számra. Érdekes azon megfigyelésünk, miszerint a korábban perkután koronária intervencióban részesült, clopidogrellel kezelt betegekben szignifikánsan alacsonyabb CEC számot találtunk.

A clopidogrel, mint hatékony trombocita aggregáció gátló a vérlemezke felszínén található $P2Y_{12}$ ADP receptor antagonistája. Antitrombocita hatása miatt elsősorban perkután koronária intervenciót követően alkalmazzák stent-trombózis megelőzése céljából. Iszkémiás szívbetegekben elvégzett klinikai vizsgálatok emellett kimutatták, hogy a clopidogrel az áramlás - mediálta vazodilatáció mértékét jelentős mértékben képes javítani (Heitzer és mtsai. 2006, Warnholtz és mtsai. 2007).

Mai napig sem tisztázott azon pontos mechanizmus, mely által a clopidogrel befolyásolhatja az endothel funkciót. Az endothelsejteken *in vivo* a $P2Y_{12}$ receptor jelenlétét fiziológiás körülmények között nem sikerült igazolni, bár két korábbi *in vitro* vizsgálat a patkány agy kapillárisain lévő $P2Y_{12}$ receptor jelenlétéről, illetve a koronária endothel sejtkultúrákon megfigyelt nikotin- indukálta $P2Y_{12}$ receptor expresszióról számolt be (Simon és mtsai. 2002, Shanker és mtsai. 2006). A receptor gátlása ezért feltehetően endothel protektív lehet.

A clopidogrel feltételezett kedvező endotheliális hatása mögött áttételesen, a trombocitákon lévő $P2Y_{12}$ receptor gátlása is állhat. Ismert, hogy a trombocita aktiváció során számos olyan endothelre negatív hatással bíró molekula szabadul fel a

vérlemezkékből, mint pl. a CD40L (Henn és mtsai. 1998). Az utóbbi években a CD40L került előtérbe mint az ateroszklerotikus folyamatok központi regulátora. Számos sejtes elem termeli (leukociták, fibroblasztok), azonban a legnagyobb pool a trombocitákban található. A CD40L az endothelsejtekre negatív hatást fejt ki, ugyanis növelheti az E-szelektin, az ICAM-1 és a VCAM-1 expresszióját és késleltetheti a reendothelizációs folyamatokat (Urbich és mtsai. 2002, Urbich 2004). Eddig publikált tudományos eredmények alapján a clopidogrel jelentős mértékben csökkentette a CD40L expresszióját és ezáltal az endothelsejtek aktivációját (Yipp és mtsai 2006, Azar és mtsai. 2006, Hermann és mtsai. 2001). Vizsgálataink során ezzel egyezően azt találtuk, hogy a clopidogrelt szedő betegekben alacsonyabb CD40L plazma szint figyelhető meg. A clopidogrel sCD40L szintet csökkentő hatása fontos lehet az ateroszklerotikus folyamat lassítása/modulálása révén is.

Vizsgálatunk során a keringő endothel sejtszám mellett párhuzamosan CD40L, E-szelektin, CRP, és IL-6 került meghatározásra, ezek CEC számra gyakorolt hatásában azonban összefüggést nem tudtunk kimutatni.

A clopidogrel feltételezett endothel protektív hatása klinikai jelentőséggel bírhat, elsősorban gyógyszer kibocsátó koronária stent beültetésen átesett betegek esetében. Mivel a stentből felszabaduló anyagok késleltetik a reendothelizációt, a clopidogrel kettős hatása -trombocita gátlás és ezzel párhuzamosan endothel protekció – különösen kedvező lehetne.

6.3. Oxidatív stressz és DNS károsodás elemzése perkután koronária intervención átesett akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben

Az iszkémiás miokardiumban történő áramlás mielőbbi helyreállítása döntő a további iszkémiás károsodás megelőzésében. Korábbi, elsősorban *in vitro* elvégzett kutatások, illetve állatkísérletek eredményei igazolták, hogy a keringés helyreállítását követően további miokardiális/ és endotheliális „reperfúziós" károsodás jön létre, mely hátterében a fokozott oxidatív stressz során felszabaduló reaktív oxigén (szuperoxid, hidrogénperoxid) és nitrogén (nitrogéndioxid, peroxinitrit) szabad gyökök állnak (Moens és mtsai. 2005). Az iszkémia, illetve a reperfúzió akut fázisában (első percek, órák) az antioxidáns hatású rendszerek - mint pl. a superoxiddizmutáz (SOD), kataláz és peroxidáz - képesek az endothelsejtek, makrofágok, neutrofilok és kardiomiociták által nagy mennyiségben termelt szabad gyököket neutralizálni, bizonyos idő után azonban ezen „scavanger" rendszerek kapacitása kimerül (Moens és mtsai. 2005).

Hidrogénperoxid

Korábbi vizsgálatok során elsősorban trombolízissel kezelt betegekben elemezték az oxidatív stressz markereit, illetve a „scavanger" rendszerek aktivitását. Akut koronáriabetegekben a trombolízist követően 6 órával szignifikánsan emelkedett izoprosztán (oxidatív stressz marker) szinteket találtak, majd 24 óra múlva csökkenést tapasztaltak (Muredach et al. 1997). Egy másik vizsgálatban az akut koronária szindrómában szenvedő betegekben az antioxidáns hatású SOD (enzim, mely a superoxid aniont hidrogénperoxiddá alakítja át) aktivitása szignifikánsan emelkedett volt az egészséges kontrollokhoz képest, a maximum értékeket 24 óra múlva érte el; a hetedik napon szignifikáns csökkenést figyeltek meg (Horiuchi és mtsai. 2004).

Az akut miokardiális infarktusban elvégzett perkután koronária intervenciót kísérő oxidatív stressz-, illetve az oxidatív sejtkárosodás mértékéről kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Vizsgálataink során az oxidatív stressz (hidrogénperoxid szint) mértékét kívántuk elemezni perkután koronária intervención átesett infarktusos betegekben. Érdekes módon, a PCI-t követően, késői szignifikáns hidrogénperoxid szint emelkedést figyeltünk meg a reperfúziót követő második, valamint a negyedik napon. A jelenség hátterében az oxidatív és az antioxidáns folyamatok („scavanger" kapacitás

kimerülése) közötti egyensúly késői eltolódása feltételezhető, ennek igazolására azonban további vizsgálatok szükségesek.

8-hidroxideoxiguanozin (8OHdG)

A felszaporodott szabad gyökök egyik kiemelkedő hatása, hogy direkt DNS-károsodást hoznak létre kardiomiocitákban és endothel sejtekben, közvetlenül vagy közvetve sejt nekrózist, illetve apoptózist eredményeznek (Moens és mtsai 2005). A poly-ADP-ribóz polimeráz-1 (PARP-1) enzim a különböző eukarióta sejtmagokban található, alapvetően a DNS károsodás felismeréséért és az ezt követő intracelluláris szignál transzdukciós folyamatok elindításáért felelős. Mint DNS repair enzim a genom integritásának megőrzésében játszik elsődleges szerepet. Kiemelendő, hogy enyhe DNS károsodás serkenti a PARP-1 aktivitást és ezzel DNS integritás helyreállításához és a sejt túléléséhez vezet. Ezzel szemben súlyos DNS károsodás esetén PARP-1 hiperaktiváció következik be, amely végső soron nekrotikus sejthalálhoz vezet (Kirkland és mtsai. 1994, Zingarelli és mtsai. 1997, Jagtap és mtsai. 2005).

Vizsgálataink során a 8-hidroxideoxiguanozin (8-OHdG) szint meghatározása révén akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben vizsgáltuk az oxidatív DNS károsodás mértékét PCI-t kísérő reperfúziót követően. A perkután koronária intervenció után szignifikáns 8OHdG szint emelkedést figyeltünk meg, majd 24 és 96 óra múlva csökkenés volt tapasztalható. Eredményeink első ízben igazolták az oxidatív DNS károsodás jelenlétét akut miokardiális infarktusban szenvedő PCI-on átesett betegekben. A 8OHdG szint emelkedésének prognosztikai értéke további tervezett vizsgálataink tárgya.

Jelen értekezéssel párhuzamosan további – a jelen összefoglalásban nem részletezett – vizsgálatokat is végeztünk. Ezek során immunohisztokémiával, illetve Western blott módszerrel PCI után a perifériás leukocitákban a 8OHdG szint emelkedésével időben összefüggő PARP-1 aktivációt figyeltünk meg, melyet véleményünk szerint a DNS reperfúziós károsodása váltott ki. A PARP-1 aktiváció farmakológiai gátlása a jövőben csökkenthetné a globális iszkémia és PCI – okozta reperfúzió alatt kialakult miokardiális és endothel sérülés hatásait. A PARP-1 inhibítorok klinikai alkalmazhatósága megítélésünk szerint további vizsgálatokat igényel.

7. Következtetések

1.) Az egészséges egyénekhez képest stabil angina pectorisban szenvedő betegekben megfigyelt szignifikánsan magasabb felvételi keringő endothel sejtszám az endothel sérülés jelenlétét jelzi.

2.) Akut ST-elevációs miokardiális infarktusban szenvedő betegekben a stabil angina csoporthoz képest szignifikánsan magasabb felvételi keringő endothel sejtszám és plazma vWF szint figyelhető meg. Eredmények igazolják az akut miokardiális iszkémia során létrejött endothel sérülést, mely a magas CEC szám mellett a vWF szint emelkedésével jól követhető. Az sICAM-1 plazma szint tekintetében nem volt kimutatható szignifikáns különbséget a stabil angina, illetve az akut koronária szindróma között. Ez alapján, az sICAM-1 plazma szintje az endothel krónikus aktivációját és az ateroszklerotikus folyamatok jelenlétét jelzi, akut miokardiális iszkémia során jelentős mértékben nem emelkedik.

3.) Stabil angina pectorisban szenvedő betegekben sem a koronarográfia, sem a stent beültetéssel járó elektív perkután koronária intervenció nem okoz szignifikáns keringő endothelsejtszám, von Willebrand faktor, illetve sICAM-1 plazma szintemelkedést. Ez alapján a stabil körülmények között elvégzett koronária manipulációk (koronarográfia, elektív perkután koronária intervenció) endothelre gyakorolt szisztémás hatása csekély.

4.) Akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben a perkután koronária intervenciót követően a keringő endothel sejtszám emelkedik, a szignifikáns maximumot a beavatkozást követően 24 óra múlva éri el, majd a negyedik napon csökkenés tapasztalható. Az eredmények alapján manifeszt miokardiális iszkémia miatt perkután koronária intervención átesett STEMI-ben betegekben jelentős endothelsérülés jön létre.

5.) Akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben a vWF plazma szintje a PCI-t követően 24 és 96 óra múlva emelkedik, ugyanakkor közvetlenül a perkután koronária intervenció után plazma vWF csökkenés tapasztalható. A jelenség hátterében az

endothel sérülés helyén kialakult egyidejű trombocita aktiváció, és trombus képződésből adódó rapid vWF kiáramlás és felhasználás állhat.

6.) Az sICAM-1 szintek akut miokardiális infarktusban szenvedő, PCI-on átesett betegekben a stabil anginában is megfigyelt kinetikát és hasonló értékeket mutatják jelezve, hogy ez a paraméter nem érzékeny a zajló akut aterotrombotikus folyamatokra.

7.) Akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben a felvételi CKMB és a 24 órás CEC értékek között szignifikáns pozitív korreláció észlelhető. Az eredmény alapján a mielőbbi koronária keringés helyreállítása nem csak a miokardiális, hanem az endothelsérülés kiterjedését is csökkentheti.

8.) A kardiovaszkuláris gyógyszeres terápia CEC számra gyakorolt hatását elemezve kiemelhető, hogy a PCI-on átesett clopidogrel kezelésben részesülő betegekben szignifikánsan alacsonyabb CEC szám figyelhető meg. Ez alapján, a clopidogrel – trombocita gátló hatása mellett - feltételezett endothel protektív hatással is rendelkezhet.

9.) Akut miokardiális infarktusban szenvedő PCI-on átesett betegekben késői szignifikáns hidrogénperoxid szintemelkedés figyelhető meg a reperfúziót követő második, valamint a negyedik napon. Ellenben, a 8OHdG szint rapid szignifikáns emelkedést mutat közvetlenül a perkután koronária intervenció után jelezve a reperfúziós oxidatív DNS károsodás jelenlétét.

Összefoglalás

A sztenotikus koronária rekanalizációja döntő a miokardium irreverzibilis iszkémiás károsodásának csökkentése szempontjából. A koszorúérben való áramlás helyreállítására szolgáló perkután koronária intervenció (PCI) áttörést jelentett az iszkémiás szívbetegség kezelésében, a perkután koronária intervenciót követő reperfúziós folyamatokról, valamint az endothelt érintő élettani hatásairól azonban kevés humán adat áll rendelkezésre. Az endothel fiziológiás működésének egyik alapfeltétele saját integritásának fenntartása. Bizonyos tényezők hatására az endothel integritása megszakad, az endothelsejtek az érfalból leválnak és a keringésbe kerülnek. Mivel az endothelt ért károsodás esetén a keringő endothelsejtszám (CEC) jelentősen megemelkedik, így endothel károsodás direkt markereként használható fel.

Vizsgálatunk célja a PCI endothelre gyakorolt hatásainak elemzése, illetve a PCI-t követő szisztémás oxidatív stressz és a reperfúziós károsodás mértékének felmérése volt. További célunk az ismert kardiovaszkuláris kockázati tényezők és a farmakoterápia endothelre gyakorolt hatásainak tanulmányozása volt. Mivel az endothel sérülés mértékét a keringő endothel sejtszámmal szerettük volna vizsgálni, elsődleges célunk a CEC izolálására alkalmas, reprodukálható metodika kidolgozása volt.

Vizsgálataink első részében az iszkémiás szívbetegségben elvégzett PCI endothelre gyakorolt hatásait elemeztük a keringő endothelsejtszám, a plazma von Willebrand faktor (vWF) és a szolubilis ICAM-1 (sICAM-1) segítségével. Akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben szignifikánsan magasabb CEC számot és plazma vWF szinteket találtunk a stabil angina csoporthoz képest, ami az akut miokardiális iszkémia során létrejött erőteljes endothel sérülést igazolja. A korábbi elképzelésekkel ellentétben, vizsgálatunk során stabil angina pectorisban elvégzett PCI nem okozott szignifikáns CEC szám, illetve plazma vWF emelkedést. Stabil angina pectorisban elvégzett koronária manipulációk endothelre gyakorolt szisztémás hatása tehát csekély. Ezzel szemben, akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben a PCI-t követően szignifikáns CEC szám emelkedést találtunk. Akut miokardiális iszkémia miatt PCI-on átesett betegekben kifejezett endothelsérülés figyelhető meg, melynek hátterében a koronária intervenció hatása mellett a plakk ruptúra és a miokardiális iszkémiához, majd reperfúzióhoz társuló szisztémás folyamatok állhatnak.

A gyógyszeres terápia endothelre gyakorolt hatását elemezve azt emelhetjük ki, hogy a PCI-on átesett clopidogrel kezelésben részesülő betegekben szignifikánsan alacsonyabb CEC számot figyeltünk meg. Ez alapján a clopidogrel – trombocita gátló hatása mellett - feltételezett endothel protektív hatással is rendelkezhet.

Vizsgálataink további részében hidrogénperoxid, valamint a 8-hidroxi-dezoxiguanozin (8-OHdG) szint meghatározása révén akut miokardiális infarktusban szenvedő betegekben az oxidatív DNS károsodás mértékét vizsgáltuk a PCI-t kísérő reperfúziót követően. Közvetlenül a PCI után szignifikáns 8OHdG szint emelkedést figyeltünk meg. Eredményeink első ízben igazolták a PCI-t követő oxidatív DNS károsodás jelenlétét humán mintákban.

Summary

The endothelium represents a metabolically active tissue with several important functions. Previous data confirmed, that cardiovascular risk factors may induce endothelial dysfunction and promote atherosclerotic process manifesting later as stable angina, or acute coronary syndrome. In patients with ischaemic heart disease, the recanalisation of occluded coronary artery is crucial for the prevention of further ischaemic myocardial damage. Over the last two decades, invasive coronary revascularization therapy has been referred as an important therapeutic strategy in patients with ischaemic heart disease. However, data regarding the oxidative stress response, and the extent of PCI induced direct/or indirect endothelial damage are still lacking. Early impairment of endothelial function caused by cardiovascular risk factors might be characterized by loss of endothelial integrity and endothelial cell detachment demonstrating as increased circulating endothelial cell count (CEC) in peripheral blood. Since the CEC number increases in conditions associated with vascular damage, the CEC count can serve as a sensitive marker of endothelial injury. The main aim of our study was to assess the endothelial effects of PCI and to evaluate the grade of systemic oxidative stress response and the reperfusion injury following invasive coronary intervention. Our further aim was to determine the endothelial effects of the cardiovascular risk factors and pharmacotherapy. In order to determine the effect of PCI, CEC count, plasma vWF and sICAM-1 were determined in ischaemic heart disease patients. In acute myocardial infarction we found significantly higher baseline CEC count and plasma vWF compared to stable angina indicating the presence of explicit endothelial damage during acute myocardial ischaemia. In our study, nor the coronarography, neither the elective PCI caused significant CEC count elevation. Moreover, the CEC count was comparable in stable angina patients undergoing PCI, or coronarography alone. In contrast to previous concepts, our results indicate that elective PCI itself (similarly to coronary angiography) performed in stable form of ischaemic heart disease does not cause explicit endothelial damage. In contrast, analyzing patients with myocardial infarction we found pronounced increase in CEC count after PCI with a significant maximum at 24 hours. Based on our results, during percutaneous coronary intervention performed in conditions of manifest myocardial ischaemia more extensive endothelial damage occurs.

Our further aim was to study the direct effect of cardiovascular risk factors and cardiovacular pharmacotherapy on endothelial cells. In our study, among the cardiovascular drugs, only clopidogrel was found to significantly decrease the CEC count. We assume, that lower CEC count in patients taking clopidogrel might indicate endothelial protective effect of the P2Y12 receptor blockers.

During further studies, serum hydrogenperoxide concentrations and plasma levels of the oxidative DNA adduct 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine were determined in patients with acute myocardialial infarction. Rapid significant 8OHdG serum level increase detected immediately after successful PCI provide the first clinical evidence of reperfusion DNA injury present in patients with myocardial infarction undergoing PCI.

Irodalomjegyzék

Aggarwal A, Schneider DJ, Terrien EF, Gilbert KE, Dauerman HL. Increase in interleukin-6 in the first hour after coronary stenting: an early marker of the inflammatory response. J Thromb Thrombolysis 2003; 15(1):25-31.

Almagor M, Keren A, Banai S. Increased C-reactive protein level after coronary stent implantation in patients with stable coronary artery disease Am Heart J 2003; 145(2):248-253.

Alon R, Chen S, Puri KD, Finger EB, Springer TA. The kinetics of L-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated rolling. J Cell Biol 1997;138(5):1169-1180.

Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E et al. Insulin causes endothelial dysfunction in humans. Circulation 2002; 105:576-582.

Aström-Olsson K, Hedström E, Hultén LM, Wiklund O, Arheden H, Ohlin AK, Gottsäter A, Ohlin H. Dissociation of the Inflammatory Reaction following PCI for Acute Myocardial Infarction. J Invasive Cardiol 2007;19(11):452-6.

Azar RR, Kassab R, Zoghbi A, Aboujaoudé S, El-Osta H, Ghorra P, Germanos M, Salamé E. Effects of clopidogrel on soluble CD40 ligand and on high-sensitivity C-reactive protein in patients with stable coronary artery disease. Am Heart J 2006;151(2):521.

Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Hebbel RP, Lip GY, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. Thromb Haemost 2005; 93(2):228-35.

Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. J Am Coll Cardiol 2006;48(8):1538-47.

Boos CJ, Balakrishnan B, Jessani S, Blann AD, Lip GY. Effects of percutanoeus coronary intervention on peripheral venous blood circulating endothelial cells and plasma indices of endothelial damage/dysfunction. Chest 2007;132(6):1920-6.

Chong AY, Blann AD, Patel J, Freestone B, Hughes E, Lip GY. Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage and brain natriuretic peptide. Circulation 2004;110(13):1794-8.

Cines DB, Pollack ES, Buck A et al: Endothelial cells in physiology and pathophysiology of vascular disorders. Blood 1998; 91:3527-3561.

DeGroot E, van Leuven SI, Duivenvoorden R, Meuwese MC, Akdim F, Bots ML, Kastelein JJ. Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2008;5(5):280-8.

Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. Biochim Biophys Acta 1999;1411(2-3):334-50.

Dignat-George F, Blann A, Sampol J. Circulating endothelial cells in acute coronary syndromes. Blood 2000;95(2):728.

Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. Clin Chim Acta 2006;373(1-2):17-26.

Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 2006;47(8 Suppl): C7-12.

Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. Clin Sci (Lond) 2009;117(4):139-55.

Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, Virmani R. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27(7):1500-10.

Freestone B, Lip GY, Chong AY, Nadar S, Lee KW, Blann AD. Circulating endothelial cells in atrial fibrillation with and without acute cardiovascular disease. Thromb Haemost 2005;94(4):702-6.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288(5789):373-6.

Furenes EB, Arnesen H, Solheim S, Grøgaard HK, Hoffmann P, Seljeflot I. The profile of circulating metalloproteinases after PCI in patients with acute myocardial infarction or stable angina. Thromb Res 2009;124(5):560-4.

George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Ambrosi P, Klein-Soyer C, Cazenave JP, Sampol J. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. Thromb Haemost 1992;67(1):147-53.

George F, Brouqui P, Boffa MC, Mutin M, Drancourt M, Brisson C, Raoult D, Sampol J. Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. Blood 1993;82(7):2109-16.

Goldberg A, Zinder O, Zdorovyak A, Diamond E, Lischinsky S, Gruberg L, Markiewicz W, Beyar R, Aronson D. Diagnostic coronary angiography induces a systemic inflammatory response in patients with stable angina. Am Heart J 2003;146(5):819-23.

Grabowski EF, Lam FP. Endothelial cell function, including tissue factor expression, under flow conditions. Thromb Haemost 1995;74(1):123-8.

Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB, Hendricks C, Mehta JL. Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. Am Heart J 1996;132(1 Pt 1):1-8.

Heitzer T, Volker R, Schwedhelm E et al. Clopidogrel improves endothelial nitric oxid bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and anti-inflammatory effect. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 1648-1652.

Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczek RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature 1998;391(6667):591-4.

Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. Platelets 2001;12(2):74-82.

Hirayama A, Saito S, Ueda Y, Takayama T, Honye J, Komatsu S, Yamaguchi O, Li Y, Yajima J, Nanto S, Takazawa K, Kodama K. Qualitative and quantitative changes in coronary plaque associated with atorvastatin therapy. Circ J 2009;73(4):718-25.

Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions. Physiol Bohemoslov 1978;27(2):140-4.

Horiuchi M, Tsutsui M, Tasaki H, Morishita T, Suda O, Nakata S, Nihei S, Miyamoto M, Kouzuma R, Okazaki M, Yanagihara N, Adachi T, Nakashima Y. Upregulation of vascular extracellular superoxide dismutase in patients with acute coronary syndromes. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24(1):106-11.

Horváth Eszter Mária. Poly (ADP-ribose) polymerase activation in circulating leukocytes. 2008; Doktori disszertáció.

Jagtap P, Szabo C. PARP and therapeutic effect of its inhibitors. Nat. Rev. Drug Discov 2005; 4: 421-440.

Janssens D, Michiels C, Guillaime G, Cuisinier B, Louagie Y, Remacle J. Increase in circulating endothelial cells in patients with primary chronic venous inssuficiency,: protective effect og Ginkor fort in a randomized double blind, placebo controlled clinical trial. J Cardiovasc Pharmacol 1999; 33: 7-11.

Kadirvelu A, Chee Kok Han, Chim Choy Lang. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. Medical progress 2002; 4-12.

Kaikita K, Ogawa H, Yasue H, Sakamoto T, Miyao Y, Suefuji H, Soejima H, Tayama S, Hayasaki K, Honda T, Kamijikkoku S. Increased plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 levels in patients with acute myocardial infarction. Jpn Circ J 1997;61(9):741-8.

Karha J, Bhatt DL. Plaque regression--a new target for antiatherosclerotic therapy. Am Heart J 2005;149(3):384-7.

Kastelein JJ, de Groot E. Ultrasound imaging techniques for the evaluation of cardiovascular therapies. Eur Heart J 2008;29(7):849-58.

Kirkland JB. Lipid peroxidation, protein thiol oxidation, and DNA damage hydrogen-peroxide- induced injury to endothelial cells: role of activation of poly (ADP- ricbose) polymerase. Biochim Biophys Acta 1994; 1092: 319-325.

Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. Blood 2005;105(2):526-32.

Lee KW, Blann AD, Lip GY. Inter-relationships of indices of endothelial damage/dysfunction [circulating endothelial cells, von Willebrand factor and flow mediated dilatation] to tissue factor and interleukin-6 in acute coronary syndromes. Int J Cardiol 2006;111(2):302-8.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 2002; 105: 1135–1143.

Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. Circulation. 2005;111(25):3481-8.

Libby P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. J Intern Med 2008; 263 (5) 517 – 527.

Lip GY, Blann A. von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders. Cardiovasc Res 1997;34(2):255-65.

Lüscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. Clin Cardiol 1997;20(11 Suppl 2):II-3-10.

Lüscher TF, Steffel J, Eberli FR, Joner M, Nakazawa G, Tanner FC, Virmani R. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. Circulation 2007;115(8):1051-8.

Makin AJ, Blann AD, Chung NA, Silverman SH, Lip GY. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. Eur Heart J 2004;25(5):371-6.

Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. Br J Pharmacol 2000;130(5):947-62.

Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. Blood 2001;97(11):3658-61.

Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS, Guha A, Sharma SK, Ambrose JA, Fallon JT, Nemerson Y, Taubman MB. Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. Circulation 1996;94(6):1226-32.

Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a rewiev of the pathophysiology, clinical manifestation and therapeutic options. Internationa Journal of Cardiology 1997; 58: 95-117.

McClung JA, Naseer N, Saleem M, Rossi GP, Weiss MB, Abraham NG, Kappas A. Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA(1)c. Diabetologia 2005;48(2):345-50.

Michiels C. Endothelial cell functions. J Cell Physiol 2003;196(3):430-43.

Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? Chest 2005;127(6):2254-63.

Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. Int J Cardiol 2005;100(2):179-90.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature 1976;263(5579):663-5.

Morange PE, Simon C, Alessi MC, Luc G, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, Evans A, Ducimetiere P, Juhan-Vague I; PRIME Study Group. Endothelial cell markers and

the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study. Circulation 2004;109(11):1343-8.

Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. Blood 1999;93(9):2951-8.

Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, Baudouin SV. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. Am J Respir Crit Care Med 2001;163(1):195-200.

Murakami M, Simons M. Regulation of vascular integrity. J Mol Med 2009;87(6):571-82.

Muredach P. Reilly, MB; Norman Delanty, MB; Louis Roy, MD; Joshua Rokach, PhD; Peter O. Callaghan, MB; Peter Crean, MD; John A. Lawson; ; Garret A. FitzGerald, MD. Increased Formation of the Isoprostanes IPF2-I and 8-Epi-Prostaglandin F2 in Acute Coronary Angioplasty. Evidence for Oxidant Stress During Coronary Reperfusion in Humans. Circulation 1997;96:3314-3320.

Murthy KG, Xiao CY, Mabley JG, Chen M, Szabo C. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in circulating leukocytes during myocardial infarction. Shock 2004; 21(3):230-4.

Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies. Part II. Circulation 2003;108:1772–1778.

Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I. Circulating endothelial cells in Kawasaki disease. Clin Exp Immunol 2003;131(3):536-40.

Ogawa H, Yasue H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Nishiyama K, Kaikita K, Suefuji H, Misumi K, Takazoe K, Kugiyama K, Yoshimura M. Plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 levels in coronary circulation in patients with unstable angina. Am J Cardiol 1999;83(1):38-42.

Piconi L. Intermittent high glucose enhances ICAM-1. VCAM-1, E-selectin and interleukin 6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly (ADP-ribose) polymerase. J Thromb Haemost 2004; 2: 1453-1459.

Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia- reperfusion injury. Ann Thorac Surg 2003; 75: 644-648.

Prasad A, Zhu J, Halcox JPJ, Waclawiw MA, Epstein SE, Quyyumi AA. Predisposition to atherosclerosis by infection: role of endothelial dysfunction. Circulation 2002; 106: 184-19049.

Rebeiz AG, Zoghbi E, Harb R, Youhanna S, Skouri HN, Dimassi A, Abou-Nader G, Nasrallah A, Sawaya J, Gharzuddine W, Alam S. Comparison of the systemic levels of inflammatory markers after percutaneous coronary intervention with bare metal versus sirolimus-eluting stents. Interv Cardiol 2009;22(2):169-74.

Rifai N, Joubran R, Yu H, Asmi M, Jouma M. Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease. Clin Chem 1999;45(11):1967-73.

Rössig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. Basic Res Cardiol 2001;96(1):11-22.

Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993 362:801-809.

Rumley A, Lowe GD, Sweetnam PM, Yarnell JW, Ford RP. Factor VIII, von Willebrand factor and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly Heart Study. Br J Haematol 1999;105(1):110-6.

Ross R: Mechanism of disease: Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med 1999;340:115-126.

Sakai H, Goto S, Kim JY, Aoki N, Abe S, Ichikawa N, Yoshida M, Nagaoka Y, Handa S. Plasma concentration of von Willebrand factor in acute myocardial infarction. Thromb Haemost 2000;84(2):204-9.

Saku K, Zhang B, Ohta T, Shirai K, Tsuchiya Y, Arakawa K. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with angiographically defined coronary atherosclerosis. Jpn Circ J 1999;63(1):19-24.

Sbarbati R, de Boer M, Marzilli M, Scarlattini M, Rossi G, van Mourik JA. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. Blood 1991;77(4):764-9.

Silber S. Cypher versus taxus: are there differences? J Interv Cardiol 2005;18(6):441-6.

Simon J, Filippov AK, Göransson S, et al. Characterization and channel coupling of the $P2Y_{12}$ nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells. JBC 2002; 277(35): 31390-31400.

Shanker G, Kontos JL, Eckman DM, Wesley-Farrington D, Sane DC. Nicotine upregulates the expression of $P2Y_{12}$ on vascular cells and megakaryoblasts. J Thromb Thrombolysis 2006; 22: 213-220.

Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. J Clin Invest 1998;101(9):1899-904.

Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes.Circulation 2008;117(11):1449-59.

Soskin P, Mossard JM, Arbogast R, Wiesel ML, Grunebaum L, Roul G, Bareiss P, Moulichon ME, Cazenave JP, Sacrez A. Variation in von Willebrand's Factor according to the treatment of acute myocardial infarction: physiopathological and clinical implications. Eur Heart J 1994;15(4):479-82.

Tanaka K, Sata M. Role of vascular progenitor cells in cardiovascular disease.Curr Pharm Des 2009;15(24):2760-8.

Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD 40L CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species.Circulation 2002;106(8):981-6.

Urbich C, Dimmeler S. CD40 and vascular inflammation. Can J Cardiol 2004;20(7):681-3.

Tesfamariam B, DeFelice AF. Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders. Vascul Pharmacol 2007;46(4):229-37.

Turner J, Belch JJ, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. Trends Cardiovasc Med 2008;18(4):109-16.

Quilici J, Banzet N, Paule P, Meynard JB, Mutin M, Bonnet JL, Ambrosi P, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes. Circulation 2004;110(12):1586-91.

Virmani R, Farb A. Pathology of in-stent restenosis. Curr Opin Lipidol 1999; 10(6):499-506.

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25(10):2054-61.

Warnholtz A, Ostad MA, Velich N et al. A single loading dose of clopidogrel causes dose- dependent improvement of endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease: Results of a double- blind randomized study. Atherosclerosis 2008;196(2):689-95.

Willerson JT, Kereiakes DJ. Endothelial dysfunction. Circulation 2003;108(17):2060-2061.

Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, Erdbruegger U, Banzet N, Haubitz M, Dignat-George F. Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. J Thromb Haemost 2006; 4(3):671-7.

Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. Lancet 2003;361(9353):206-10.

Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. Nephrol Dial Transplant 2002;17(10):1728-30.

Yamashita A, Sumi T, Goto S, Hoshiba Y, Nishihira K, Kawamoto R, Hatakeyama K, Date H, Imamura T, Ogawa H, Asada Y. Detection of von Willebrand factor and tissue factor in platelets-fibrin rich coronary thrombi in acute myocardial infarction. Am J Cardiol 2006;97(1):26-8.

Yip HK, Chang LT, Sun CK, Yang CH, Hung WC, Cheng CI, Chua S, Yeh KH, Wu CJ, Fu M. Impact of clopidogrel on suppression of circulating levels of soluble CD40 ligand in patients with unstable angina undergoing coronary stenting. Am J Cardiol 2006; 97(2):192-4.

Zeitler H, Ko Y, Zimmermann C, Nickenig G, Glänzer K, Walger P, Sachinidis A, Vetter H. Elevated serum concentrations of soluble adhesion molecules in coronary artery disease and acute myocardial infarction. Eur J Med Res 1997;2(9):389-94.

Zingarelli B, Cuzzocrea S, Zsengeller Z, Salzman AL, Szabo C. Protection agains myocardial ischemia and reperfusion injury by 3- aminobenzamide, an inhibitor of PARP. Cardiovascular research 1997; 36: 205- 215.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények:

Vargová K, Toth-Zsamboki E, Beres BJ, Bencze J, Kerecsen G, Gulacsi-Bardos P, Kiss RG, Preda I. Circulating endothelial cell count, plasma vWF and soluble ICAM-1 levels following primary or elective percutaneous coronary intervention. Atherosclerosis 2008 Jun; 198(2):366-72. (**IF: 4,601)**

Tóth-Zsámboki E, Horváth E, Vargova K, Pankotai E, Murthy K, Zsengellér Z, Bárány T, Pék T, Fekete K, Kiss RG, Préda I, Lacza Z, Gerö D, Szabó C. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. Mol Med 2006 Sep-Oct; 12(9-10):221-8. (**IF: 2,708)**

Vargová K, Tóth-Zsámboki E, Bencze J, Kiss RG, Préda I. Keringő endothelsejtek elemzésének jelentősége aterotrombózissal járó kórképekben. Metabolizmus 2005; 3(2): 92-96.

Préda I, Bencze J, Vargová K. Endothelfunkció és ischémiás szívbetegség. Orvosi Hetilap 2005; 146 (20) Suppl. 2 :1047-1053.

Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

Merkely B, Tóth-Zsamboki E, Becker D, Beres BJ, Szabó G, Vargova K, Fülöp G, Kerecsen G, Preda I, Spaulding C, Kiss RG. Very late drug-eluting stent thrombosis after nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment despite dual antiplatelet therapy. Can J Cardiol. 2009 Apr;25(4):229-32. (**IF: 1,796)**

Béres BJ, Tóth-Zsámboki E, Vargová K, László A, Masszi T, Kerecsen G, Préda I, Kiss RG. Analysis of platelet alpha2-adrenergic receptor activity in stable coronary artery disease patients on dual antiplatelet therapy. Thromb Haemost. 2008 Nov;100(5):829-38. (**IF: 3,803)**

Bencze J, Kiss RG, Toth-Zsamboki E, Vargova K, Kerecsen G, Korda A, Molnar F, Preda I. Inverse correlation between coronary blood flow velocity and sICAM-1 level observed in ischemic heart disease patients. Atherosclerosis. 2006 Sep; 188(1):142-9. **(IF: 3,811)**

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Préda István Professzor Úrnak a lehetőségért, hogy részese lehettem e kutatási programnak. Tapasztalatai, szakmai tanácsai, támogatása és kedvessége nélkülözhetetlen segítséget jelentett mindvégig.

Köszönöm Dr. Kiss Róbert Gábor Főorvos Úrnak, hogy munkahelyi vezetőként lehetővé tette számomra a kutatás további folytatását, és a szakmai segítség mellet támogatott a célok elérésében a napi feladatok végzése mellett is.

Köszönöm Dr. Tóth- Zsámboki Emesének a rendkívül értékes tanácsokat és a szakmai segítséget, melyet mindvégig nyújtott. Nem csak munkatársként, hanem kedves barátként és nagyon értékes emberként is gondolok rá.

Nagyon köszönöm Kovács Andreának, hogy sokféle feladat elvégzésében értékes szakmai tapasztalat mellett nagy segítséget nyújtott a laboratóriumi munkákban.

Köszönöm Dr. Béres Bernátnak és Dr. Horváth Eszternek az együttműködést és a szakmai segítséget.

Köszönettel tartozom a Haemodinamikai labor összes munkatársának a vérminták levételében való segítséget.

Köszönöm barátomnak, Dr. Gálhidy Lászlónak a lelki támogatást és a türelmet, melyet a mindennapi munkámhoz, valamint a doktori értekezés elkészítés ideje alatt nyújtott.

Nem utolsó sorban hálával tartozom a szeretett szüleimnek, öcsémnek, akik mindig mellettem álltak, bátorításukkal segítettek és szeretetükkel, támogatásukkal lehetővé tették a tanulmányaim elvégzését.