

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Jelena T. Rakočević

Uticaj nivoa cirkulišućeg serumskog
vaskularnog endotelnog faktora rasta i
stepena angiogeneze aspiriranog tromba
na angiografski i klinički ishod pacijenata
sa akutnim infarktom miokarda sa
elevacijom ST segmenta lečenih
primarnom perkutanom koronarnom
intervencijom

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Jelena T. Rakočević

Impact of circulating vascular endothelial growth factor level and the angiogenesis degree of the aspirated coronary thrombi on angiographic and clinical outcome of patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

MENTOR:

Doc. dr Milica Labudović Borović, Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ.Kostić“, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

Doc. dr Dejan Orlić, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Akademik prof. dr Miodrag Ostojić, profesor emeritus Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
2. Akademik prof. dr. Vladimir Bumbaširević, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Branko Beleslin, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
4. Dr Snežana Kojić, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Miloje Tomašević, Fakultet medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru, doc. dr Milici Labudović Borović, na nesebičnoj pomoći pri svakom istraživačkom koraku, svakodnevnom ohrabrenju i jednom divnom prijateljskom odnosu koji bi svaki doktorant poželeo.

Zahvaljujem se mom komentoru, doc.dr Dejanu Orliću, čiji nas je izvanredni doktorat inspirisao i pokrenuo da počnemo sa radom na ovoj doktorskoj disertaciji, kao i na savetima i pomoći prilikom izrade ove teze.

Posebnu zahvalnost dugujem akademiku prof. dr Miodragu Ostojiću, za moj „kardiološki početak”, što sam bila deo jednog sjajnog tima mladih stipendista, njegovih *matičnih ćelija* i što smo imali priliku da učimo od njega na svakom koraku.

Zahvalnost dugujem dr Snežani Kojić, za pružena nova znanja i veštine u laboratorijskom radu, kao i na sugestijama prilikom pisanja ove teze.

Zahvaljujem se prijateljima i kolegama dr Nataši Zlatić, dr Olgi Petrović, dr Dejanu Milašinoviću i dr Ivanu Zaletelu za pruženu pomoć u prikupljanju materijala i podataka za izradu ove teze, kao i Jovanki Ognjanović za pomoć u pripremi histoloških preparata.

Iskreno se zahvaljujem svim kolegama i prijateljima sa Instituta za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao i kolegama u Sali za kateterizaciju KCS-a na saradnji i razumevanju.

Rad povećujem Milošu i Vukašinu.

Uticaj nivoa cirkulišućeg serumskog vaskularnog endotelnog faktora rasta i stepena angiogeneze aspiriranog tromba na angiografski i klinički ishod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda sa elevacijom ST segmenta lečenih primarnom perkutanom koronarnom intervencijom

REZIME

Uvod. Koronarni tromb dobijen manuelnom aspiracionom trombektomijom od pacijenata sa akutnim infarktom miokarda sa elevacijom ST-segmenta (STEMI) lečenih primarnom perkutanom koronarnom intervencijom (pPCI) predstavlja pogodan materijal za proučavanje patofizioloških mehanizama u osnovi koronarne tromboze, trajanja ishemije kod STEMI pacijenata, kao i različitog obima angiogeneze u trombu. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) je ključni molekul angiogeneze, koji se može meriti u krvi STEMI pacijenata. Vrednosti cirkulišućeg VEGF-a mogu reflektovati kompenzatorni angiogeni odgovor ishemijskog miokarda i predstavljati važan prognostički faktor kod pacijenata sa infarktom miokarda.

Cilj. Cilj ove studije bio je da se odredi starost i stepen angiogeneze aspiriranog koronarnog tromba i izmeri vrednost cirkulišućeg serumskog VEGF-a (sVEGF) u populaciji STEMI pacijenata lečenih pPCI uz aspiracionu trombektomiju, kao i ispitivanje njihovog uticaja na angiografske i kliničke ishode STEMI pacijenata.

Materijal i metode. U istraživanje je uključeno 100 konsekutivnih STEMI pacijenata lečenih pPCI i aspiracionom trombektomijom od kojih je dobijena adekvatna količina materijala za dalju patohistološku analizu ($>1 \text{ mm}^3$). Aspirirani materijal analiziran je svetlosnom i konfokalnom mikroskopijom. Kategorizacija trombova prema starosti (svež, litički i organizovani tromb) izvršena je bojenjem hematoksilin-eozinom. Stepem angiogeneze je određen imunohistohemijskim bojenjem na markere endotelnih ćelija (EĆ) – CD34 i CD31, i gradiran kao pojedinačne EĆ, grupisane EĆ i kapilarne petlje EĆ. Vrednosti sVEGF-a prilikom prijema pacijenata u salu za kateterizaciju pre PCI određivane su ELISA metodom. Angiografski ishodi su podrazumevali analizu stepena miokardnog ispiranja (MBG) na finalnom angiogramu i stepena rezolucije ST-elevacije (STR) na elektrokardiogramu nakon 60 minuta od pPCI. Klinički ishodi procenjeni su veličinom infarkta miokarda na osnovu maksimalnih vrednosti oslobođenih

kardiospecifičnih enzima tokom hospitalizacije (CK_{max} , troponin I_{max}), ehokardiografskim parametrima veličine infarkta i remodelovanja leve komore tokom hospitalizacije i nakon 6 meseci praćenja (EDVI, ESVI, LVEF, WMSI), i učestalošću neželjenih kardiovaskularnih i cerebralnih događaja (MACCE) tokom perioda praćenja od 6 meseci nakon STEMI (smrt, reinfarkt miokarda, moždani udar, revaskularizacija infarktne arterije, tromboza stenta, hospitalizacija zbog srčane insuficijencije).

Rezultati. Kod većine pacijenata (58%) aspirirani tromb bio je histološki stariji od 24h, iako je vreme od pojave bola u grudima do pPCI iznosilo do 12h. Ukupno ishemijsko vreme bilo je značajno duže kod pacijenata sa aspiriranim starijim trombima u odnosu na sveže trombe (220 vs. 150 minuta, $p=0,019$). Postojala je povezanost nalaza starijih trombova sa pojavom antecedentne angine ($\chi^2=6,542$, $p=0,011$).

Angiogeneza je bila prisutna kod većine aspiriranih trombova (69,3%). Rane EĆ su najčešće bile u formi grupisanih $CD34^+CD31^+$ ćelija (50,8%), ređe u vidu pojedinačnih EĆ (32,8%), dok su najređe bile u formi kapilarnih petlji (16,4%). Stepen organizacije $CD34^+CD31^+$ ćelija se povećavao sa starošću tromba, dok nije uočena povezanost sa trajanjem ukupnog ishemijskog vremena ($p=0,210$). Svi organizovani trombi su pokazivali znake angiogeneze, EĆ su registrovane kod 75% litičkih tromba, dok su sveži trombi imali prisutne EĆ u 50% slučajeva.

Registrovana je ko-ekspresija $CD34/CD31$ i D2-40, LYVE-1 i VEGFR3 na ranim EĆ u raslim u trombotično tkivo. Ovo je prvi slučaj detekcije prisustva D2-40 imunoreaktivnosti na vaskularnim EĆ u netumorskim uslovima.

Pacijenti sa većim vrednostima sVEGF-a imali su duže ukupno ishemijsko vreme u odnosu na pacijente sa manjim vrednostima sVEGF-a (270 vs. 170 minuta, $p=0,03$). Kod pacijenata sa organizovanim trombima češće su izmerene povišene vrednosti sVEGF-a (91,1%) u odnosu na pacijente sa aspiriranim svežim (43,2%) i litičkim (45%) trombima. Anigiogenezu u trombu pratile su veće vrednosti sVEGF-a u odnosu na pacijente bez EĆ u trombu (232,88 vs. 150,87 pg/ml, $p=0,039$).

Kod aspiriranog svežeg tromba češće je registrovan TIMI 3 protok nakon aspiracije u odnosu na aspiraciju starijeg materijala (67,6% vs. 45,1%, $p=0,037$). Kod pacijenata sa znacima angiogeneze u trombu značajno češće je registrovan MBG 0/1 u odnosu na trombe bez EĆ (31,1% vs. 7,4%, $p=0,016$). Distalna embolizacija uočena je značajno

češće kod pacijenata sa trombom veće površine ($p=0,005$), bez razlike u sadržaju eritrocita ili fibrina u trombu, starosti tromba i angiogenezi tromba.

Angiografske karakteristike pacijenata (infarktna arterija, prisustvo višesudovne bolesti, vrednost TIMI protoka, Rentrop stepen razvijenosti kolaterala, vrednost MBG i pojava distalne embolizacije) nisu se značajno razlikovale u odnosu na izmerene vrednosti sVEGF-a. Uočena je tendencija ka korelaciji između nižih vrednosti sVEGF-a i većih vrednosti bazalnog SYNTAX skora ($\rho=-0,207$, $p=0,053$).

CK_{max} i troponin I_{max} nisu pokazivali povezanost sa makroskopskom bojom tromba, histološkom starošću tromba, prisustvom angiogeneze i stepenom organizacije EĆ, kao ni sa vrednostima sVEGF-a.

Procentualne promene u ehokardiografskim parametrima (ESVI, EDVI, LVEF, WMSI) nakon 6 meseci od STEMI u odnosu na inicijalne vrednosti, kao i pojava remodelovanja leve komore nisu se značajno razlikovali u odnosu na boju aspiriranog tromba (crveni ili beli), njegovu starost i prisustvo angiogeneze. Postojala je tendencija ka većem oporavku LVEF kod pacijenata sa pojedinačnim EĆ u trombu u odnosu na grupisane i kapilarne petlje EĆ ($p=0,063$), dok se ostali ehokardiografski parametri (procentualna promena EDVI, ESVI i WMSI) nisu značajno razlikovali prema stepenu organizacije angiogeneze.

Vrednosti sVEGF-a nisu pokazivale korelaciju sa procentualnom promenom ehokardiografskih parametara tokom perioda praćenja pacijenata: EDVI ($\rho=0,025$, $p=0,8320$), ESVI ($\rho=-0,016$, $p=0,891$), LVEF ($\rho=-0,157$, $p=0,189$) i WMSI ($\rho=0,694$, $p=0,225$). Nije uočena razlika u pojavi remodelovanja leve komore kod pacijenata sa različitim vrednostima sVEGF-a. Tokom perioda praćenja pacijenata registrovano je ukupno 9 MACCE.

Zaključak. Rezultati naše studije ukazuju na značaj proučavanja starosti i angiogeneze aspiriranog tromba STEMI pacijenata, kao i cirkulišućih i *in situ* angiogenih molekula uključenih u ovaj proces. Sagledavanje ovih faktora omogućava dobijanje novih informacija o kompleksnim patofiziološkim mehanizmima u osnovi koronarne tromboze, statusu koronarne mikrocirkulacije i predviđanje ishoda pacijenata nakon STEMI.

Ključne reči: tromb, akutni infarkt miokarda sa elevacijom ST-segmenta, primarna perkutana koronarna intervencija, aspiraciona trombektomija, vaskularni endotelni faktor rasta, angiogeneza tromba

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Kardiologija

Impact of circulating vascular endothelial growth factor level and the angiogenesis degree of the aspirated coronary thrombi on angiographic and clinical outcome of patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention

SUMMARY

Introduction. Coronary thrombus obtained by manual aspiration thrombectomy from patients with acute ST-elevation myocardial infarction (STEMI) treated with primary percutaneous coronary intervention (pPCI) represents convenient material for studying pathophysiologic mechanisms underlying coronary thrombosis, duration of ischemia in STEMI patients, and the degree of thrombus angiogenesis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the key molecule involved in angiogenesis, which can be measured in the blood of STEMI patients. Level of circulating VEGF could reflect compensatory angiogenic response of ischemic myocardium and represent an important prognostic factor for patients with myocardial infarction.

Aim. The aim of this study was to determine the age and the angiogenesis level of aspirated thrombi, and to measure the level of circulating serum VEGF (sVEGF) in STEMI patients treated with pPCI with aspiration thrombectomy, exploring their impact of angiographic and clinical outcomes of STEMI patients.

Methods. Study included 100 consecutive STEMI patients with successful thrombectomy during pPCI obtaining adequate amount of material for further pathohistologic analysis ($>1 \text{ mm}^3$). Aspirated thrombotic material was analyzed by light and confocal microscopy. Age of the aspirated thrombus (fresh, lytic and organized) was determined by hematoxylin-eosin staining. The degree of angiogenesis was assessed by immunohistochemical staining using endothelial cell (EC) markers (CD34 and CD31), and graded as single EC, clusters and EC microvessels. sVEGF was measured during the hospital admission before pPCI and detected by ELISA. Angiographic outcomes were defined as myocardial blush grade (MBG) on final angiogram, with assessing the degree of resolution of ST-elevation (STR) on electrocardiogram 60 minutes after pPCI. Clinical outcomes were evaluated by the final infarct size estimated by the maximum levels of released cardiospecific enzymes during

hospitalization (CK_{max} , troponin I_{max}), echocardiographic parameters during the initial hospitalization and after 6-months follow-up (EDVI, ESVI, LVEF and WMSI), and the incidence of major adverse cardiovascular and cerebrovascular events (MACCE) during the 6-months follow-up (death, reinfarction, stroke, target vessel revascularization, stent thrombosis, hospitalization due to heart failure).

Results. In the majority of patients (58%) aspirated thrombus was histologically older than 24h, although the time from the pain onset to pPCI was up to 12h. Total ischemic time was significantly longer in patients with aspirated older thrombi compared to fresh thrombi (220 vs. 150 minutes, $p=0,019$). Aspiration of older thrombi was associated with antecedent angina ($\chi^2=6,542$, $p=0,011$).

Angiogenesis was present in 69,3% aspirated thrombi. Early ECs were most frequently organized as clusters (50,8%), less frequently as single ECs (32,8%), rarely as microvessels (16,4%). $CD34^+CD31^+$ ECs became more organized with the thrombus age, at the same time not showing association with total ischemic time ($p=0,210$). All organized thrombi showed some extent of angiogenesis, ECs were present in 75% of lytic thrombi, while 50% of fresh thrombi contained ECs.

Early EC present in aspirated thrombi showed co-expression of CD34/CD31 and D2-40, as well as LYVE-1 and VEGFR3. This is the first case of D2-40 immunoreactivity of vascular ECs under non-tumorous conditions.

Patients with higher levels of sVEGF had longer total ischemic time compared to patients with lower sVEGF (270 vs. 170 minutes, $p=0,03$). Patients with aspirated organized thrombi more frequently had higher sVEGF levels (91,9%) than patients with fresh (43,2%) and lytic thrombi (45%). Thrombus angiogenesis was followed by higher sVEGF levels compared to patients without thrombotic ECs (232,88 vs. 150,87 pg/ml, $p=0,039$).

TIMI 3 flow after thrombus aspiration was more frequently registered when fresh thrombi were aspirated, compared to aspiration of older thrombotic material (67,6% vs. 45,1%, $p=0,037$). Patients with thrombus angiogenesis had MBG 0/1 more frequently than patients with thrombi without ECs (31,1% vs. 7,4%, $p=0,016$). Distal embolization was more common when thrombi with large surface area were aspirated ($p=0,005$), with

no difference in the hemorrhage or fibrin content, thrombus age and presence of angiogenesis.

Angiographic characteristics (infarct artery, multivessel disease, TIMI flow, Rentrop collateral grade, MBG and distal embolization) showed no significant difference in patients with lower or higher sVEGF values. There was tendency towards correlation between lower sVEGF levels and higher basal SYNTAX score ($\rho=-0,207$, $p=0,053$).

CK_{max} and troponin I_{max} showed no association with thrombus color, age, presence and the degree of angiogenesis, nor with sVEGF levels.

Changes in echocardiographic parameters (ESVI, EDVI, LVEF, WMSI) after 6 months follow-up, and left ventricle remodelling showed no significant difference when compared with thrombus color (red or white), thrombus age and angiogenesis. There was tendency towards higher LVEF recovery in patients with single ECs compared to EC clusters and microvessles ($p=0,063$), while other echocardiographic parameters (EDVI, ESVI and WMSI) showed no statistical difference according to angiogenesis degree.

sVEGF values showed no correlation with percentage change in echocardiographic parameters during follow-up period: EDVI ($\rho=0,025$, $p=0,8320$), ESVI ($\rho=-0,016$, $p=0,891$), LVEF ($\rho=-0,157$, $p=0,189$) and WMSI ($\rho=0,694$, $p=0,225$). No significant difference in left ventricle remodelling was observed in patients with different sVEGF levels. During the follow-up period total of 9 MACCEs were registered.

Conculsion. Our results emphasize the significance of investigating the age and angiogenesis of thrombus aspirated from STEMI patients, and exploring angiogenic factors involved in this process. They could provide new information on complex pathophysiologic mechanisms underlying coronary thrombosis, coronary microcirculation status and outcomes in STEMI patients.

Keywords: thrombus, acute ST-elevation myocardial infarction, primary percutaneous coronary intervention, aspiration thrombectomy, vascular endothelial growth factor, thrombus angiogenesis

Scientific field: Medicine

Specific scientific field: Cardiology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Akutni infarkt miokarda sa elevacijom ST segmenta (STEMI).....	1
1.2. Lečenje STEMI pacijenata	2
1.3. Aspiracija koronarnog tromba tokom primarne PCI	11
1.4. Analiza aspiriranog koronarnog tromba nakon primarne PCI.....	16
1.4.1. Svetlosna mikroskopija.....	17
1.4.2. Imunohistohemijska analiza	19
1.4.3. Angiogeneza tromba	20
1.4.4. Elektronska mikroskopija	21
1.5. Marker endotelnih ćelija.....	24
1.5.1. CD34.....	24
1.5.2. CD31.....	25
1.5.3. D2-40	25
1.5.4. VEGFR3	26
1.5.5. LYVE-1	27
1.6. Vaskularni endotelni faktor rasta.....	27
1.6.1. VEGF-A i njegovi receptori	28
1.6.2. VEGF i angiogeneza tokom ishemije miokarda	29
1.6.3. Prognostički značaj VEGF-a kod koronarne bolesti srca	31
2. CILJEVI RADA	34
3. MATERIJAL I METODE	35
3.1. Dizajn studije.....	35
3.2. Ispitivana populacija.....	35
3.2.1. Kriterijumi za uključivanje u istraživanje:.....	36
3.1.2. Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja	36

3.3.	Podaci o ispitanicima.....	37
3.4.	Lečenje bolesnika	37
3.4.1.	Primarna perkutana kornarna intervencija	37
3.4.2.	Medikamentno lečenje	38
3.5.	Analiza trombotičnog materijala	38
3.5.1.	Morfometrijska analiza	39
3.5.2.	Starost aspiriranog tromba	39
3.5.3.	Imunohistohemijska analiza	40
3.5.4.	Dvostruko imunofluorescentno bojenje	43
3.6.	Određivanje vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF	44
3.7.	Angiografski ishodi	45
3.8.	Elektrokardiografska analiza	46
3.9.	Merenje vrednosti kardiospecifičnih enzima.....	46
3.10.	Ehokardiografski pregled.....	47
3.11.	Neželjeni kardiovaskularni događaji	47
3.12.	Definicije	48
3.13.	Etički aspekti istraživanja	50
3.14.	Statistička analiza	50
4.	REZULTATI	51
4.1.	Ispitivana populacija	51
4.2.	Kliničke karakteristike pacijenata	51
4.3.	Makroskopski izgled tromba	52
4.4.	Mikroskopski izgled tromba	55
4.4.1.	Morfometrijska analiza	55
4.4.2.	Starost aspiriranog tromba	58
4.4.3.	Imunohistohemijska analiza	70

4.4.3.1.	Ekspresija CD34 i CD31.....	70
4.4.3.2.	Ekspresija D2-40.....	80
4.4.3.3.	Ekspresija VEGF	82
4.4.4.	Dvostruka imunofluorescenca	84
4.5.	Vrednosti serumskog VEGF-a.....	87
4.5.1.	VEGF i starost aspiriranog tromba	89
4.5.2.	VEGF i angiogeneza tromba.....	90
4.6.	Angiografske karakteristike pacijenata.....	91
4.6.1.	Angiografske karakteristike i starost tromba	94
4.6.2.	Angiografske karakteristike i angiogeneza tromba.....	98
4.6.3.	Angiografske karakteristike i vrednost VEGF-a.....	101
4.7.	EKG analiza.....	103
4.7.1.	STR u ispitivanoj populaciji	103
4.7.2.	STR i karakteristike aspiriranog tromba	106
4.8.	Enzimski procenjena veličina infarkta miokarda	108
4.9.	Ehokardiografska analiza.....	110
4.10.	Neželjeni kardiovaskularni događaji (MACCE)	116
5.	DISKUSIJA	117
6.	ZAKLJUČCI	137
7.	LITERATURA	141

1. UVOD

1.1. Akutni infarkt miokarda sa elevacijom ST segmenta (STEMI)

Akutni infarkt miokarda sa elevacijom ST segmenta (STEMI) predstavlja klinički oblik koronarne bolesti srca gde usled ruptуре, fisure ili erozije aterosklerotskog plaka dolazi do akutne koronarne tromboze i okluzije koronarne arterije, što rezultira ishemijskom nekrozom miokarda (1). Najčešći uzrok tromboze kod STEMI pacijenata predstavlja ruptura fibrozne kape aterosklerotskog plaka. Plak rupturira na mestima gde je fibrozna kapa najtanja i gde se nalazi najveći broj penastih ćelija i makrofaga, što je obično na ivicama plaka (2). Smatra se da rupturi aterosklerotskog plaka doprinose dva ključna procesa: (a) postepeno smanjenje broja glatkomišićnih ćelija u fibroznoj kapi, i (b) akumulacija makrofaga u plaku. Akumulirani makrofazi sekretuju matriksne metaloproteinaze koje dovode do enzimske digestije i istanjivanja fibroznog pokrivača aterosklerotskog plaka, čemu pogoduje istovremeno smanjenje broja glatkomišićnih ćelija (3).

Nakon ruptуре aterosklerotskog plaka trombogeno lipidno jezgro i tkivni faktor se izlažu cirkulišućoj krvi, što aktivira koagulacionu kaskadu (4). Inicijalno se formiraju nestabilni agregati trombocita, što može dovesti do intermitentnih prekida koronarnog protoka krvi uz moguću distalnu embolizaciju (5). Fibrin stabilizuje agregate trombocita formirajući tzv. bele trombe, bogate trombocitima i fibrinom. Beli trombi se najčešće nalaze blizu mesta ruptуре aterosklerotskog plaka. Dalja opstrukcija protoka krvi dovodi do propagacije tromba proksimalo i distalno od okluzije, kada nastaje tzv. crveni tromb. Ovaj tromb je bogat eritrocitima koji se smenjuju sa regionima fibrina, trombocita i inflamatornih ćelija zarobljenih u fibrinskoj mreži (6).

U daljem toku dolazi do organizacije trombotičnog materijala sa urastanjem vezivnog tkiva, glatkomišićnih ćelija i deponovanja kolagena s jedne strane, kao i urastanja endotelnih ćelija, formiranja kapilarnih petlji i rekanalizacije tromba s druge strane (7). Ukoliko nastali tromb nije u potpunosti okludirao koronarnu arteriju, tada je reč o

subokluzivnom trombu koji se prekriva endotelnim ćelijama i dovodi do fiksne stenozе koronarne arterije.

Epizode subokluzivne tromboze često prolaze asimptomatski, organizacijom trombotičnog materijala i formiranjem muralnog tromba. Ukoliko je u više navrata nastupio intermitentni prekid u protoku krvi, koronarni tromb će pokazivati slojevitu strukturu, što ukazuje na ponovne epizode rasta tromba (8,9).

Učestalost asimptomatskih tzv. *silent* ruptura plaka nije poznata. Histološke studije su pokazale da pojava organizacije i zarastanja rupturiranog plaka korelira sa stepenom suženja lumena arterije. Organizovani rupturirani plakovi registruju se kod 16% lezija gde je stenozа <20%, kod 19% lezija sa stenozom između 21-50%, kao i kod 73% lezija sa stenozom >50% (10). Patohistološke analize obdukcionog materijala osoba koje su imale iznenadnu srčanu smrt su pokazale su da veću stenozu arterije prati veći broj zalečenih rupturiranih plakova (11). Takođe, kod većine ovih osoba se pronalaze stariji, organizovani trombi, što ukazuje da komplikacije aterosklerotskog plaka i trombogeneza traju nekoliko dana ili čak nedelja pre iznenadnog, fatalnog srčanog događaja (11-13).

Ruptura aterosklerotskog koronarnog plaka superponirana okluzivnim trombom najčešće rezultira kliničkom prezentacijom STEMI, uz tipičan anginozni bol u grudima, perzistentnu elevaciju ST-segmenta ili novonastali blok leve grane na elektrokardiogramu, i oslobađanje kardiospecifičnih enzima u krvotok. Vreme od rupture aterosklerotskog plaka do pojave prvih simptoma STEMI je varijabilno (14). Sama ruptura predstavlja asimptomatski proces, a prati je tromboza različitog obima koja se često ne može predvideti. Na količinu formiranog trombotičnog materijala utiču elementi klasične Virhovljeve trijade: hiperkoagulabilnost, oštećenje krvnog suda i hemodinamske promene.

1.2. Lečenje STEMI pacijenata

Terapija STEMI pacijenata podrazumeva što ranije otvaranje infarktne koronarne arterije uz postizanje adekvatne reperfuzije miokarda. Lečenje je moguće izvesti

mehaničkim putem (primarnom perkutanom koronarnom intervencijom), ili farmakološkim putem (primenom trombolitičke terapije). Ključni faktor u lečenju ovih pacijenata predstavlja rano dijagnostikovanje STEMI, uz što ranije snimanje 12-kanalnog elektrokardiograma (EKG). Na postojanje STEMI ukazuje pojava bola u grudima koji traje bar 20 minuta i ne prolazi na primenu nitroglicerina, uz moguću iradijaciju duž leve ruke, u vrat i vilicu, kao i tipične promene na EKG-u. Prema univerzalnoj definiciji infarkta miokarda, dijagnostička elevacija ST-segmenta (kod pacijenata bez hipertrofije leve komore i bloka leve grane Hisovog snopa – LBBB, engl. *left bundle branch block*) podrazumeva novonastalu elevaciju ST segmenta u nivou J tačke u najmanje dva susedna odvoda ≥ 2 mm (0.2 mV) kod muškaraca, odnosno ≥ 1.5 mm (0.15 mV) kod žena u V2–V3 prekordijalnim odvodima, i/ili ≥ 1 mm (0.1 mV) u drugim susednim prekordijalnim ili ekstremitetnim odvodima (1).

Primena reperfuzione terapije u što kraćem vremenskom periodu od započinjanja simptoma STEMI smanjuje mogućnost komplikacija i povećava korist od ove terapije (15). Savremeno lečenje STEMI pacijenata teži dobro organizovanoj zdravstvenoj mreži i infrastrukturi, uz trijažu pacijenata i postavljanje STEMI dijagnoze od strane službe hitne medicinske pomoći. Nastoji se da se STEMI pacijenti transportuju direktno u salu za kateterizaciju, uz zaobilazanje centara bez mogućnosti PCI (tzv. *non-PCI* centri). Ukoliko se ne može postići pravovremena PCI, potrebno je razmotriti primenu fibrinolitičke terapije. Međutim, i dalje postoje neslaganja po pitanju prihvatljivog vremena do reperfuzije pre donošenja odluke o primeni fibrinolitika (16,17). Pokazalo se da svakih 30 minuta kašnjenja u lečenju STEMI pacijenata povećava rizik od jednogodišnjeg morlitaliteta (RR=1,05-1,07) (18-21). S obzirom da kašnjenje reperfuzione terapije u potpunosti nije moguće eliminisati, potrebno ga je svesti na najmanju moguću meru („vreme je miokard“).

Kašnjenje bolesnika (engl. *patient delay*) podrazumeva vreme od pojave bola u grudima do prvog medicinskog kontakta, što može biti pozivanje službe hitne medicinske pomoći, prvi kontakt sa doktorom ili nekim od članova medicinskog tima u vanbolničkim uslovima, kao i odlazak u zdravstvenu ustanovu. Pacijenti sa STEMI se najčešće obraćaju za medicinsku pomoć nakon 1,5 – 2 sata od početka simptoma (22,23). Duže kašnjenje pacijenata je češće prisutno kod žena, starijih osoba,

visokorizičnih pacijenata i pacijenata sa težom kliničkom slikom (22,24,25). Do prvog medicinskog kontakta duže čekaju i pacijenti kod kojih se simptomi razlikuju od očekivane simptomatologije akutnog infarkta miokarda sa izraženim, jakim bolom u grudima (26). Približno trećina pacijenata ima simptome infarkta miokarda koji ne podrazumevaju tipičan bol u grudima (1). Čest razlog za kašnjenje pacijenata je pokušaj samolečenja medikamentnima i/ili pomoćnim lekovitim sredstvima (27), kao i mišljenje da će simptomi STEMI proći i da nisu dovoljno ozbiljni za odlazak lekaru (27-29). Takođe, pacijenti često nisu dovoljno obavešteni koliku korist donosi rana reperfuziona terapija i pozivanje službe hitne medicinske pomoći ubrzo nakon pojave prvih simptoma STEMI.

Uzrok kašnjenja prilikom lečenja STEMI pacijenata može biti i organizacija zdravstvenog sistema (tzv. kašnjenje zdravstvenog sistema, engl. *system delay*). Kašnjenje zdravstvenog sistema predstavlja vreme od prvog medicinskog kontakta do započinjanja reperfuzije miokarda. Na ovaj vremenski interval je moguće lakše uticati i skratiti ga organizacijom zdravstvene infrastrukture, nego kašnjenje samih pacijenata. Kod svih STEMI pacijenata sa peizistentnom elevacijom ST-segmenta ili novonastalim LBBB kod kojih bol u grudima traje do 12 sati indikovana je reperfuzija (Tabela 1). Ukoliko je vreme od prvog medicinskog kontakta do reperfuzije do 90 minuta, savetuje se transport bolesnika službom hitne medicinske pomoći do sale za kateterizaciju. U slučaju da je očekivano vreme transporta do najbliže PCI-ustanove >120 minuta, savetuje se primena fibrinolitičke terapije.

Tabela 1. Preporuke za reperfuzionu terapiju STEMI pacijenata.

Preporuke	Klasa preporuke	Nivo dokaza
Primeniti reperfuzionu terapiju kod svih indikovanih STEMI pacijenata kada su simptomi počeli unutar prethodnih 12 h.	I	A
Primarna PCI je preporučeni metod reperfuzije ukoliko je izvode iskusni operatori u preporučeno vreme.	I	A
Direktan transport bolesnika službom hitne medicinske pomoći do zdravstvene ustanove koja izvodi primarnu PCI ukoliko je vreme od prvog medicinskog kontakta do reperfuzije \leq 90 minuta.	I	B
Ukoliko STEMI pacijenti inicijalno dođu ili su transportovani u centar koji ne radi PCI, savetuje se hitan transport u PCI-ustanovu ukoliko se proceni da je vreme od prvog medicinskog kontakta do reperfuzije \leq 120 minuta.	I	B
Primeniti fibrinolitičku terapiju kod STEMI pacijenata u ustanovama koje ne rade PCI ukoliko je očekivani transport do PCI-centra $>$ 120 minuta (ukoliko nema kontraindikacija za fibrinolizu).	I	B
U slučaju da je fibrinolitička terapija metod reperfuzije, primeniti je unutar 30 minuta od dolaska u bolnicu.	I	B
Razmotriti primenu reperfuzione terapije kod STEMI pacijenata kada su simptomi počeli unutar prethodnih 12-24 h, a postoje klinički i/ili EKG dokazi o postojanju ishemije. Primarna PCI je preporučeni metod reperfuzije.	IIa	B

Modifikovano prema: O’Gara et al. 2013 (Ref 15).

Primarna PCI predstavlja reperfuzionu terapiju izbora kod STEMI pacijenata, za koju je potreban dobro obučeni i iskusan interventni tim. Ustanove kod kojih je moguće izvođenje ovih intervencija tokom 24 sata svakog dana u nedelji mogu imati primarnu PCI kao standardan vid lečenja STEMI pacijenata. Primarna PCI je efikasan metod lečenja koji obezbeđuje prohodnost koronarne arterije uz izbegavanje hemoragijskog rizika koji prati fibrinolizu. Randomizovane kliničke studije koje su poredile

pravovremenu primarnu PCI sa intrahospitalnom trombolizom pokazale su superiornost perkutanog lečenja u odnosu na farmakološku reperfuziju (30-34). U slučaju da se primarna PCI ne može izvesti unutar 120 minuta od prvog medicinskog kontakta, potrebno je razmotriti fibrinolitičku terapiju, naročito ukoliko je moguća primena u prehospitalnim uslovima (31,34,35) i unutar 120 minuta od početka simptoma (36,37).

Procenjuje se da oko 50% STEMI pacijenata ima višesudovnu koronarnu bolest (38,39). Američke preporuke za lečenje STEMI pacijenata iz 2013. godine savetuju da se tokom primarne PCI leči samo infarktne arterije (15) (Tabela 2). U ovim preporukama se navodi da je PCI lečenje višesudovne koronarne bolesti tokom akutne faze STEMI opravdano jedino u slučajevima kardiogenog šoka sa multiplim, kritičnim stenozama ($\geq 90\%$ dijametra lumena krvnog suda) ili kod izuzetno nestabilnih lezija sa angiografskim znacima moguće tromboze ili disrupcije lezije, kao i kod perzistentne ishemije infarktne lezije nakon PCI. Međutim, kod pacijenata sa kardiogenim šokom i višesudovnom bolešću nije se savetovala rutinska ugradnja stentova u neinfarktne lezije bez kritičnih stenoza, već lečenje samo infarktne arterije.

Od objavljivanja ovih preporuka nekoliko randomizovanih kliničkih studija je ukazalo da lečenje višesudovne koronarne bolesti, bilo u vreme primarne PCI ili kao odložena, planirana (tzv. *staged*) procedura može biti korisno i bezbedno za STEMI pacijente (40-43).

Tabela 2. Preporuke za primenu primarne PCI kod STEMI pacijenata.

Preporuke	Klasa preporuke	Nivo dokaza
Primarna PCI je indikovana kod svih STEMI pacijenata unutar 12 h od početka ishemijskih simptoma	I	A
Primarna PCI je indikovana kod STEMI pacijenata unutar 12 h od početka ishemijskih simptoma kod kojih postoje kontraindikacije na fibrinolitičku terapiju, bez obzira na kašnjenje od prvog medicinskog kontakta do reperfuzije	I	B
Primarna PCI je indikovana kod STEMI pacijenata u kardiogenom šoku ili sa teško akutnom srčanom insuficijencijom, bez obzira na kašnjenje od pojave prvih simptoma infarkta miokarda	I	B
Razmotriti primarnu PCI kod STEMI pacijenata nakon 12 – 24 h od početka simptoma, ukoliko postoje klinički i/ili EKG dokazi o postojanju ishemije	IIa	B
PCI neinfarktne arterije nije indikovana tokom primarne PCI kod hemodinamski stabilnih STEMI pacijenata	III	B

Modifikovano prema: O’Gara et al. 2013 (Ref 15).

Jedna od njih je PRAMI (*Preventive Angioplasty in Acute Myocardial Infarction*) studija sa 465 pacijenata, gde se pokazalo da značajno manji broj pacijenata kod kojih je lečena višesudovna bolest tokom primarne PCI ima neželjene događaje od interesa (smrtni ishod srčanog uzroka, nefatalni infarkt miokarda ili refraktornu anginu) u poređenju sa lečenjem samo infarktne arterije tokom primarne PCI (9% vs. 22%) (42). Slično je registrovano u CvLPRIT studiji na manjem broju ispitanika (n=296). Ovde je kompozitni primarni cilj (smrtni ishod, reinfarkt miokarda, srčana insuficijencija i revaskularizacija usled ishemije) nakon 12 meseci od primarne PCI registrovan kod 10% pacijenata kojima je inicijalno lečena višesudovna koronarna bolest u odnosu na 21% pacijenata gde je lečena samo infarktne arterije (41). U DANAMI 3 PRIMULTI studija (*Third Danish Study of Optimal Acute Treatment of Patients with ST-segment Elevation Myocardial Infarction*) je poređeno lečenje višesudovne koronarne bolesti odloženom procedurom pomoću FFR-procena značajnosti stenozne lezije (FFR – frakciona rezerva protoka) i lečenje samo infarktne lezije STEMI pacijenata (40).

Pokazalo se da je kompozitni primarni cilj studije (ukupan mortalitet, nefatalni infarkt miokarda ili revaskularizacija neinfarktne arterije usled ishemije) registrovan značajno češće kod pacijenata gde je lečena samo infarktne arterije (22%) u poređenju sa odloženim lečenjem višesudovne bolesti (13%). Još jedna randomizovana studija iz 2015. godine, PRAGUE-13 (*Primary Angioplasty in Patients Transferred From General Community Hospitals to Specialized PTCA Units With or Without Emergency Thrombolysis*) je pokazala da odložena revaskularizacija (3-40 dana od primarne PCI) kod STEMI pacijenata sa višesudovnom bolešću dovodi do slične učestalosti neželjenih događaja (ukupnog mortaliteta, nefatalnog infarkta miokarda i moždanog udara) kao i revaskularizacija samo infarktne arterije (43).

Navedeni rezultati su uticali na promenu preporuka o revaskularizaciji višesudovne koronarne bolesti tokom primarne PCI iz klase III, gde se ne savetuje ova intervencija, u klasu IIb. Dopuna preporuka o primeni primarne PCI u lečenju STEMI pacijenata iz 2015. godine sada savetuje da se razmotri PCI neinfarktne arterije kod hemodinamski stabilnih STEMI pacijenata sa višesudovnom bolešću tokom primarne PCI ili kao planirana (*staged*) procedura (44). Radna grupa koja je pisala ove preporuke ističe da se ova promena odnosi na rutinsko lečenje svih STEMI pacijenata sa višesudovnom bolešću. Još uvek nema dovoljno podataka iz opservacionih i randomizovanih studija o optimalnom vremenu izvođenja planirane PCI intervencije kod višesudovne bolesti STEMI pacijenata. Preporuke o lečenju neinfarktne arterije STEMI pacijenata pre otpusta iz bolnice su ostale nepromenjene (Tabela 3).

Tabela 3. Preporuke za lečenje neinfarktних arterija STEMI pacijenata pre otpusta iz bolnice.

Preporuke	Klasa preporuke	Nivo dokaza
PCI lečenje neinfarktних arterija STEMI pacijenata je indikovano u vreme odvojeno od primarne PCI u slučaju pojave spontanih simptoma ishemije miokarda.	I	A
Razmotriti PCI lečenje neinfarktних arterija STEMI pacijenata u vreme odvojeno od primarne PCI kod pacijenata sa umerenim ili visokorizičnim nalazom prilikom neinvazivnog testiranja.	IIa	B

Modifikovano prema: O’Gara et al. 2013 (Ref 15).

Tokom primarne PCI se savetuje ugradnja koronarnih stentova (metalnih ili stentova sa oslobađanjem leka) u zavisnosti od karakteristika pacijenata i mogućnosti uzimanja dvojne antiagregacione terapije (Tabela 4).

Tabela 4. Primena stentova kod STEMI pacijenata.

Preporuke	Klasa preporuke	Nivo dokaza
Ugradnja stentova (metalnih ili sa oslobađanjem leka) tokom primarne PCI korisna je za STEMI pacijente.	I	A
Primena metalnih stentova se savetuje kod pacijenata sa velikim rizikom od krvarenja, kada nije izvodljiva primena dvojne antiagregacione terapije tokom godinu dana i kod očekivane ili invazivne hirurške intervencije naredne godine.	I	C
Ne savetuje se primena stentova sa oslobađanjem leka kod pacijenata koji ne tolerišu ili nije izvodljiva duža primena dvojne antiagregacione terapije zbog povećanog rizika od tromboze stenta	III	B

Modifikovano prema: O’Gara et al. 2013 (Ref 15).

Kod svih STEMI pacijenata upućenih na primarnu PCI savetuje se što ranija primena dvojne antiagregacione terapije (aspirin i blokator ADP receptora) i parenteralnog antikoagulansa pre angiografije (Tabela 5). Kod pojedinih grupa STEMI pacijenata savetuje se primena GPIIb/IIIa inhibitora, što je odluka operatora tokom primarne PCI.

Tabela 5. Antitrombocitna terapija kod STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI.

Preporuke	Klasa preporuke	Nivo dokaza
Dati aspirin u dozi od 162 – 325 mg pre primarne PCI.	I	B
Nakon primarne PCI nastaviti sa primenom aspirina doživotno.	I	A
Dati punu dozu inhibitora P2Y ₁₂ receptora STEMI pacijentima što ranije ili tokom primarne PCI:		
• Klopido­grel 600 mg, ili	I	B
• Prasugrel 60 mg, ili	I	B
• Tikagrelor 180 mg	I	B
Nastaviti sa primenom inhibitora P2Y ₁₂ receptora kod STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI sa implantacijom stenta (metalnog ili sa oslobađanjem leka) u sledećim dozama održavanja:		
• Klopido­grel 75 mg/dan, ili	I	B
• Prasugrel 10 mg/dan, ili	I	B
• Tikagrelor 90 mg, dva puta dnevno	I	B
Kod određenih STEMI pacijenata koji dobijaju nefrakcionisani heparin razmotriti primenu intravenskih inhibitora GPIIb/IIIa receptora:	IIa	
• abciximab, ili	IIa	A
• tirofiban, veća doza u bolusu, ili	IIa	B
• eptifibatid, dvostruki bolus	IIa	B
Razmotriti primenu intravenskih inhibitora GPIIb/IIIa receptora kod STEMI pacijenata upućenih na primarnu PCI pre dolaska u salu za kateterizaciju.	IIb	B
Razmotriti intrakoronarnu primenu abciximaba STEMI pacijentima tokom primarne PCI.	IIb	B
Razmotriti primenu inhibitora P2Y ₁₂ receptora nakon godinu dana od ugradnje stenta sa oslobađanjem leka.	IIb	B
Ne davati prasugrel pacijentima sa prethodnim moždanim udarom ili tranzitornim ishemijskim atakom.	III	B

Modifikovano prema: O’Gara et al. 2013 (Ref 15).

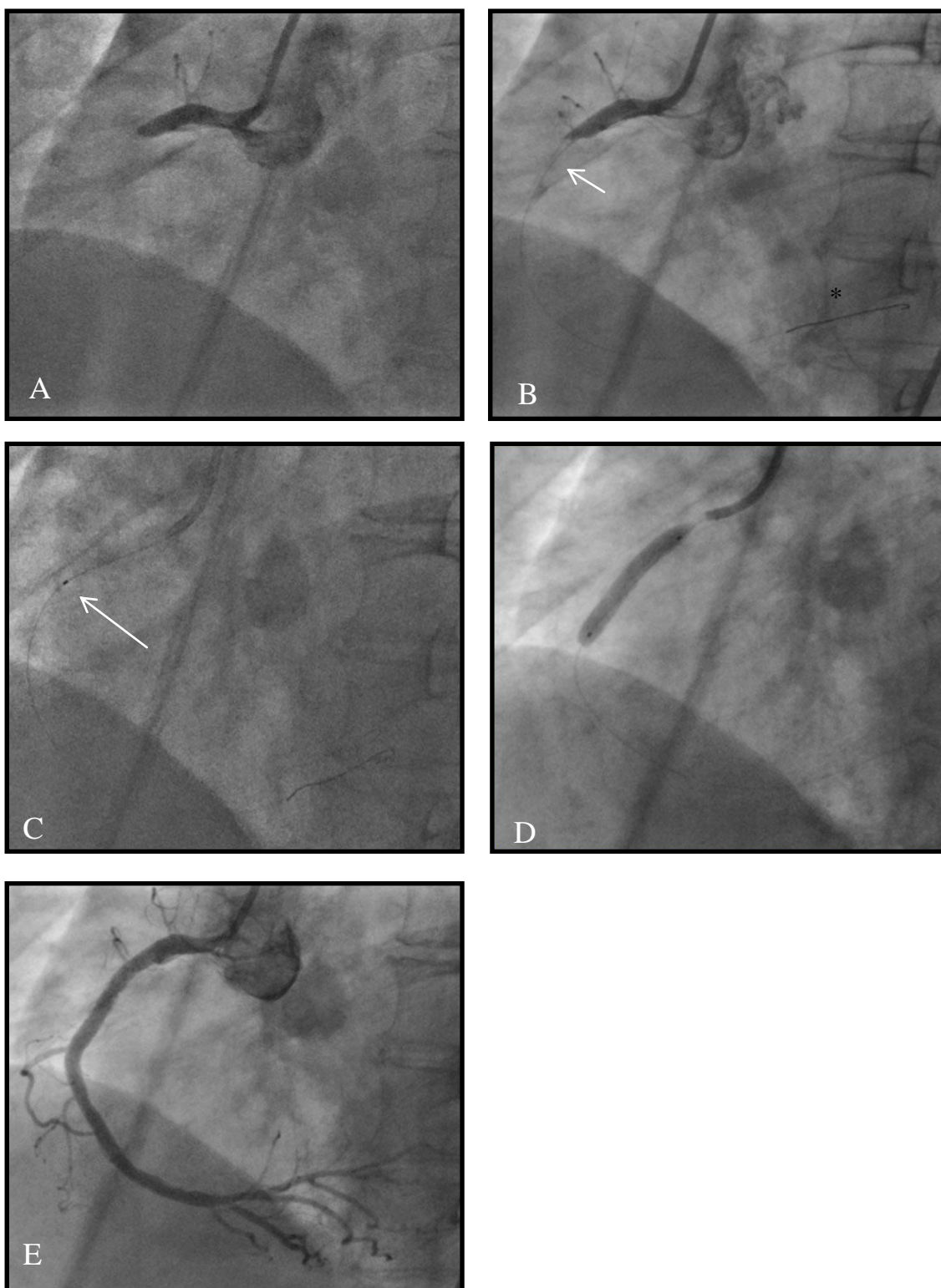
1.3. Aspiracija koronarnog tromba tokom primarne PCI

Glavni cilj lečenja STEMI pacijenata je što ranije uspostavljanje normalnog koronarnog protoka uz optimalnu perfuziju miokarda. Tokom primarne PCI moguće je odvajanje delova aterosklerotskog plaka i trombotičnog materijala uz distalnu embolizaciju koronarne arterije, što vodi suboptimalnoj perfuziji miokarda u teritoriji vaskularizacije infarktne arterije. Smanjenje mikrovaskularne perfuzije rezultira većim infarktom, manjom ejectionom frakcijom leve komore i većim mortalitetom (45-47). Jedan od načina prevencije distalne embolizacije i poboljšanja mikrovaskularne perfuzije pre implantacije stenta je primena manuelne aspiracione trombektomije.

Inicijalno je nekoliko manjih randomizovanih studija pokazalo da primena aspiracione trombektomije tokom primarne PCI vodi većoj učestalosti optimalne perfuzije miokarda u poređenju sa standardnom PCI (48-50). TAPAS (*Thrombus Aspiration during Percutaneous coronary intervention in Acute myocardial infarction*) studija sa 1071 konsekutivnih STEMI pacijenata randomizovanih na grupu lečenu primarnom PCI uz aspiracionu trombektomiju ili grupu lečenu konvencionalnom PCI pokazala je da aspiraciona trombektomija dovodi do bolje miokardne perfuzije i boljih kliničkih ishoda ovih pacijenata (51,52). Pacijenti kod kojih je učinjena aspiracija tromba imali su ređu pojavu stepena miokardnog ispiranja 0 i 1 (MBG0/1) u poređenju sa standardnom primarnom PCI (17,1% vs. 26,3%). Kompletna rezolucija elevacije ST-segmenta (STR) registrovana je značajno češće u grupi sa aspiracionom trombektomijom (56,6% vs. 44,2%). Takođe, pojava smrtnog ishoda srčanog uzroka tokom godinu dana od primarne PCI bila je značajno ređa kod pacijenata u aspiracionoj grupi u odnosu na PCI lečenje bez aspiracije tromba (3,6% vs. 6,7%). Nakon TAPAS studije, pozitivni rezultati EXPIRA studije (53) i meta-analize dotadašnjih randomizovanih studija (54) su u najvećoj meri doprineli da manuelna aspiraciona trombektomija dobije klasu IIa (nivo dokaza B) u evropskim preporukama iz 2012. godine (55) i američkim preporukama iz 2013. godine za lečenje STEMI pacijenata (15). Ovo podrazumeva da je tokom lečenja STEMI pacijenata primarnom PCI indikovano razmotriti primenu manuelne aspiracione trombektomije.

Usledili su negativni rezultati tri velike multicentrične studije o primeni manuelne aspiracione trombektomije tokom primarne PCI (56-59). INFUSE-AMI (*Intracoronary Abciximab in STEMI patients*) studija je pokazala da primena aspiracione trombektomije pre primarne PCI ne smanjuje veličinu infarkta kod pacijenata sa prednjim infarktom i okluzijom proksimalnog ili medijalnog segmenta LAD (56). Rezultati TASTE (*Thrombus Aspiration During ST-Segment Elevation Myocardial Infarction*) studije (57,58) sa ukupno 7244 randomizovanih STEMI pacijenata pokazali su da izvođenje aspiracione trombektomije pre standardne primarne PCI ne smanjuje mortalitet nakon 30 dana i godinu dana u poređenju sa klasičnom primarnom PCI. Takođe, istraživači nisu registrovali razlike u učestalosti reinfarkta miokarda, tromboze stenta, revaskularizacije prethodno lečene arterije i ukupne učestalosti navedenih neželjenih događaja. TOTAL (*Trial of Routine Aspiration Thrombectomy With PCI Versus PCI Alone in Patients With STEMI*) studija je randomizovala do sada najveći broj STEMI pacijenata (n =10.732) koji su lečeni primarnom PCI uz rutinsku manuelnu aspiracionu trombektomiju ili samo primarnom PCI (59). Nakon 6 meseci nije uočena razlika u učestalosti neželjenih događaja između dve grupe pacijenata (ukupna učestalost smrtnog ishoda kardiovaskularnog uzroka, rekurentni infarkt miokarda, kardiogeni šok i NYHA IV klasa srčane insuficijencije). Nakon mesec dana praćenja registrovana je češća pojava moždanog udara u grupi lečenoj aspiracionom trombektomijom u poređenju sa standardnom primarnom PCI koja je dostigla statističku značajnost (0,7% vs. 0,3%, p=0,02). Meta-analiza iz 2015. godine koja je pored INFUSE-AMI, TASTE i TOTAL, obuhvatila još 14 kliničkih studija sa ukupno 20.960 STEMI pacijenata pokazala je da rutinska aspiraciona trombektomija ne smanjuje rizik od smrtnog ishoda, reinfarkta ili tromboze stenta (60).

Slika 1 pokazuje angiografski nalaz akutno okludirane RCA (Slika 1A), prolazak koronarne žice kroz intrakoronarni tromb (Slika 1B), manuelnu aspiraciju tromba (Slika 1C), implantaciju stenta u infarktnu leziju (Slika 1D) i finalni angiografski rezultat (Slika 1E).



Slika 1. Angiografski nalaz akutno okludirane RCA (A), uz angiografsku vizualizaciju intrakoronarnog tromba (B strelica) nakon uspešnog pozicioniranja koronarne žice u distalno korito RCA (B zvezdica). Slika 1C pokazuje manualnu trombaspiraciju (strelica označava distalni deo aspiracionog katetera), nakon čega sledi implantacija stenta (D) i finalni angiografski rezultat (E)

Rezultati publikovanih studija uticali su da se revidiraju važeći stavovi o primeni aspiracione trombektomije prilikom primarne PCI. Tako je tokom 2015. godine objavljena dopuna važećih američkih preporuka o primeni perkutane koronarne intervencije iz 2011. godine i preporuka za lečenje STEMI pacijenata iz 2013. godine (15,44,61). Umesto klase IIa, primena rutinske trombektomije u lečenju STEMI pacijenata je dobila klasu III preporuka (nivo dokaza A), što označava da nije korisna u lečenju STEMI pacijenata prilikom primarne PCI. U slučaju selektivne i tzv. *bailout* aspiracione trombektomije pre PCI, takođe je promenjena klasa preporuke iz IIa u IIb, što označava da korist od navedene intervencije nije dovoljno ustanovljena (Tabela 6).

Tabela 6. Izmena preporuka o primeni aspiracione trombektomije kod STEMI pacijenata.

2011/2013 Preporuke	2015 Dopuna preporuka
Klasa IIa, nivo dokaza B Razmotriti manuelnu aspiracionu trombektomiju tokom primarne PCI.	Klasa IIb, nivo dokaza C Nije ustanovljena korist od selektivne i <i>bailout</i> aspiracione trombektomije tokom primarne PCI.
	Klasa III: nije korisno Rutinska aspiraciona trombektomija nije korisna pre primarne PCI. (nova preporuka)

Modifikovano prema: Levine GN et al. 2015 (Ref 44).

Nova meta-analiza iz 2017. godine obuhvatila je individualne podatke o pacijentima iz TAPAS, TASTE i TOTAL studije (62). Još jednom se pokazalo da rutinska aspiraciona trombektomija ne poboljšava kliničke ishode STEMI pacijenata. U analizu je uključeno ukupno 18.306 STEMI pacijenata randomizovanih u aspiracionu grupu (n=9155) ili grupu kojoj nije učinjena aspiracija tokom primarne PCI (n=9151). Nije registrovana značajna razlika u učestalosti kardiovaskularnog smrtnog ishoda tokom 30 dana od PCI između ove dve grupe (2,4% u grupi sa aspiracijom vs. 2,9% u grupi sa standardnom PCI, p=0,06). Slično je registrovano kod pojave moždanog udara ili tranzitornog ishemijskog ataka (0,8% u aspiracionoj-grupi vs. 0,5% u PCI-grupi bez aspiracije, p=0,06), uz slične učestalosti reinfarkta miokarda, tromboze stenta, srčane insuficijencije i revaskularizacije infarktne arterije. Međutim, veću korist od aspiracije

ima podgrupa pacijenata sa većim trombotskim opterećenjem (TIMI gradus tromba ≥ 3), uz manje kardiovaskularnih smrtnih ishoda i cerebrovaskularnih događaja.

Prilikom interpretacije kontradiktornih rezultata studija sa manuelnom aspiracijom tromba tokom primarne PCI kod STEMI pacijenata potrebno je uzeti u obzir nekoliko ograničenja. Prvo, primarna PCI u velikoj meri smanjuje mortalitet STEMI pacijenata (63), stoga se ne može očekivati izraženo dodatno smanjenje mortaliteta dodavanjem rutinske manuelne aspiracije tromba ovoj proceduri. Mogla bi se očekivati veća korist od aspiracije koronarnog tromba kod visokorizičnih pacijenata, ali su oni često izostavljeni iz većine randomizovanih kliničkih studija usled strogih kriterijuma za uključivanje i isključivanje. Drugo, miokardna perfuzija nakon primarne PCI u kliničkim studijama se često procenjuje manje objektivnim angiografskim parametrom, MBG, koji najčešće procenjuju operatori u sali za kateterizaciju. Objektivnija procena reperfuzije je moguća stepenom rezolucije elevacije ST-segmenta (STR). Međutim, postoji varijabilnost u definisanju elevacije ST-segmenta i STR u različitim studijama. U nekim studijama se analiza ST segmenta vrši nakon 20, 60 ili 80 ms od J tačke, odnosno neposredno nakon procedure (64), ili 30, 60 (52,56,65) ili 90 minuta nakon procedure (53). Kompletna STR se može definisati kao $>50\%$ (50,66), odnosno $>70\%$ (52). Treće, najveća efikasnost manuelne aspiracije tromba se ogleda u pravilnom odabiru pacijenata. Iako patogeneza STEMI kod većina pacijenata podrazumeva rupturu aterosklerotskog plaka sa superponiranjem tromba, u kliničkoj praksi postoji velika varijabilnost trombotskog opterećenja pacijenata. Četvrto, uređaji za mehaničku aspiraciju tromba ne mogu u potpunosti sprečiti distalnu embolizaciju. Naprotiv, primena ovih uređaja može dovesti do embolizacije prilikom prolaska kroz trombotičnu leziju. Ovo je uočeno u AIMI studiji (67), sa paradoksalno većim infarktним regionom kod trombektomisanih pacijenata, što u velikoj meri zavisi od vrste uređaja za aspiraciju tromba. Konačno, bitno je napomenuti da distalna embolizacija nije jedini uzrok loše reperfuzije i većeg infarkta. Reperfuziono oštećenje (tzv. *no-reflow* fenomen), povećani otpor mikrocirkulacije usled opstrukcije neutrofilima i/ili konstrikcije arteriola, kao i progresivni edem miokarda, takođe doprinose suboptimalnoj perfuziji miokarda nakon PCI. Rana reperfuzija i dobra regionalna organizacija zdravstvene službe uz rano dijagnostikovanje, stratifikaciju rizika i direktni transport bolesnika u salu za

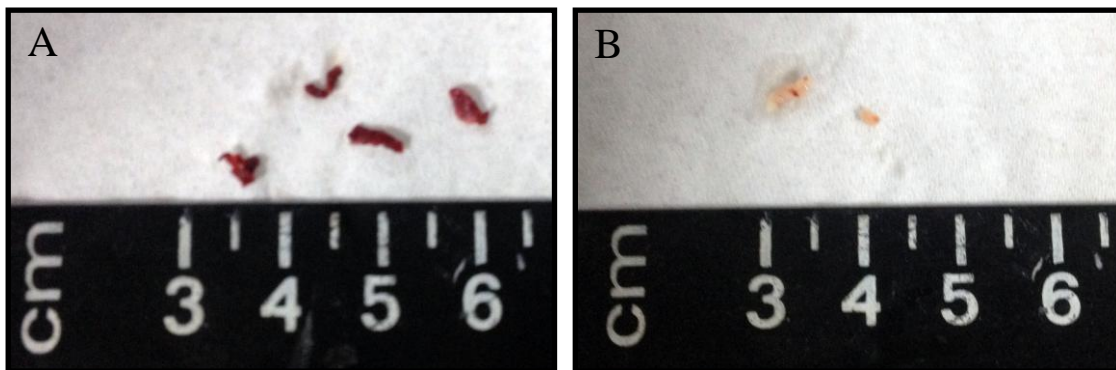
kateterizaciju mogu doprineti smanjenju veličine infarkta i njihovom boljem preživljavanju.

1.4. Analiza aspiriranog koronarnog tromba nakon primarne PCI

Aspiracija tromba tokom primarne PCI omogućava uzorkovanje trombotičnog materijala iz koronarne arterije koji je uzrok infarkta miokarda. Histološka analiza svežeg aspiriranog tromba tokom akutne faze STEMI može pomoći u razumevanju patofizioloških mehanizama koji leže u osnovi dinamičnog procesa koronarne tromboze tokom STEMI.

Boja aspiriranog tromba ukazuje na njegov sastav i može uticati na angiografske i kliničke ishode STEMI pacijenata. Makroskopski gledano, aspirirani koronarni trombi mogu biti crveni (bogati eritrocitima, Slika 2A), beli (predominantno sastavljeni od trombocita i fibrina, Slika 2B) i mešoviti, ukoliko sadrže crvena i bela polja. Poznato je da su beli aspirirani trombi u proseku manji od crvenih trombova, što se pokazalo i u TAPAS studiji gde su trombi bogati eritrocitima bili najčešće umerene veličine (0,5 – 2 mm) i veći od 2 mm (52). Uočeno je da aspiraciju crvenog tromba prati veća stopa mortaliteta u poređenju sa aspiracijom belog tromba nakon 30 dana od primarne PCI (10,1% vs. 0%), uz trend ka većoj učestalosti ozbiljnih neželjenih srčanih događaja (13,9% vs. 4,2%, $p = 0,10$) (68). Fokkema i sar. (69) su pokazali da sastav i veličina koronarnog tromba utiču na pojavu angiografski vidljive distalne embolizacije nakon PCI. Kod pacijenata sa angiografski vidljivom distalnom embolizacijom je uočeno da su aspirirani trombi veći i da sadrže više eritrocita u odnosu na trombe dobijene od pacijenata bez distalne embolizacije (69). Nalaz aspiriranih trombova bogatih eritrocitima prilikom primarne PCI kod STEMI pacijenata povezan je sa lošijom perfuzijom miokarda nakon PCI (inkompletnom STR i suboptimalnim MBG) (70).

Bolji ishodi koji prate nalaz belog tromba mogu se objasniti manjom veličinom belog tromba u odnosu na crveni, različitim sastavom ova dva tipa tromba (beli trombi sadrže manje ćelija u odnosu na crveni tromb), i kraćim ishemijskim vremenom koje se registruje kod aspiracije belog tromba. Moguće je da ove karakteristike doprinose manjoj učestalosti distalne embolizacije i boljoj perfuziji miokarda nakon PCI. Otuda važnost analize boje, veličine i sastava aspiriranog tromba tokom primarne PCI.



Slika 2. Aspiriran tromb crvene (Slika 2A) i bele boje (slika 2B).

Prilikom analize aspiriranog trombotičnog materijala potrebno je uzeti u obzir nekoliko ograničenja. Prvo, analizirani tromb ne predstavlja nužno celokupan trombotičan materijal prisutan u infarktnoj koronarnoj arteriji. Češće je u pitanju samo deo tromba koji postoji *in vivo*. Tokom dobijanja materijala moguća je fragmentacija, delimična aspiracija ili zaostajanje dela trombotičnog tkiva u aspiracionom kateteru. Drugo, prilikom aspiracije i prolaska tromba kroz kateter moguće je mehaničko oštećenje trombotičnog tkiva. Međutim, poznato je da trombi imaju odlične elastične karakteristike (71,72) i da ukoliko dođe do oštećenja, ono je uglavnom minimalno i zahvata periferni deo tromba (tzv. *crush* artefakt) uz očuvane ćelije vidljive na većini histoloških preparata. Treće, aspiriran trombotični materijal može biti stariji nego što se očekuje na osnovu dužine ishemijskog vremena (73). U tim situacijama moguće je superponiranje svežeg tromba na stariji trombotični materijal, što bi moglo predstavljati uzrok greške u određivanju starosti tromba.

1.4.1. Svetlosna mikroskopija

Trombi aspirirani iz koronarnih arterija STEMI pacijenata sadrže različitu količinu trombocita, eritrocita, inflamatornih ćelija, fibrina i ostataka aterosklerotskog plaka sa penastim ćelijama i holesterolskim kristalima (73-77). Smatra se da je ishemijsko vreme jedan od najvažnijih faktora koji korelira sa arhitekturom tromba.

Brojne studije su pokazale jasnu pozitivnu korelaciju ukupnog ishemijskog vremena sa starošću tromba, gde nalaz histološki starijeg tromba prati duže ishemijsko vreme

(64,73,78-80). Patofiziološka osnova STEMI pretpostavlja direktnu povezanost rupture plaka i superponiranja tromba sa pojavom akutne ishemije miokarda i pratećih simptoma (5). Međutim, obdukcioni patohistološki nalazi osoba koje su imale iznenadnu srčanu smrt ukazuju na postojanje dugotrajne koronarne tromboze, što potvrđuje da komplikacije plaka mogu biti asimptomatske nekoliko dana ili nedelja pre smrtnog ishoda (11,12).

Analiza aspiriranog koronarnog tromba olakšala je razumevanje i dobijanje novih informacija o procesu koronarne tromboze. Standardna patohistološka podela aspiriranog materijala na sveže (< 1. dana starosti), litičke (stare 1 – 5 dana) i organizovane trombe (> 5 dana starosti) pokazala je da u velikom broju slučajeva starost tromba prevazilazi trajanje akutnog bola kod STEMI pacijenata (73,77,78). Rittersma i sar. (77) su kod 51% STEMI pacijenata identifikovali trombotični materijal stariji od 24 h (litički i organizovan tromb), iako je kod svih pacijenata bol u grudima trajao do 6 h. Studije sa većim brojem ispitanika (preko 1000) poslatih na primarnu PCI unutar 12 sati od početka bola u grudima potvrdile su značajnu učestalost starijeg tromba (40%) prilikom aspiracije (73,78). Pokazalo se da duže vreme od pojave bola do primarne PCI (do 24 h) ne dovodi do povećanja broja aspiriranih starijih trombova (40%) (80). Navedeni rezultati podržavaju teoriju da kod većeg broja STEMI pacijenata nakon inicijalne ruptуре aterosklerotskog plaka dolazi do pokrivanja mesta ruptуре endotelnim ćelijama, zarastanja i nastanka muralnog tromba bez ispojava ishemijskih simptoma (tzv. *silent* ruptura plaka). Ovu teoriju takođe podržavaju Rittersma i sar. (77) koji nisu uočili povezanost starosti aspiriranog tromba sa pojavom preinfarktne angine pectoris.

U daljem toku bolesti dolazi do organizacije muralnog tromba sa urastanjem glatkomišićnih i endotelnih ćelija, što predstavlja čest obdukcioni nalaz (10-12). Organizovani muralni trombi mogu se u potpunosti inkorporirati u aterosklerotsku leziju, uz uspostavljanje koronarnog protoka. Kod pojedinih pacijenata može doći ponavljane tromboze i rasta tromba do okluzije lumena krvnog suda, što konačno rezultira akutnim koronarnim sindromom. Ovaj mehanizam objašnjava čest nalaz heterogenog tromba kod STEMI pacijenata, odnosno tromba koji sadrži elemente različite histološke starosti (svež, litički i organizovan) (64,73,77,78,80). U tim slučajevima se najčešće viđa svež tromb superponiran na starije trombotično tkivo.

Starost tromba može uticati na perfuziju miokarda nakon primarne PCI. Tako se angiografski vidljiva distalna embolizacija češće registruje kod pacijenata sa litičkim trombima (21,2%) u odnosu na sveže (12,1%) i organizovane trombe (15,2%, $p = 0,007$) (78). Slično su uočili Verouden i sar. (64), uz češću pojavu distalne embolizacije kod starijeg tromba (20% kod litičkog i 16% kod organizovanog) u poređenju sa svežim trombima (11%). Inkompletna rezolucija ST-segmenta (STR) nakon primarne PCI predstavlja snažan prediktor lošije prognoze STEMI pacijenata (64,221,222). Pokazalo se da kod pacijenata sa starijim trombima postoji tendencija ka inkompletnoj STR u poređenju sa pacijentima sa svežim trombima (37% vs. 44%, $p=0,097$) (64). Ređa pojava kompletne STR nakon PCI kod pacijenata sa starijim trombom može biti posledica ranijih epizoda subkliničke distalne embolizacije i posledične mikrovaskularne opstrukcije. Međutim, druga grupa autora nije uočila povezanost histološke starosti tromba sa stepenom STR (80). Mogući razlog za neslaganje rezultata je nešto drugačija populacija pacijenata uključenih u istraživanje. Carol i sar. (80) su u svoju studiju uključili pacijente sa bolom u grudima do 24 h pre primarne PCI, kao i pacijente sa prethodnim infarktom miokarda, prethodnom PCI i hirurškom revaskularizacijom miokarda, što nije slučaj u drugim studijama.

Prisustvo starijeg tromba tokom aspiracije kod STEMI pacijenata može nositi bitne prognostičke implikacije za pacijenta. Istraživanje sa oko 1000 STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI pokazalo je da je nalaz aspiriranog tromba histološki starijeg od 24 h nezavisni prediktor mortaliteta (73). Kumulativna stopa mortaliteta tokom 4 godine kod pacijenata sa aspiriranim starijim trombom iznosila je 16%, u poređenju sa 7,4% u grupi sa svežim trombom ($p = 0,008$). Moguće je da dužina ishemijskog vremena utiče na formiranje starijeg tromba, međutim u istom istraživanju nije registrovana povezanost ishemijskog vremena sa rizikom od mortaliteta, kao ni povezanost enzimski procenjene veličine infarkta ili pojave distalne embolizacije sa mortalitetom.

1.4.2. *Imunohistohemijska analiza*

Primena imunohistohemijskih tehnika olakšala je citohistološku analizu aspiriranog trombotičnog materijala kod STEMI pacijenata. Ciljano bojenje markera pojedinih tipova ćelija (npr. glikoforin-A kod eritrocita, P-selektin i glikoprotein IIb/IIIa kod

trombocita, mijeloperoksidaza kod neutrofilnih granulocita) omogućava određivanje procentualne zastupljenosti pojedinih komponenti tromba, uz detaljniju klasifikaciju starosti aspiriranog tromba.

Yunoki i sar. (70) su pokazali da trombi sa većim sadržajem eritrocita imaju veći sadržaj neutrofila, uz manje regione trombocitne imunopozitivnosti. Takođe, površina tromba je pokazivala pozitivnu korelaciju sa sadržajem eritrocitnih polja, što se slaže sa nalazima pri klasičnom hematoksilin-eozin bojenju (52). Optimalna miokardna perfuzija nakon PCI (MBG3, engl. *myocardial blush grade*) značajno češće je registrovana kod pacijenata sa manjim sadržajem eritrocita u aspiriranom trombu (60,0%) u poređenju sa većim sadržajem eritrocita (32,2%) (70). Veća gustina neutrofila koja prati trombe bogate eritrocitima može biti objašnjenje lošije koronarne mikrocirkulacije. Aktivirani neutrofili su glavni izvor kiseoničnih radikala, utiču na povećanje aktivnosti tkivnog faktora i dovode do mikrovaskularnog oštećenja i reperfuzionog oštećenja srca (66). U prilog inflamatornog oštećenja miokarda govori i nalaz lošije koronarne mikrocirkulacije, većeg oštećenja miokarda i disfunkcije leve komore kod pacijenata sa većim brojem neutrofila u aspiriranom trombu (66). Tako su pacijenti sa većom gustinom neutrofila u aspiriranom materijalu imali veću učestalost MBG 0/1 (79%) u poređenju sa manjom gustinom inflamatornih ćelija (31%), veću učestalost inkompletne STR (55% prema 13%, $p < 0,001$), veće maksimalne vrednosti oslobođenog CK (4.387 ± 400 U/L prema 3.284 ± 403 U/L) uz manje vrednosti ejskione frakcije leve komore nakon 6 meseci praćenja ($42,4 \pm 1,4$ vs. $47,1 \pm 1,5\%$).

1.4.3. *Angiogeneza tromba*

Okluzivnoj trombozi koronarne arterije često prethode epizode progresivnog rasta tromba, što se na histološkim preparatima može videti kao slojevita građa aspiriranog materijala. Slično zarastanju rana, organizacija tromba i stabilizacija njegove strukture zavisi od urastanja krvnih sudova. Vaskularizacija obezbeđuje dotok kiseonika i nutrijenata, kao i normalno funkcionisanje inflamatornih ćelija i fibroblasta uključenih u organizaciju tromba (81).

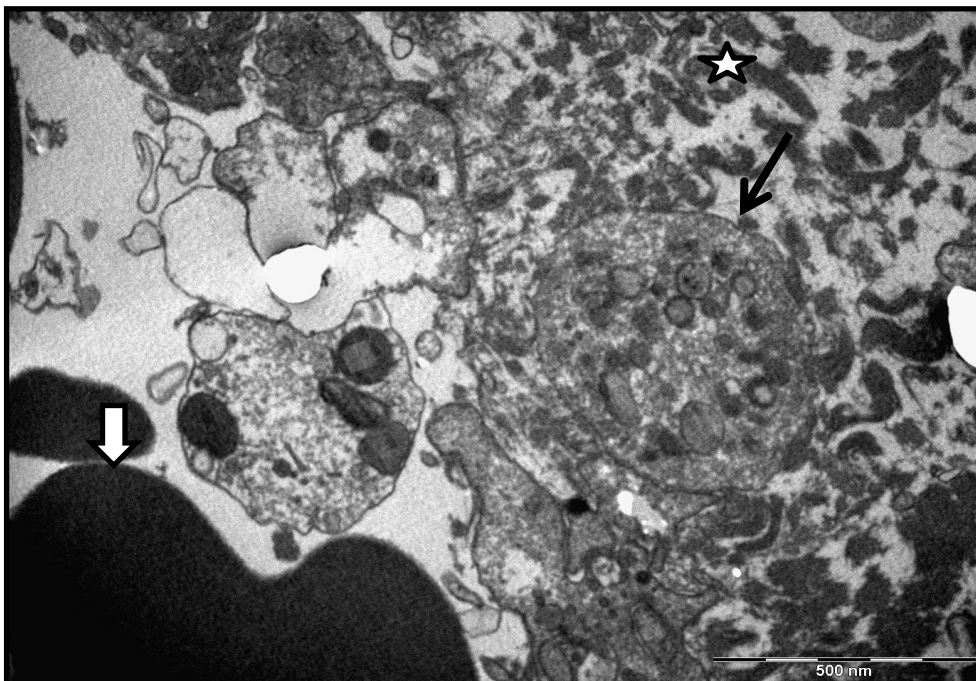
Tradicionalna definicija angiogeneze podrazumeva formiranje novih krvnih sudova pupljenjem endotelnih ćelija iz postojeće vaskulature, dok vaskulogeneza podrazumeva

de novo formiranje krvnih sudova koje se isključivo dešava tokom embriogeneze (82). Međutim, sa otkrićem i izolacijom cirkulišućih endotelnih progenitorskih ćelija (EPC) intenzivno se ispituje mogućnost formiranja novih krvnih sudova iz matičnih ćelija u adultnom periodu (83).

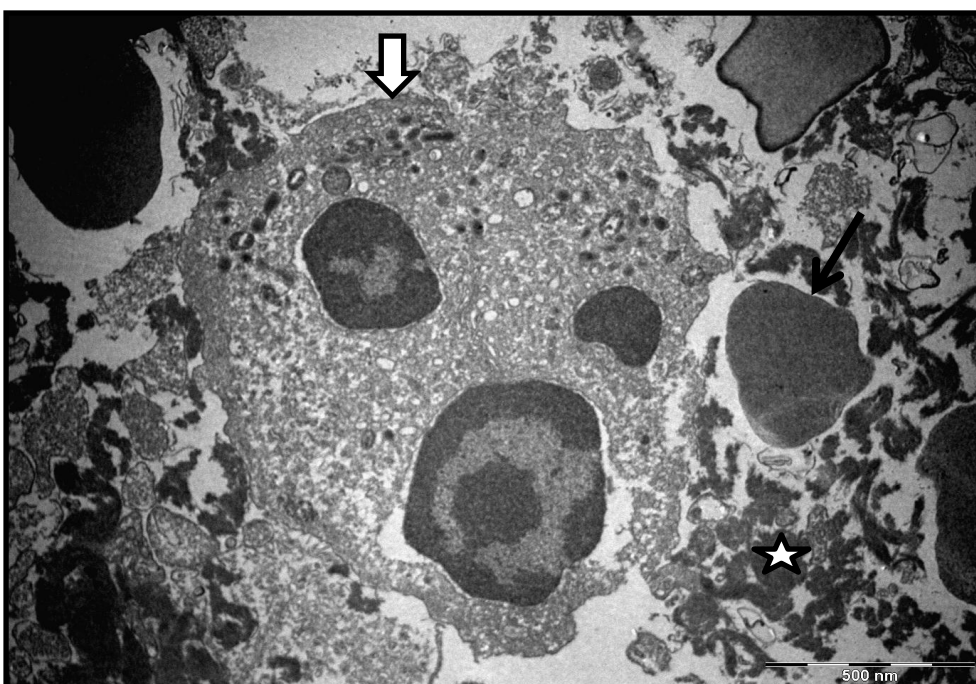
Ispitivanje angiogeneze u aspiriranim koronarnim trombima moguće je imunohistohemijskim bojenjem na brojne markere endotelnih ćelija (CD34, CD31, CD105, VEGFR2 i dr.). Nakon vizualizacije endotelnih ćelija, uobičajena kvantifikacija podrazumeva prisustvo pojedinačnih endotelnih ćelija, grupa od tri i više endotelnih ćelija, ili formiranje kapilarnih petlji (84). Pokazalo se da su rane endotelne ćelije (CD34/CD31 imunopozitivne) prisutne u skoro svim aspiriranim trombima serije od 120 STEMI pacijenata, iako je bol u grudima trajao do 12 h od primarne PCI (84). Pojedinačne endotelne ćelije bile su podjednako prisutne u svim starosnim kategorijama tromba (svež, litički i organizovan), grupe endotelnih ćelija su značajno češće bile prisutne u organizovanim trombima, dok su kapilarne petlje bile retke kod sve tri starosne grupe trombova. Pokazalo se da se sa starošću tromba povećava broj aktiviranih i aktivno proliferišućih endotelnih ćelija, uz retku pojavu progenitorske subpopulacije ćelija.

1.4.4. *Elektronska mikroskopija*

Primena transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) u analizi starosti aspiriranog trombotičnog materijala STEMI pacijenata potvrdila je nalaze svetlosne mikroskopije (85, Slika 3A i 3B). U svežim trombima uočen je tamni matriks eritrocita, gusti snopovi fibrina različite orijentacije, kao i trombociti sa optički praznim kanalikularnim sistemom uz veoma malo elektronski-gustih granula, što ukazuje na njihovu degranulaciju. Neutrofilni granulociti svežih trombova nisu pokazivali znake kompletne degranulacije. S druge strane, kod starijih trombova uočeni su znaci autolize, došlo je do gubitka gustine matriksa eritrocita, dok se kod nekih leukocita i velikog broja trombocita nije videla jasna ultrastrukturalna organizacija. Starije trombe je karakterisalo i prisustvo makrofaga, sa brojnim fagolizozomima i lipozomima, dok su pojedini makrofazi bili u različitim stadijumima autolize.



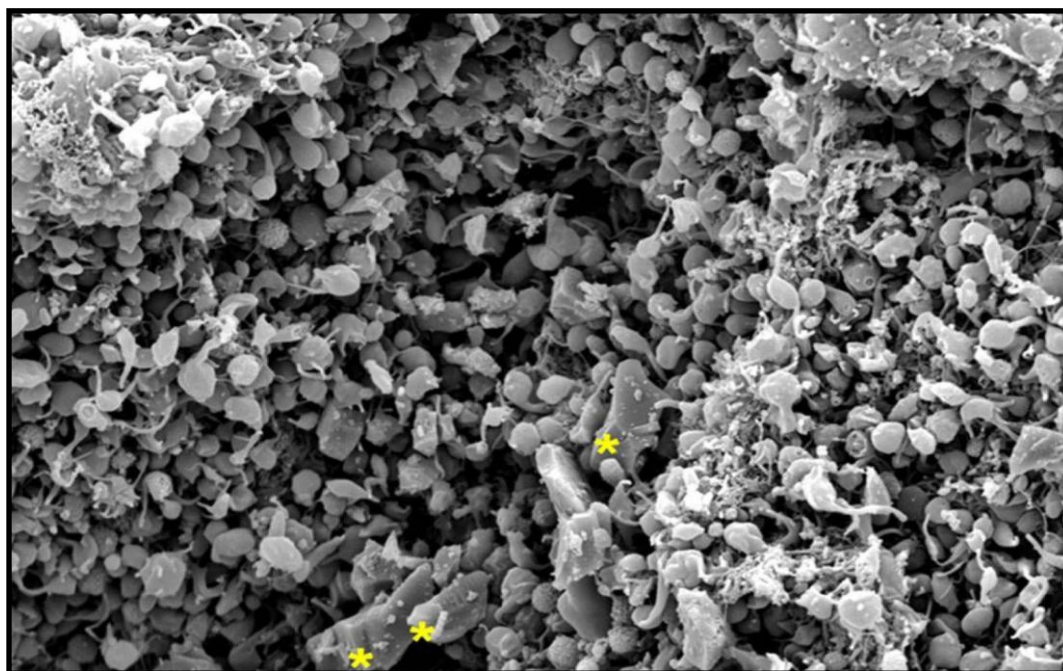
Slika 3A. TEM svežeg tromba pokazuje prisustvo intaktnih trombocita (strelica), eritrocita (debela strelica) i fibrina (zvezdica).



Slika 3. TEM svežeg aspiriranog tromba pokazuje prisustvo neutrofilnog granulocita (debela strelica), eritrocita (strelica) i fibrina (zvezdica).

Rezultati skenirane elektronske mikroskopije (SEM) pokazali su da se sa povećanjem ishemijskog vremena povećava sadržaj fibrina, a smanjuje sadržaj trombocita u trombima (79, Slika 4). Analiza materijala dobijenog od 66 STEMI pacijenata

omogućila je izdvajanje dva različita tipa tromba. Prvu grupu su činili tzv. stari, fibrinski trombi, izgrađeni uglavnom od fibrina i eritrocita (>70% površine predstavljao je fibrin, a <30% su činili trombociti). Fibrinski trombi su uglavnom bili prisutni kod pacijenata gde je ishemijsko vreme bilo duže od 3h. Drugoj grupi su pripadali sveži, trombocitni trombi, u kojima je >30% površine bilo pod trombocitima, a <70% je činio fibrin. Kod pacijenata sa svežim trombima ishemijsko vreme je trajalo u proseku sat vremena.



Slika 4. SEM analiza aspiriranog tromba koja pokazuje agregate trombocita uz retke holesterolske kristale (zvezdice). Preuzeto iz: Silvain et al. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(12):1359–67.

Glavno ograničenje SEM analize je posmatranje površine tromba, bez uvida u unutrašnji deo aspirata. Ovo ograničenje su pokušali da prevaziđu Zalewski i sar. (86), analizirajući površinu i unutrašnji deo aspiriranih tromba skening elektronskom mikroskopijom kod 80 STEMI pacijenata. Pokazalo se da približno polovinu tromba izgrađuje fibrin, uz značajno više fibrina na površini (61,6%) u odnosu na unutrašnji deo tromba (34,3%). Slično je uočeno analizom sadržaja trombocita (8,2% na površini i 4,8% u unutrašnjosti tromba), dok su suprotni rezultati dobijeni analizom prisustva eritrocita (15,8% na površini i 42,9% u unutrašnjosti tromba). Ovo istraživanje je

potvrdilo pozitivnu korelaciju sadržaja fibrina sa ishemijskim vremenom, kao i sa maksimalno oslobođenim troponinom tokom hospitalizacije.

1.5. Markeri endotelnih ćelija

Markeri endotelnih ćelija su membranski ili citoplazmatski molekuli koje ekspimiraju endotelne ćelije. Ovi molekuli olakšavaju identifikaciju endotelnih ćelija i njihovo razlikovanje od drugih ćelijskih tipova. Markeri endotelnih ćelija najčešće imaju svoje specifične funkcije i ne pokazuju jednaku ekspresiju u svim fazama razvoja i ćelijskog ciklusa. Ovo omogućava njihovu primenu u praćenju diferencijacije endotelnih ćelija od nediferentovanih stadijuma do zrelog fenotipa.

Tokom embrionalnog razvoja, vaskularne i limfatične endotelne ćelije nastaju od zajedničkog mezenhimalnog prekursora, hemangioblasta. Zbog toga ne iznenađuje činjenica da vaskularne i limfatične endotelne ćelije imaju slične morfološke i funkcionalne karakteristike, uz ekspresiju istih i/ili sličnih markera u normalnim i patoloških uslovima (87). Do sada nije pronađen nijedan marker patognomoničan isključivo za vaskularne ili limfatične endotelne ćelije, već se za identifikaciju ćelijskog tipa najčešće koristi nekoliko markera.

1.5.1. CD34

CD34 je transmembranski glikoprotein ekspimiran na ranim i zrelim endotelnim ćelijama, te se smatra pan-endotelnim markerom. Sastoji se iz većeg ekstracelularnog domena bogatog glikoziliranim ostacima serina, treonina i prolina, transmembranskog dela i manjeg intracelularnog domena koji sadrži brojna fosforilisana mesta. Usled značajnih posttranslacionih promena, CD34 ima veću molekulsku masu od očekivane (88).

CD34 molekul je važan u međućelijskoj adheziji i regulaciji ćelijske proliferacije i diferencijacije (89). Osim na endotelnim ćelijama, CD34 je važan marker hematopoetskih stem ćelija mijeloidne i limfoidne loze (90). Pored toga, CD34 ekspimiraju i neke nehematopoetske progenitorske ćelije, poput vaskularnih endotelnih

progenitorskih ćelija (91), epitelnih progenitorskih ćelija (92) i embrionalnih fibroblasta (93).

Limfatične endotelne ćelije u normalnim, nepatološkim uslovima ne ekspimiraju CD34 molekul. Međutim, poznato je da limfatični endotel često ekspimirira CD34 molekul u tumorskom tkivu karcinoma kolona, dojke, pluća, kao i kod melanoma (94), zbog čega se ne može koristiti za razlikovanje vaskularnih i limfatičnih sudova.

Pored toga, CD34 ekspimiraju i brojne zrele ćelije mezenhimalnog porekla, kao što su mastociti (95), fibroblasti (96), mikroglia (97) i dendritske ćelije (98).

1.5.2. CD31

CD31 (PECAM-1, engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) je transmembranski glikoprotein koji se ekspimirira na ranim i zrelim vaskularnim endotelnim ćelijama. Ovaj marker pripada imunoglobulinskoj superfamiliji i sastoji se od šest ekstracelularnih domena nalik imunoglobulinu, manjeg transmembranskog dela, i citoplazmatskog repa bogatog fosforilisanim ostacima serina i tirozina (99).

CD31 je lokalizovan na mestima kontakta dve endotelne ćelije i predstavlja važnu komponentu međućelijskog spoja, jer je na taj način uključen u regulaciju stepena permeabilnosti vaskularne barijere. Ovaj endotelni marker značajan je za transmigraciju leukocita kroz endotel tokom inflamacije, kao i u imunološkim reakcijama (100). Takođe, CD31 je važan tokom angiogeneze jer aktivno učestvuje u migraciji endotelnih ćelija, formiranju kapilarnih petlji, nastanku međućelijskih spojeva i sazrevanju interakcija između ćelija i međućelijskog matriksa (101).

Osim endotelnih ćelija, CD31 ekspimiraju brojne zrele ćelije krvi i ćelije hematopoeze, poput trombocita (102), neutrofila (103), T-, B- i NK-limfocita (104), hematopoetskih progenitorskih ćelija (105) i megakariocita (106).

1.5.3. D2-40

D2-40 je monoklonsko antitelo usmereno na podoplanin, površinski sijaloglikoprotein ekspimiran na brojnim ćelijama embrionalnih i adultnih tkiva. Podoplanin učestvuje u

razvoju organa, ćelijskoj pokretljivosti, inicijalnoj tumorigenezi i daljem formiranju metastaza (107). Inicijalno je pokazano da antitelo D2-40 reaguje sa O-vezanim sijaloglikoproteinom molekulske mase 20.000 koji ekspimiraju tumorske germinativne ćelije testisa (108). Kasnije je ustanovljeno da D2-40 selektivno detektuje limfatične endotelne ćelije i da se može koristiti za njihovo razlikovanje od vaskularnih endotelnih ćelija (109).

Ovaj marker se normalno ekspimirira i na folikularnim dendritskim ćelijama (110), Kahalovim intersticijalnim ćelijama (111), mioepitelnim ćelijama (112) i bazalnim ćelijama epitela prostate (113). Očekivano, D2-40 pokazuje ekspresiju prilikom bojenja tumorskog tkiva poreklom limfnih sudova, poput limfangioma, vaskularnih transformacija sinusa limfnih čvorova, Kaposi sarkoma i pojedinih angiosarkoma (114). Pored toga, brojni tumori nelimfatičnog porekla poput švanoma, meningeoma, sinovijalnog sarkoma, gastrointestinalnog stromalnog tumora i leiomiosarkoma, pokazuju snažno D2-40 imuno-bojenje (115). Međutim, do sada nije pokazano da vaskularne endotelne ćelije pokazuju D2-40 imunopozitivnost u normalnim, netumorskim uslovima.

1.5.4. *VEGFR3*

VEGFR3 (Flt-4, engl. *Fms-like tyrosine kinase 4*) je receptor prisutan na svim endotelnim ćelijama tokom embrionalnog razvoja, ali se nakon rođenja ekspimirira isključivo na limfatičnim endotelnim ćelijama i pojedinim endotelnim ćelijama sinusoidnih kapilara (116,117). Ovaj transmembranski receptor poseduje tirozin-kinaznu aktivnost i pripada familiji VEGF receptora. VEGF-C i VEGF-D, glavni regulari limfangiogeneze su ligandi koji se vezuju za *VEGFR3* (118).

S obzirom da se *VEGFR3* ekspimirira i na sinusoidnim kapilarima koštane srži, jetre i slezine (119,120), kao i na fenestriranim kapilarima glomerula i endokrinih žlezdi (121), ne smatra se isključivim markerom limfatičnih endotelnih ćelija. Takođe, pojedini vaskularni tumori (hemangiomi, Kaposi sarkom i angiosarkomi) ekspimiraju *VEGFR-3* receptor (122).

1.5.5. LYVE-1

LYVE-1 (engl. *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) predstavlja tip-I integralni membranski glikoprotein koji je snažno eksprimiran na površini limfatičnih endotelnih ćelija. Ovaj površinski molekul funkcionise kao receptor za hijaluronsku kiselinu i pokazuje veliku sličnost sa CD44 hijaluronskim receptorom leukocita (123). LYVE-1 učestvuje u transportu hijalurona iz ekstracelularnog matriksa, kao i u daljoj degradaciji hijaluronske kiseline u limfnim čvorovima. Poslednjih godina se intenzivno ispituje funkcija LYVE-1 molekula u tumorskoj metastazi (124).

Iako se nalazi na limfatičnim endotelnim ćelijama, LYVE-1 pokazuje ekspresiju na sinusoidnim kapilarima jetre i slezine (109), venulama sa visokim endotelom (HEV) u limfnim čvorovima (125), kao i na aktiviranim tkivnim makrofagima (126). Kao i brojni drugi markeri endotelnih ćelija, LYVE-1 eksprimiraju brojni vaskularni tumori (127), što onemogućava njegovu primenu u razlikovanju limfatičnog i vaskularnog endotela.

1.6. Vaskularni endotelni faktor rasta

Familiju vaskularnih endotelnih faktora rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) čini 7 proteina slične strukture (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i placentalni faktor rasta – PGF, engl. *placental growth factor*) koji funkcionišu kao mitogeni vaskularnih i limfatičnih endotelnih ćelija (128). Vezivanje VEGF za njegove receptore (VEGFR) ključno je za razvoj vaskulature u embrionalnom periodu, kao i u brojnim fiziološkim i patološkim uslovima, uključujući zarastanje rana, hronična inflamatorna oboljenja, ishemiju miokarda, neovaskularizaciju retine i rast tumora (129-132).

Na ekspresiju VEGF-a utiču brojni hormoni, faktori rasta i citokini, uključujući interleukin-6, epidermalni faktor rasta, transformišiću faktor rasta- β , prostaglandin E2 i azot-monoksid (133). Glavni stimulus za sekreciju VEGF-a je hipoksija. U hipoksičnim uslovima molekul HIF-1 α (faktor indukovan hipoksijom-1 α , engl. *hypoxia-inducible factor-1 α*) se vezuje sa promotor VEGF gena, dovodeći do povećane ekspresije VEGF-a (128).

1.6.1. VEGF-A i njegovi receptori

Smatra se da je VEGF-A prvi molekul specifičan za endotelne ćelije koji se sekretuje u embrionalnom periodu. Ujedno, on predstavlja ključni molekul u procesu indukcije vaskulogeneze i angiogeneze (134). Tokom embriogeneze neophodna je adekvatna ekspresija VEGF-a, jer je uočeno da homozigotni *knockout* miševi za VEGF-A gen umiru rano tokom embriogeneze (8 - 9 dana nakon rođenja). U slučaju nedostatka jednog VEGF-A alela smrtni ishod nastupa nekoliko dana kasnije (11 - 12 dana) (134).

VEGF-A je inicijalno opisan kao faktor vaskularne permeabilnosti koji sekretuju tumorske ćelije. Pokazalo da ovaj molekul povećava permeabilnost krvnih sudova kože i stimuliše nastanak ascitesa (135). Kasnija istraživanja su ustanovila da je VEGF-A glavni molekul koji stimuliše proliferaciju, pupljenje, migraciju endotelnih ćelija i formiranje kapilarnih struktura (128). Takođe, VEGF-A povećava permeabilnost endotelnih ćelija, utiče na vaskularni tonus i stvaranje vazoaktivnih molekula (136).

VEGF-A ispoljava svoje efekte nakon vezivanja za svoje receptore: VEGFR-1 (KDR/Flk-1) and VEGFR-2 (Flt-1). Ovi receptori pripadaju porodici tirozin-kinaza, jer sadrže sedam ekstracelularnih domena nalik imunoglobulinima i intracelularni efektor sa tirozin-kinaznom aktivnošću (128). Nakon vezivanja za VEGF dolazi do homodimerizacije i autofosforilacije receptora VEGFR1 i VEGFR2, što aktivira intracelularnu signalnu kaskadu. U daljem toku dolazi do povećane produkcije cikličnog GMP-a od strane guanil-ciklaze. Iako VEGF poseduje veći afinitet za VEGFR1, smatra se da ovaj molekul ostvaruje svoj angiogeni efekat posredstvom VEGFR2 receptora. Pokazano je da vezivanje VEGF za VEGFR1 endotelne ćelije predstavlja veoma slab mitotski signal, ali da se ovaj signal značajno pojačava nakon vezivanja za VEGFR2 (137).

Do sada je detektovano najmanje 6 izoformi ovog angiogenog faktora koji zapravo predstavljaju VEGF-A polipeptide različite dužine sa 121, 145, 165, 183, 189 i 206 aminokiselinskih ostataka. Ove izoforme imaju različite, ali delimično preklapajuće funkcije u procesu angiogeneze (138). Izofome VEGF-a nastaju alternativnim isecanjem iRNK i daljom proteolitičkom obradom molekula. Istraživanja na *knockout* životinjama

su pokazala da je izoforma VEGF-A₁₆₅ najvažnija za angiogenetske efekte ovog faktora rasta (128).

VEGF-A indukuje ekspresiju antiapoptotskih proteina (bcl-2 i A1) u endotelnim ćelijama, produžavajući na taj način njihovo preživljavanje (139). Ovaj faktor ne deluje samo na endotelne ćelije, već se pokazalo da je i snažan mitogen retinalnih pigmentnih ćelija i Švanovih ćelija (140), kao i da učestvuje u proliferaciji i migraciji vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (141).

Osim endotelnih ćelija, VEGF sintetišu i brojne druge ćelije mezenhimalnog porekla koje pokazuju VEGF ekspresiju, kao što su vaskularne glatke mišićne ćelije (142), neutrofili (143), monociti i makrofagi (144), osteoblasti (145) i keratociti (146).

VEGFR-1 se nalazi na površini endotelnih ćelija, a pored toga je eksprimiran na površini pericita, monocita, makrofaga, pojedinih hematopoetskih matičnih ćelija, osteocita, trofoblastnih ćelija placentе i mezangijalnih ćelija bubrega (147). Ovaj receptor je značajan tokom embriogeneze, jer *knockout* miševi za VEGFR1 umiru rano tokom embrionalnog perioda usled dezorganizacije endotelnih ćelija (E8.5) (148). Ekspresija VEGFR1 na monocitima i makrofazima važna je za migraciju ovih ćelija (149). Endotelne ćelije u velikoj meri eksprimiraju VEGFR2, ali se ovaj marker može naći i na površini megakariocita (150), hematopoetskih stem ćelija (151), endotelnih progenitorskih ćelija (83) i trombocita (152).

1.6.2. *VEGF i angiogeneza tokom ishemije miokarda*

Iznenadna ishemija usled okluzije epikardne koronarne arterije indukuje odgovor ishemijskog tkiva kako bi se poboljšala perfuzija miokarda. Kompenzatorni odgovor miokarda podrazumeva procese arteriogeneze i angiogeneze (153). Ubrzo nakon okluzije koronarne arterije dolazi do arteriogeneze, odnosno uvećavanja postojećih kolateralnih krvnih sudova u ishemijskom regionu. Prisustvo kolaterala kod pacijenata lečenih primarnom PCI povezano je sa manjim infarktним regionom i boljom funkcijom leve komore (154). Međutim, dobro razvijene kolaterale se vide kod tek malog broja pacijenata sa akutnim infarktom miokarda tokom primarne PCI (10-40%) (155). Drugi kompenzatorni mehanizam podrazumeva angiogenezu, odnosno urastanje novih

kapilara iz normalnog miokarda u infarktni region. Angiogeneza se dešava kasnije u odnosu na akutnu okluziju koronarne arterije i uvećavanje kolaterala. Takođe, formiranje novih kapilara nije ograničeno samo na akutnu fazu, već je angiogeneza prisutna i u subakutnoj i hroničnoj fazi infarkta miokarda (156). Cilj urastanja novih krvnih sudova je smanjenje rezidualne ishemije i brža organizacija nekrotičnog tkiva. Angiogeneza je precizno regulisan proces gde postoji interakcija endotelnih ćelija, ekstracelularnog matriksa i susednih ćelija, uz učešće brojnih faktora rasta, njihovih receptora i intracelularnih signala (157). Jedan od važnih faktora koji učestvuje u ovom procesu je VEGF.

U uslovima ishemije VEGF pospešuje formiranje kolateralnih krvnih sudova kako bi se obezbedila adekvatna perfuzija ishemijskog miokarda, sprečila nekroza kardiomiocita i remodelovanje leve komore (158). Eksperimentalni model akutnog infarkta miokarda kod pacova pokazao je da vrlo rano nakon infarkta dolazi do povećanja ekspresije informacione RNK za VEGF u kapilarima ivičnog regiona infarkta (159). Takođe, formiranje novih krvnih sudova u infarktnom regionu se registruje od 24h do 6 nedelja posle infarkta. Dalja istraživanja na animalnim modelima su pokazala da VEGF pospešuje neovaskularizaciju u infarktnom regionu i smanjuje veličinu infarkta (160,161).

Osim u ishemijskom tkivu, vrednost VEGF-a se može meriti u cirkulišućoj krvi kao potencijalni marker ishemije miokarda. Cirkulišući VEGF uglavnom potiče iz trombocita i granulocita. Međutim, pretpostavlja se da serum sadrži i male količine slobodnog VEGF-a koje se značajno uvećavaju degranulacijom trombocita i neutrofila (162). Trombociti predstavljaju važan cirkulišući depo VEGF-a koji se otpušta nakon njihove aktivacije trombinom (163). Zbog toga je koncentracija VEGF-a značajno veća u serumu u odnosu na plazmu (162). U neutrofilima se VEGF nalazi u posebnim granulama kao preformirani molekul (164) koji se oslobađa nakon aktivacije različitim proinflamatornim citokinima poput TNF- α (engl. *tumor necrosis factor-alpha*). Kusumanto i sar. (165) su pokazali da kod zdravih osoba 58% cirkulišućeg VEGF-a potiče iz neutrofila, dok trombociti učestvuju sa 34%. Zbog toga se smatra da tokom angiogeneze neutrofili u najvećoj meri kontrolišu permeabilnost krvnih sudova.

Neovaskularizacija je značajan proces koji se odigrava u srčanom mišiću prilikom ishemijskih uslova. Glavni stimulusi za sekreciju VEGF-a su smanjenje tkivne perfuzije i dopremanja kiseonika u periferna tkiva. Stoga se pretpostavlja da određivanje vrednosti cirkulišućeg VEGF-a može biti od koristi u proceni težine ishemije miokarda, kardiovaskularnog rizika i progresije koronarne bolesti srca. Međutim, mehanizam delovanja i klinički značaj VEGF-a tokom akutnog infarkta miokarda nije dovoljno razjašnjen. Tok akutnog infarkta miokarda je kompleksan i dinamični proces koji obuhvata ne samo kardiomiocite, već i druge ćelije poput vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, endotelnih ćelija i ćelija krvi, koje predstavljaju dodatni izvor VEGF-a (143,166-8).

1.6.3. *Prognostički značaj VEGF-a kod koronarne bolesti srca*

Poznato je da pacijenti sa refraktornom nestabilnom anginom pectoris imaju povišene vrednosti VEGF-a u odnosu na zdrave ispitanike (169,170). Brojna ispitivanja su potvrdila da kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda postoje značajno veće vrednosti cirkulišućeg VEGF-a u poređenju sa zdravom populacijom (170-9). Serijska merenja VEGF-a tokom akutnog infarkta miokarda ukazuju na postepen porast ovog markera od prvog dana infarkta do 7 – 14. dana, kada dostiže maksimalne vrednosti (173-7,180,181). Do normalizacije vrednosti VEGF-a dolazi tek nakon 6 meseci posle infarkta miokarda (170). Pretpostavlja se da prolazno povećanje ovog angiogenog markera oslikava učešće VEGF-a u reparatornim mehanizmima nakon akutnog infarkta miokarda.

Pokazalo se da vrednosti VEGF-a merene pri prijemu STEMI pacijenata u bolnicu ne koreliraju sa kliničkim karakteristikama, kao što su dužina ishemijskog vremena, ejeckiona frakcija leve komore i postojanje kolaterala na koronarogramu (177). Kim i sar. (182) nisu uočili razliku u stepenu razvijenosti kolaterala na angiogramu (Rentrop 0/1 vs. Rentrop 2/3) u odnosu serijski merene vrednosti VEGF-a kod STEMI pacijenata. Takođe, ovi autori su potvrdili rast cirkulišućeg VEGF-a nakon 24h i 48h u odnosu na vrednosti pri prijemu, ali nije zapažena značajna razlika između vrednosti merenih nakon 24h i 48h od STEMI.

Nakajima i sar. (183) su uočili da pacijenti sa anginoznim tegobama i višesudovnom koronarnom bolešću imaju veće vrednosti VEGF-a u odnosu na grupu pacijenata bez značajnih stenoza na koronarnom angiogramu ili sa jednosudovnom bolešću. Stoga se pretpostavlja da nalaz povišenih vrednosti VEGF-a u plazmi pacijenata sa višesudovnom koronarnom bolešću može biti odraz angiogeneze, reparacije tkiva ili vaskularne protekcije. Kucukardali i sar. (184) su pokazali da povišene vrednosti VEGF-a kod pacijenata sa koronarnom bolešću srca mogu ukazivati na kritičnu stenozu koronarne arterije. Na taj način bi povišene vrednosti ovog markera mogle služiti kao indikator potrebe za revaskularizacijom miokarda. Suprotno tome, nekoliko studija je pokazalo da kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda ne postoji korelacija vrednosti cirkulišućeg VEGF-a sa težinom stenozе i brojem zahvaćenih koronarnih arterija (176,185,186).

Dosadašnja istraživanja su dala kontradiktorne rezultate o prognostičkom značaju vrednosti cirkulišućeg VEGF kod pacijenata sa koronarnom bolešću srca. Tako su rezultati CAPTURE studije (*c7E3 Anti Platelet Therapy in Unstable Refractory Angina*) pokazali da su veće vrednosti VEGF-a kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom povezane sa lošijim kliničkim ishodima (smrtni ishod i nefatalni infarkt miokarda) nakon mesec dana i 6 meseci praćenja (169). Takođe, veće vrednosti VEGF-a su pratile veće vrednosti oslobođenog troponina T i lošiji epikardni TIMI protok. Međutim, ovaj nalaz se ne uklapa u kardioprotektivan efekat VEGF-a koji je uočen u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima (187).

Suprotno rezultatima CAPTURE studije, NAMIS (*Nagoya Acute Myocardial Infarction Study*) studija je pokazala da niže vrednosti VEGF-a merene sedmog dana nakon STEMI ukazuju na lošije kliničke ishode tokom perioda praćenja od 6 meseci (188). Među kliničkim ishodima naročito se izdvaja veća učestalost ponovne pojave akutnog koronarnog sindroma kod pacijenata sa nižim vrednostima VEGF-a. Istraživači NAMIS studije uočili su da ne postoji povezanost vrednosti cirkulišućeg VEGF-a i CK_{max}, što se slaže sa rezultatima Kranz i sar. (176) i Kim i sar. (182). Međutim, neslaganje postoji oko nalaza povezanosti VEGF-a izmerenog 7-14 dana od akutnog infarkta miokarda sa enzimski procenjenom veličinom infarkta (172,175,177).

Važno je napomenuti da kontradiktorni rezultati mogu delom poticati i od: (1) vrste eseja kojim je merena vrednost cirkulišućeg VEGF-a, (2) izoforme detektovanog VEGF-a, (3) vrste analiziranog materijala (serum ili plazma), (4) prisustva molekula koji mogu uticati na koncentraciju VEGF-a (189), i (5) vremena uzorkovanja i analize VEGF-a.

2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Određivanje koncentracije cirkulišućeg serumskog VEGF-a kod STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI
2. Određivanje stepena angiogeneze aspiriranog koronarnog tromba STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI
3. Ispitivanje povezanosti kocentracije serumskog VEGF i stepena angiogeneze aspiriranog koronarnog tromba sa:
 - 1) Elektrokardiografskim i angiografskim znacima perfuzije miokarda:
 - rezolucijom ST-segmenta ≥ 70 % nakon 60 minuta od završetka pPCI procedure
 - MBG (engl.myocardial blush grade, 0-3) na finalnom angiogramu
 - 2) Kliničkim ishodima pacijenta:
 - veličinom infarkta miokarda procenjenim na osnovu maksimalnih vrednosti oslobođenih kardiospecifičnih enzima tokom hospitalizacije (CK, troponin I)
 - ehokardiografskim parametrima (LVEF – ejectiona frakcija leve komore, WMSI - indeks skora pokretljivosti zidova leve komore, indeksima volumena leve komore: EDVI – end-sistolni volumni indeks, i ESVI – end-dijastolni volumni indeks) unutar 3 dana od infarkta miokarda i nakon 6 meseci
 - učestalošću neželjenih kardiovaskularnih događaja tokom perioda praćenja od 6 meseci nakon STEMI (smrt, reinfarkt miokarda, moždani udar, revaskularizacija infarktne arterije, tromboza stenta, hospitalizacija zbog srčane insuficijencije)

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Dizajn studije

Studija je prospektivna, opservaciona, deskriptivna i po tipu studije slučajeva. Istraživanje je vršeno u tri centra. Lečenje STEMI pacijenata uz uzimanje aspiriranog tromba iz koronarne arterije i venske krvi za VEGF analizu se obavljalo u Klinici za kardiologiju Kliničkog centra Srbije. Patohistološka analiza aspiriranog trombotičnog materijala se vršila u Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a određivanje vrednosti serumskog VEGF-a ELISA metodom se obavljalo na Institutu za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Postavili smo radnu hipotezu da vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a i stepen angiogeneze aspiriranog koronarnog tromba ukazuju na postojanje dugotrajne ishemije i lošiji ishod kod STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI. Nismo imali preliminarne podatke za precizno i adekvatno računanje veličine uzorka. Odlučili smo se za analizu podataka o 100 konsekutivnih STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI tokom koje je urađena uspešna aspiracija koronarnog tromba. Na ovu odluku uticali su radovi iz oblasti patohistološke analize aspiriranih tromba u kojima je analiziran materijal sličnog broja pacijenata (68,78,80,84,190).

3.2. Ispitivana populacija

U ispitivanje je bilo uključeno 100 STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI u Klinici za kardiologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od jula 2014. do januara 2017. godine. Primarna PCI je izvođena u sali za kateterizaciju Kliničkog centra Srbije, a pacijenti su dalje lečeni u Koronarnoj jedinici i stacionarnim odeljenjima Klinike za kardiologiju Kliničkog centra Srbije.

3.2.1. *Kriterijumi za uključivanje u istraživanje:*

U istraživanje su uključeni svi konsekutivni STEMI pacijenti koji su ispunjavali sledeće kriterijume:

1. Bol u grudima koji traje duže od 30 minuta.
2. Dolazak u salu za kateterizaciju unutar 12 sati od početka bola u grudima.
3. Novonastala perzistentna elevacija ST segmenta $\geq 1,5\text{mm}$ u ≥ 2 susedna elektrokardiografska odvoda.
4. Hemodinamski stabilni pacijenti u svesnom stanju uz sistolni arterijski krvni pritisak $> 90\text{ mmHg}$.
5. Jasno vizualizovan koronarni tromb tokom koronarografije ili vrednost koronarnog protoka TIMI 0 ili 1 nakon prolaska koronarne žice.
6. Veličina aspiriranog materijala $>1\text{mm}^3$ tokom pPCI.
7. Saglasnost pacijenta za uključivanje u studiju, kao i potpisan informisani pristanak.

3.1.2. *Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja*

1. Prethodni infarkt miokarda.
2. Prethodna hirurška revasuklarizacija miokarda.
3. Prethodna tromboliza (tzv. „spasavajuća“ PCI, engl. *rescue* PCI).
4. Tromboza prethodno implantiranog koronarnog stenta.
5. Kardiopulmonalna reanimacija pacijenta.
6. Kardiogeni šok.
7. Alergija na aspirin, klopidogrel ili heparin.
8. Trenutno učestvovanje u nekoj drugoj kliničkoj studiji.
9. Nemogućnost davanja saglasnosti za učešće u istraživanju.

3.3. Podaci o ispitanicima

Od svih uključenih ispitanika anamnezom i uvidom u medicinsku dokumentaciju prospektivno su prikupljeni sledeći podaci i uneti u jedinstvenu elektronsku bazu podataka:

- Demografske i kliničke karakteristike - pol, starost, telesna težina i visina; vreme početka bola u grudima, vreme prvog medicinskog kontakta, vreme dolaska u salu za kateterizaciju, ukupno ishemijsko vreme, krvni pritisak i srčana frekvencija na prijemu, prisustvo srčane insuficijencije na prijemu, pojava bola u grudima pre STEMI prezentacije
- Anamnestički podaci - prisustvo faktora rizika za kardiovaskularne bolesti: status pušenja, porodična pojava kardiovaskularnih oboljenja, arterijska hipertenzija, diabetes mellitus, hiperholesterolemija; prisustvo pridruženih oboljenja (anemija, prethodna krvarenja, ulkusna bolest, prehodna vaskularna operacija, hronična bubrežna insuficijencija, hronična opstruktivna bolest pluća, prethodni moždani udar), upotreba lekova u redovnoj terapiji
- Laboratorijske analize tokom hospitalizacije (vrednosti kardiospecifičnih enzima – CK i troponin I tokom hospitalizacije; broj leukocita, leukocitarna formula, trombociti, hemoglobin i glikemija prilikom prijema u bolnicu)
- Angiografski podaci (infarktne arterije, zahvaćenost neinfarktne arterije, epikardni TIMI protok tokom intervencije, MBG na finalnom angiogramu, prisustvo kolaterala na koronarnom angiogramu, pojava distalne embolizacije, SYNTAX skor)
- Proceduralne karakteristike (predilatacija infarktne lezije, vrsta i dimenzije implantiranog stenta, postdilatacija infarktne lezije)

3.4. Lečenje bolesnika

3.4.1. Primarna perkutana koronarna intervencija

Svi STEMI pacijenti uključeni u istraživanje su upućeni na hitnu koronarnu angiografiju, gde su lečeni standardnim perkutanim tehnikama sa pristupom putem femoralne arterije. Kod svih pacijenata je učinjena aspiracija trombotičnog materijala iz

koronarne arterije, posle koje je usledila angioplastika i/ili implantacija stenta u koronarnu arteriju. U slučaju da aspiracioni kateter nije mogao da prođe mesto lezije, bila je dozvoljena predilatacija sa balon-kateterom. Aspiracija tromba se izvodila od proksimalnog prema distalnom kraju infarktne arterije, brzinom 1-2 mm/s, napred-nazad načinom, uz prolazak mesta lezije od najmanje 10 mm dok se u potpunosti ne napune barem dva šprica od 20 mL.

3.4.2. *Medikamentno lečenje*

Svi ispitanici su pre započinjanja lečenja primarnom PCI dobili aspirin 300 mg, klopidogrel 600 mg i nefrakcionisani heparin u dozi od 70-100 IU/kg. Tokom intervencije su pacijenti dobijali nitroglicerina intrakoronarno (pre implantacije koronarnog stenta i na kraju intervencije pre završnog angiograma). Odluku o primeni inhibitora glikoproteinskih receptora IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) tokom primarne PCI donosio je interventni kardiolog prema sopstvenoj proceni. Nakon primarne PCI pacijenti su dobijali standardnu medikamentnu terapiju prema postojećim indikacijama i preporukama za lečenje STEMI pacijenata. Ova terapija je podrazumevala i 100 mg aspirina jednom dnevno doživotno, a u slučaju implantacije koronarnog stenta i klopidogrel 75 mg jednom dnevno do isteka propisanog perioda uzimanja (15).

3.5. Analiza trombotičnog materijala

Nakon aspiracije iz koronarne arterije, trombotični materijal je odmah potopljen u 4% neutralno puferisan formaldehid na sobnoj temperaturi tokom namanje 24 sata radi fiksacije. Kod svakog tromba registrovan je broj fragmenata, dužina i boja. Makroskopski, trombi su gradirani prema boji na crvene, bele i mešovite (ukoliko se vide polja crvene i bele boje).

Fiksiran materijal je zatim dehidratisan rastućim koncentracijama alkohola (70%, 96% i 100%), prosvetljen u ksilolu i kalupljen u parafinu aparatom za kalupljenje (Tissue Tech II Tissue Embedding Center). Ukupljen materijal sečen je mikrotomom (Leica Reinhart Austria i Leica SM 2000 R) na isečke debljine 4-5 µm. Serijski isecci su prikupljeni sa najmanje 7 različitih nivoa, i to najmanje 4 isečka sa svakog nivoa. Ovi isecci su bojeni za histološko ispitivanje, imunohistohemijske i imunofluorescentne

analize. Prva četiri i poslednja četiri isečka su bojena hematoksilinom i eozinom. Za morfološku analizu korišćen je optički mikroskop Leica DM4000 B LED. Rezultati su dokumentovani za svakog pacijenta ponaosob mikrofotografijama digitalne kamere Leica DFC295 korišćenjem programa Leica Application Suite (LAS, v4.4.0) software system. U zavisnosti od neophodne analize obojenog materijala, korišćena su sva dostupna uveličanja optičkog mikroskopa (40x, 100x, 200x, 400x i 1000x). Za dodatnu morfometrijsku analizu dobijenih mikrofotografija korišćen je slobodno dostupan program ImageJ. Analizu trombotičnog materijala su obavljali nezavisno jedan patolog i jedan histolog, ne znajući kliničke i angiografske karakteristike ispitanika. U slučaju neslaganja rezultata, preparati su ponovo pregledani i analizirani radi postizanja zajedničkog zaključka. Kapa koeficijent međuposmatračkog slaganja iznosio je 0,9.

3.5.1. *Morfometrijska analiza*

Mikrofotografije dobijene na najmanjem uveličanju optičkog mikroskopa korišćene su za morfometrijsku analizu aspiriranog tromba programom ImageJ. Kod svih trombova je merena najveća dužina, najveća širina, ukupna površina, površina polja sa eritrocitima, procenat eritrocita u trombu (dobijen kao količnik površine eritrocita i ukupne površine tromba), površina polja sa fibrinom i procenat fibrina u trombu (dobijen kao količnik površine pod fibrinom i ukupne površine tromba). U slučaju postojanja više segmenata tromba, ukupna dužina tromba dobijena je sabiranjem dužina svih tkivnih segmenata.

Prema prisustvu eritrocita, trombi su podeljeni u tri grupe prema vrednostima terčila procenta površine eritrocita u trombu na: (a) grupu sa manjom količinom eritrocita (<35,25% površine tromba), (b) grupu sa umerenom količinom eritrocita (35,25 - 64,84%), i (c) grupu bogatu eritrocitima (>64,84% površine tromba).

3.5.2. *Starost aspiriranog tromba*

Svi aspirirani trombi bojani su hematoksilinom i eozinom, što je omogućilo njihovu analizu i klasifikovanje na osnovu procenjene starosti trombotičnog materijala kao što je prethodno opisano (191):

- a) Sveži trombi (starosti do 1. dana), sa potpuno očuvanim eritrocitima, trombocitima i/ili granulocitima i fibrinom
- b) Litički trombi (starosti od 1 do 5 dana), sa poljima kolikvacione nekroze tkiva uz fragmentaciju jedra granulocitnih leukocita
- c) Organizovani trombi (stariji od 5 dana), u kojima se uočava urastanje mio/fibroblasta i glatkih mišićnih ćelija, sa ili bez depozicije vezivnog tkiva i urastanja krvnih sudova

Trombi u kojima postoje polja različite histološke starosti gradirani su na osnovu najstarije komponente (npr. trombi sa svežim i litičkim poljima su klasifikovani kao litički trombi). Za potrebe određenih statističkih analiza, trombi su klasifikovani u dve grupe - sveži i stariji trombi, koji podrazumevaju litičke i organizovane trombe. Komponente aterosklerotskog plaka u aspiriranom materijalu registrovane su na osnovu prisustva penastih ćelija, holesterolskih kristala, kolagena i/ili mikrokalifikacija.

Uočeno minimalno tkivno oštećenje sa lizom ćelija na ivičnim delovima preparata usled mehaničke manipulacije trombotičnim materijalom (tzv. *crush* efekat) nije uzeto u obzir prilikom analize starosti tromba.

3.5.3. *Imunohistohemijska analiza*

Prethodno pripremljeni parafinski iseći tkiva za svetlosnu mikroskopiju korišćeni su za imunohistohemijsko bojenje. Iseći su deparafinisani i ispirani TBS-Tween puferom (engl. *Tris buffer saline*) pH=7,4 tokom 10 minuta. Demaskiranje antigena vršeno je prema preporuci proizvođača korišćenog antitela: (1) 10 mM citratni pufer pH 6, uz inkubaciju tokom 21 minuta u mikrotalasnoj pećnici na 800 W (za vimentin, dezmin, SMA, VEGFR2 i Ki67), (2) 10 mM EDTA pufer pH 6 uz inkubaciju tokom 21 minuta u mikrotalasnoj pećnici na 800 W (za CD34, CD31, LYVE-1 i VEGFR3), i (3) enzimskom digestijom proteazom XXV tokom 10 minuta na 37°C (za CD105). Razblaženje komercijalno dostupnih koncentrovanih antitela vršeno je komercijalno dostupnim diluentom (Large Volume UltraAb diluent, Thermo Scientific LabVision, TA-125-UD), ili pomoću TBS-Tween pufera, pH vrednosti 7,4. Blokiranje endogene peroksidaze obavljeno je komercijalnim preparatom (Large Volume Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific LabVision, TA-060-HP), ili 3% rastvorom vodonik-peroksida

tokom 5 - 15 minuta. Radi dodatnog blokiranja nespecifičnog bojenja nanošen je komercijalni rastvor (UltraV Block, Thermo Scientific LabVision, TA-060-UB) u trajanju do 10 minuta. Inkubacija primarnim antitelom vršena je na sobnoj temperaturi tokom noći, osim u slučaju CD105 antitela gde je inkubacija trajala 60 minuta.

Reakcija je razvijana primenom dva vizualizaciona sistema UltraVision (Thermo Scientific LabVision): streptavidin-peroksidaza uz DAB hromogen i streptavidin-alkalna fosfataza uz Fast Red hromogen. Kod prvog sistema je nakon ispiranja isečaka TBS-om dodato biotinom obeleženo sekundarno antitelo u rastvoru PBS-a (engl. *phosphate-buffered saline*) koje deluje 10 minuta. Nakon toga su isecci ispirani TBS-Tween puferom i inkubirani sa konjugatom peroksidaze rena HRP (engl. *horseradish peroxidase*) i streptavidina rastvorenim u PBS-u, do 15 minuta u mraku. Isecci su ponovo ispirani TBS-Tween puferom i izlagani delovanju rastvora hromogena DAB (diaminobenzidin) u trajanju od 10 minuta. Nakon toga su isecci ispirani TBS-Tween puferom i kontrastno bojeni Majerovim (*Mayer*) hematoksilinom (Merck, 1092490500) tokom 30 sekundi. Isecci su dehidratirani alkoholima rastuće koncentracije, prosvetljivani ksilolom i pokriveni pomoću DPX medijuma.

Kod drugog vizualizacionog sistema je posle primene sekundarnog antitela i ispiranja u TBS-Tween puferu usledila inkubacija sa rastvorom koji sadrži streptavidin konjugovan sa alkalnom fosfatazom tokom 10 minuta. Nakon ispiranja u TBS-Tween puferu, isecci su izloženi rastvorenoj tzv. Fast Red tableti u puferu naftol-fosfata do dobijanja crveno prebojenog signala od interesa. Nakon razvijanja reakcije, postupak je isti kao i u prethodno opisanoj metodi sa DAB hromogenom.

Sva imunohistohemijska bojenja izvedena su uz kontrolu kvaliteta i specifičnog bojenja primenom pozitivnih i negativnih kontrola prema preporukama UK NEQAS (UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry). Negativne kontrole isečaka dobijene su izostavljanjem primarnog antitela. Pregled svih korišćenih antigena i tehnika vizuelizacije dat je u Tabeli 7.

Tabela 7. Antitela korišćena u imunohistohemijskoj analizi aspiriranog trombotičnog materijala.

Antitelo	Poreklo	Proizvođač, kataloški broj	Dilucija
CD34, klasa II	Monoklonsko mišje	DAKO, M0760	1:50
CD31 (PECAM-1)	Monoklonsko mišje	ThermoScientific, MS-353-S0	1:50
CD31 (PECAM-1)	Poliklonsko zečje	Santa Cruz Biotechnology, sc-1506-R	1:50
VEGF	Monoklonsko mišje	Thermo Scientific, MS-1467-P0	1:100
VEGFR2 (Flk-1/KDR)	Poliklonsko zečje	Thermo Scientific, RB-1526-P0	1:25
CD105 (endoglin, TGFβ 1/3 receptor)	Monoklonsko mišje	Thermo Scientific, MS-1290-P0	1:25
D2-40	Monoklonsko mišje	DAKO, M3619	1:50
VEGFR3 (Flt-4)	Poliklonsko zečje	Thermo Scientific, PA5-32409	1:100
LYVE-1	Poliklonsko zečje	Abcam, ab10278	1:50
CD164	Poliklonsko zečje	Santa Cruz Biotechnology, sc-33124	1:50
CD73	Monoklonsko mišje	SantaCruz Biotechnology sc-32299	1:50
Ki67	Monoklonsko mišje	DAKO, M7240	1:50
αSMA	Monoklonsko mišje	DAKO, M0851	1:50
Vimentin	Monoklonsko mišje	DAKO, M7020	1:50

αSMA – α glatkomišićni aktin

Endotelne ćelije su identifikovane na osnovu ko-espresije CD34 i CD31. Prisustvo CD34⁺CD31⁺ ćelija gradirano je prema stepenu njihove prostorne organizacije kao što je prethodno opisano (84):

- a) pojedinačne, izolovane CD34⁺CD31⁺ ćelije na površini ili unutar trombotičnog materijala,
- b) grupisane CD34⁺CD31⁺ ćelije, kada postoje grupe od tri ili više CD34⁺CD31⁺ ćelija
- c) kapilarne petlje CD34⁺CD31⁺ ćelija

Trombi koji su pokazivali VEGF pozitivnost na površini tromba, ekstracelularno su klasifikovani u dve grupe, kao:

- a) slaba VEGF pozitivnost (ukoliko je VEGF ekspresija zauzimala $< 50\%$ površine tromba)
- b) veća VEGF pozitivnost (ukoliko je VEGF ekspresija zauzimala $\geq 50\%$ površine tromba)

Prisustvo eksprimiranog CD105 molekula označavalo je subpopulaciju aktiviranih endotelni ćelija. Prisustvo limfatičnih endotelni ćelija ispitivano je bojenjem na njihove membranske markere D2-40, VEGFR3 i LYVE-1. Marker Ki67 je korišćen za identifikaciju proliferišućih ćelija. Kako bi se dokazalo prisustvo glatkih mišićni ćelija kod tromba starijih od 1.dana korišćeno je imunohistohemijsko bojenje na alfa-glatkomišićni aktin (α SMA).

3.5.4. Dvostruko imunofluorescentno bojenje

Kod isečaka gde je postojala imunohistohemijska pozitivnost na CD34 i CD31, primenjeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje. Prvo primenjeno primarno antitelo je bilo CD31, dok je drugo primarno antitelo bilo D2-40, LYVE-1 ili VEGFR3. Nakon deparafinizacije i rehidratacije usledilo je demaskiranje antigena u Tris-EDTA puferu, pH = 9 (za D2-40, LYVE-1) ili citratnom puferu (za VEGFR3) uz zagrevanje pod povećanim pritiskom tokom 30 minuta. Između svakog narednog koraka isečci su ispirani u PBS puferu. Na sve isečke nanošen je 3% rastvor glicina u PBS-u tokom sat vremena. Zatim je na isečke dodat 1% rastvor BSA (engl. *bovine serum albumine*) kako bi se blokiralo nespecifično bojenje. Posle toga je nanošeno prvo primarno antitelo (CD31) uz inkubaciju od sat vremena na sobnoj temperaturi. Isečci su potom inkubirani sa prvim fluorescentno konjugovanim sekundarnim antitelom (kozije anti-zečje antitelo konjugovano sa Alexa Fluor 594, Santa Cruz Biotechnology, razblaženje 1:500 ili koziji anti-mišji IgG konjugivan sa FITC, Santa Cruz Biotechnology, sc-2010, razblaženje 1:100) tokom sat vremena u mraku. Usledila je inkubacija drugim primarnim antitelom (D2-40, Lyve-1 ili VEGFR3) tokom sat vremena, nekog čega su isečci inkubirani drugim fluorescentno konjugovanim sekundarnim antitelom (Alexa Fluor 488, kozije anti-mišje, Life Technologies, razblaženje 1:500 ili mišije anti-zečje IgG-TR, Santa

Cruz Biotechnology, sc-3917, razblaženje 1:100). Za bojenje jedra ćelija korišćen je DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Preparati su pokriveni medijumom koji smanjuje gubitak fluorescencije. Negativne kontrole tretirane su na isti način, uz izostavljanje primarnih antitela. Isečci su analizirani invertnim fluorescentnim konfokalnim mikroskopom (SP8, Leica).

3.6. Određivanje vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF

Svim pacijentima je neposredno nakon završene primarne PCI uzeto 5 mL krvi iz kubitalne vene za određivanje vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a. Uzorci su ostavljeni da koagulišu na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, nakon čega su centrifugirani na 2000 rpm tokom 10 minuta na 4°C kako bi se izdvojio serum. Svi uzorci seruma su alikvotirani (po 500 µL u propilenske tube) i čuvani na temperaturi od -80°C do analiziranja.

Vrednost cirkulišućeg serumskog VEGF₁₆₅ merena je komercijalnim enzimskim imunotestom (Quantikine®, R&D Systems, DEG00), tzv. „sendvič“ ELISA tehnikom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) prema priloženom uputstvu proizvođača. U sve bunarčiće ELISA ploče obložene primarnim monoklonskim antitelima specifičnim za humani VEGF dodavan je esej diluent, a zatim standard ili uzorci seruma. Nakon inkubacije od 2 sata na sobnoj temperaturi i ispiranja puferom, u svaki bunarčić dodat je konjugat poliklonskih antitela na humani VEGF i HRP usmerena na humani VEGF. Posle još jedne inkubacije od 2 sata na sobnoj temperaturi i ispiranja puferom, u svaki bunarčić dodat je rastvor supstrata i inkubiran 20 minuta u mraku. Kako bi se zaustavila reakcija enzim-supstrat, u svaki bunarčić pipetiran je tzv. „stop“ rastvor, uz blago mešanje ELISA ploče kako bi se ujednačila boja produkta u bunarčićima.

Očitavanje optičke gustine obavljalo se unutar 30 minuta od početka razvijanja reakcije na TECAN čitaču mikroploča, pri talasnoj dužini od 450 nm uz korekciju na 540 nm. Na osnovnu optičkih gustina sedam uzoraka rekombinantnog humanog VEGF-a poznatih koncentracija (VEGF standardi) konstruisana je standardna kriva. Koncentracija VEGF je određivana izračunavanjem prema jednačini standardne krive.

Sve analize su rađene u tehničkom duplikatu, a konačni rezultati su računati kao srednja vrednost merenja duplikata. Za testiranje ispravnosti ELISA testa korišćeni su uzorci seruma kontrolne grupe. Ovu grupu je činilo 20 zdravih ispitanika koji: (a) nisu imali kliničke i laboratorijske znake akutnog ili hroničnog inflamatornog oboljenja, (b) nisu imali neoplastično oboljenje, i (c) nisu imali poznatu ishemijsku bolest. Prema brošuri proizvođača, opseg vrednosti serumskog VEGF-a u zdravoj populaciji iznosi 62 – 707 pg/mL.

3.7. Angiografski ishodi

Uspešnost reperfuzije gradirana je na osnovu angiografskog epikardnog TIMI (engl. *Thrombolysis In Myocardial Infarction*) protoka kao što je opisano u TIMI studiji (192):

- TIMI gradus 0 – ne postoji anterogradni protok kroz okludiranu koronarnu arteriju
- TIMI 1 – postoji protok kontrasta kroz okluziju, ali ne ispunjava koronarnu arteriju do kraja
- TIMI 2 – kontrast prolazi do kraja infarktne arterije, ali je sporiji i slabiji u odnosu na normalne koronarne sudove
- TIMI 3 – normalan protok kao u susednim koronarnim sudovima

TIMI protok je registrovan na inicijalnom koronarogramu, posle prolaska koronarne žice, nakon aspiracije koronarnog tromba, predilatacije balon-kateterom (ukoliko je učinjena) i prilikom završnog koronarograma na kraju procedure. Završni koronarni angiogram je načinjen nakon intrakoronarne primene bolusa nitroglicerina od 200 mcg.

Stepen miokardne perfuzije procenjen je stepenom miokardnog ispiranja (engl. *Myocardial Blush Grade*; MBG) kao što su ranije opisali Van 't Hof i sar. (193):

- MBG 0 – nema miokardnog ispiranja (kontrast ne ulazi u mikrocirkulaciju)
- MBG 1 – minimalno miokardno ispiranje (veoma mala količina kontrasta u mikrocirkulaciji)
- MBG 2 – umereno miokardno ispiranje (manji stepen miokardne perfuzije u odnosu na susednu ili kontralateralnu neinfarktenu arteriju)

- MBG 3 – normalno miokardno ispiranje (slična perfuzija kao u susednoj ili u kontralateralnoj neinfarktnoj arteriji)

U slučaju pezistentnog miokardnog ispiranja (curenja kontrasta u intersticijum), stepen MBG je gradiran sa 0.

Tromb je definisan kao angiografski defekt u punjenju arterije kontrastom u vidu rasvetljenja okruženog kontrastom ili kao perzistiranje kontrasta (194). Distalna embolizacija registrovana je kao defekt u punjenju arterije kontrastom ili nagli prekid protoka kroz infarktnu arteriju ili neku od njenih grana distalno od infarktne lezije, bez dokaza o postojanju disekcije, stenozе ili vazospazma koronarne arterije (195). MBG i distalna embolizacija su analizirani na finalnom angiogramu. Svim pacijentima je računat SYNTAX skor na inicijalnom angiogramu, kao i nakon završene primarne PCI (rezidualni SYNTAX) (196). Analizu koronarnih angiograma obavljali su iskusni interventni kardiolozi.

3.8. Elektrokardiografska analiza

EKG analiza je vršena na osnovu 12-to kanalnih EKG zapisa snimljenih u sali za kateterizaciju neposredno pre primarne PCI, kao i 60 minuta nakon završene intervencije. Elevacija ST-segmenta je merena kao udaljenost od izoelektrične linije do elevacije ST-segmenta na 60 ms od J tačke. Rezolucija elevacije ST-segmenta (STR) je određena kao razlika sume elevacija ST-segmenta u svim odvodima inicijalnog EKG-a i sume svih ST-elevacija na EKG posle 60 minuta od završetka PCI procedure. STR je gradirana kao kompletna ($\geq 70\%$), delimična STR (30-69%) ili odsustvo STR ($< 30\%$) (193). U slučaju da je infarktna arterija bila LAD ili neka od njenih grana, infarkt je označen kao anteriorni (A), anteroseptalni (AS) ili anterolateralni (AL). Kada je infarktna arterija bila RCA ili Cx, infarkt je klasifikovan kao inferioni (I), inferolateralni (IL) ili inferoposterolateralni (IPL).

3.9. Merenje vrednosti kardiospecifičnih enzima

Tokom hospitalizacije ispitnicima su rutinski merene vrednosti oslobođenih kardiospecifičnih enzima kreatin kinaze (CK), miokardne frakcije CK (CK-MB, engl. *myocardial band*) i troponina I (TnI). Merenje je vršeno u Biohemijskoj laboratoriji

Urgentnog centra, Kliničkog centra Srbije spektrofotometrijskom metodom (CK i CK-MB) i hemiluminiscentnim imunoesejom (TnI). Radi procene veličine infarkta korišćene su vrednosti maksimalno oslobođenih enzima CK (CK_{max}) i troponina I (TnI_{max}) tokom hospitalizacije.

3.10. Ehokardiografski pregled

Ehokardiografsko ispitivanje rađeno je unutar 3 dana od primarne PCI, uz ponovni transtorakalni ehokardiogram nakon 6 meseci (\pm 15 dana) od perkutane intervencije. Globalna sistolna funkcija leve komore procenjena je merenjem ukupne ejeckione frakcije leve komore (LVEF, engl. *left ventricle ejection fraction*) po Simpsonovoj metodi. Segmentna kinetika procenjena je indeksom skora pokretljivosti zidova leve komore (engl. *Wall Motion Score Index; WMSI*) (197). WMSI je računat 17-o segmentnim modelom (197), gde je svaki segment zida bodovan prema stepenu miokardnog debljanja u sistoli na sledeći način: 1 - normokinetičan ili hiperkinetičan, 2 – hipokinetičan, 3 – akinetičan, i 4 – diskinetičan. WMSI je računat kao količnik sume skorova segmentnih pokreta i broja vizualizovanih segmenata. Tokom ehokardiografskih pregleda pacijentima su računati end-sistolni volumen (ESV) i end-dijastolni volumen (EDV) leve komore. Remodelovanje leve komore je definisano kao povećanje EDV leve komore za $> 20\%$ nakon 6 meseci u odnosu na vrednost na inicijalnom ehokardiogramu. Procenat promene ehokardiografskih parametara (Δ EDVI%, Δ ESVI%, Δ EF%, Δ WMSI%) definisan je kao razlika ehokardiografskog parametra nakon 6 meseci i prilikom inicijalnog pregleda (unutar 3 dana od STEMI), podeljena inicijalnom vrednošću tog parametra.

3.11. Neželjeni kardiovaskularni događaji

Tokom hospitalizacije i perioda praćenja od 6 meseci registrovana je pojava ozbiljnih srčanih i cerebralnih neželjenih događaja (MACCE, engl. *Major Cardiac and Cerebral Events*). MACCE podrazumeva ukupnu učestalost smrtnog ishoda, reinfarkta miokarda, moždanog udara, revaskularizacije infarktne arterije, tromboze stenta i hospitalizacije zbog srčane insuficijencije tokom 6 meseci praćenja posle STEMI. Reinfarkt miokarda je definisan kao pojava perzistentnog bola u grudima trajanja 20 i više minuta, uz elevaciju ST-segmenta i porast kardiospecifičnih enzima. Moždani udar je definisan kao

prisustvo novog fokalnog neurološkog deficita vaskularnog porekla u trajanju dužem od 24 sata. Revaskularizacija infarktne arterije definisana je kao PCI ili hirurška revaskularizacija prethodno lečene arterije usled pojave ishemije. Tromboza stenta definisana je kao definitivna tromboza stenta na koronarnoj angiografiji uz pojavu tegoba i kliničke slike akutnog koronarnog sindroma, ili kao verovatna tromboza stenta u slučaju naprasne smrti nakon primarne PCI. Hospitalizacija zbog srčane insuficijencije je definisana kao hospitalizacija duža od 24 sata zbog lečenja zastoje srčane insuficijencije.

3.12. Definicije

Starost aspiriranog tromba definisana je kao kategorijska varijabla, gradiranjem na osnovnu histološki procenjene starosti tromba, kao: (a) sveži tromb, starosti do 1. dana sa potpuno očuvanim eritrocitima, trombocitima i/ili granulocitima i fibrinom, (b) litički tromb, starosti od 1 do 5 dana, gde postoje polja kolikvacione nekroze tkiva uz fragmentaciju jedra granulocitnih leukocita, i (c) organizovani tromb, stariji više od 5 dana, gde se uočava urastanje mio/fibroblasta i glatkih mišićnih ćelija, sa ili bez depozicije vezivnog tkiva i urastanja krvnih sudova. Stariji trombi su podrazumevali litičke i organizovane trombe. Angiogeneza tromba definisana je kao kategorijska varijabla stepenom organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija u trombu, i to kao (a) pojedinačne, izolovane rane endotelne ćelje na površini ili unutar trombotičnog materijala, kao (b) grupisane endotelne ćelije kada formiraju grupe od tri ili više CD34⁺CD31⁺ ćelija, i u vidu (c) kapilarnih petlji CD34⁺CD31⁺ ćelija.

Reperfuzija miokarda analizirana je stepenom rezolucije elevacije ST-segmenta na elektrokardiogramu i stepenom miokardnog ispiranja na finalnom angiogramu. Rezolucija elevacije ST-segmenta predstavljena je kao kontinuirana varijabla i kategorisana kao kompletna, delimična rezolucija i odsustvo rezolucije ST-elevacije. Kompletna rezolucija elevacije ST-segmenta definisana je kao smanjenje ukupne elevacije ST-segmenta $\geq 70\%$ u odnosu na inicijalni EKG, delimična rezolucija kao smanjenje u opsegu $\geq 30-70\%$, a odsustvo rezolucije kao smanjenje ukupne ST-elevacije za $< 30\%$ (193). Step en ispiranja miokarda (engl. *myocardial blush grade*, MBG) kategorisan je kao MBG3, kada kontrast ispunjava i prazni mikrovaskularni

odeljak za manje od 3 srčana ciklusa, MBG2, ukoliko ispiranje miokarda od kontrasta traje ≥ 3 srčana ciklusa, MBG1, ukoliko kontrast jedva ispunjava mikrovaskularni odeljak, i MBG0, kada kontrast ne ispunjava mikrovaskulaturu ili ispunjava intersticijum (van 'Hof 1998). Reperfuzija miokarda procenjena je pojavom kompletne rezolucije elevacije ST-segmenta i učestalošću MBG2 i MBG3 (MBG2/3).

Enzimski procenjena veličina infarkta miokarda učinjena je na osnovu maksimalno oslobođenih vrednosti kardiospecifičnih enzima CK i troponina I.

Globalna sistolna funkcija leve komore procenjena je merenjem ukupne ejeckione frakcije leve komore (LVEF, engl. *left ventricle ejection fraction*) po Simpsonovoj metodi. Segmentna kinetika procenjena je indeksom skora pokretljivosti zidova leve komore (engl. *Wall Motion Score Index; WMSI*). WMSI je računat 17-o segmentnim modelom, gde je svaki segment zida bodovan prema stepenu miokardnog debljanja u sistoli na sledeći način: 1 - normokinetičan ili hiperkinetičan, 2 – hipokinetičan, 3 – akinetičan, i 4 – diskinetičan. WMSI je računat kao količnik sume skorova segmentnih pokreta i brojem vizualizovanih segmenata (197). Remodelovanje leve komore je definisano kao povećanje EDV leve komore za $> 20\%$ nakon 6 meseci u odnosu na vrednost na inicijalnom ehokardiogramu. Procenat promene ehokardiografskih parametara ($\Delta\text{EDVI}\%$, $\Delta\text{ESVI}\%$, $\Delta\text{EF}\%$, $\Delta\text{WMSI}\%$) definisan je kao razlika ehokardiografskog parametra nakon 6 meseci i prilikom inicijalnog pregleda (unutar 3 dana od STEMI), podeljena inicijalnom vrednošću tog parametra.

Neželjeni kardiovaskularni događaji definisani su kao ukupna učestalost smrtnog ishoda, reinfarkta miokarda, moždanog udara, revaskularizacije infarktne arterije, tromboze stenta i hospitalizacije zbog srčane insuficijencije tokom 6 meseci praćenja posle STEMI. Reinfarkt miokarda je definisan kao pojava perzistentnog bola u grudima trajanja 20 i više minuta, uz elevaciju ST-segmenta i porast kardiospecifičnih enzima. Moždani udar je definisan kao prisustvo novog fokalnog neurološkog deficita vaskularnog porekla u trajanju dužem od 24 sata. Revaskularizacija infarktne arterije definisana je kao PCI ili hirurška revaskularizacija prethodno lečene arterije usled pojave ishemije. Tromboza stenta definisana je kao definitivna tromboza stenta na koronarnoj angiografiji uz pojavu tegoba i kliničke slike akutnog koronarnog sindroma,

ili kao verovatna tromboza stenta u slučaju naprasne smrti nakon primarne PCI. Hospitalizacija zbog srčane insuficijencije je definisana kao hospitalizacija duže od 24 sata zbog lečenja zastojne srčane insuficijencije.

3.13. Etički aspekti istraživanja

Svi ispitanici su pre primarne PCI bili detaljno upoznati sa planom istraživanja, ciljevima i analizama, i dali saglasnost za uključivanje u studiju uz potpisivanje informisanog pristanka. Informisani pristanak je sastavljen u skladu sa preporukama Helsinške deklaracije o ljudskim pravima i odobren od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.14. Statistička analiza

Od metoda deskriptivne statistike određivani su sledeći parametri: aritmetička sredina (za varijable sa normalnom raspodelom), medijana (za varijable koje nisu imale normalnu distribuciju), standardna devijacija i interkvartilni rang. Od metoda analitičke statistike korišćeni su testovi za procenu značajnosti razlike (Studentov t-test, χ^2 test, Fišerov test, ANOVA, Man-Whitney U-test, Kruskal-Wallis H-test), i metode za ispitivanje značajnosti povezanosti (Spirmanov koeficijent korelacije).

Normalnost distribucije podataka je ispitivana Kolmogorov-Smirnov testom. Za prikaz varijabli sa normalnom distribucijom korišćene su vrednosti aritmetičke sredine sa standardnom devijacijom (mean \pm SD). Kontinuirane varijable koje nisu imale normalnu distribuciju prikazane su vrednostima medijane i interkvartilnim opsegom (25.-75. percentil). Kategorijske varijable prikazane su kao frekvencije i procenti.

Statistička značajnost je definisana kao $p < 0.05$. U statističkoj analizi korišćen je komercijalni softver SPSS ver. 23 Inc., Chicago.

4. REZULTATI

4.1. Ispitivana populacija

Od 100 konsekutivnih STEMI bolesnika kod kojih je tokom primarne PCI urađena aspiracija koronarnog tromba, kod 88 pacijenata je bilo dovoljno materijala za patohistološku analizu, i oni su činili definitivnu studijsku populaciju. Kod 9 bolesnika je tokom patohistološke pripreme i kalupljenja za svetlosnu mikroskopiju došlo do razlaganja trombotičnog materijala, dok kod 3 ispitanika nije bilo dovoljno materijala za histološku analizu ($<1 \text{ mm}^3$).

4.2. Kliničke karakteristike pacijenata

Kliničke karakteristike pacijenata su bile uobičajene za populaciju pacijenata sa koronarnom bolešću srca (Tabela 8). Prosečna starost pacijenata je iznosila 59 godina, dok je 73,9% bilo muškog pola. Skoro svi pacijenti (87/88, 98,8%) su imali bar jedan od standardnih faktora rizika za koronarnu bolest srca. Ukupno 58% ispitanika imalo je povišene vrednosti arterijskog pritiska, 48,9% pacijenata je imalo hiperholesterolemiju, a kod 45,5% je postojala porodična istorija kardiovaskularnih bolesti. Većina pacijenata (79/89, 89,8%) je prilikom STEMI prezentacije bila bez znakova srčane insuficijencije. Ukupno ishemijsko vreme iznosilo je u proseku 180 minuta (IQR 120,0 - 337,5 minuta).

Tabela 8. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata.

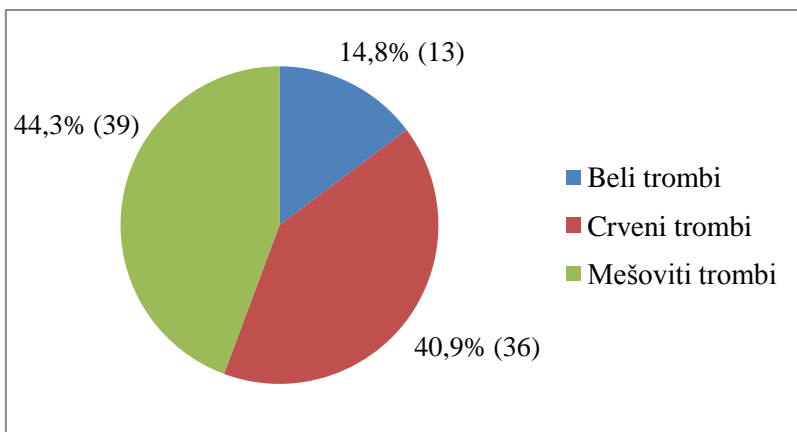
Muški pol, n	65/88 (73,9%)
Starost (godine \pm SD)	58,8 \pm 11,9
BMI ($\text{kg}/\text{m}^2 \pm$ SD)	27,07 \pm 4,18
Pušenje, n	50/88 (56,8%)
Hipertenzija, n	51/88 (58%)
Diabetes mellitus, n (%)	13/88 (14,8%)
• Oralni hipoglikemici	10/88 (11,4%)
• Insulin, n	3/88 (3,4%)
Hiperholesterolemija, n	43/88 (48,9%)
Hereditet za KVB, n	40/88 (45,5%)

Srčana frekvenca (/min ± SD)	75,52±18,12
Sistolni KP (mmHg ± SD)	122,67±22,42
Dijastolni KP (mmHg ± SD)	76,25±12,85
Antecedentna AP, n	45/88 (51,1%)
Prethodna AP, n	22/88 (25%)
Killip klasa, n	
• 1	79/88 (89,8%)
• 2	8/88 (9,1%)
• 3	1/88 (1,1%)
Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	
• Kašnjenje bolesnika	60 (23-130)
• Kašnjenje sistema	105 (71,5-165,0)
STEMI lokalizacija, n	
• A, AS, AL	57/88 (64,8%)
• I, IL, IPL	31/88 (35,2%)

SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; KVB – kardiovaskularne bolesi; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg; A – anteriorni; AS – anteroseptalni; AL – anterolateralni; I – inferiorni; IL – inferolateralni; IPL – inferoposterolateralni.

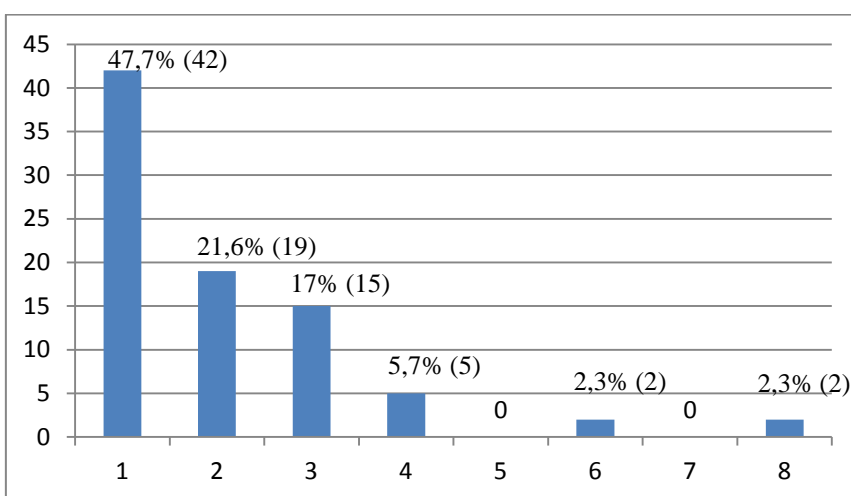
4.3. Makroskopski izgled tromba

Kod svih pacijenata aspiriran je makroskopski vidljiv tromb. Trombotični materijal bio je najčešće mešovitog tipa, sa poljima crvene i bele boje (44,3%, Grafikon 1). Analizom predominantne obojenosti tromba (predominantno crvene ili bele boje), crveni tromb je bio prisutan kod tri četvrtine pacijenata (n=66, 75%), dok je kod 22 pacijenata (25%) aspiriran tromb bio bele boje.



Grafikon 1. Makroskopski izgled tromba prema boji aspiriranog materijala.

Kod skoro polovine pacijenata ($n=42$, 47,7%) aspiriran je samo jedan segment trombotičnog materijala, dok je kod 19 pacijenata (21,6%) aspiracijom dobijeno dva segmenta tromba, odnosno kod 15 pacijenata (17%) dobijena su 3 segmenta aspiriranog tkiva (Grafikon 2).



Grafikon 2. Broj segmenata aspiriranog tromba kod STEMI pacijenata.

Prosečna dužina aspiriranog materijala bila je 6,5 mm (IQR 4,25-11,75 mm). Slika 5 pokazuje veliki, predominantno crveni tromb, aspiriran iz desne koronarne arterije (RCA) koji sadrži više segmenata trombotičnog tkiva.



Slika 5. Veliki predominantno crveni tromb sa više segmenata trombotičnog tkiva aspiriran iz RCA.

Makroskopski izgled aspiriranog tromba nije se značajno razlikovao u odnosu na prisustvo faktora rizika za koronarnu bolest. Jedino je kod pacijenata sa porodičnim kardiovaskularnim opterećenjem češće aspiriran crveni tromb (54,5% vs. 18,2%, $p=0,003$). Aspiracija crvenog, odnosno belog tromba nije zavisila od ukupnog ishemijskog vremena ($p=0,950$). Kod pacijenata sa bolovima u grudima u poslednja 72h pred STEMI češće je aspiriran crveni tromb (57,6% vs. 31,8%, $p=0,036$).

Uočena je povezanost makroskopskog izgleda tromba sa prethodnom pojavom angine pectoris ($p=0,010$). Pacijenti sa predinfarktnom anginom češće su imali crveni tromb (68,2% vs. 32,8%), dok je kod pacijenata bez prethodnih epizoda bolova u grudima češće aspiriran beli tromb (95,4% vs. 4,6%, $p=0,010$). Postojala je tendencija ka većem broju hipertoničara u grupi pacijenata sa crvenim trombom u odnosu na aspiriran beli tromb (63,6% vs. 40,6%, $p=0,061$) (Tabela 9).

Tabela 9. Kliničke karakteristike pacijenata u odnosu na makroskopsku boju tromba.

Karakteristike pacijenata	Crveni tromb (n=66)	Beli tromb (n=22)	p
Muški pol, n	48/66 (72,7%)	17/22 (77,3%)	0,674
Starost (godine \pm SD)	59,68 \pm 11,72	56,18 \pm 12,01	0,233
BMI (kg/m ² \pm SD)	27,56 \pm 4,34	25,59 \pm 3,33	0,055
Pušenje, n	37/66 (56,1%)	13/22 (59,1%)	0,804
Hipertenzija, n	42/66 (63,6%)	9/22 (40,9%)	0,061
Diabetes mellitus, n	11/66 (16,7%)	2/22 (9,1%)	0,386
Hiperholesterolemija, n	35/66 (53%)	8/22 (36,4%)	0,176

Hereditet za KVB, n	36/66 (54,5%)	4/22 (18,2%)	0,003
Srčana frekvenca (/min ± SD)	74,32±19,57	79,14±12,48	0,283
Sistolni KP (mmHg ± SD)	122,71±23,89	122,55±17,78	0,976
Dijastolni KP (mmHg ± SD)	75,97±13,85	77,09±10,56	0,725
Antecedentna AP, n	38/66 (57,6%)	7/22 (31,8%)	0,036
Prethodna AP, n	21/66 (31,8%)	1/22 (4,5%)	0,010
Killip klasa, n			
• 1	57/66 (86,4%)	22/22 (100%)	
• 2	8/66 (12,1%)	0	
• 3	1/66 (1,5%)	0	
Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	187,5 (120,0-327,5)	176,5 (103,75-435,0)	0,950
• Kašnjenje bolesnika	50,0 (26,5-141,25)	60,0 (22,5-102,5)	0,877
• Kašnjenje sistema	105,0 (74,5-165,0)	100,0 (58,75-264,25)	0,958
STEMI lokalizacija, n (%)			
• A, AS, AL	20/66 (30,3%)	11/22 (50%)	0,094
• I, IL, IPL	46/66 (69,7%)	11/22 (50%)	

SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; KVB – kardiovaskularne bolesti; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg; A – anteriorni; AS – anteroseptalni; AL – anterolateralni; I – inferiorni; IL – inferolateralni; IPL – inferoposterolateralni.

4.4. Mikroskopski izgled tromba

4.4.1. Morfometrijska analiza

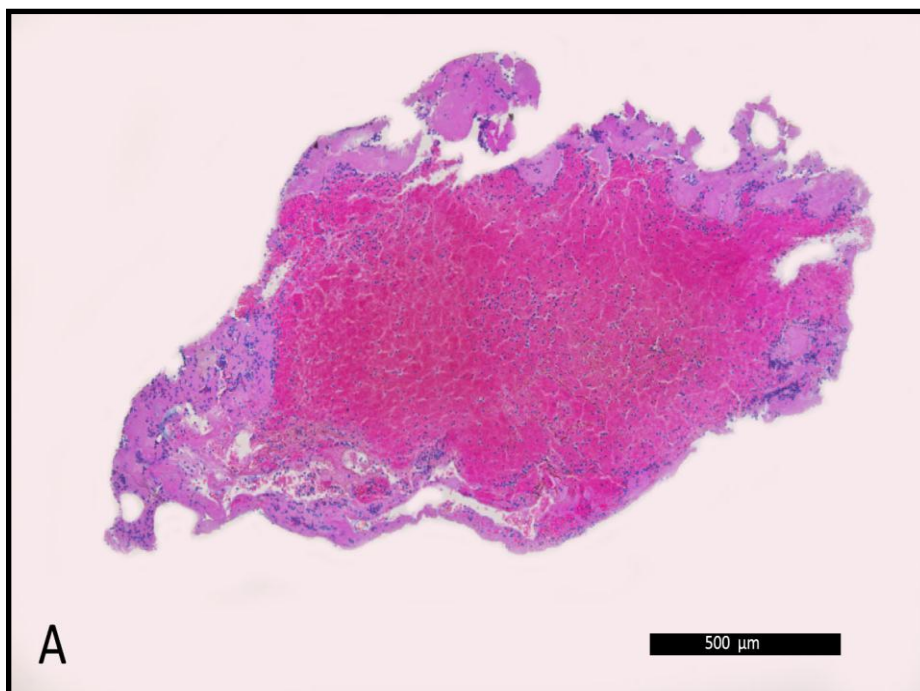
Prosečna dužina trombotičnog materijala na histološkim presecima je iznosila 3,33 cm (Tabela 10). Veću površinu tromba pratila je veća dužina tromba ($p < 0,001$), veća širina tromba ($p < 0,001$), veći sadržaj eritrocita ($p < 0,001$), i manji sadržaj fibrina ($p < 0,001$). Registrovana je snažna negativna korelacija zastupljenosti fibrina i eritrocita u trombu ($p < 0,001$). Različita zastupljenost eritrocita i fibrina u trombotičnom materijalu prikazana je na Slici 6.

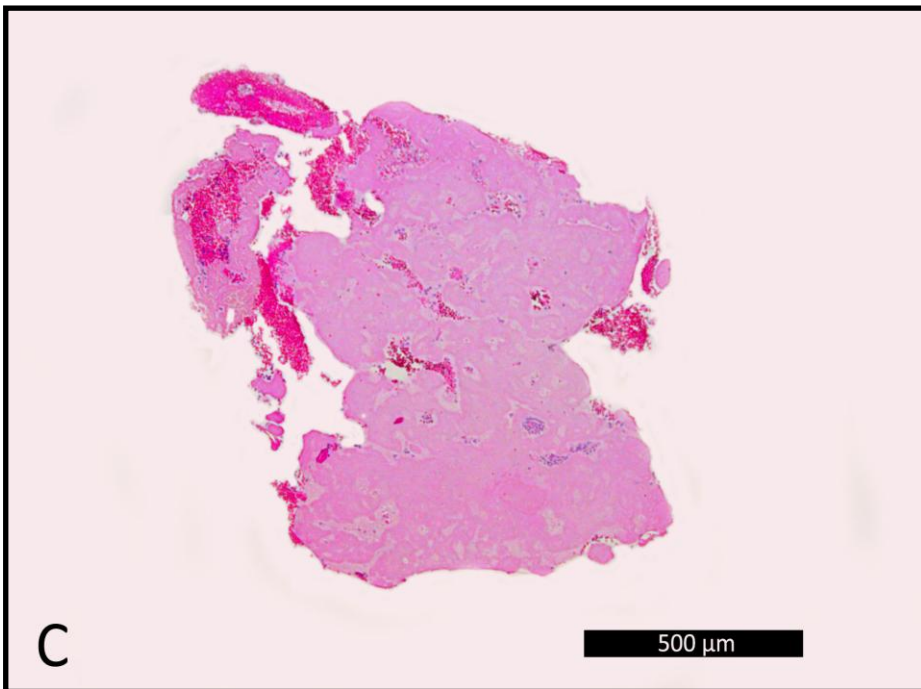
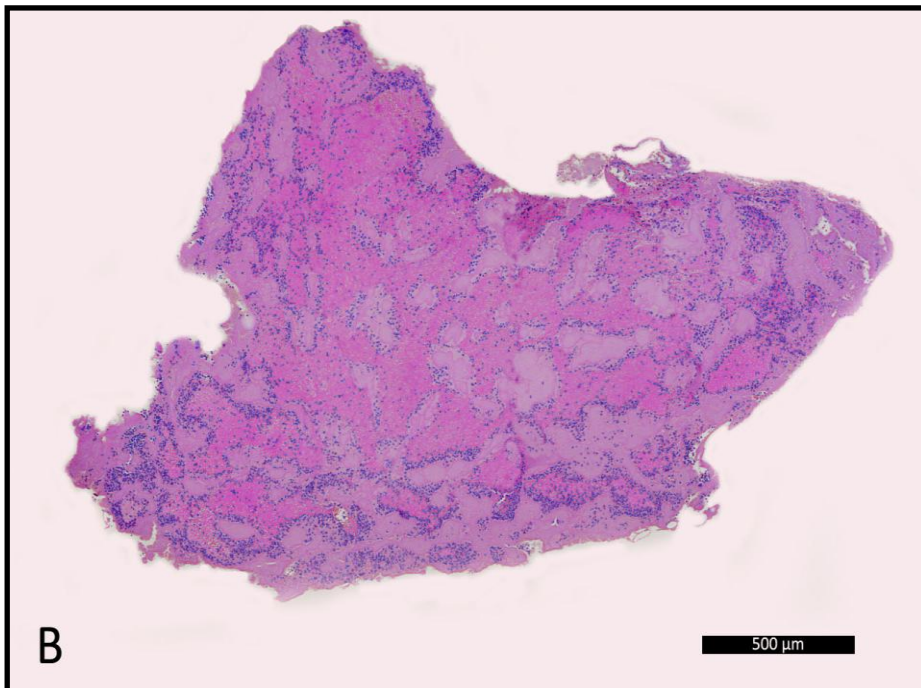
Tabela 10. Morfometrijska analiza aspiriranog trombotičnog materijala.

Dužina tromba (cm, IQR)	3,33 (1,88-5,35)
Širina tromba (mm, IQR)	0,99 (0,76-1,35)
Površina tromba (mm ² , IQR)	2,66 (1,01-5,55)
Površina eritrocita (mm ² , IQR)	1,50 (2,82-3,26)
Površina eritrocita (% , ±SD)	48,91±29,67
Površina fibrina (mm ² , IQR)	0,96 (0,41-2,11)
Površina fibrina (% , ±SD)	48,41±29,36

IQR – interkvartilni opseg; SD – standardna devijacija.

Trajanje ishemijskog vremena nije značajno koreliralo sa procentualnim sadržajem fibrina i eritrocita u trombu, ali je zapažena tendencija ka manjem sadržaju fibrina kod dužeg trajanja ishemijskog vremena ($\rho=-0,163$, $p=0,128$) i većem sadržaju eritrocita ($\rho=0,183$, $p=0,089$).





Slika 6. Mikroskopski izgled tromba gde dominira centralna eritrocitna komponenta uz malo fibrina na periferiji (A), približno jednaka površina eritrocita i fibrina, gde fibrin prožima polja eritrocita dajući „slojeviti“ izgled trombu (B), i predominantno fibrinski tromb (C).

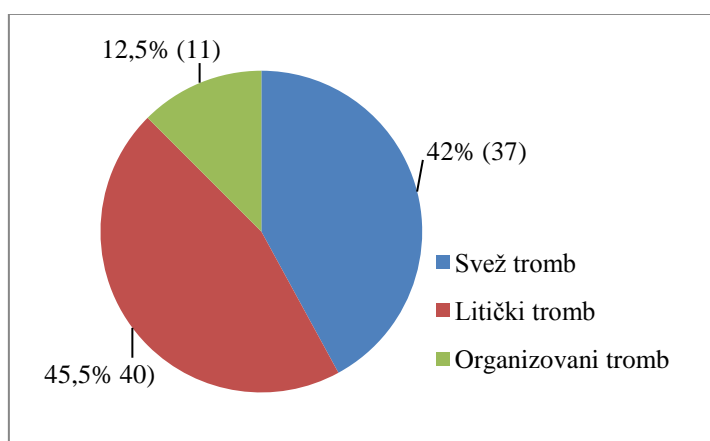
Crveni trombi su bili značajno duži ($p=0,001$), širi ($p=0,009$), veće ukupne površine ($p<0,001$) i površine eritrocita ($p<0,001$) u odnosu na bele trombe, dok su beli trombi pokazivali veći sadržaj fibrina ($p<0,001$) u odnosu na crvene trombe (Tabela 11).

Tabela 11. Morfometrijske karakteristike crvenih i belih trombova.

	Crveni trombi (n=66)	Beli trombi (n=22)	p
Dužina tromba (mm, IQR)	3,92 (2,43-6,76)	1,92 (1,47-3,48)	0,001
Širina tromba (mm)	1,09 (0,84-1,44)	0,85 (0,48-1,12)	<0,001
Površina tromba (mm ²)	3,39 (1,89-6,21)	0,95 (0,43-2,25)	<0,001
Površina eritrocita (%)	57,90±24,08	21,92±28,90	<0,001
Površina fibrina (%)	39,20±22,75	76,04±30,03	<0,001

4.4.2. Starost aspiriranog tromba

Kod 37 (42%) pacijenata aspiriran je svež tromb, litičke promene u aspiriranom materijalu registrovane su kod 40 (45,5%) pacijenata, dok je najmanje pacijenata ($n=11$, 12,5%) imalo organizovan tromb (Grafikon 3). Ukupno 51 (58%) pacijenata je imalo stariji tromb, tj. tromb histološki stariji od jednog dana. Elementi aterosklerotskog plaka uočeni su kod 24 (27,3%) pacijenata, i to najčešće u svežim (16, 66,7%) i litičkim trombima (6, 25%), a najmanje kod pacijenata sa organizovanim trombima (2, 8,3%)



Grafikon 3. Raspodela aspiriranog trombotičnog materijala po histološki procenjenoj starosti.

Kod 51 (58%) pacijenata aspirirani materijal je imao komponente različite histološke starosti. Uniformna histološka starost viđena je kod svih svežih trombova, kao i kod jednog litičkog i jednog organizovanog tromba (Tabela 12).

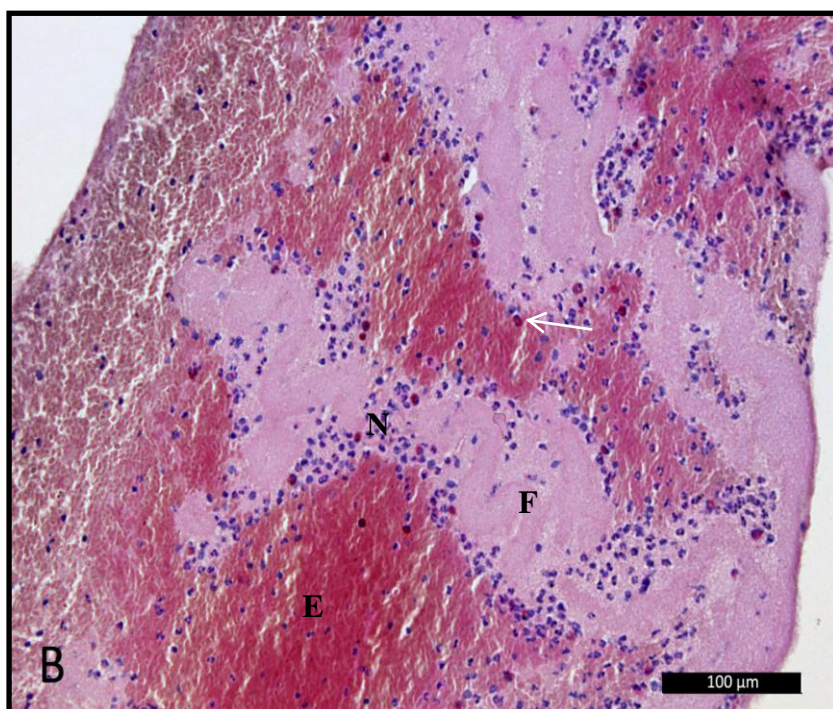
Tabela 12. Klasifikacija aspiriranog tromba prema starosti trombotičnog materijala.

Starost tromba	Broj pacijenata (n=88)	Starost tromba (podgrupa)	Broj pacijenata
Svež tromb	37/88 (42%)	Samo svež	37/88 (42%)
Litički tromb	40/88 (45,5%)	Samo litički	1/40 (1,14%)
		Svež i litički	39/40(44,32%)
Organizovan tromb	11/88 (12,5%)	Samo organizovan	1/11 (1,14%)
		Svež i organizovan	0
		Litički i organizovan	1/11 (11,4%)
		Svež, litički i organizovan	9/11 (10,23%)

Kod svežih trombova uočeni su slojeviti regioni eritrocita, trombocita, fibrina, neutrofilnih granulocita, eozinofilnih granulocita, uz ređe prisutne monocite, makrofage i limfocite (Slika 7 A-B).

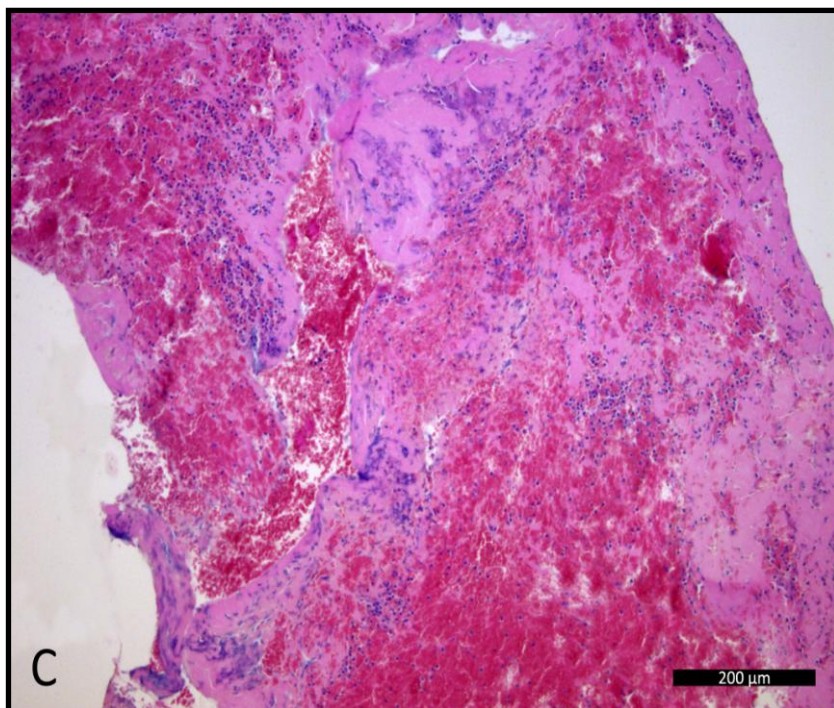


Slika 7A. Svež tromb sa većim poljima eritrocita koje presecaju polja fibrina (HE).

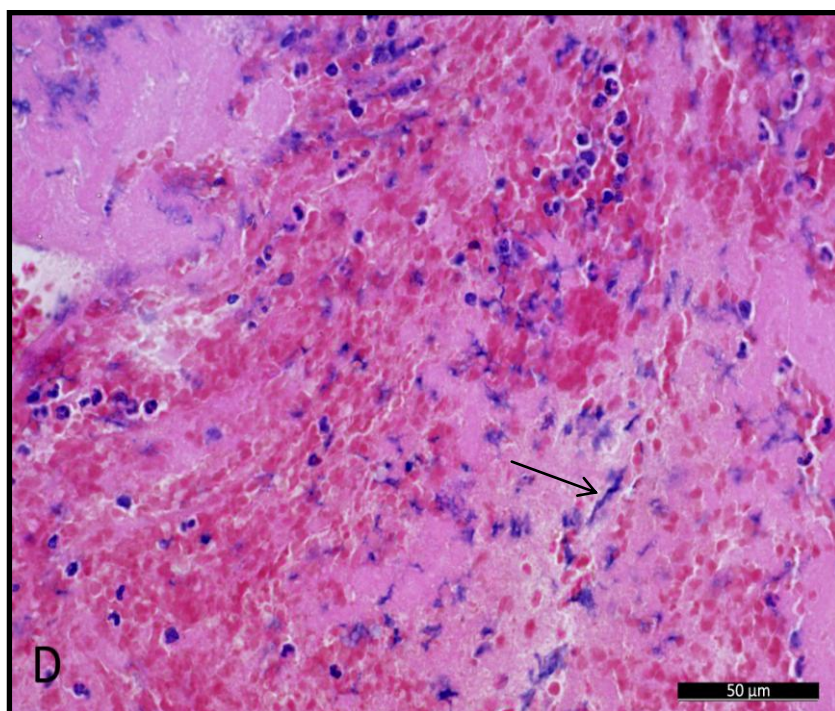


Slika 7B. Svež tromb gde se uočavaju eritrociti (E), neutrofilni granulociti (N), eozinofilni granulociti (strelica) i fibrin (F).

Litički trombi su pokazivali polja kolikvacione nekroze uz karioreksu neutrofilnih granulocita (Slika 7C-D).

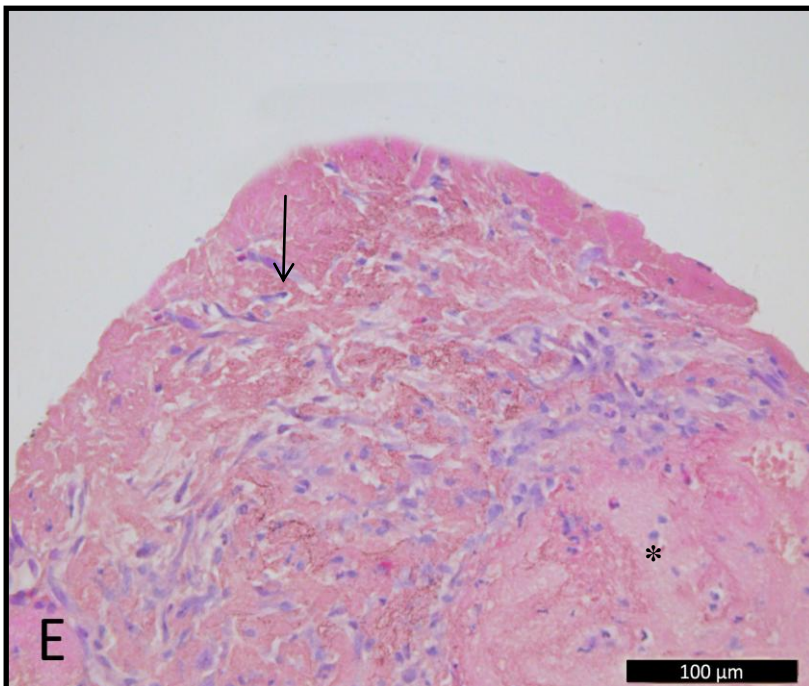


Slika 7C. Litički tromb, sa zonama kolikvacione nekroze i kariorekse neutrofila (HE).

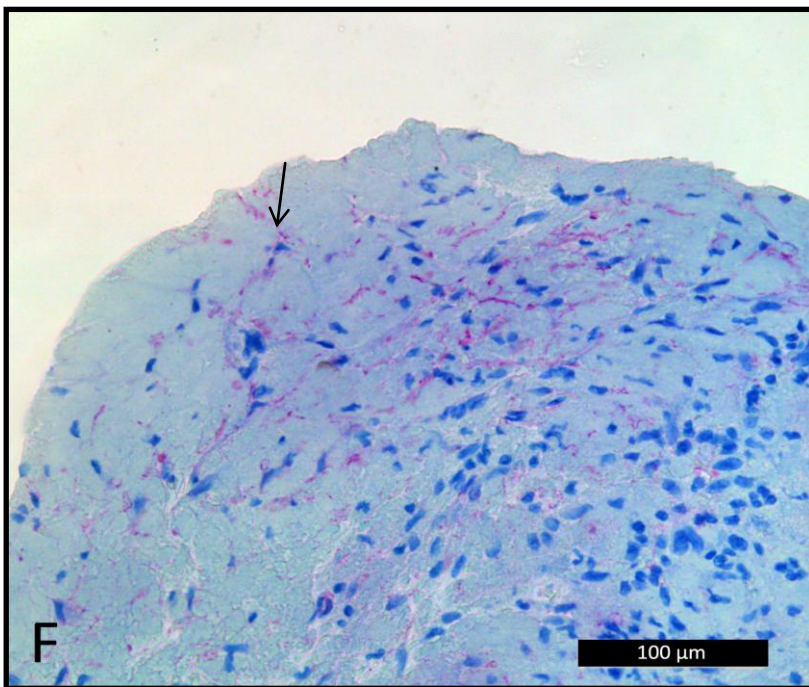


Slika 7D. Litički tromb sa karioreksom neutrofilnih granulocita (strelica) (HE).

Organizovani trombi su pokazivali depoziciju kolagena, uz urastanje glatkomišićnih ćelija i endotelnih ćelija (Slika 7E-F).

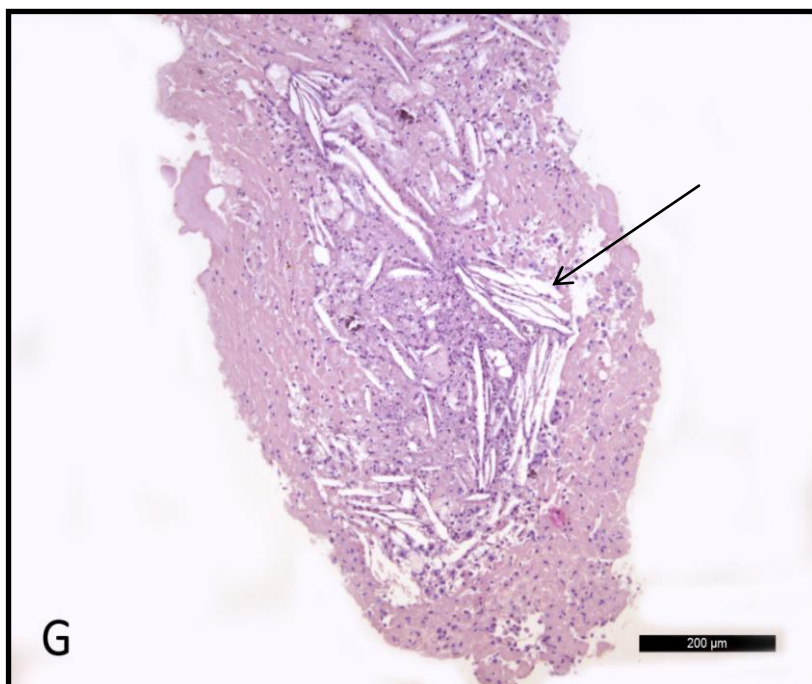


Slika 7E. Organizovani tromb sa uraslim glatkomišićnim ćelijama (strelica) i depozicijom kolagena (zvezdica).

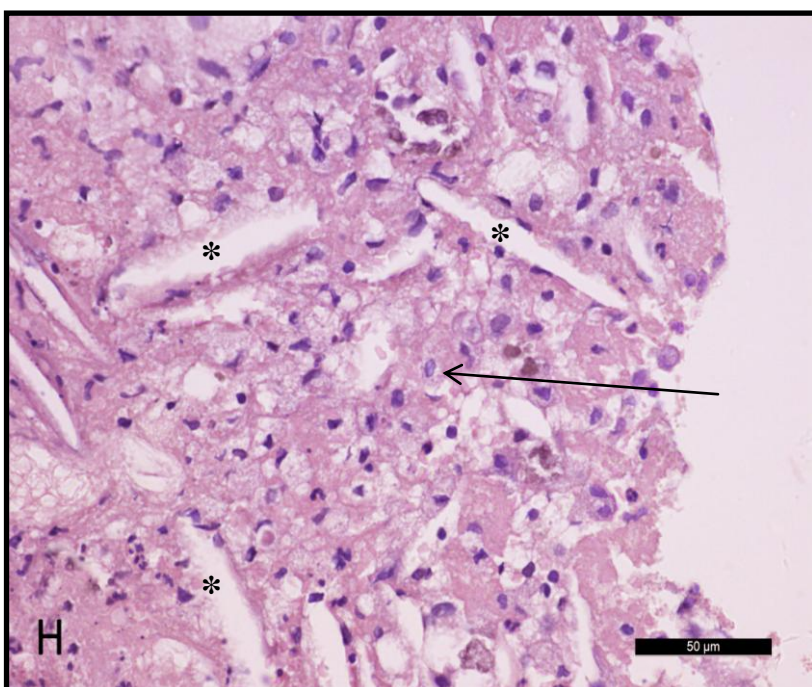


Slika 7F. Prisustvo glatkomišićni ćelija koje pokazuju imunoreaktivnost na α SMA (strelica).

Slike 7G i 6H pokazuju elemente aterosklerotskog plaka prisutne u aspiriranom trombu.



Slika 7G. Holesterolski kristali prisutni u aspiriranom koronarnom trombu (strelica).



Slika 7H. Elementi aterosklerotskog plaka u aspiriranom trombu (holesterolski kristali označeni zvezdicama i penaste ćelije označene strelicom).

Kod pacijenata sa bolom u grudima unutar 72 h pre STEMI češće su registrovani organizovani (72,2%) i litički trombi (60%) u poređenju sa svežim trombima (35,1%, $p=0,029$). Starost tromba nije bila povezana sa pojavom predinfarktne angine ($p=0,252$). Postojala je tendencija ka dužem ishemijskom vremenu kod pacijenata sa histološki starijim koronarnim trombima koja nije dostigla statističku značajnost ($p=0,062$). Druge kliničke karakteristike nisu bile povezane sa starošću aspiriranog trombotičnog materijala (Tabela 13).

Tabela 13. Kliničke karakteristike pacijenata u odnosu na starost aspiriranog tromba (svež, litički i organizovan).

Karakteristike pacijenata	Svež tromb (n=37)	Litički tromb (n=40)	Organizovani tromb (n=11)	P
Muški pol, n	27/37 (73%)	30/40 (75%)	8/11 (72,7%)	0,976
Starost (godine \pm SD)	59,59 \pm 12,58	58,48 \pm 12,32	57,36 \pm 7,66	0,840
BMI (kg/m ² \pm SD)	27,74 \pm 4,45	26,63 \pm 4,01	26,43 \pm 3,51	0,438
Pušenje, n	21/37 (56,8%)	22/40 (55,5%)	7/11 (63,6%)	0,877
Hipertenzija, n	24/37 (64,9%)	22/40 (55,5%)	5/11 (45,5%)	0,455
Diabetes mellitus, n	4/37 (10,8%)	8/40 (20%)	1/11 (9,1%)	0,447
Hiperholesterolemija, n (%)	18/37 (48,6%)	20/40 (50%)	5/11 (45,5%)	0,964
Hereditet za KVB, n (%)	17/37 (45,9%)	18/40 (45)	5/11 (45,5%)	0,997
Srčana frekvenca (/min \pm SD)	77,35 \pm 16,79	75,98 \pm 20,86	67,73 \pm 7,95	0,299
Sistolni KP (mmHg \pm SD)	125,32 \pm 22,64	119,70 \pm 22,99	124,55 \pm 21,50	0,527
Dijastolni KP (mmHg \pm SD)	78,00 \pm 13,16	74,73 \pm 13,28	75,91 \pm 10,20	0,538
Antecedentna AP, n	13/37 (35,1%)	24/40 (60%)	8/11 (72,7%)	0,029
Prethodna AP, n	6/37 (16,2%)	13/40 (32,5%)	3/11 (27,3%)	0,252
Killip klasa, n				
• 1	32/37 (86,5%)	36/40 (90%)	11/11 (100%)	
• 2	5/37 (13,5%)	3/40 (7,5%)	0	
• 3	0	1/40 (2,5%)	0	
Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	150,0 (95,0-292,5)	212,5 (136,25-412,5)	230 (140-660)	0,062
• Kašnjenje bolesnika	37 (15-105)	60 (30-180)	60 (30-200)	0,088
• Kašnjenje sistema	100,0 (57,5-167,5)	112,5 (76,25-164,5)	110 (75-330)	0,610

STEMI lokalizacija, n				
• A, AS, AL	11/37 (29,7%)	16/40 (40%)	4/11 (36,4%)	0,639
• I, IL, IPL	26/37 (70,3%)	24/40 (60%)	7/11 (63,6%)	

SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; KVB – kardiovaskularne bolesti; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg; A – anteriorni; AS – anteroseptalni; AL – anterolateralni; I – inferiorni; IL – inferolateralni; IPL – inferoposterolateralni.

Histološka podela starosti tromba na sveže i starije dala je slične rezultate. Prisustvo starijeg tromba bilo je povezano sa pojavom antecedentne angine ($p=0,011$), dok povezanost nije registrovana u slučaju ranije pojave bola u grudima ($p=0,105$). Ukupno ishemijsko vreme bilo je značajno duže kod pacijenata sa trombima starijim od 24 h u poređenju sa svežim trombotičnim tkivom ($p=0,019$). Registrovano je značajno duže kašnjenje bolesnika u grupi sa starijim trombima ($p=0,028$), dok nije bilo razlike u kašnjenju zdravstvenog sistema ($p=0,352$) (Tabela 14).

Tabela 14. Kliničke karakteristike pacijenata u odnosu na starosti aspiriranog tromba (sveži i stariji).

Karakteristike pacijenata	Sveži trombi (n=37)	Stariji trombi (n=51)	p
Muški pol, n	27/37 (73%)	38/51 (74,5%)	0,871
Starost (godine \pm SD)	59,59 \pm 12,58	58,24 \pm 11,42	0,599
BMI (kg/m ² \pm SD)	27,74 \pm 4,45	26,58 \pm 3,87	0,200
Pušenje, n	21/37 (56,8%)	29/51 (56,9%)	0,992
Hipertenzija, n	24/37 (64,9%)	27/51 (52,9%)	0,263
Diabetes mellitus, n	4/37 (10,8%)	9/51 (17,6%)	0,372
Hiperholesterolemija, n	18/37 (48,6%)	25/51 (49%)	0,973
Hereditet za KVB, n	17/37 (45,9%)	23/51 (45,1%)	0,937
Srčana frekvenca (/min \pm SD)	77,35 \pm 16,79	74,20 \pm 19,07	0,423
Sistolni KP (mmHg \pm SD)	125,32 \pm 22,64	120,75 \pm 22,55	0,347
Dijastolni KP (mmHg \pm SD)	78,00 \pm 13,16	74,98 \pm 12,60	0,279
Antecedentna AP, n	13/37 (35,1%)	32/51 (62,7%)	0,011
Prehodna AP, n	6/37 (16,2%)	16/51 (31,4%)	0,105
Killip klasa, n			

• 1	32/37 (86,5%)	47/51 (92,2%)	
• 2	5/37 (13,5%)	3/51 (5,9%)	
• 3	0	1/51 (1,9%)	
Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	150,0 (95,0-292,5)	220 (140-450)	0,019
• Kašnjenje bolesnika	37 (15-105)	60 (30-180)	0,027
• Kašnjenje sistema	100,0 (57,5-167,5)	110 (75-165)	0,352
STEMI lokalizacija, n			
• A, AS, AL	11/37 (29,7%)	20/51 (39,2%)	0,358
• I, IL, IPL	26/37 (70,3%)	31/51 (60,8%)	

SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; KVB – kardiovaskularne bolesti; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg; A – anteriorni; AS – anteroseptalni; AL – anterolateralni; I – inferiorni; IL – inferolateralni; IPL – inferoposterolateralni.

Nije bilo razlike u makroskopskoj boji tromba (crveni ili beli) u odnosu na starost tromba (svež, litički i organizovan, $p=0,301$). Takođe, makroskopske i mikroskopske karakteristike tromba nisu se značajno razlikovale prema histološki procenjenoj starosti trombotičnog tkiva (Tabela 15). Razlike nisu uočene ni prilikom klasifikacije tromba na svež i stariji aspirirani materijal (Tabela 16). Sveži i stariji trombi se nisu značajno razlikovali u boji ($p=0,383$). Uočeno je da su stariji trombi bili širi u odnosu na sveže ($p=0,036$), dok nije bilo razlike u ukupnoj površini tromba ($p=0,597$), procentualnoj zastupljenosti eritrocita ($p=0,223$) i fibrina ($p=0,268$).

Tabela 15. Makroskopske i mikroskopske karakteristike tromba u odnosu na histološku starost (svež, litički i organizovan).

Karakteristike tromba	Starost tromba			p
	Svež tromb (n=37)	Litički tromb (n=40)	Organizovani tromb (n=11)	
Makroskopske karakteristike				
Broj fragmenata, n (IQR)	2 (1-3)	2 (1-3)	1 (1-1)	
Dužina tromba (cm, IQR)	7,5 (5,0-13,5)	6,25 (4-10)	5 (3-10)	0,076
Crveni tromb, n	26/37 (70,3%)	33/40 (82,5%)	7/11 (63,6%)	0,301
Beli tromb, n	11/37 (29,7%)	7/40 (17,5%)	4/11 (36,4%)	

Mikroskopske karakteristike				
Dužina tromba (cm, IQR)	3,25 (1,70-4,99)	3,50 (2,01-6,59)	3,32 (1,78-5,90)	0,672
Širina tromba (mm, IQR)	0,86 (0,59-1,29)	1,17 (0,92-1,37)	0,94 (0,74-1,30)	0,055
Površina tromba (mm ² , IQR)	2,54 (0,75-6,77)	3,29 (1,55-5,39)	2,00 (1,00-5,91)	0,721
Površina eritrocita (mm ² , IQR)	1,25 (0,81-3,46)	1,81 (0,43-3,38)	1,26 (0,11-2,21)	0,442
Površina eritrocita (% , ±SD)	44,36±28,96	54,50±29,20	43,83±32,88	0,274
Površina fibrina (mm ² , IQR)	1,04 (0,35-2,71)	1,09 (0,47-1,83)	0,73 (0,41-1,72)	0,726
Površina fibrina (% , ±SD)	52,50±27,57	44,32±30,23	49,51±32,68	0,475

IQR – interkvartilni opseg; SD – standardna devijacija.

Postojala je tendencija ka većoj dužini svežih tromba u odnosu na starije trombe ($p=0,053$), dok se druge makroskopske i mikroskopske karakteristike nisu značajno razlikovale između ove dve grupe (Tabela 16).

Tabela 16. Makroskopske i mikroskopske karakteristike tromba u odnosu na histološku starost (svež i stariji).

Karakteristike tromba	Starost tromba		p
	Svež tromb (n=37)	Stariji tromb (n=51)	
Makroskopske karakteristike			
Broj fragmenata, n (IQR)	2 (1-3)	1 (1-3)	0,343
Dužina tromba (cm, IQR)	7,5 (5,0-13,5)	6,0 (4,0-10,0)	0,053
Crveni tromb, n	26/37 (70,3%)	40/51 (78,4%)	0,383
Beli tromb, n	11/37 (29,7%)	11/51 (21,6%)	
Mikroskopske karakteristike			
Dužina tromba (cm, IQR)	3,25 (1,70-4,99)	3,44 (2,07-9,45)	0,410
Širina tromba (mm, IQR)	0,86 (0,59-1,29)	1,15 (0,91-1,36)	0,036
Površina tromba (mm ² , IQR)	2,54 (0,75-6,77)	2,97 (1,36-5,46)	0,597
Površina eritrocita (mm ² , IQR)	1,25 (0,81-3,46)	1,54 (0,39-3,28)	0,540
Površina eritrocita (% , ±SD)	44,36±28,96	52,20±30,02	0,223

Površina fibrina (mm ² , IQR)	1,04 (0,35-2,71)	0,99 (0,44-1,82)	0,624
Površina fibrina (% , ±SD)	52,50±27,57	45,44±30,51	0,268

IQR – interkvartilni opseg; SD – standardna devijacija.

Prema površini eritrocita u trombu pacijenti su podjeljeni u tri grupe. Trombe sa manjom količinom eritrocita (<35,25% površine eritrocita u trombu) imalo je 29 pacijenata, kod 30 pacijenata aspiriran tromb imao je umerenu količinu eritrocita (35,25-64,84%), dok su kod 29 pacijenata registrovani trombi bili bogati eritrocitima (>64,84% površine tromba).

Kod pacijenata sa prethodnom pojavom bolova u grudima značajno češće su registrovani trombi bogati eritrocitima (41,1%) u odnosu na trombe sa malom (23,3%) i umerenom površinom hemoragije (10,3%, p=0,023). Sadržaj eritrocita nije bio povezan sa pojavom antecedentne angine pectoris (p=0,352). Uočen je trend ka dužem ishemijskom vremenu sa povećanjem sadržaja hemoragije u trombu (165 vs. 176,5 vs. 260 minuta, p=0,153), dok ostale kliničke karakteristike pacijenata nisu uticale na sadržaj eritrocita u trombu (Tabela 17).

Tabela 17. Kliničke karakteristike pacijenata u odnosu na sadržaj eritrocita u trombu.

Karakteristike pacijenata	Sadržaj eritrocita			p
	Manji (n=29)	Umereni (n=30)	Veći (n=29)	
Muški pol, n	22/29 (75,9%)	20/30 (66,7%)	23/29 (73,9%)	0,519
Starost (godine ± SD)	57,97±11,37	60,83±12,23	57,55±12,11	0,516
BMI (kg/m ² ± SD)	26,69±3,38	26,80±3,42	27,73±5,49	0,582
Pušenje, n	19/29 (65,5%)	14/30 (46,7%)	17/29 (58,6%)	0,334
Hipertenzija, n	19/29 (65,5%)	16/30 (53,3%)	16/29 (55,2%)	0,596
Diabetes mellitus, n	4/29 (13,8%)	5/30 (16,7%)	4/29 (13,8%)	0,937
Hiperholesterolemija, n	11/29 (37,9%)	16/30 (53,3%)	16/29 (55,2%)	0,352
Hereditet za KVB, n	9/29 (31%)	16/30 (53,3%)	15/29 (51,7%)	0,162
Srčana frekvencija (/min ± SD)	81,38±14,79	70,83±18,16	74,52±19,98	0,076
Sistolni KP (mmHg ± SD)	128,10±21,23	121,47±19,01	118,48±26,20	0,249
Dijastolni KP (mmHg ± SD)	78,90±11,96	75,90±18,16	74,52±19,98	0,342

Antecedentna AP, n	13/29 (28,9%)	14/30 (46,7%)	18/29 (62,1%)	0,352
Prethodna AP, n	3/29 (10,3%)	7/30 (23,3%)	12/29 (41,1%)	0,023
Killip klasa, n				
• 1	26/29 (89,7%)	27/30 (90%)	26/29 (89,8%)	
• 2	3/29 (10,3%)	3/30 (10%)	2/29 (6,9%)	
• 3	0	0	1/29 (3,4%)	
Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	165 (102,5-335)	176,5 (110-291,25)	260 (145-455)	0,153
• Kašnjenje bolesnika	60 (30-115)	30 (15-120)	60 (26-162,5)	0,214
• Kašnjenje sistema	85 (57,5-180)	102,5 (67,5-163,5)	120 (80-210)	0,311
STEMI lokalizacija, n				
• A, AS, AL	12/29 (41,4%)	12/30 (40%)	7/29 (24,1%)	0,310
• I, IL, IPL	17/29 (58,6%)	18/30 (60%)	22/29 (75,9%)	

SD – standardna devijacija; KVB – kardiovaskularne bolesti; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg; A – anteriorni; AS – anteroseptalni; AL – anterolateralni; I – inferiorni; IL – inferolateralni; IPL – inferoposterolateralni.

Odnos makroskopskih i mikroskopskih karakteristika tromba i obima hemoragije u trombu prikazan je u Tabeli 18. Crveni trombi su značajno češće imali veća (93,1%) i umereno velika polja eritrocita (86,7%) u odnosu na bele trombe, kod kojih su dominirala manja polja eritrocita (55,2%, $p < 0,001$). Trombi sa manjim sadržajem eritrocita su bili značajno kraći ($p = 0,001$), uži ($p = 0,008$) i manje površine preseka ($p < 0,001$) u poređenju sa trombima koji su imali veća i umereno velika polja hemoragije (Tabela 18).

Tabela 18. Makroskopske i mikroskopske karakteristike tromba u odnosu na sadržaj eritrocita.

Karakteristike tromba	Sadržaj eritrocita			p
	Manji (n=29)	Umereni (n=30)	Veći (n=29)	
Makroskopske karakteristike				
Broj fragmenata, n (IQR)	2 (1-3)	2 (1-3)	1 (1-2,5)	
Dužina tromba (cm, IQR)	5,0 (3,5-10,0)	7,0 (5,0-12,5)	7,0 (5,0-13,0)	
Crveni tromb, n	13/29 (44,8%)	26/30 (86,7%)	27/29(93,1%)	<0,001
Beli tromb, n	16/29 (55,2%)	4/30 (13,3%)	2/29 (6,9%)	
Mikroskopske karakteristike				
Dužina tromba (cm, IQR)	1,88 (1,51-3,66)	3,99 (2,47-5,68)	3,95 (2,56-7,97)	0,001
Širina tromba (mm, IQR)	0,87 (0,47-1,05)	1,10 (0,88-1,39)	1,15 (0,82-1,48)	0,008
Površina tromba (mm ² , IQR)	1,01 (0,46-2,43)	4,04 (1,47-5,59)	3,43 (2,00-6,86)	<0,001

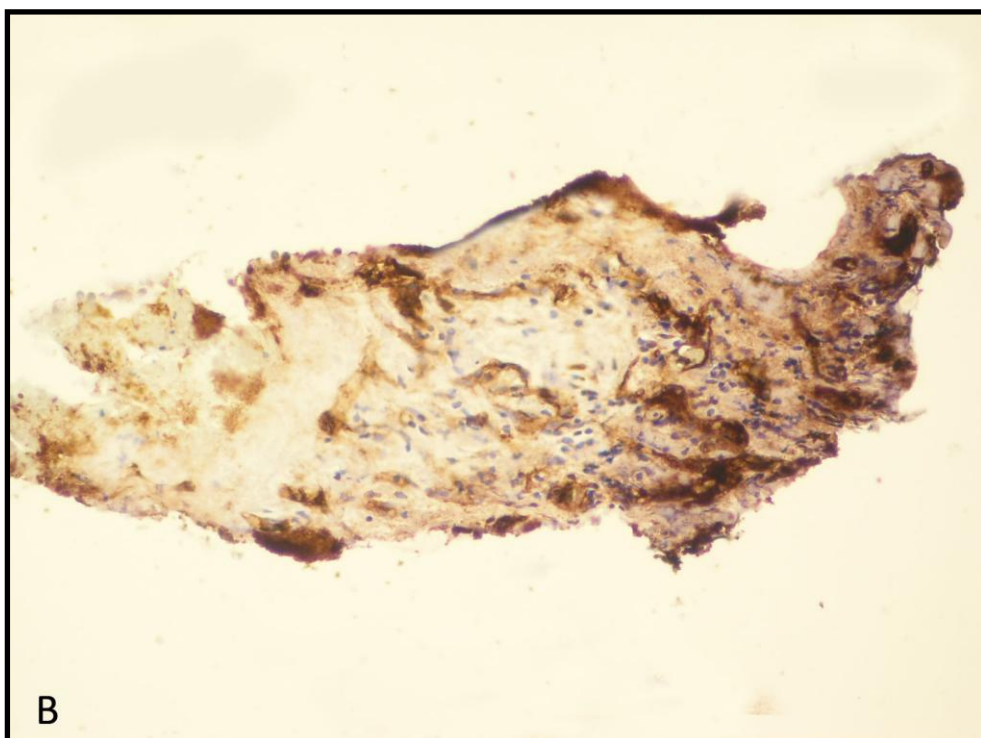
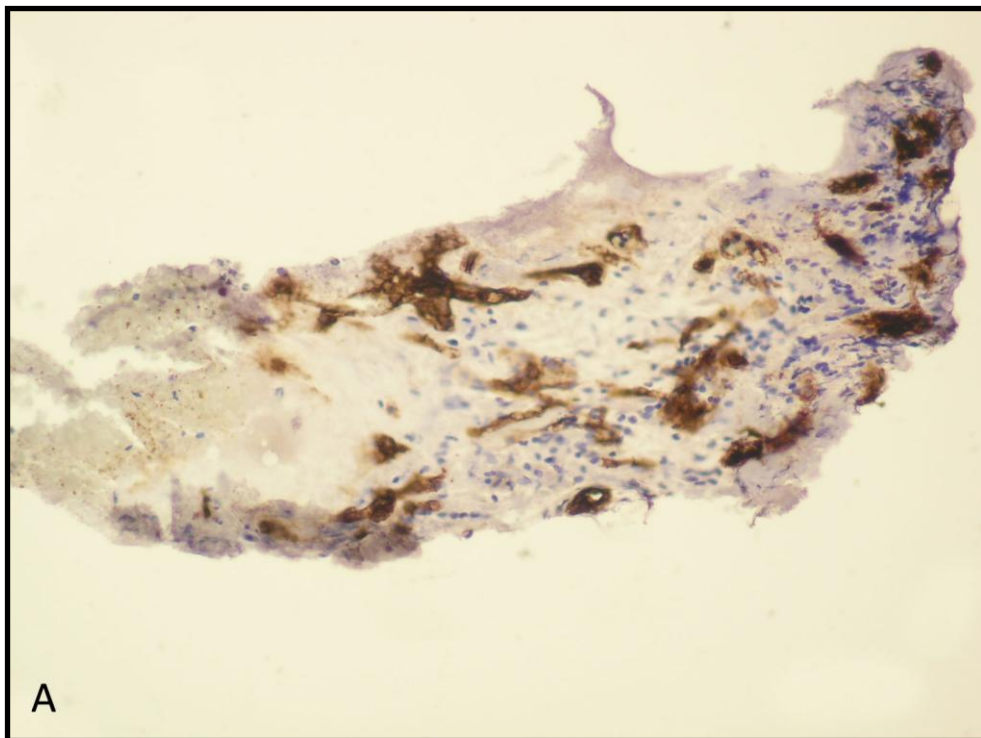
IQR – interkvartilni opseg; SD – standardna devijacija.

4.4.3. Imunohistohemijska analiza

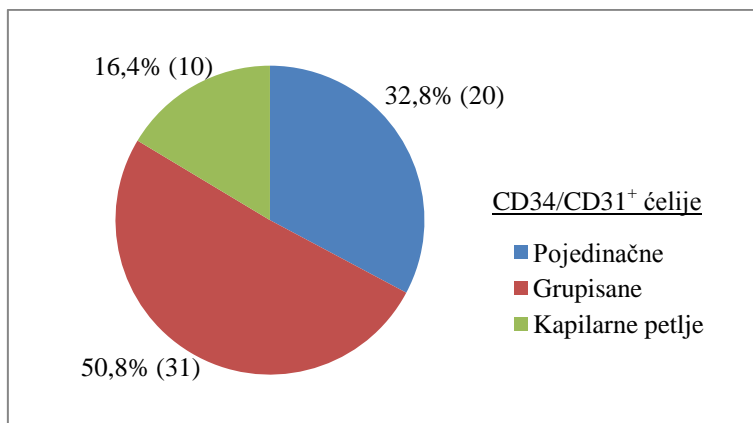
4.4.3.1. Ekspresija CD34 i CD31

Kod 61 (69,3%) pacijenata registrovana je ekspresija CD34 i CD31 molekula u trombotičnom materijalu. Imunohistohemijsko bojenje serijskih isečaka tromba pokazalo je podudarajuće regione CD34 i CD31 imunopozitivnosti (Slika 8), što je dokazano imunofluorescentnim bojenjem.

CD34⁺CD31 imunopozitivne (CD34⁺CD31⁺) ćelije najčešće su registrovane kao grupisane (kod 31/61, tj. 50,8% pacijenata), zatim kao pojedinačne CD34⁺CD31⁺ ćelije (20/61, tj. 32,8% pacijenata), dok su najređe videne kapilarne petlje ovih ćelija (kod 10/61, odnosno 16,4% pacijenata, Grafikon 4).

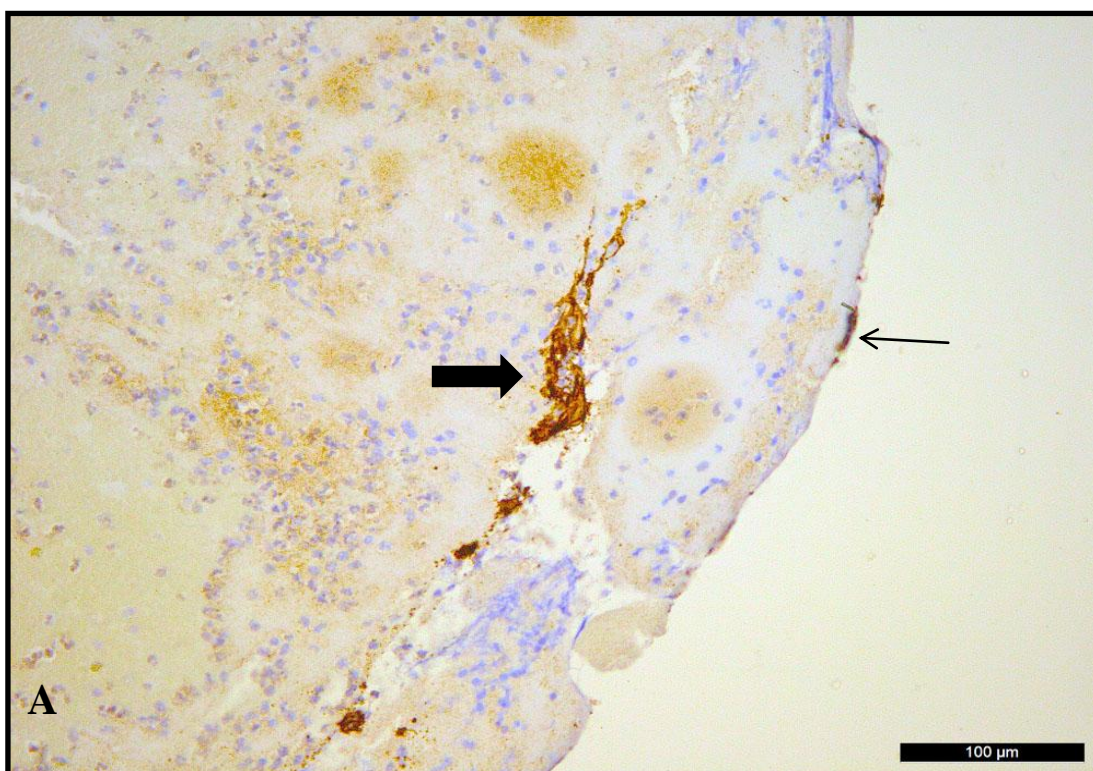


Slika 8. Imunohistohemijsko bojenje serijskih isečaka tromba koje pokazuje podudarajuće regione CD34 (A) i CD31 imunopozitivnosti (B) (uveličanje 200x).

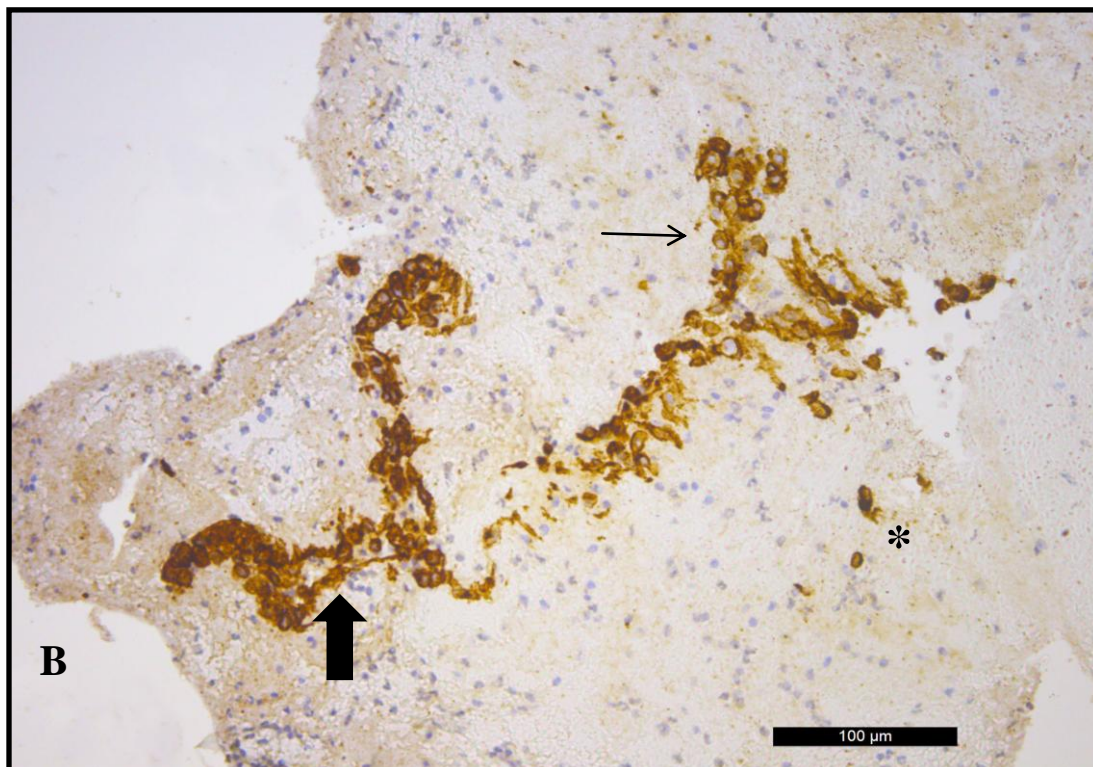


Grafikon 4. Distribucija organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija u aspiriranim trombima.

CD34⁺CD31⁺ ćelije su pokazivale dva različita fenotipa; bile su prisutne na površini tromba kao izdužene ćelije vretenastog oblika, delujući kao da prijanjaju na površinu tromba, dok je drugi tip ćelija urastao u trombotično tkivo (Slika 9A). Urasle rane endotelne ćelije su bile okrugle sa jasnim okruglim jedrom, prisutne kao pojedinačne ili grupisane, ili vretenastog oblika u slučaju formiranja kapilarnih petlji (Slika 9B).



Slika 9A. Pojedinačne CD34⁺CD31⁺ ćelije na površini tromba (tanka strelica) i urasle u trombotično tkivo kao grupisane i kapilarne petlje CD34⁺CD31⁺ ćelija (deblja strelica).



Slika 9B. CD34⁺CD31⁺ ćelije uralasle u trombotično tkivo kao pojedinačne (tanka zvezdica), grupisane (strelica) i izdužene ćelije koje formiraju lumenske strukture (debela strelica).

Prisustvo CD34⁺CD31⁺ ćelija u aspiriranim trombima bilo je značajno češće kod pacijenata sa predinfarktnom anginom u odnosu na pacijente bez bolova u grudima pre STEMI prezentacije (69,3% vs. 11,1%, $p=0,045$). Pojava angiogeneze u trombu nije se značajno razlikovala u odnosu na pojavu antecedentne angine (52,5% vs. 48,1%, $p=0,709$). Druge kliničke karakteristike pacijenata se nisu značajno razlikovale u odnosu na prisustvo neovaskularizacije tromba (Tabela 19).

Tabela 19. Poređenje stepena angiogeneze i kliničkih karakteristika bolesnika.

Karakteristike pacijenata	Ekspresija CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelija		p
	Da (n=61)	Ne (n=27)	
Muški pol, n	46/61 (75,4%)	19/27 (70,4%)	0,620
Starost (godine ± SD)	58,51±11,99	59,48±11,79	0,725
BMI (kg/m ² ± SD)	27,01±4,66	27,20±2,89	0,846
Pušenje, n	36/61 (59%)	14/27 (51,9%)	0,531

Hipertenzija, n	33/61 (54,1%)	18/27 (66,7%)	0,271
Diabetes mellitus, n	7/61 (11,5%)	6/27 (22,2%)	0,190
Hiperholesterolemija, n	27/61 (44,3%)	16/27 (59,3%)	0,194
Hereditet za KVB, n	26/61 (42,6%)	14/27 (51,9%)	0,423
Srčana frekvenca (/min ± SD)	74,82±18,24	77,11±18,06	0,587
Sistolni KP (mmHg ± SD)	123,80±23,09	120,11±21,01	0,479
Dijastolni KP (mmHg ± SD)	76,51±13,23	75,67±12,16	0,779
Antecedentna AP, n	32/61 (52,5%)	13/27 (48,1%)	0,709
Prehodna AP, n	19/61 (69,3%)	3/27 (11,1%)	0,045
Killip klasa, n			
• 1	54/61 (88,5%)	25/27 (92,6%)	
• 2	6/61 (9,8%)	2/27 (7,4%)	
• 3	1/61 (1,6%)	0	
Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	205 (115-312,5)	180 (120-415)	0,949
• Kašnjenje bolesnika	60 (28,5-142,5)	55 (15-60)	0,152
• Kašnjenje sistema	105 (60-161,5)	110 (75-280)	0,218
STEMI lokalizacija, n			
• A, AS, AL	22/61 (36,1%)	9/27 (33,3%)	0,805
• I, IL, IPL	39/61 (63,9%)	18/27 (66,7%)	

SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; KVB – kardiovaskularne bolesti; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg; A – anteriorni; AS – anteroseptalni; AL – anterolateralni; I – inferiorni; IL – inferolateralni; IPL – inferoposterolateralni.

Trombi sa znacima angiogeneze bili su značajno duži ($p=0,008$), veće ukupne površine ($p=0,017$) i veće površine eritrocita ($p=0,028$) u odnosu trombe bez $CD34^+CD31^+$ ćelija. Prisustvo angiogeneze nije se značajno razlikovalo između crvenih i belih trombova ($p=0,083$) (Tabela 20).

Tabela 20. Makroskopske i mikroskopske karakteristike aspiriranog materijala u odnosu na prisustvo CD34⁺CD31⁺ ćelija.

Karakteristike tromba	Ekspresija CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelija		p
	Da (n=61)	Ne (n=27)	
Makroskopske karakteristike			
Broj fragmenata, n (IQR)	2 (1-3)	2 (1-3)	
Dužina tromba (cm, IQR)	6,5 (4,0-12,0)	6,0 (4,5-10,0)	0,975
Crveni tromb, n	49/61 (80,3%)	17/27 (63%)	0,083
Beli tromb, n	12/61 (19,7%)	10/27 (37%)	
Mikroskopske karakteristike			
Dužina tromba (cm, IQR)	3,98 (2,17-6,77)	2,46 (1,59-3,86)	0,008
Širina tromba (mm, IQR)	1,06 (0,82-1,40)	0,90 (0,51-1,15)	0,077
Površina tromba (mm ² , IQR)	3,43 (1,59-5,92)	1,53 (0,58-5,11)	0,017
Površina hemoragije (mm ² , IQR)	2,00 (0,46-3,59)	0,48 (0,05-2,94)	0,028
Površina hemoragije (% , ±SD)	52,42±28,24	40,95±31,77	0,095
Površina fibrina (mm ² , IQR)	1,04 (0,44-2,12)	0,99 (0,33-2,11)	0,524
Površina fibrina (% , ±SD)	44,76±28,14	56,66±30,89	0,079

IQR – interkvartilni opseg; SD – standardna devijacija.

Pacijenti sa pojedinačnim CD34⁺CD31⁺ ćelijama u aspiriranom trombu su bili mlađi od pacijenata sa grupisanim i kapilarnim petljama CD34⁺CD31⁺ ćelija (p=0,044). Kašnjenje zdravstvenog sistema je bilo značajno kraće kod pacijenata sa grupisanim CD34⁺CD31⁺ ćelijama nego kod ostalih formi urastanja ranih endotelnih ćelija (p=0,047). Nije uočena povezanost stepena angiogeneze sa trajanjem ukupnog ishemijskog vremena (p=0,210) i kašnjenja bolesnika (p=0,982) (Tabela 21).

Tabela 21. Kliničke karakteristike pacijenata u odnosu na stepen organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija.

Karakteristike pacijenata	CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelije			p
	Pojedinačne (n=20)	Grupisane (n=31)	Kapilarne petlje (n=10)	
Muški pol, n	18/20 (90%)	21/31 (67,7%)	7/10 (70%)	0,179
Starost (godine ± SD)	53,2±13,62	61,68±10,16	59,30±11,17	0,044
BMI (kg/m ² ± SD)	28,41±5,42	26,38±4,28	26,17±4,00	0,263
Pušenje, n	15/20 (75%)	15/31 (48,4%)	6/10 (60%)	0,168
Hipertenzija, n	10/20 (50%)	18/31 (58,1%)	5/10 (50%)	0,819
Diabetes mellitus, n	4/20 (20%)	1/31 (3,2%)	2/10 (20%)	0,121
Hiperholesterolemija, n	9/20 (45%)	13/31 (41,9%)	5/10 (50%)	0,902
Hereditet za KVB, n	10/20 (50%)	12/31 (38,7%)	4/10 (40%)	0,716
Srčana frekvenca (/min ± SD)	75,70±19,03	75,45±18,87	71,10±15,76	0,796
Sistolni KP (mmHg ± SD)	120,95±21,63	124,94±24,40	126,00±23,55	0,949
Dijastolni KP (mmHg ± SD)	76,25±13,66	77,00±14,28	75,50±9,56	0,785
Antecedentna AP, n	12/20 (60%)	13/31 (41,9%)	7/10 (70%)	0,216
Prethodna AP, n	7/20 (35%)	9/31 (29%)	3/10 (30%)	0,901
Killip klasa, n				
• 1	16/20 (80%)	28/31 (90,3%)	10/10 (100%)	
• 2	4/20 (20%)	2/31 (6,5%)	0	
• 3	0	1/31 (3,2%)	0	
Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	235,0 (107,5-132,5)	165,0 (110,0-260,0)	230,0 (163,75-667,5)	0,210
- Kašnjenje bolesnika	90,00 (27,75-135,00)	60,00 (25,00-145,00)	52,50 (30,00-262,50)	0,982
- Kašnjenje sistema	112,5 (59,5-198,75)	85,0 (50,0-120,0)	141,5 (95,0-232,5)	0,047
STEMI lokalizacija, n				
• A, AS, AL	12/20 (60%)	13/31 (41,9%)	7/10 (70%)	0,216
• I, IL, IPL	8/20 (40%)	18/31 (58,1%)	3/10 (30%)	

SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; KVB – kardiovaskularne bolesti; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg; ; A –

anteriorni; AS – anteroseptalni; AL – anterolateralni; I – inferiorni; IL – inferolateralni; IPL – inferoposterolateralni.

Stepen organizacije uraslih CD34⁺CD31⁺ ćelija nije se značajno razlikovao između crvenih i belih trombova (p=0,630). Step en angiogeneze nije pokazivao povezanost sa dužinom tromba (p=0,100), širinom tromba (p=0,778), površinom tromba (p=0,259), kao i površinom hemoragije (p=0,239) i površinom fibrina (p=0,206) u aspiriranom tkivu (Tabela 22).

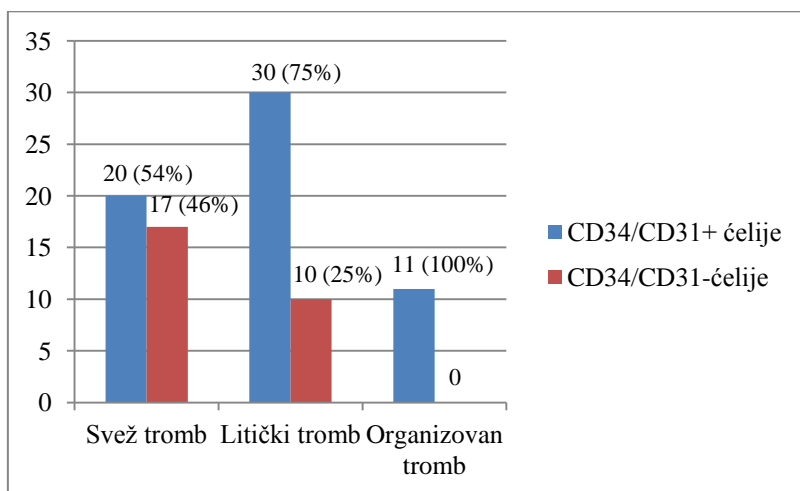
Tabela 22. Poređenje stepena angiogeneze i karakteristika aspiriranog tromba.

Karakteristike tromba	CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelije			p
	Pojedinačne (n=20)	Grupisane (n=31)	Kapilarne petlje (n=10)	
Makroskopske karakteristike				
Broj fragmenata, n (IQR)	1,5 (1-3)	2 (1-3)	1 (1-1,5)	0,166
Dužina tromba (cm, IQR)	5,50 (3,25-12,50)	8,00 (5,00-13,00)	4,50 (2,75-11,25)	0,100
Crveni tromb, n	16/20 (80%)	26/31 (83,9%)	7/10 (70%)	0,630
Beli tromb, n	4/20 (20%)	5/31 (16,1%)	3/10 (30%)	
Mikroskopske karakteristike				
Dužina tromba (cm, IQR)	3,44 (1,69-4,62)	4,23 (3,25-7,01)	3,56 (1,78-6,98)	0,256
Širina tromba (mm, IQR)	1,07 (0,70-1,41)	1,09 (0,90-1,51)	0,94 (0,74-1,33)	0,778
Površina tromba (mm ² , IQR)	2,24 (1,05-4,77)	4,41 (2,58-6,19)	2,66 (1,27-6,91)	0,259
Površina hemoragije (mm ² , IQR)	2,97 (2,96-2,99)	2,53 (1,21-4,90)	1,58 (0,25-2,65)	0,158
Površina hemoragije (% , ±SD)	44,21±30,53	57,96±26,01	51,68±28,97	0,239
Površina fibrina (mm ² , IQR)	0,78 (0,42-2,06)	1,18 (0,44-2,28)	0,72 (0,45-1,78)	0,709
Površina fibrina (% , ±SD)	53,95±31,37	40,04±25,88	41,00±26,30	0,206

IQR – interkvartilni opseg; SD – standardna devijacija.

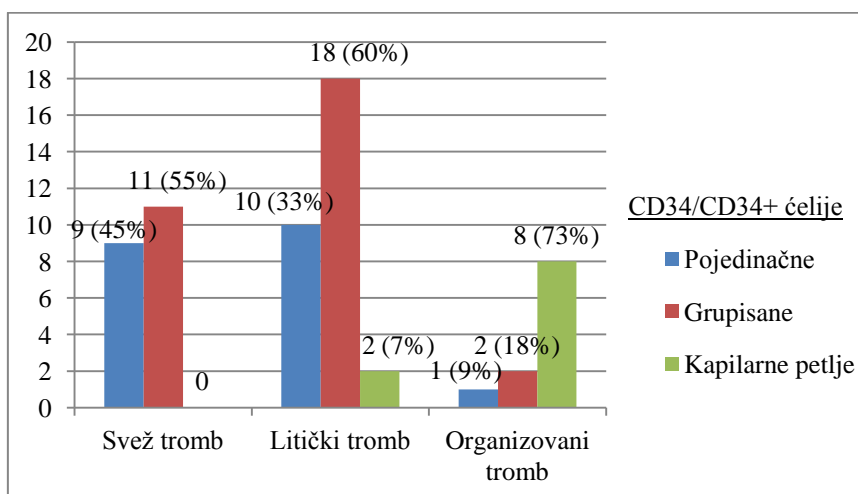
Odnos broja CD34⁺CD31⁺ ćelija prema starosti aspiriranog tromba dat je na Grafikonu 5. Uočena je statistički značajna povezanost ekspresije CD34 i CD31 na ranim endotelnim ćelijama sa starošću tromba (p=0,009). Svi organizovani trombi (n=11) imali su prisutne CD34⁺CD31⁺ ćelije, manje ovih ćelije uočeno kod litičkog

trombotičnog materijala (n=30, 75%), dok su sveži trombi pokazivali ekspresiju CD34/CD31 u 20 od 37 (54,1%) slučajeva.



Grafikon 5. Prisustvo CD34⁺CD31⁺ ćelija u trombima različite histološke starosti.

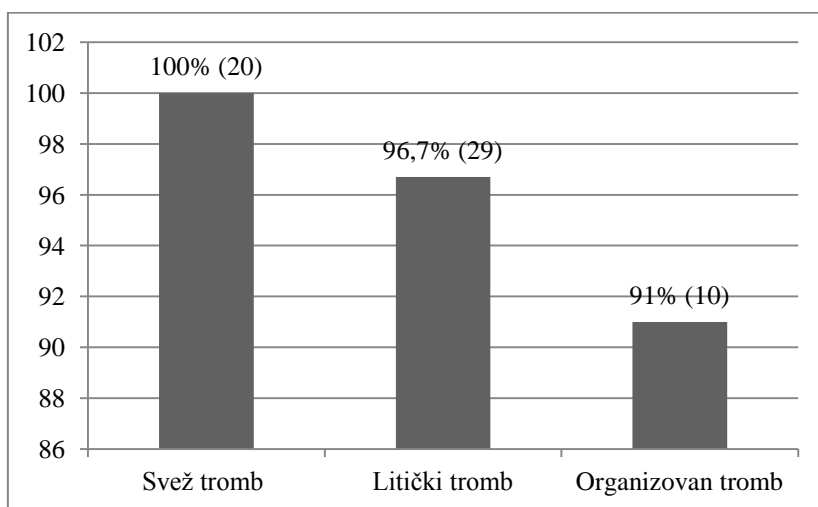
Kod svežih trombova registrovane su pojedinačne (n=9) i grupisane forme CD34⁺CD31⁺ ćelija (n=11), dok su sva tri tipa prostorne organizacije ranih endotelnih ćelija uočena kod litičkih trombova (10 pojedinačnih, 18 grupisanih i 2 kapilarne petlje CD34⁺CD31⁺ ćelija). Organizovani trombi su najčešće sadržali kapilarne petlje CD34⁺CD31⁺ ćelija (n=8, tj.73%) (Grafikon 6).



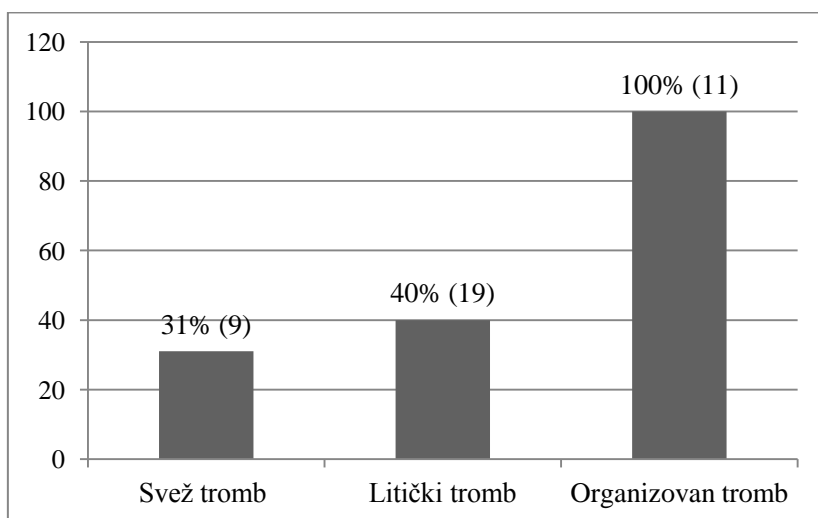
Grafikon 6. Step organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija prema starosti tromba.

CD34⁺CD31⁺ ćelije su registrovane na površini tromba kao izdužene pojedinačne i grupisane ćelija (kod 59 pacijenata, 96,7%). Rane endotelne ćelije urasle u trombotično tkivo zauzimale su sva tri vida prostorne organizacije kod 39 pacijenata (63,9%).

Pojava periferno lociranih CD34⁺CD31⁺ ćelija nije se značajno razlikovala u odnosu na starost tromba. Svi sveži trombi (20, 100%) su imali periferno postavljene rane endotelne ćelije, dok je nešto manje ovih ćelija uočeno kod litičkih (29, 96,7%) i organizovanih trombova (10, 90,9%, p=0,397) (Grafikon 7). Postojala je značajna povezanost uraslih ranih endotelnih ćelija sa starošću tromba (p=0,009). Svi organizovani trombi su imali urasle CD34⁺CD31⁺ ćelije (11, 100%), manje ovih ćelija je postojalo kod litičkih (19, 63,3%), a najmanje uraslih ranih endotelnih ćelija je registrovano kod svežih trombova (9, 23,1%) (Grafikon 8).



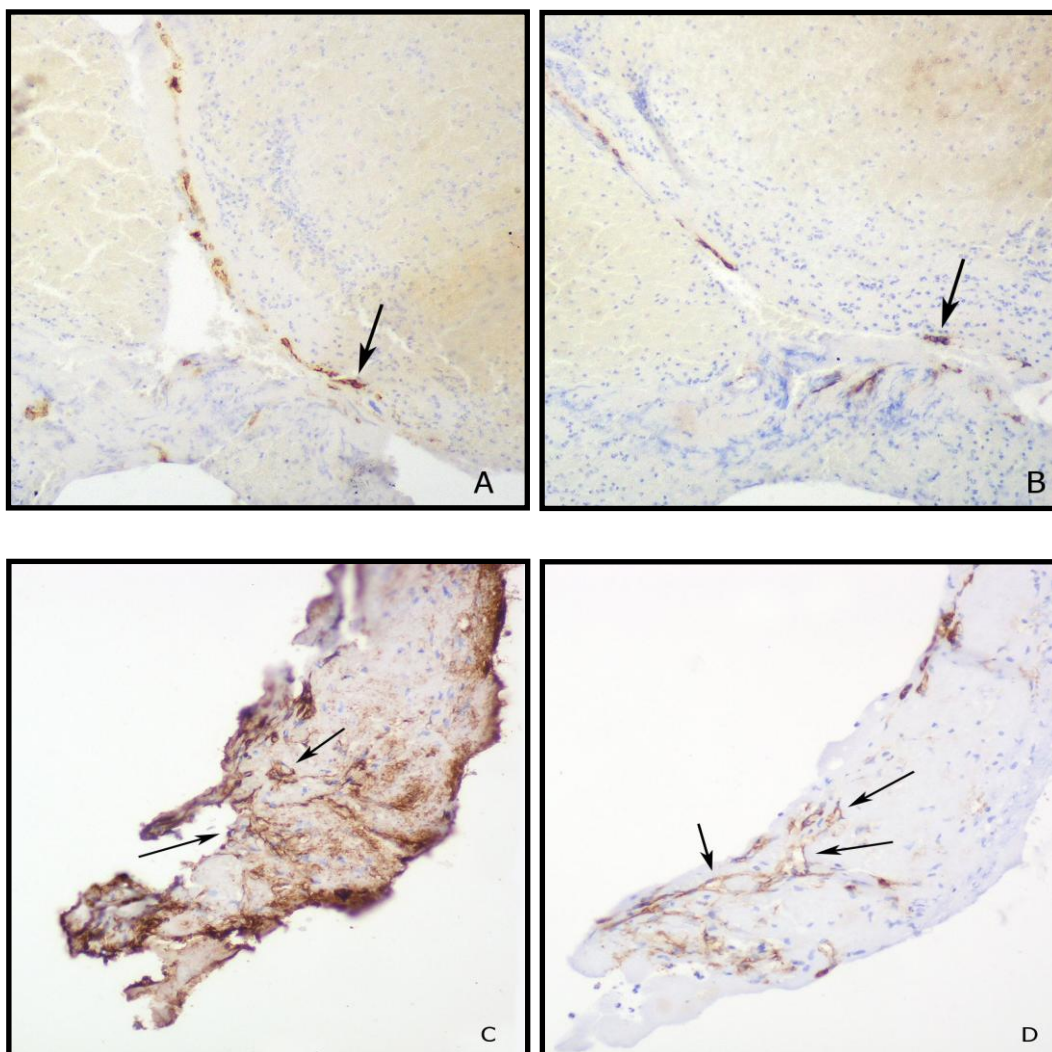
Grafikon 7. Prisustvo CD34⁺CD31⁺ ćelija na periferiji tromba u odnosu na histološku starost.



Grafikon 8. Prisustvo uraslih CD34⁺CD31⁺ ćelija u trombima različite histološke starosti.

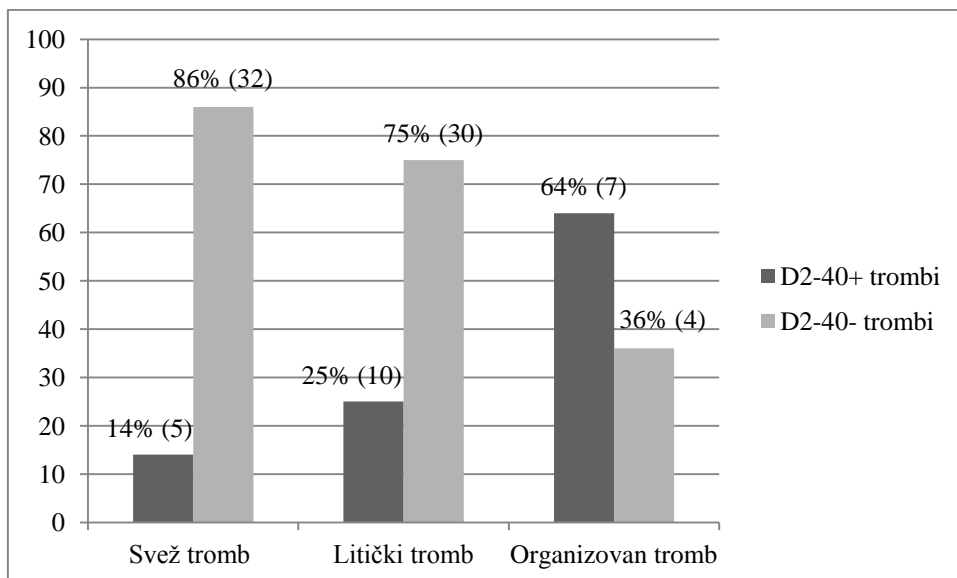
4.4.3.2. Ekspresija D2-40

Ekspresija D2-40 u trombotičnom tkivu registrovana je kod 22 (36,1%) pacijenata, i to isključivo kod pacijenata čiji su trombi pokazivali CD34/CD31 imunopozitivnost. Dvostruka imunofluorescenca je potvrdila ko-ekspresiju D2-40 i CD31 na istim ranim endotelnim ćelijama.



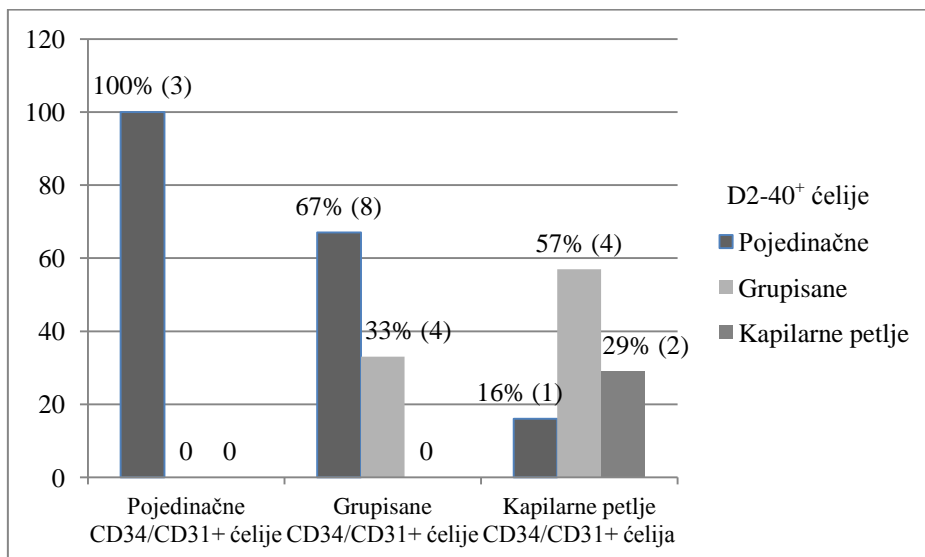
Slika 10. Regioni podudarajuće ekspresije CD34 (A) i D2-40 molekula (B), kao i CD31 (C) i D2-40 (D) molekula označeni strelicama.

Prisustvo D2-40⁺ ćelija u trombotičnom materijalu se povećavao sa starošću tromba. Ove ćelije su značajno češće uočene kod organizovanih tromba (64%), u manjem broju kod trombova sa litičkim promenama (25%), dok su sveži trombi u najmanjem broju pokazivali D2-40 imunopozitivnost (14%, $p=0,003$) (Grafikon 9).



Grafikon 9. Distribucija ekspresije D2-40 prema starosti trombotičnog materijala.

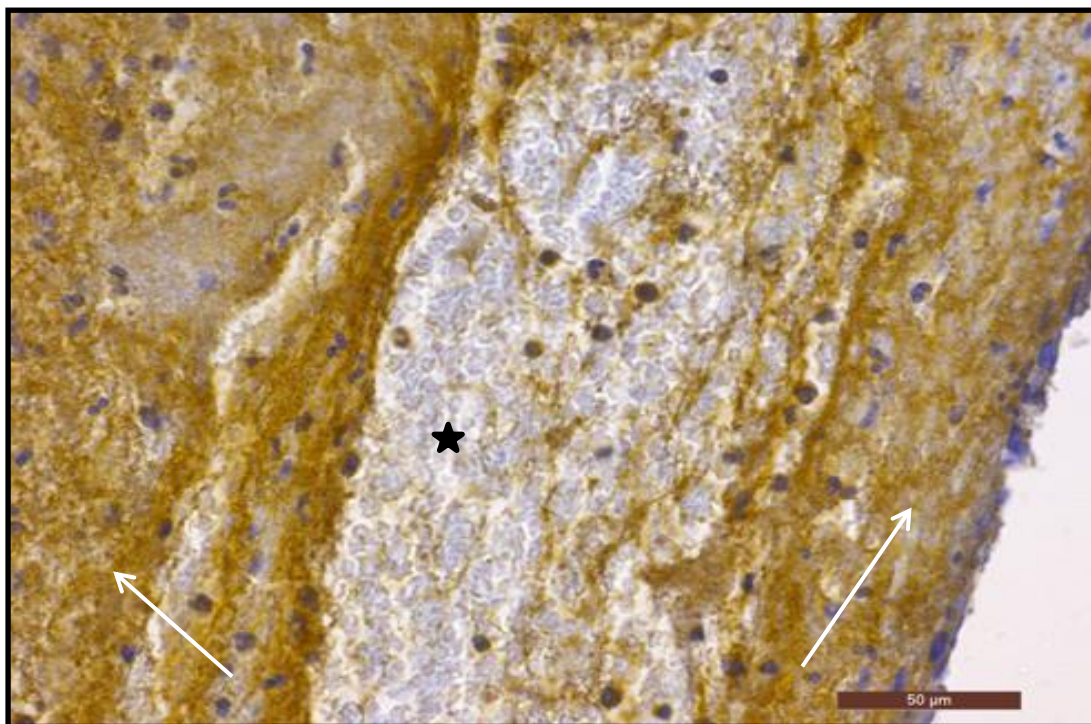
Pojedinačne D2-40⁺ ćelije viđene su u trombima gde postoje sva tri tipa prostorne organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija, dok je kod pojedinačno uraslih CD34⁺CD31⁺ ćelija uočeno prisustvo samo pojedinačnih D2-40⁺ ćelija. Grupisanje CD34⁺CD31⁺ ćelija pratilo je grupisanje D2-40⁺ ćelija, dok su kod kapilarnih petlji CD34⁺CD31⁺ ćelija uočena sva tri tipa prostorne organizacije D2-40⁺ ćelija, uključujući i njihove kapilarne petlje (Grafikon 10).



Grafikon 10. Organizacija ekspresije D2-40 u odnosu na prostornu organizaciju CD34⁺CD31⁺ ćelija u aspiriranom koronarnom trombu.

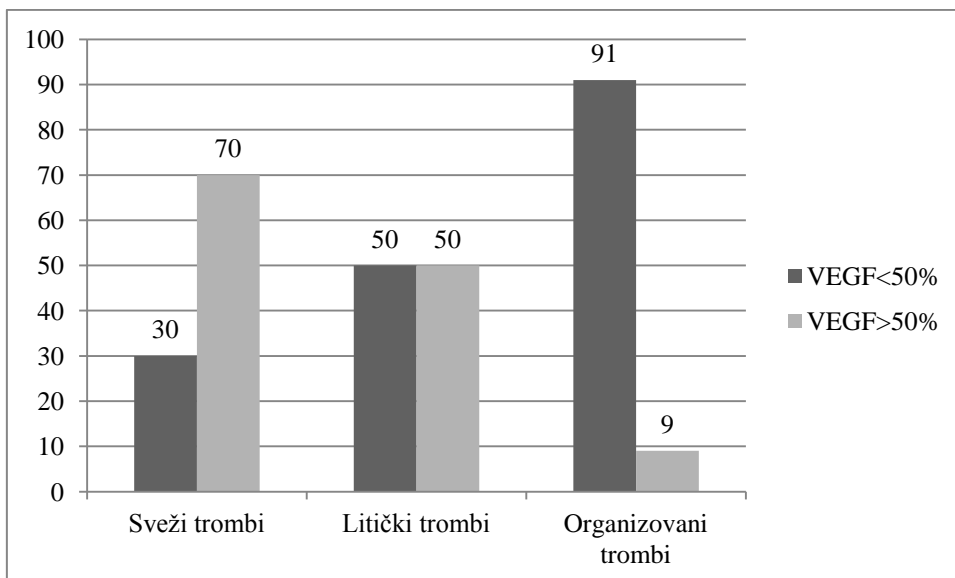
4.4.3.3. Ekspresija VEGF

Ekspresija VEGF je detektovana u trombima koji su pokazivali CD34/CD31 imunopozitivnost. Signal je bio lokalizovan van ćelija sa granularnom ekspresijom, uz trombocite kao glavne nosioce VEGF-pozitivnosti (Slika 11).



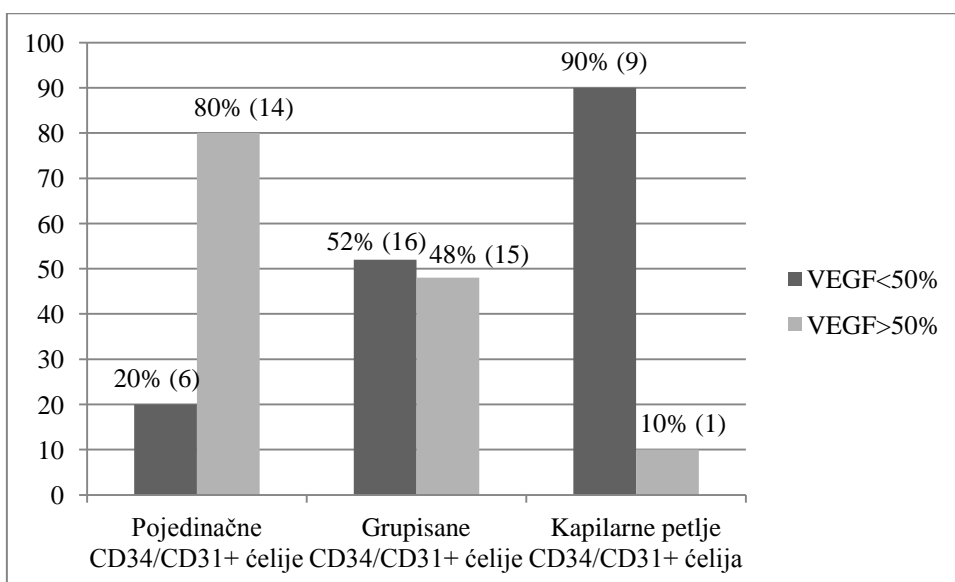
Slika 11. Ekstracelularna, granularna ekspresija VEGF-a u aspiriranom trombu (strelice), uz manju ekspresiju u regionima bogatim eritrocitima (zvezdica).

Ekspresija VEGF-a u trombu značajno se smanjivala sa starošću tromba ($p=0,005$). Polja veće VEGF ekspresije ($>50\%$ površine tromba) najčešće su registrovana kod svežih trombova (70%), u manjoj meri kod litičnih trombova (50%), dok su veća polja VEGF imunopozitivnosti najređe uočena kod organizovanog trombotičnog tkiva (9%). Suprotno tome, polja manje VEGF pozitivnosti ($<50\%$ površine tromba) najčešće su vizualizovana kod organizovanih trombova (91%), a najređe u svežim trombima (30%) (Grafikon 11).



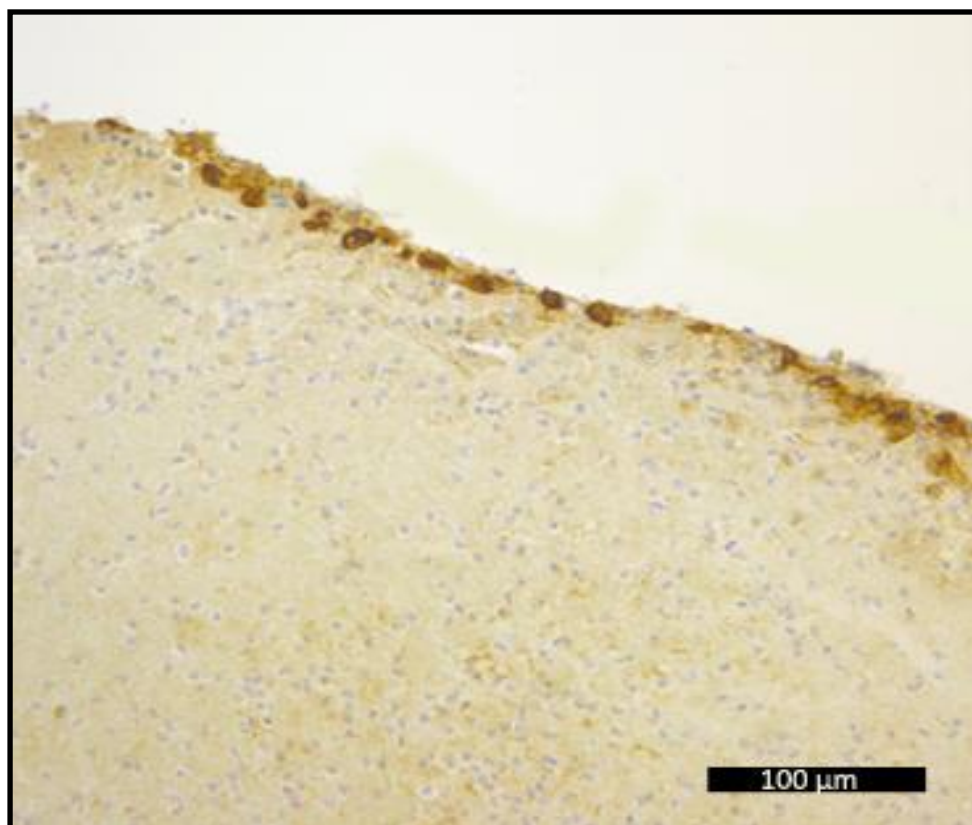
Grafikon 11. Raspodela tromba sa manjom ili većom ekspresijom VEGF-a prema starosti aspiriranog tromba.

Trombi sa pojedinačnim CD34⁺CD31⁺ ćelijama su najčešće pokazivali veća polja VEGF imunopozitivnosti (70%), litički trombi su imali sličnu zastupljenost polja veće (48%) i manje ekspresije VEGF (52%), dok su trombi sa kapilarnim petljama uglavnom sadržali manje površine VEGF pozitivnosti (90%) (Grafikon 12).



Grafikon 12. Nivo ekspresije VEGF prema stepenu organizacije ranih endotelinih ćelija u trombu.

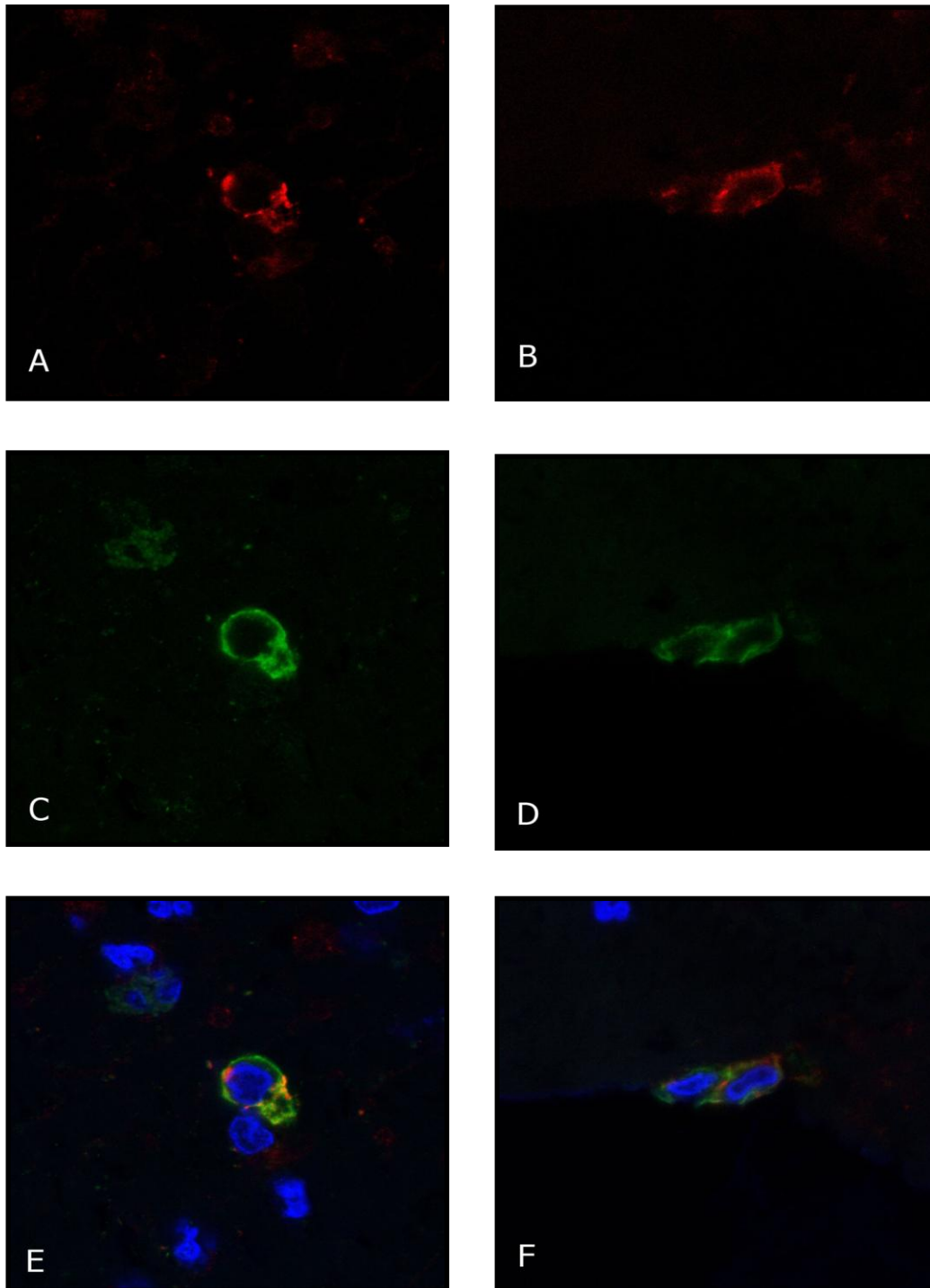
Aspirirani trombotični materijal nije pokazivao ekspresiju CD64 i CD173. Ekspresija CD105 je registrovana kod 8 pacijenata (9,1%), i to u tri slučaja svežeg, tri slučaja litičkog i dva slučaja organizovanog tromba (Slika 12). Okrugle CD105⁺ ćelije su bile prisutne na periferiji tromba.



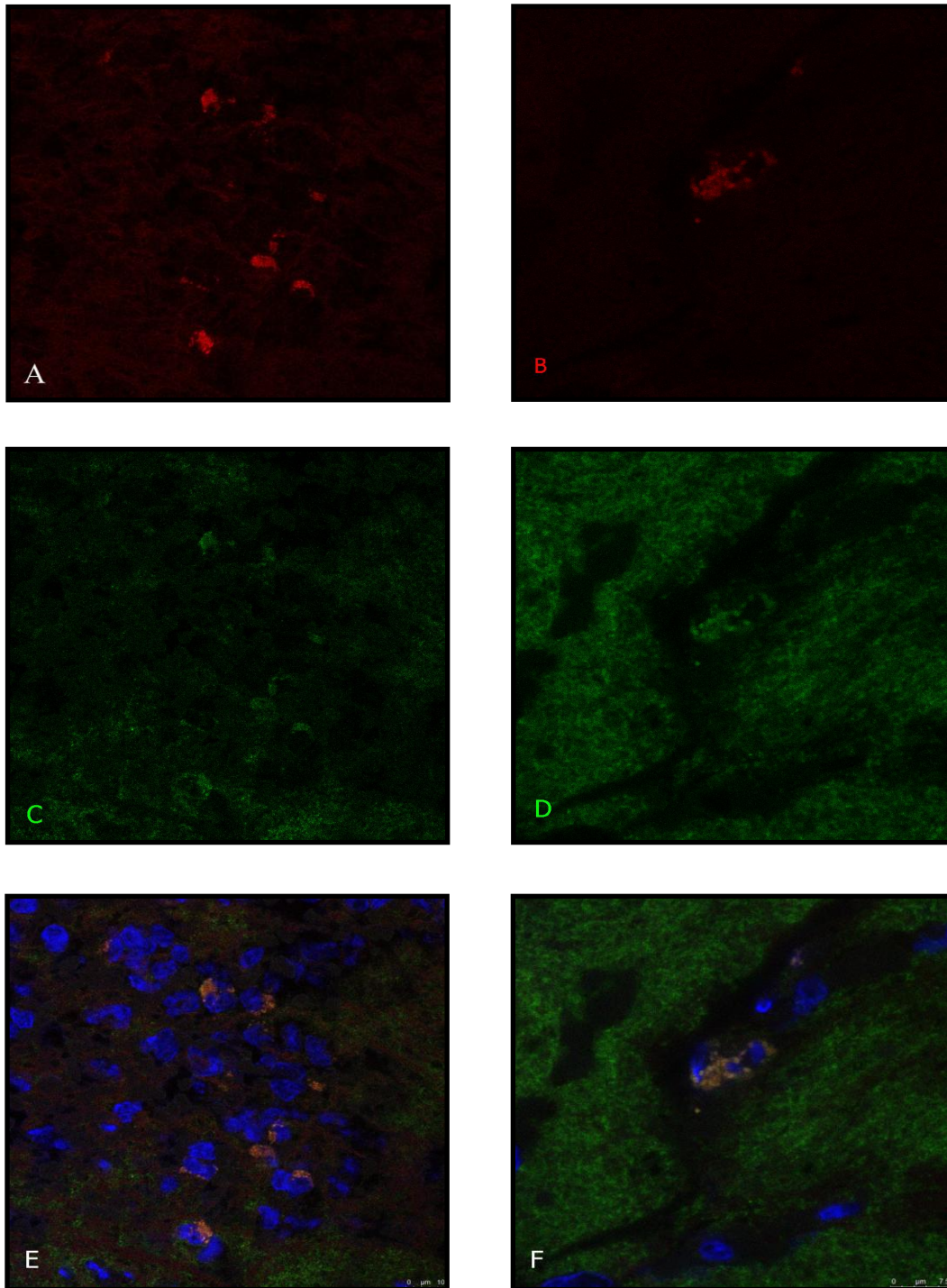
Slika 12. Ekspresija CD105 u površinskim ćelijama aspiriranog trombotičnog materijala

4.4.4. *Dvostruka imunofluorescenca*

Ko-ekspresija CD31 i D2-40 na istim ranim endotelnim ćelijama dokazana je dvostrukom imunofluorescencom (Slika 13). Pokazana je ko-ekspresija CD31 i VEGFR3 (Slika 14A, C i E), kao i ko-ekspresija CD31 i LYVE-1 molekula (Slika 14B, D i F).



Slika 13. Dvostruko imunofluorescentno bojenje pokazuje CD31 imunopozitivnost (A i B, crveno obojeno), D2-40 imunopozitivnost (C i D, zeleno obojeno) i ko-ekspresiju CD31 i D2-40 molekula na istoj ćeliji (E i F, žuto obojeno), uz DAPI-plavo obojena jedra



Slika 14. Dvostruko imunofluorescentno bojenje pokazuje LYVE-1 imunopozitivnost (A, crveno obojeno), VEGFR3 imunopozitivnost (B, crveno obojeno), CD31 imunopozitivnost (C i D, zeleno obojeno), i ko-ekspresiju LYVE-1/CD31 (E) i VEGFR3/LYVE-1 (F) na istoj ćeliji, uz DAPI-plavo obojena jezra

4.5. Vrednosti serumskog VEGF-a

Srednja vrednost (medijana) cirkulišućeg serumskog VEGF-a u studijskoj grupi iznosila je 179,20 pg/ml (IQR 65,73 – 309,71). Na osnovu ove vrednosti pacijenti su podeljeni u dve podgrupe: (1) grupa sa nižim VEGF vrednostima (<179,2 pg/ml), i (2) grupa sa višim vrednostima serumskog VEGF-a (≥179,2 pg/ml). Kod pacijenata sa većim vrednostima VEGF-a registrovano je duže ukupno ishemijsko vreme (medijana 270 minuta) u odnosu na pacijente sa manjim vrednostima VEGF-a (medijana 170 minuta, p=0,030). Ostale demografske i kliničke karakteristike pacijenata nisu se značajno razlikovale prema izmerenoj vrednosti serumskog VEGF-a (Tabela 23).

Tabela 23. Kliničke karakteristike pacijenata u odnosu na vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a.

Karakteristike pacijenata	Vrednost serumskog VEGF-a (pg/ml)		p
	<179,2 (n=44)	≥179,2 (n=44)	
Muški pol, n	32/44 (72,7%)	33/44 (75%)	0,808
Starost (godine ± SD)	59,89±10,29	57,73±13,29	0,397
BMI (kg/m ² ± SD)	26,63±3,77	27,51±4,56	0,325
Pušenje, n	25/44 (56,8%)	25/44 (56,8%)	1,000
Hipertenzija, n	26/44 (59,1%)	25/44 (56,8%)	0,829
Diabetes mellitus, n	7/44 (15,9%)	6/44 (13,6%)	0,764
Hiperholesterolemija, n	20/44 (45,5%)	23/44 (52,3%)	0,522
Hereditet za KVB, n	19/44 (43,2%)	21/44 (47,7%)	0,669
Srčana frekvenca (/min ± SD)	74,41±19,03	76,64±17,30	0,567
Sistolni KP (mmHg ± SD)	119,57±22,75	125,77±21,90	0,196
Dijastolni KP (mmHg ± SD)	75,11±13,49	77,39±12,22	0,410
Antecedentna AP, n	21/44 (47,7%)	24/44 (54,5%)	0,522
Prethodna AP, n	11/44 (25%)	11/44 (25%)	1,000
Killip klasa, n (%)			
• 1	36/44 (81,8%)	43/44 (97,7%)	
• 2	7/44 (15,9%)	1/44 (2,3%)	
• 3	1/44 (2,3%)	0	

Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	170 (112,5-227,5)	270 (125-435)	0,030
• Kašnjenje bolesnika	57,5 (16,25-112,5)	60 (30-172,5)	0,137
• Kašnjenje sistema	95 (56,25-159,75)	110 (80-207,5)	0,069
STEMI lokalizacija, n			
• A, AS	16/44 (36,4%)	15/44 (34,1%)	0,823
• I, IL, IPL	28/44 (63,6%)	29/44 (65,9%)	

SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; KVB – kardiovaskularne bolesti; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg.

Cirkulišući trombociti i neutrofilni predstavljaju važan izvor VEGF-a u cirkulaciji. Srednje vredosti trombocita pri prijemu STEMI pacijenata u bolnicu iznosile su $252 \times 10^9/l$ ($\pm 66,03$), dok su neutrofilni bili $9,64 \times 10^9/l$ ($\pm 3,49$). Nije registrovana korelacija između vrednosti serumskog VEGF-a i broja trombocita pri prijemu u bolnicu ($\rho=0,181$, $p=0,094$), kao ni korelacija serumskog VEGF-a i broja neutrofila ($\rho=0,049$, $p=0,653$) (Tabela 24).

Tabela 24. Broj trombocita i ukupnih leukocita pri prijemu pacijenata u odnosu na vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a.

Laboratorijske vrednosti prijemu	Vrednost serumskog VEGF-a (pg/ml)		p
	<179,20 (n=44)	$\geq 179,20$ (n=44)	
Trombociti, n \pm SD	245,14 \pm 71,20	258,68 \pm 60,62	0,865
Neutrofilni	9,27 \pm 3,26	10,01 \pm 3,24	0,302

SD – standardna devijacija.

Nije postojala povezanost između vrednosti serumskog VEGF-a i makroskopske boje aspiriranog tromba ($p=0,325$). Kod pacijenata sa manjim vrednostima VEGF-a registrovani su trombi veće širine (medijana 1,09 mm vs. 0,91 mm, $p=0,007$), veće apsolutne površine fibrina ($p=0,004$), uz tendenciju ka većoj površini tromba (medijana $3,11 \text{ mm}^2$ vs. $1,81 \text{ mm}^2$, $p=0,066$) u odnosu na pacijente sa većim vrednostima VEGF-a (Tabela 25).

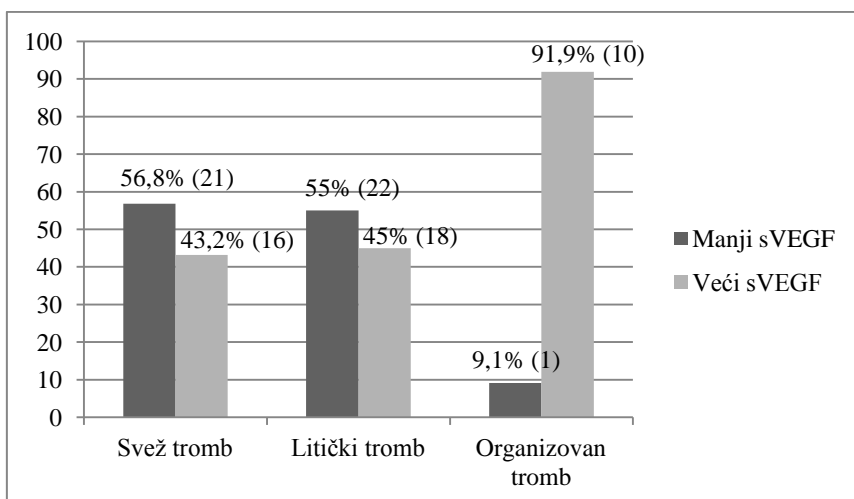
Tabela 25. Makroskopske i mikroskopske karakteristike tromba u odnosu na vrednosti serumskog VEGF-a.

Karakteristike tromba	Vrednost serumskog VEGF-a (pg/ml)		p
	<179,20 (n=44)	≥179,20 (n=44)	
Makroskopske karakteristike			
Crveni tromb, n	35/44 (79,5%)	31/44 (70,5%)	0,325
Beli tromb, n	9/44 (20,5%)	13/44 (29,5%)	
Mikroskopske karakteristike			
Dužina tromba (cm, IQR)	3,83 (2,51-5,35)	2,56 (1,75-5,65)	0,093
Širina tromba (mm, IQR)	1,09 (0,90-1,56)	0,91 (0,65-1,21)	0,007
Površina tromba (mm ² , IQR)	3,11 (1,94-5,84)	1,81 (0,82-5,37)	0,066
Površina hemoragije (mm ² , IQR)	1,78 (0,47-2,90)	1,00 (0,10-3,38)	0,381
Površina hemoragije (% , ±SD)	48,29±28,52	49,52±31,09	0,848
Površina fibrina (mm ² , IQR)	1,53 (0,73-2,60)	0,68 (0,30-1,64)	0,004
Površina fibrina (% , ±SD)	49,01±27,37	47,81±31,53	0,850

IQR – interkvartilni opseg; SD – standardna devijacija.

4.5.1. VEGF i starost aspiriranog tromba

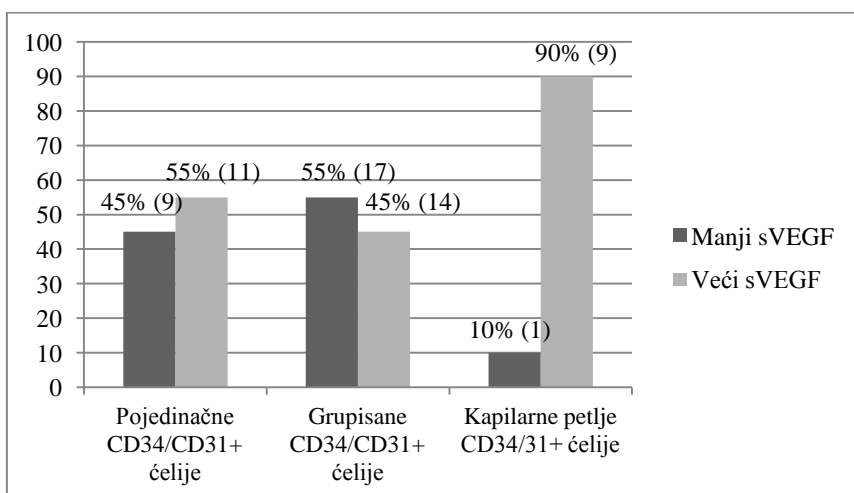
Grafikon 13 pokazuje distribuciju vrednosti serumskog VEGF-a prema starosti aspiriranog tromba. Veće vrednosti serumskog VEGF-a značajno češće su registrovane kod pacijenata sa organizovanim trombima (91,9%) u poređenju sa svežim (43,2%) i litičkim (45%) aspiriranim materijalom (p=0,015).



Grafikon 13. Vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a prema starosti aspiriranog tromba (sVEGF – serumski VEGF).

4.5.2. VEGF i angiogeneza tromba

Vrednost VEGF-a je bila značajno veća kod pacijenata kod kojih su aspirirani trombi sadržali CD34⁺CD31⁺ ćelije u poređenju sa pacijentima bez znakova angiogeneze tromba (medijana 232,88 pg/ml vs. 150,87 pg/ml, p=0,039). Kod pacijenata čiji su trombi pokazivali kapilarne petlje CD34⁺CD31⁺ ćelija značajno češće su izmerene veće vrednosti serumskog VEGF-a (90%) u poređenju sa pacijentima sa pojedinačnim (55%) i grupisanim (55%) CD34⁺CD31⁺ ćelijama u aspiriranom trombu (p=0,046, Grafikon 14).



Grafikon 14. Vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a prema stepenu urastanja CD34⁺CD31⁺ ćelija u trombotično tkivo (sVEGF – serumski VEGF).

4.6. Angiografske karakteristike pacijenata

Osnovne angiografske karakteristike (infarktna arterija, prisustvo značajnih stenoza na neinfarktним arterijama, prisustvo kolaterala, angiografska veličina tromba, epikardni TIMI protok pre, tokom i posle intervencije, MBG na finalnom angiogramu, pojava distalne embolizacije i vrednost SYNTAX skora pre i nakon intervencija) date su u Tabeli 26.

Infarktna arterija je u najvećem broju slučajeva bila desna koronarna arterija (RCA, 52,3%), zatim leva prednja descendenta arterija (LAD, 36,4%), dok je tromb aspiriran iz cirkumflaksne arterije (Cx) kod 11,4% pacijenata. Kod većine pacijenata postojala je jednosudovna koronarna bolest (54,5%), dok su dvosudovna i trosudovna bolest imale sličnu učestalost (23,9%, odnosno 21,6%). Kod većine pacijenata nisu registrovane kolaterale na angiogramu (Rentrop 0 - 73,9%). Inicijalni TIMI 0 protok je postojao kod 79 (89,8%) pacijenata, dok je TIMI 3 protok na finalnom angiogramu registrovan kod 89,8% pacijenata. Prosečna vrednost (medijana) bazalnog SYNTAX skora iznosila je 11,5, dok je kod rezidualnog bila 0. Najčešći razlog za izvođenje aspiracione trombektomije bio je protok TIMI 0 posle prolaska žice ili dilatacije balona (45,5%). Kod 37,5% pacijenata trombektomija je rađena kao rutinska tehnika, dok je kod 17% pacijenata indikacija za trombektomiju bila angiografski viljdiv veliki koronarni tromb.

Tabela 26. Osnovne angiografske karakteristike pacijenata.

Infarktna arterija, n	
• LAD	32/88 (36,4%)
• RCA	46/88 (52,3%)
• Cx	10/88 (11,4%)
Segment infarktne arterije, n	
• proksimalni	41/88 (46,6%)
• medijalni	34/88 (38,6%)
• distalni	13/88 (14,8%)
Zahvaćenost krvnih sudova, n	
• jednosudovna bolest	48/88 (54,5%)

• dvosudovna bolest	21/88 (23,9%)
• trosudovna bolest	19/88 (21,6%)
Angiografska dužina tromba (mm, IQR)	5,0 (3,5-10,0)
Kolaterale, n	
• Rentrop 0	65/88 (73,9%)
• Rentrop 1	11/88 (12,5%)
• Rentrop 2	8/88 (9,1%)
• Rentrop 3	4/88 (4,5%)
TIMI inicijalni, n	
• TIMI 0	79/88 (89,8%)
• TIMI 1	2/88 (2,3%)
• TIMI 2	4/88 (4,5%)
• TIMI 3	3/88 (3,4%)
TIMI nakon prolaska žice, n	
• TIMI 0	51/88 (58%)
• TIMI 1	17/88 (19,3%)
• TIMI 2	12/88 (13,6%)
• TIMI 3	8/88 (9,1%)
TIMI posle aspiracije, n	
• TIMI 0	10/88 (11,4%)
• TIMI 1	12/88 (13,6%)
• TIMI 2	18/88 (20,5%)
• TIMI 3	48/88 (54,5%)
TIMI finalni angiogram, n	
• TIMI 1	1/88 (1,1%)
• TIMI 2	8/88 (9,1%)
• TIMI 3	79/88 (89,8%)
MBG finalni angiogram, n	
• MBG 0	2/88 (2,3%)
• MBG 1	19/88 (21,9%)
• MBG 2	32/88 (36,4%)

• MBG 3	35/88 (39,8%)
Distalna embolizacija, n	12/88 (13,6%)
SYNTAX skor	
- bazalni (IQR)	11,5 (8,0-20,5)
- rezidualni (IQR)	0 (0-4,75)

LAD – leva prednja descendenta arterija; RCA – desna koronarna arterija; Cx – cirkumfleksna arterija; IQR – interkvartilni opseg.

Kod većine pacijenata (92%) je tokom primarne PCI implantiran stent. Postojala je slična zastupljenost metalnih stentova (48,1%) i stentova sa oslobađanjem leka (49,4%), dok su kod dva pacijenta (2,5%) ugrađeni bioresorptivni stentovi. Tri pacijenta (3,4%) su lečeni samo aspiracijom koronarnog tromba, dok je kod 4 pacijenta (4,5%) nakon aspiracije tromba urađena balon-dilatacija bez implantacije stenta (Tabela 27).

Tabela 27. Osnovne proceduralne karakteristike studijske populacije.

Predilatacija – aspiracija, n	8/88 (9,1%)
Predilatacija – stent, n	40/88 (45,5%)
• dijametar balona, mm ± SD	2,45±0,48
• broj atmosfera, atm ± SD	12,74±3,36
Ugrađen stent, n	81/88 (92%)
• BMS	39/88 (48,1%)
• DES	40/88 (49,4%)
• Bioresorptivni	2/88 (2,5%)
• direktna implantacija	36/88 (44,4%)
• dijametar stenta, mm ± SD	3,35±0,50
• dužina stenta, mm ± SD	25,22±7,27
• broj atmosfera, atm ± SD	15,36±2,62
Postdilatacija, n	26/88 (32,1)
• dijametar balona, mm ± SD	3,48±0,49
• broj atmosfera, atm ± SD	15,35±3,87
POBA, n	4/88 (4,5%)
Samo aspiracija tromba, n	3/88 (3,4%)

SD – standardna devijacija; BMS – metalni stent; DES – stent sa oslobađanjem leka; POBA – balon-dilatacija

4.6.1. Angiografske karakteristike i starost tromba

Starost aspiriranog tromba nije uticala na vrednost TIMI protoka tokom primarne PCI, kao ni na vrednost MBG nakon intervencije ($p=0,580$) i stepen razvijenosti kolaterala ($p=0,880$). Ostale angiografske karakteristike se nisu značajno razlikovale među pacijentima sa aspiriranim trombom različite starosti (Tabela 28).

Tabela 28. Angiografske karakteristike pacijenata u odnosu na histološku starost tromba (svež, litički i organizovan).

Angiografske karakteristike	Svež tromb (n=37)	Litički tromb (n=40)	Organizovani tromb (n=11)	p
Infarkt na arteriju, n				
• LAD	11/37 (29,7%)	17/40 (42,5%)	4/11 (36,4%)	
• RCA	23/37 (62,2%)	18/40 (45%)	5/11 (45,5%)	
• Cx	3/37 (8,1%)	5/40 (12,5%)	2/11 (18,2%)	
Višesudovna bolest, n	15/37 (40,5%)	20/40 (50%)	5/11 (45,5%)	0,707
Dužina tromba (mm, IQR)	5 (3-10)	5 (3,5-10)	10 (5-10)	0,091
TIMI 0/1 inicijalno, n	35/37 (94,6%)	36/40 (90%)	10/11 (90,9%)	
TIMI 0/1 posle prolaska žice, n	29/37 (78,4%)	30/40 (75%)	9/11 (81,8%)	0,872
TIMI 0/1 posle predilatacije, n	1/37 (5,6%)	3/40 (13%)	0	
TIMI 3 posle predilatacije, n	16/18 (88,9%)	16/23 (69,6%)	7/7 (100%)	
TIMI 3 posle aspiracije, n	25/37 (67,6%)	19/40 (47,5%)	4/11 (36,4%)	0,091
TIMI 3 finalni, n	34/37 (91,9%)	35/40 (87,5%)	10/11 (90,9%)	
Rentrop 0/1, n	32/37 (86,5%)	34/40 (85%)	10/11 (90,9%)	0,880
Rentrop 2/3, n	5/37 (13,5%)	6/40 (15%)	1/11 (9,1%)	
MBG 0/1, n	8/37 (21,6%)	9/40 (22,5%)	4/11 (36,4%)	0,580
MBG 2/3, n	29/37 (78,4%)	31/40 (77,5%)	7/11 (63,6%)	
Distalna embolizacija, n	6/37 (16,2%)	5/40 (12,5%)	1/11 (9,1%)	
SYNTAX bazalni	9,5 (8,0-20,0)	12,25 (8,00-18,45)	21 (13-29,2)	0,598
SYNTAX rezidualni	0 (0-2,5)	0 (0-5,75)	0 (0-5)	0,502

LAD – leva prednja descendenta arterija; RCA – desna koronarna arterija; Cx – cirkumfleksna arterija; IQR – interkvartilni opseg.

Kod klasifikacije trombova na sveže i starije uočena je značajno češća pojava TIMI 3 protoka posle aspiracije svežeg (67,6%) u odnosu na starije trombe (45,1%, p=0,037). Pojava distalne embolizacije se nije značajno razlikovala u odnosu na starost tromba (16,2% kod svežih i 11,8% kod starijih trombova, p=0,548) (Tabela 29).

Tabela 29. Angiografske karakteristike pacijenata u odnosu na histološku starost tromba (svež i stariji).

Angiografske karakteristike	Sveži trombi (n=37)	Stariji trombi (n=51)	p
Infarktna arterija, n			
• LAD	11/37 (29,7%)	21/51 (41,2%)	
• RCA	23/37 (62,2%)	23/51 (45,1%)	
• Cx	3/37 (8,1%)	7/51 (13,7%)	
Višesudovna bolest, n	15/37 (40,5%)	25/51 (49%)	0,430
Dužina tromba (mm, IQR)	5 (3-10)	5 (5-10)	0,337
TIMI 0/1 inicijalno, n	35/37 (94,6%)	46/51 (90,2%)	
TIMI 0/1 posle prolaska žice, n	29/37 (78,4%)	39/51 (76,5%)	0,833
TIMI 0/1 posle predilatacije, n	1/18 (5,6%)	3/30 (10%)	
TIMI 3 posle predilatacije, n	16/18 (88,9%)	23/30 (76,7%)	0,294
TIMI 3 posle aspiracije, n	25/37 (67,6%)	23/51 (45,1%)	0,037
TIMI 3 finalni, n	34/37 (91,9%)	45/51 (88,2%)	0,576
Rentrop 0/1, n	32/37 (86,5%)	44/51 (86,3%)	0,977
Rentrop 2/3, n	5/37 (13,5%)	7/51 (13,7%)	
MBG 0/1, n	8/37 (21,6%)	13/51 (25,5%)	0,674
MBG 2/3, n	29/37 (78,4%)	38/51 (74,5%)	
Distalna embolizacija, n	6/37 (16,2%)	6/51 (11,8%)	0,548
SYNTAX bazalni	9,5 (8,0-20,0)	13,0 (8,0-19,5)	0,630
SYNTAX rezidualni	0 (0-2,5)	0 (0-5)	0,247

LAD – leva prednja descendenta arterija; RCA – desna koronarna arterija; Cx – cirkumfleksna arterija; IQR – interkvartilni opseg.

Nije uočena povezanost makroskopske boje tromba sa infarktnom arterijom iz koje je aspiriran ($p=0,228$), kao ni sa stepenom razvijenosti kolaterala ($p=0,473$). Pojava angiografski vidljive distalne embolizacije je bila slična kod pacijenata sa aspiriranim crvenim (10,6%) i belim trombom (22,7%, $p=0,151$). Stepen MBG na finalnom angiogramu se nije razlikovao u odnosu na boju tromba ($p=0,665$) (Tabela 30).

Tabela 30. Angiografske karakteristike pacijenata u odnosu na makroskopsku boju aspiriranog tromba.

Angiografske karakteristike	Crveni trombi (n=66)	Beli trombi (n=22)	p
Infarktna arterija, n			
• LAD	21/66 (31,8%)	11/22 (50%)	0,228
• RCA	36/66 (54,5%)	10/22 (45,5%)	
• Cx	9/66 (13,6%)	1/22 (4,5%)	
Višesudovna bolest, n	30/66 (45,5%)	10/22 (45,5%)	1,000
Dužina tromba (mm, IQR)	5 (3-10)	5 (5-10)	0,463
TIMI 0/1 inicijalno, n	62/66 (93,9%)	19/22 (84,6%)	
TIMI 0/1 posle prolaska žice, n	51/66 (78,8%)	16/22 (72,7%)	0,557
TIMI 0/1 posle predilatacije, n	4/61 (10,5%)	0	
TIMI 3 posle predilatacije, n	30/38 (78,9%)	9/10 (90%)	
TIMI 3 posle aspiracije, n	37/66 (56,1%)	11/22 (50%)	0,621
TIMI 3 finalni, n	60/66 (90,9%)	19/22 (86,4%)	0,542
Rentrop 0/1, n	56/66 (84,8%)	20/22 (90,9%)	0,473
Rentrop 2/3, n	10/66 (15,2%)	2/22 (9,1%)	
MBG 0/1, n	15/66 (22,7%)	6/22 (27,3%)	0,665
MBG 2/3, n	51/66 (77,3%)	16/22 (72,7%)	
Distalna embolizacija, n	7/66 (10,6%)	5/22 (22,7%)	0,151
SYNTAX bazalni	11,5 (8,0-20,5)	19,37 (10,50-27,80)	0,771
SYNTAX rezidualni	0 (0-5)	0 (0-4,5)	0,987

LAD – leva prednja descendentna arterija; RCA – desna koronarna arterija; Cx – cirkumfleksna arterija; IQR – interkvartilni opseg.

Sadržaj eritrocita u trombu nije značajno uticao na angiografske karakteristike pacijenata. Između pacijenata sa manjim, umerenim i većim sadržajem eritrocita u trombu nije bilo značajne razlike u MBG ($p=0,864$), stepenu razvijenosti kolaterala ($p=0,433$), kao ni u učestalosti distalne embolizacije ($p=0,778$) (Tabela 31). Pokazalo se da učestalost MBG3 nije značajno različita kod postojanja različite površine eritrocita u trombu (37,1% kod manjeg sadržaja, 37,1% kod umerenog i 25,7% kod većeg sadržaja eritrocita u trombu, $p=0,498$).

Tabela 31. Angiografske karakteristike pacijenata u odnosu na obim hemoragije u trombu.

Angiografske karakteristike	Sadržaj eritrocita u trombu			p
	Manji (n=29)	Umereni (n=30)	Veći (n=29)	
Infarktna arterija, n				
• LAD	12/29 (41,4%)	13/30 (43,3%)	7/29 (24,1%)	
• RCA	16/29 (55,2%)	14/30 (46,7%)	16/29 (55,2%)	
• Cx	1/29 (3,4%)	3/30 (10%)	6/29 (20,7%)	
Višesudovna bolest, n	11/29 (37,9%)	11/30 (36,7%)	18/29 (62,1%)	0,090
Dužina tromba (mm, IQR)	5 (5-10)	5 (3-10)	5 (3-10)	0,587
TIMI 0/1 inicijalno, n	24/29 (82,8%)	29/30 (96,7%)	28/29 (96,6%)	
TIMI 0/1 posle prolaska žice, n	24/29 (82,8%)	24/30 (80%)	20/29 (69%)	0,414
TIMI 0/1 posle predilatacije, n	1/15 (6,7%)	2/15 (13,3%)	1/18 (5,6%)	
TIMI 3 posle predilatacije, n	13/15 (86,7%)	12/15 (80%)	14/18 (77,8%)	
TIMI 3 posle aspiracije, n	17/29 (58,6%)	16/30 (53,3%)	15/18 (51,7%)	0,859
TIMI 3 finalni, n	25/29 (86,2%)	27/30 (90%)	27/29 (93,1%)	
Rentrop 0/1, n	27/29 (93,1%)	25/30 (83,3%)	24/29 (82,8%)	0,433
Rentrop 2/3, n	2/29 (6,9%)	5/30 (16,7%)	5/29 (17,2%)	
MBG 0/1, n	6/29 (20,7%)	8/30 (26,7%)	7/29 (24,1%)	0,864
MBG 2/3, n	23/29 (79,3%)	22/30 (73,3%)	22/29 (75,9%)	
Distalna embolizacija, n	4/29 (13,8%)	5/30 (16,7%)	3/29 (10,3%)	0,778
SYNTAX bazalni	9 (8-18)	13,5 (8-20,5)	12 (8-18,4)	0,659
SYNTAX rezidualni	0 (0-3,5)	0 (0-2,75)	0 (0-8)	0,199

LAD – leva prednja descendentna arterija; RCA – desna koronarna arterija; Cx – cirkumfleksna arterija; IQR – interkvartilni opseg.

4.6.2. Angiografske karakteristike i angiogeneza tromba

Pojava ranih endotelnih ćelija u trombu nije se razlikovala u odnosu na infarktnu arteriju iz koje je aspiriran tromb. Registrovan je sličan TIMI protok pre, tokom i nakon primarne PCI. Razvijene kolaterale (Rentrop 2/3) bile su prisutne kod 11,5% pacijenata sa angiogenezom tromba, u odnosu na 18,5% pacijenata bez angiogeneze (p=0,375). Kod pacijenata sa CD34⁺CD31⁺ ćelijama u trombu značajno češće je registrovan MBG 0 ili 1 u odnosu na MBG 2 ili 3 (31,1% vs. 7,4%, p=0,016) (Tabela 32).

Tabela 32. Angiografske karakteristike pacijenata u odnosu na prisustvo angiogeneze u trombu.

Angiografske karakteristike	Prisustvo CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelija		p
	Da (n=61)	Ne (n=27)	
Infarktna arterija, n			
• LAD	23/61 (37,7%)	9/27 (33,3%)	
• RCA	33/61 (54,1%)	13/27 (48,1%)	
• Cx	5/61 (8,2%)	8/27 (18,5%)	
Višesudovna bolest, n	25/61 (41%)	15/27 (55,6%)	0,205
Dužina tromba (mm, IQR)	5 (5-10)	5 (3-10)	0,356
TIMI 0/1 inicijalno, n	57/61 (93,4%)	24/27 (88,9%)	0,467
TIMI 0/1 posle prolaska žice, n	48/61 (78,7%)	20/27 (74,1%)	0,634
TIMI 0/1 posle predilatacije, n	4/4 (100%)	0	
TIMI 3 posle predilatacije, n	25/34 (73,5%)	14/14 (100%)	
TIMI 3 posle aspiracije, n	30/61 (49,2%)	18/27 (66,7%)	0,129
TIMI 3 finalni, n	53/61 (86,9%)	26/27 (96,3%)	
Rentrop 0/1, n	54/61 (88,5%)	22/27 (81,5%)	0,375
Rentrop 2/3, n	7/61 (11,5%)	5/27 (18,5%)	
MBG 0/1, n	19/61 (31,1%)	2/27 (7,4%)	0,016
MBG 2/3, n	42/61 (68,9%)	25/27 (92,6%)	
Distalna embolizacija, n	8/61 (13,1%)	4/27 (14,8%)	0,535
SYNTAX bazalni	15 (9-20,5)	10,5 (8-19,75)	0,108
SYNTAX rezidualni	0 (0-3)	0 (0-8)	0,133

LAD – leva prednja descendentna arterija; RCA – desna koronarna arterija; Cx – cirkumfleksna arterija; IQR – interkvartilni opseg

Angiografske karakteristike pacijenata u odnosu na stepen organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija date su u Tabeli 33. Nije bilo značajnih razlika u TIMI protoku, MBG, razvijenosti kolaterala i SYNTAX skor, ali je uočen trend ka većoj učestalosti distalne embolizacije u trombima sa pojedinačnim CD34⁺CD31⁺ ćelijama (30%) u odnosu na grupisane (6,5%) i kapilarne petlje (0%) ovih ćelija.

Tabela 33. Angiografske karakteristike pacijenata u odnosu na stepen organizacije ranih endotelnih ćelija u trombu.

Angiografske karakteristike	Stepen organizacije CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelija			p
	Pojedinačne (n=20)	Grupisane (n=31)	Kapilarne petlje (n=10)	
Infarktna arterija, n				
• LAD	9/20 (45%)	11/31 (35,5%)	3/10 (30%)	
• RCA	11/20 (55%)	17/31 (54,8%)	5/10 (50%)	
• Cx	0 (0)	3/31 (9,7%)	2/10(20%)	
Višesudovna bolest, n	6 (30,0)	14 (45,2)	5 (50,0)	0,459
Dužina tromba (mm, IQR)	5 (3,5-7,5)	5 (5-10)	5 (5-10)	0,523
TIMI 0/1 inicijalno, n	17/20 (85%)	30/31 (96,8%)	10 (100)	
TIMI 0/1 posle prolaska žice, n	11/20 (55%)	28/31 (90,3%)	9 (90,0)	
TIMI 0/1 posle predilatacije, n	2/20 (16,7%)	2/31 (12,5%)	0 (0)	
TIMI 3 posle predilatacije, n	9/29 (75%)	10/31 (62,5%)	6/10 (60%)	
TIMI 3 posle aspiracije, n	8/20 (40%)	18/31 (58,1%)	4/10 (40%)	
TIMI 3 finalni, n	16/20 (80%)	27/31 (87,1%)	10/10 (100%)	
Rentrop 0/1, n	18/20 (90%)	27/31 (87,1%)	9/10 (90%)	
Rentrop 2/3, n	2/20 (10%)	4/31 (12,9%)	1/10 (10%)	
MBG 0/1, n	9/20 (45%)	7/31 (22,6%)	3/10 (30%)	
MBG 2/3, n	11/20 (55%)	24/31 (77,4%)	7/10 (70%)	
Distalna embolizacija, n	6/20 (30%)	2/31 (6,5%)	0 (0)	
SYNTAX bazalni (IQR)	11,5 (8-20,5)	8 (8-16,5)	13 (8-21,75)	0,365
SYNTAX rezidualni (IQR)	0 (0-4,5)	0 (0-0)	0 (0-6,75)	0,388

LAD – leva prednja descendentna arterija; RCA – desna koronarna arterija; Cx – cirkumfleksna arterija; IQR – intervartilni opseg.

Aspiracija belog ili crvenog tromba nije uticala na postproceduralni MBG ($p=0,665$). MBG2/3 je češće uspostavljen posle aspiracije tromba veće mikroskopski izmerene širine ($p=0,026$), dok nije bilo razlike u površini tromba, hemoragije i fibrina između pacijenata sa MBG0/1 i MBG2/3 (Tabela 34).

Tabela 34. Stepen angiografski procenjene perfuzije miokarda na finalnom angiogramu (MBG) u odnosu na makroskopske i mikroskopske karakteristike tromba.

Karakteristike tromba	MBG0/1 (n=21)	MBG2/3 (n=67)	p
Makroskopske karakteristike			
Crveni tromb, n	15/21 (71,4%)	51/67 (76,1%)	0,665
Beli tromb, n	6/21 (28,6%)	16/67 (23,9%)	
Mikroskopske karakteristike			
Dužina tromba (cm, IQR)	2,47 (1,63-3,70)	3,86 (2,10-6,12)	0,035
Širina tromba (cm, IQR)	0,85 (0,58-1,17)	1,06 (0,83-1,47)	0,026
Površina tromba (mm ² , IQR)	2,58 (0,70-3,81)	2,78 (1,06-5,93)	0,160
Površina hemoragije (% , ±SD)	44,44±31,12	50,30±29,30	0,433
Površina fibrina (% , ±SD)	53,78±30,61	46,72±28,98	0,339

IQR – interkvartilni opseg, SD – standardna devijacija.

Analizirane su mikroskopske i makroskopske karakteristike aspiriranog tromba u odnosu na pojavu angiografski vidljive distalne embolizacije (Tabela 34). Distalna embolizacija je bila značajno češća kod pacijenata sa trombom veće površine ($p=0,005$), dok nije bilo razlike u procentualnom sadržaju hemoragije ($p=0,375$) i fibrina ($p=0,545$). Postojala je tendencija ka prisustvu aterosklerotskog plaka kod pacijenata sa distalnom embolizacijom ($p=0,057$). Pojava angiografski vidljive distalne embolizacije nije bila povezana sa starošću tromba ($p=0,548$), kao ni sa angiogenezom tromba ($p=0,803$).

Tabela 35. Makroskopske i mikroskopske karakteristike tromba u odnosu na pojavu distalne embolizacije na angiogramu.

Makroskopske karakteristike	Prisustvo distalne embolizacije		p
	Da (n=12)	Ne (n=76)	
Crveni tromb, n	7/12 (58,3%)	59/76 (77,6%)	0,151
Beli tromb, n	5/12 (41,7%)	17/76 (58,3%)	
Mikroskopske karakteristike			
Dužina tromba (cm, IQR)	3,90 (1,99-18,13)	3,25 (1,88-5,26)	0,307
Širina tromba (mm, IQR)	1,38 (0,92-1,84)	1,25 (0,97-1,59)	0,031
Površina tromba (mm ² , IQR)	7,06 (2,45-19,07)	2,46 (0,99-5,08)	0,005
Površina hemoragije (% , ±SD)	41,80±30,89	50,03±29,52	0,375
Površina fibrina (% , ±SD)	53,21±30,59	47,65±29,30	0,545
Starost tromba			
Svež, n	6/12 (50%)	31 (40,8%)	
Litički, n	5/12 (41,7%)	35 (46,0%)	
Organizovan, n	1/12 (8,3%)	10/76 (13,2%)	
Stariji, n	6/12 (50%)	45/76 (59,2%)	0,548
Aterosklerotski plak, n	6/12 (50%)	6/76 (9,4%)	0,057
CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelije, n	8/12 (66,7%)	53/76 (69,7%)	0,803
• Pojedinačne	6/8 (75%)	14/53 (26,4%)	
• Grupisane	2/8 (25%)	29/53 (54,7%)	
• Kapilarne petlje	0	10/53 (18,9%)	

SD – standardna devijacija; IQR – interkvartilni opseg.

4.6.3. Angiografske karakteristike i vrednost VEGF-a

Angiografske karakteristike pacijenata nisu se značajno razlikovale u odnosu na vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a (Tabela 36). Veći stepen razvijenosti kolaterala (Rentrop 2/3) zabeležen je kod 18,2% pacijenata sa nižim vrednostima serumskog VEGF-a, i kod 9,1% pacijenata sa višim vrednostima VEGF-a (p=0,352). Podjednak broj pacijenata (13,6%) iz grupe sa nižim i višim vrednostima serumskog VEGF-a je imao distalnu embolizaciju. Uočena je tendencija ka korelaciji između nižih

vrednosti serumskog VEGF-a i većih vrednosti bazalnog SYNTAX skora ($p=0,207$, $p=0,053$).

Tabela 36. Angiografske karakteristike pacijenata prema vrednosti serumskog VEGF-a.

Angiografske karakteristike	Vrednost serumskog VEGF-a (pg/ml)		p
	<179,20 (n=44)	≥179,20 (n=44)	
Infarktna arterija, n			
• LAD	16/44 (36,4%)	16/44 (36,4%)	1,000
• RCA	23/44 (52,3%)	23/44 (52,3%)	
• Cx	5/44 (11,4%)	5/44 (11,4%)	
Višesudovna bolest, n	19/44 (43,2%)	21/44 (47,7%)	0,669
Dužina tromba (mm, IQR)	5 (5-10)	5 (3-9,5)	0,183
TIMI 0/1 inicijalno, n	43/44 (97,7%)	38/44 (86,4%)	0,110
TIMI 0/1 posle prolaska žice, n	35/44 (79,5%)	33/44 (75%)	0,611
TIMI 0/1 posle predilatacije, n	1/44 (3,8%)	3/44 (13,6%)	0,320
TIMI 3 posle predilatacije, n	21/44 (80,8%)	18/44 (81,8%)	0,926
TIMI 3 posle aspiracije, n	21/44 (47,7%)	27/44 (61,4%)	0,199
TIMI 3 finalni, n	38/44 (86,4%)	41/44 (93,2%)	0,484
Rentrop 0/1, n	36/44 (81,8%)	40/44 (90,9%)	0,352
Rentrop 2/3, n	8/44 (18,2%)	4/44 (9,1%)	
MBG 0/1, n	8/44 (18,2%)	13/44 (29,5%)	0,211
MBG 2/3, n	36/44 (81,8%)	31/44 (70,5%)	
Distalna embolizacija, n	6/44 (13,6%)	6/44 (13,6%)	1,000
SYNTAX bazalni (IQR)	15,5 (8-20,5)	10,25 (8-16,12)	0,081
SYNTAX rezidualni (IQR)	0 (0-6,75)	0 (0-3)	0,652

IQR – interkvartilni opseg.

4.7. EKG analiza

Elektrokardiografske karakteristike ispitivane grupe pacijenata prikazane su u Tabeli 37. Kompletna rezolucija elevacije ST-segmenta (STR) je registrovana kod većine pacijenata (48,9%), delimična rezolucija je postignuta kod 33% pacijenata, dok 18,2% pacijenata nije imalo STR nakon 60 minuta od primarne PCI.

Tabela 37. EKG karakteristike ispitivane grupe pacijenata.

EKG karakteristike pacijenata	
Suma elevacije ST-segmenta pre PCI, mm±SD	8,53±7,62
Broj odvoda sa elevacijom ST-segmenta, n (IQR)	3 (3-5)
Suma depresije ST-segmenta pre PCI	5,01±6,15
Q zubac na prijemu, n (%)	59 (67)
Rezolucija elevacije ST-segmenta	
• Kompletna (<70%)	43/88 (48,9%)
• Delimična (30-70%)	29/88 (33,0%)
• Odsutna (<30%)	16/88 (18,2%)

SD – standardna devijacija; IQR – interkvartilni opseg.

4.7.1. STR u ispitivanoj populaciji

Stepen STR se nije značajno razlikovao prema kliničkim karakteristikama pacijenata (Tabela 38). Jedino je registrovana veća učestalost kompletne STR kod pacijenata sa I, IP i IPL infarktom u poređenju sa anteriornom lokalizacijom (p=0,005). Isto je uočeno i prilikom poređenja prisustva ili odsustva kompletne STR (Tabela 38).

Tabela 38. Kliničke karakteristike pacijenata prema stepenu STR.

Karakteristike pacijenata	Rezolucija elevacije ST-segmenta			p
	Kompletna (n=43)	Delimična (n=29)	Odsutna (n=16)	
Muški pol, n	33/43 (76,7%)	19/29 (65,5%)	13/16 (81,3%)	0,431
Starost (godine ± SD)	58,30±11,06	61,10±12,79	56,00±12,23	0,361
BMI (kg/m ² ± SD)	27,16±4,69	25,94±3,45	28,88±3,40	0,076

Pušenje, n	28/43 (65,1%)	13/29 (44,8%)	9/16 (56,3%)	0,234
Hipertenzija, n	24/43 (55,8%)	18/29 (62,1%)	9/16 (56,3%)	0,860
Diabetes mellitus, n	4/43 (9,4%)	6/29 (20,7%)	3/16 (18,8%)	
Hiperholesterolemija, n	21/43 (48,8%)	15/29 (51,7%)	7/16 (43,8%)	0,877
Hereditet za KVB, n	19/43 (44,2%)	12/29 (41,4%)	9/16 (56,3%)	0,614
Srčana frekvencija (/min ± SD)	73,58±17,21	77,79±21,25	76,63±14,46	0,609
Sistolni KP (mmHg ± SD)	121,30±22,28	125,76±22,21	120,75±24,01	0,666
Dijastolni KP (mmHg ± SD)	75,74±10,92	77,86±14,14	74,69±15,54	0,689
Antecedentna AP, n	20/43 (46,5%)	16/29 (55,2%)	9/16 (56,3%)	0,696
Prethodna AP, n	10/43 (23,3%)	7/29 (24,1%)	5/16 (31,3%)	0,813
Killip klasa, n				
• 1	42/43 (97,9%)	25/29 (86,2%)	12/16 (75%)	
• 2	1/43 (2,3%)	4/29 (13,8%)	3/16 (18,8%)	
• 3	0	0	1/16 (6,3%)	
Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	205 (120-420)	173 (95-307,5)	235 (91,25-338,75)	0,396
• Kašnjenje bolesnika	60 (30-145)	35 (15-172,5)	42,5 (15-120)	0,218
• Kašnjenje sistema	110 (80-170)	90 (57,5-154)	110 (42,5-297,5)	0,364
STEMI lokalizacija, n				
• A, AS, AL	8/43 (16,3%)	16/29 (55,2%)	7/16 (43,8%)	0,005
• I, IL, IPL	35/43 (81,4%)	13/29 (44,8%)	9/16 (56,3%)	

SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; KVB – kardiovaskularne bolesti; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg; A – anteriorni; AS – anteroseptalni; AL – anterolateralni; I – inferiorni; IL – inferolateralni; IPL – inferoposterolateralni.

Slično je registrovano prilikom analize kliničkih karakteristika pacijenata prema pojavi kompletne STR. Veća učestalost kompletne STR je jedino postojala u grupi pacijenata sa I, IP i IPL infarktom (81,4%) u odnosu na A, AS i AL (16,3%, p=0,001) (Tabela 39).

Tabela 39. Kliničke karakteristike pacijenata prema postojanju kompletne STR.

Karakteristike pacijenata	Kompletna STR		p
	Da (n=43)	Ne (n=45)	
Muški pol, n	33/43 (76,7%)	32/45 (71,7%)	0,548
Starost (godine ± SD)	58,30±11,06	59,29±12,70	0,699
BMI (kg/m ² ± SD)	27,16±4,69	26,98±3,68	0,844
Pušenje, n	28/43 (65,1%)	22/45 (48,9%)	0,124
Hipertenzija, n	24/43 (55,8%)	27/45 (60%)	0,691
Diabetes mellitus, n	4/43 (9,4%)	9/45 (20%)	0,231
Hiperholesterolemija, n	21/43 (48,8%)	22/45 (48,9%)	0,996
Hereditet za KVB, n	19/43 (44,2%)	21/45 (46,7%)	0,815
Srčana frekvencija (/min ± SD)	73,58±17,21	77,38±18,95	0,329
Sistolni KP (mmHg ± SD)	121,30±22,28	123,98±22,72	0,579
Dijastolni KP (mmHg ± SD)	75,74±10,92	76,73±14,56	0,720
Antecedentna AP, n	20/43 (46,5%)	25/45 (55,6%)	0,396
Prethodna AP, n	10/43 (23,3%)	12/45 (26,7%)	0,712
Killip klasa, n			
• 1	42/43 (97,9%)	37/45 (82,2%)	
• 2	1/43 (2,3%)	7/45 (15,6%)	
• 3	0	1/45 (2,2%)	
Ukupno ishemijsko vreme (min, IQR)	205 (120-420)	180 (95-330)	0,276
• Kašnjenje bolesnika	60 (30-145)	35 (15-130)	0,081
• Kašnjenje sistema	110 (80-170)	100 (55-165)	0,276
STEMI lokalizacija, n			
• A, AS, AL	8/43 (16,3%)	23/45 (51,1%)	0,001
• I, IL, IPL	35/43 (81,4%)	22/45 (48,9%)	

SD – standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; KVB – kardiovaskularne bolesti; KP – krvni pritisak; AP – angina pectoris; IQR – interkvartilni opseg; A – anteriorni; AS – anteroseptalni; AL – anterolateralni; I – inferiorni; IL – inferolateralni; IPL – inferoposterolateralni.

4.7.2. STR i karakteristike aspiriranog tromba

Stepen STR se nije značajno razlikovao između crvenih i belih aspiriranih trombova ($p=0,801$). Morfometrijske karakteristike tromba su bile slične kod pacijenata sa različitim stepenom STR. Starost tromba se nije značajno razlikovala kod pacijenata sa kompletnom, delimičnom STR ili bez STR ($p=0,538$). Prisustvo ranih endotelnih ćelija u aspiriranim trombima nije uticalo na stepen STR ($p=0,996$) (Tabela 40).

Tabela 40. Makroskopske i mikroskopske karakteristike tromba prema stepenu STR.

Makroskopske karakteristike	Rezolucija elevacije ST-segmenta			p
	Kompletna (n=43)	Delimična (n=29)	Odsutna (n=16)	
Crveni tromb, n	32/43 (74,4%)	21/29 (72,4%)	13/16 (81,3%)	0,801
Beli tromb, n	11/43 (25,6%)	8/29 (7,6%)	3/16 (18,7%)	
Mikroskopske karakteristike				
Dužina tromba (cm, IQR)	3,80 (2,10-6,75)	3,33 (2,07-4,99)	2,56 (1,65-6,57)	0,719
Širina tromba (mm, IQR)	0,99 (0,74-1,51)	0,94 (0,78-1,28)	1,15 (0,70-1,34)	0,828
Površina tromba (mm ² , IQR)	3,31 (1,06-6,27)	2,29 (0,99-4,65)	2,29 (0,87-5,64)	0,574
Površina hemoragije (mm ² , IQR)	2,06 (1,05-4,34)	0,62 (0,27-2,41)	1,65 (0,44-2,85)	0,323
Površina hemoragije (% , ±SD)	51,20±31,77	41,71±27,89	55,79±25,70	0,246
Površina fibrina (mm ² , IQR)	1,10 (0,36-2,28)	1,07 (0,56-1,89)	0,69 (0,40-2,06)	0,856
Površina fibrina (% , ±SD)	45,36±30,14	55,48±29,97	43,78±25,17	0,283
Starost tromba				
Svež, n	20/43 (46,5%)	9/29 (31%)	8/16 (50%)	0,538
Litički, n	17/43 (39,5%)	17/29 (58,6%)	6/16 (37,5%)	
Organizovan, n	6/43 (14%)	3/29 (10,3%)	2/16 (12,5%)	
Stariji, n	23/43 (45,1%)	20/29 (69%)	8/16 (50%)	0,331
CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelije, n	30/44 (69,8%)	20/29 (69%)	11/16 (68,8%)	0,996
- Pojedinačne	5/30 (16,7%)	9/20 (45%)	6/16 (54,5%)	
- Grupisane	19/30 (63,3%)	9/20 (45%)	3/16 (27,3%)	
- Kapilarne petlje	6/30 (20%)	2/20 (10%)	2/16 (18,2%)	

IQR – interkvartilni opseg; SD – standardna devijacija.

Aspiracija tromba različite makroskopske boje nije uticala na pojavu kompletne STR kod pacijenata ($p=0,902$). Morfometrijske karakteristike tromba se nisu značajno razlikovale među pacijentima sa i bez kompletne STR. Starost tromba nije uticala na pojavu kompletne STR ($p=0,552$), kao ni prisustvo angiogeneze u trombotičnom tkivu ($p=0,929$) (Tabela 41).

Tabela 41. Makroskopske i mikroskopske karakteristike tromba u odnosu na pojavu kompletne STR.

Makroskopske karakteristike	Kompletna rezolucija elevacije ST-segmenta		
	Da (n=43)	Ne (n=45)	p
Crveni tromb, n	32/43 (74,4%)	34/45 (75,6%)	0,902
Beli tromb, n	11/43 (25,6%)	11/45 (24,4%)	
Mikroskopske karakteristike			
Dužina tromba (cm, IQR)	3,80 (2,10-6,75)	3,25 (1,83-5,18)	0,655
Širina tromba (mm, IQR)	0,99 (0,74-1,51)	0,99 (0,77-1,30)	0,411
Površina tromba (mm ² , IQR)	3,31(1,06-6,27)	2,29 (0,99-4,86)	0,593
Površina hemoragije (mm ² , IQR)	2,06 (0,11-4,34)	1,21 (0,38-2,47)	0,306
Površina hemoragije (% , ±SD)	51,20±31,77	46,71±27,69	0,482
Površina fibrina (mm ² , IQR)	1,10 (0,36-2,28)	0,98 (0,44-1,89)	0,233
Površina fibrina (% , ±SD)	45,36±30,14	51,32±28,63	0,344
Starost tromba			
Svež, n	20/43 (46,5%)	17/45 (38,7%)	0,552
Litički, n	17/43 (39,5%)	23/45 (51,1%)	
Organizovan, n	6/43 (14%)	5/45 (11,1%)	
Stariji, n	23/43 (53,5%)	28/45 (62,2%)	0,407
CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelije, n	30/43 (69,8%)	31/45 (68,9%)	0,929
• Pojedinačne	5/30 (16,7%)	15/45 (48,4%)	0,073
• Grupisane	19/30 (63,3%)	12/45 (38,7%)	
• Kapilarne petlje	6/30 (20%)	4/45 (12,9%)	

IQR – interkvartilni opseg; SD – standardna devijacija.

Kompletna STR je registrovana kod 15 pacijenata (51,7%) sa manjim sadržajem eritrocita, kod 9 pacijenata (30%) sa umerenom količinom eritrocita u trombu, kao i kod 19 pacijenata (65,5%) sa većom količinom hemoragije ($p=0,023$).

Nije postojala razlika u vrednostima serumskog VEGF-a između pacijenata sa različitim stepenom STR ($p=0,233$). Pacijenti sa kompletnom STR su imali prosečne vrednosti serumskog VEGFR-a 201,11 pg/ml (IQR 67,28-406,42), grupa sa delimičnom STR je imala 110,46 pg/ml (IQR 64,43-201,67), dok je kod pacijenata bez STR registrovana prosečna vrednost VEGF-a od 180,57 pg/ml (IQR 54,55-318,49). Vrednosti serumskog VEGF-a se nisu značajno razlikovale između grupa sa i bez kompletne STR ($p=0,125$).

4.8. Enzimski procenjena veličina infarkta miokarda

Prosečna maksimalna vrednost oslobođenog CK (CK_{max}) tokom hospitalizacije iznosila je 1901 U/L (IQR 1067,00-3169,50). Nije postojala razlika u vrednosti CK_{max} i starosti aspiriranog tromba ($p=0,370$). Srednja vrednost CK_{max} kod pacijenata sa svežim trombom iznosila je 1822 U/L, kod litičkog tromba 1401 U/L, dok su pacijenti sa organizovanim trombima u proseku imali CK_{max} 2955 U/L. Vrednosti CK_{max} nisu se značajno razlikovale između svežih i litičkim trombova ($p=0,495$), litičkih i organizovanih trombova ($p=0,177$), kao ni između svežih i organizovanih trombova ($p=0,333$).

Klasifikacija tromba na sveže i starije takođe nije pokazala povezanost sa maksimalno oslobođenim CK ($p=0,816$). Prosečne vrednosti CK_{max} se nisu značajno razlikovale kod pacijenata sa aspiriranim crvenim i belim trombima (2230 U/L kod crvenih vs. 1246 U/L kod belih trombova, $p=0,138$). Prisustvo $CD34^+CD31^+$ ćelija nije uticalo na vrednosti CK_{max} ($p=0,667$), kao ni različiti stepen angiogeneze tromba ($p=0,696$). Vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a nisu pokazivale korelaciju sa vrednostima CK_{max} ($p=0,368$).

Vrednosti maksimalno oslobođenog troponina I tokom hospitalizacije (TnI_{max}) nedostajale su za 19 (21,6%) pacijenata. Prosečna vrednost TnI_{max} iznosila je 82,68 μ g/L (IQR 29,81-228,12). Maksimalne vrednosti oslobođenog troponina I se nisu razlikovale u odnosu na makroskopsku boju tromba ($p=0,753$), starost tromba ($p=0,929$), prisustvo angiogeneze u trombu ($p=0,948$) i organizacije $CD34^+CD31^+$ ćelija ($p=0,994$). Vrednosti TnI_{max} između nisu se značajno razlikovale svežih i litičkih trombova ($p=0,704$), litičkih i organizovanih trombova ($p=0,872$), kao ni između svežih

i organizovanih trombova ($p=1,000$). Vrednosti TnI_{max} nisu pokazivale korelaciju sa vrednostima serumskog VEGF-a ($\rho=-0,149$, $p=0,223$) (Tabela 42).

Tabela 42. Vrednosti maksimalno oslobođenih kardiospecifičnih enzima u odnosu na boju, starost i angiogenezu tromba, i vrednost serumskog VEGF-a.

	Makroskopska boja tromba		p
	Crveni trombi (n=66)	Beli trombi (n=22)	
CK _{max} (I/U, ±SD)	2506,36±2077,82	2057,82±1994,20	
(U/L, IQR)	2211,00 (1108,00-2955,00)	1192,50 (454,75-4418,50)	0,138
TnI _{max} (µg/L, IQR)	232,41±736,21	583,47±1854,91	
(µg/L, ±SD)	91,40 (35,23-203,50)	74,90 (12,83-262,56)	0,753
	Starost tromba		p
	Sveži trombi (n=37)	Litički (n=40)	Organizovan (n=11)
CK _{max} (U/L, ±SD)	2549,00±2376,49	2107,40±1774,09	2916,64±1849,70
(U/L, IQR)	1862,00 (593,00-3495,75)	1510,00 (842,50-2658,75)	2955,00 (1901,00-5278,00)
TnI _{max} (µg/L, IQR)	306,43±952,66	380,93±1396,64	139,01±123,44
(µg/L, ±SD)	161,14 (35,35-209,12)	69,85 (24,75-253,17)	102,86 (19,36-277,32)
			0,929
	Svež tromb (n=37)	Stariji tromb (n=51)	
CK _{max} (U/L, ±SD)	2549,00±2376,49	2281,94±1803,40	
(U/L, IQR)	1862,00 (593,00-3495,75)	1901,00 (859,00-2955,00)	0,816
TnI _{max} (µg/L, IQR)	306,43±952,66	337,51±1265,91	
(µg/L, ±SD)	161,14 (35,35-209,12)	72,58 (21,64-264,90)	0,753
	Prisustvo CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelija		p
	Da (n=61)	Ne (n=17)	
CK _{max} (U/L, ±SD)	2342,13±1847,43	2118,76±1795,89	
(U/L, IQR)	2076,00 (1086,25-3009,00)	1538,00 (582,50-3420,50)	0,667

TnI _{max} (µg/L, ±SD)	238,06±758,80	520,42±1717,629	
(µg/L, IQR)	80,49 (27,68-229,17)	106,23 (27,66-237,35)	0,948
Stepen organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija			
	Pojedinačne (n=20)	Grupisane (n=31)	Kapilarne petlje (n=10)
CK _{max} (U/L, ±SD)	2315,81±1902,00	2201,52±1874,68	2904,43±1783,34
(U/L, IQR)	1598,80 (643,00-3897,50)	1902,00 (958,00-2607,50)	2346,00 (1901,00-4215,00)
TnI _{max} (µg/L, ±SD)	151,92±137,58	322,62±1046,090	132,94±152,66
(µg/L, IQR)	172,10 (16,48-267,68)	78,31 (36,93-206,07)	67,13 (19,36-277,32)
Vrednosti serumskog VEGF-a (pg/ml)			
	<179,2 (n=44)	≥179,2 (n=44)	
CK _{max} (U/L, ±SD)	2364,21±2008,70	2186,66±1644,49	
(U/L, IQR)	1901,00 (589,00-3027,00)	1720,00 (572,00-3345,50)	0,368
TnI _{max} (µg/L, ±SD)	531,06±1594,05	122,84±121,89	
(µg/L, IQR)	106,23 (38,87-236,91)	77,73 (19,19-221,06)	0,475

IQR – interkvartilni opseg.

4.9. Ehokardiografska analiza

Ehokardiografski pregled urađen je unutar 3 dana od STEMI kod 85 (96,6%) pacijenata. Kontrolni ultrazvučni pregled nakon 6 meseci od STEMI urađen je kod 75 (85,2%) pacijenata. Prosečne vrednosti inicijalnih ehokardiografskih parametara iznosile su: EDV 119,91 mL, EDVI 61,26 mL/m², ESV 61,82 mL, ESVI 31,34 mL/m², EF 45%, dok je prosečna vrednost WMSI bila 1,38. Kontrolni ehokardiografski pregled nakon 6 meseci je pokazao sledeće promene u vrednostima ehokardiografskih parametara; prosečni porast EDVI za 6,95 mL/m², prosečni porast ESVI za 1,92 mL/m², prosečni porast LVEF za 4,5%, kao i prosečno smanjenje WMSI za 0,11 u odnosu na inicijalni ultrazvučni pregled. Remodelovanje leve komore registrovano je kod 25 (28,4%) pacijenata (Tabela 43).

Tabela 43. Ehokardiografske karakteristike pacijenata.

Unutar 3 dana od STEMI	
EDV (mL, \pm SD)	119,91 \pm 22,67
EDVI (mL/m ² , \pm SD)	61,26 \pm 12,89
ESV (mL, \pm SD)	61,82 \pm 17,99
ESVI (mL/m ² , \pm SD)	31,34 \pm 9,52
LVEF (% \pm SD)	45,59 \pm 10,63
WMSI (\pm SD)	1,38 \pm 0,26
Posle 6 meseci od STEMI	
EDV (mL, \pm SD)	134,17 \pm 38,08
EDVI (mL/m ² , \pm SD)	68,52 \pm 18,09
ESV (mL, \pm SD)	65,27 \pm 26,73
ESVI (mL/m ² , \pm SD)	33,07 \pm 12,46
LVEF (% \pm SD)	49,90 \pm 10,01
WMSI (\pm SD)	1,28 \pm 0,24
Remodelovanje leve komore	25/88 (28,4%)
Prosečna razlika u vrednostima ehokardiografskih parametara	
Δ EDVI (mL/m ² , \pm SD)	6,95 \pm 13,05
(medijana, IQR)	5,80 (1,68-13,26)
Δ ESVI (mL, \pm SD)	1,92 \pm 7,38
(medijana, IQR)	2,59 (-0,58, 4,44)
Δ LVEF (% \pm SD)	4,50 \pm 5,87
(medijana, IQR)	5,00 (0,00-7,75)
Δ WMSI (\pm SD)	-0,11 \pm 0,15
(medijana, IQR)	-0,11 (-0,18, -0,05)
Procentualna promena u vrednostima ehokardiografskih parametara	
Δ EDVI% (mL/m ² , \pm SD)	12,00 \pm 19,85
(medijana, IQR)	8,86 (3,09-22,33)
Δ ESVI% (mL, \pm SD)	7,15 \pm 20,58
(medijana, IQR)	8,62 (-1,94, 17,33)
Δ LVEF% (% \pm SD)	12,28 \pm 16,00
(medijana, IQR)	11,11 (0,00-19,89)

Δ WMSI% (\pm SD)	-6,84 \pm 10,14
(medijana, IQR)	-8,00 (-10,86, -4,06)

IQR – interkvartilni opseg.

Aspiracija tromba predominantno crvene ili bele boje nije bila povezana sa promenom u EDVI (p=0,458), ESVI (p=0,549), LVEF (p=0,960), WMSI (p=0,308) i pojavom remodelovanja leve komore nakon 6 meseci od STEMI (p=0,845) (Tabela 44).

Tabela 44. Ehokardiografske karakteristike pacijenata u odnosu na makroskopsku boju aspiriranog tromba.

Eho karakteristike	Makroskopska boja tromba		p
	Crveni tromb (n=55)	Beli tromb (n=20)	
Δ EDVI% (mL/m ² , \pm SD)	13,37 \pm 19,34	8,43 \pm 21,22	
(medijana, IQR)	9,28 (4,71-22,28)	6,45 (-6,04, 24,02)	0,458
Δ ESVI% (mL, \pm SD)	8,45 \pm 17,31	3,75 \pm 27,58	
(medijana, IQR)	10,12 (2,88-17,05)	6,17 (-13,61, 18,71)	0,549
Δ LVEF% (\pm SD)	11,30 \pm 14,41	14,83 \pm 19,74	
(medijana, IQR)	11,11 (1,25-20,00)	10,10 (0,00-16,67)	0,960
Δ WMSI% (\pm SD)	-6,87 \pm 9,82	-6,75 \pm 11,18	
(medijana, IQR)	-8,53 (-11,22, -4,06)	-5,66 (-9,02, -0,91)	0,308
Remodelovanje leve komore	18 (32,7%)	7 (35%)	0,854

IQR – interkvartilni opseg.

Prisustvo svežeg, litičkog i organizovanog tromba nije bilo značajno povezano sa razlikom u vrednostima ehokardiografskih parametara tokom 6 meseci praćenja pacijenata: Δ EDVI% (p=0,252), Δ ESVI% (p=0,790), Δ LVEF% (p=0,542), Δ WMSI% (p=0,574), kao ni sa pojavom remodelovanja leve komore (p=0,713) (Tabela 45).

Tabela 45. Ehokardiografske karakteristike pacijenata u odnosu na starost aspiriranog tromba (svež, litički i organizovanif).

Karakteristike pacijenata	Svež tromb (n=31)	Litički tromb (n=34)	Organizovani tromb (n=10)	P
Δ EDVI% (mL/m ² , \pm SD)	7,60 \pm 20,55	15,14 \pm 13,04	14,14 \pm 34,09	
(medijana, IQR)	6,58 (-7,58, 21,35)	11,02 (5,00-22,87)	13,89 (-11,29, 31,41)	0,252
Δ ESVI% (mL, \pm SD)	6,17 \pm 18,76	8,73 \pm 20,47	4,57 \pm 28,00	
(medijana, IQR)	9,10 (0,50-18,11)	9,82 (-1,06, 16,57)	3,77 (-7,93, 18,16)	0,790
Δ LVEF% (% , \pm SD)	13,61 \pm 17,57	10,03 \pm 13,04	16,13 \pm 20,69	
(medijana, IQR)	12,50 (0,00-21,25)	9,09 (0,00-16,67)	11,11 (0,00-33,69)	0,542
Δ WMSI% (\pm SD)	-7,84 \pm 11,04	-6,83 \pm 8,95	-3,51 \pm 11,54	
(medijana, IQR)	-8,18 (-11,68, -4,06)	-8,53 (-10,96, -3,85)	-7,27 (-8,73, 4,55)	0,574
Remodelovanje LK	9 (29,0%)	13 (38,2%)	3 (12,0%)	0,713

IQR – interkvartilni opseg, LK – leva komora.

Promene u vrednostima ehokardiografskih parametara nisu se značajno razlikovale kod pacijenata sa aspiracijom svežeg i starijeg tromba: Δ EDVI% (p=0,165), Δ ESVI% (p=0,796), Δ LVEF% (p=0,453) i Δ WMSI% (p=0,897), kao ni povezanost sa pojavom remodelovanja leve komore (p=0,507). (Tabela 46).

Tabela 46. Ehokardiografske karakteristike pacijenata u odnosu na starost aspiriranog tromba (svež i stariji tromb).

Karakteristike pacijenata	Svež tromb (n=31)	Stariji tromb (n=44)	p
Δ EDVI% (mL/m ² , \pm SD)	7,60 \pm 20,55	15,14 \pm 18,97	
(medijana, IQR)	6,58 (-7,58, 21,35)	12,45 (4,75-23,94)	0,165
Δ ESVI% (mL, \pm SD)	6,17 \pm 18,76	7,84 \pm 21,98	
(medijana, IQR)	9,10 (0,50-18,11)	8,62 (-5,46, 17,47)	0,796
Δ LVEF% (% , \pm SD)	13,61 \pm 17,57	11,33 \pm 14,92	
(medijana, IQR)	12,50 (0,00-21,25)	10,10 (0,00-16,67)	0,453
Δ WMSI% (\pm SD)	-7,84 \pm 11,04	-6,12 \pm 9,51	
(medijana, IQR)	-8,18 (-11,68, -4,06)	-7,85 (-10,35, -2,73)	0,897
Remodelovanje LK	9 (29,0%)	16 (36,4%)	0,507

IQR – interkvartilni opseg, LK – leva komora.

Nije postojala značajna razlika u promeni ehokardiografskih parametara tokom praćenja STEMI pacijenata u odnosu na prisustvo ranih endotelih ćelija u aspiriranim trombima Δ EDVI% ($p=0,323$), Δ ESVI% ($p=0,629$), Δ LVEF% ($p=0,972$) i Δ WMSI% ($p=0,910$). Nije registrovana povezanost pojave remodelovanja leve komore sa prisustvom $CD34^+CD31^+$ ćelija u trombotičnom materijalu ($p=0,166$) (Tabela 47).

Tabela 47. Ehokardiografske karakteristike pacijenata u odnosu na postojanje angiogeneze u trombotičnom materijalu.

Karakteristike pacijenata	Prisustvo $CD34^+CD31^+$ ćelija		p
	Da (n=50)	Ne (n=25)	
Δ EDVI% (mL/m ² , \pm SD)	11,26 \pm 20,00	13,38 \pm 19,90	
(medijana, IQR)	8,32 (2,94-21,36)	15,46 (4,36-23,02)	0,323
Δ ESVI% (mL, \pm SD)	7,14 \pm 21,68	7,16 \pm 18,76	
(medijana, IQR)	7,42 (-5,40, 17,33)	10,42 (2,24, 18,76)	0,629
Δ LVEF% (% , \pm SD)	11,47 \pm 15,33	13,81 \pm 17,41	
(medijana, IQR)	11,11 (0,00-20,00)	11,11 (0,00-18,12)	0,972
Δ WMSI% (\pm SD)	-6,47 \pm 10,04	-7,52 \pm 10,49	
(medijana, IQR)	-7,55 (-11,01, -3,64)	-8,51 (-9,97, -5,66)	0,910
Remodelovanje LK	14 (28%)	11 (44%)	0,166

IQR – interkvartilni opseg, LK – leva komora.

Postojala je tendencija ka boljem oporavku LVEF kod pacijenata sa pojedinačnim ranim endotelnim ćelijama u aspiriranom trombu u odnosu na grupisane i kapilarne petlje $CD34^+CD31^+$ ćelija ($p=0,063$), dok se ostali ehokardiografski parametri nisu značajno razlikovali prema stepenu organizovanja ranih endotelih ćelija: Δ EDVI% ($p=0,923$), Δ ESVI% ($p=0,566$) i Δ WMSI% ($p=0,356$) (Tabela 48).

Tabela 48. Ehokardiografske karakteristike pacijenata u odnosu na stepen organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija.

Karakteristike pacijenata	CD34 ⁺ CD31 ⁺ ćelije			p
	Pojedinačne (n=20)	Grupisane (n=31)	Kapilarne petlje (n=10)	
ΔEDVI% (mL/m ² , ± SD)	10,47±17,92	12,59±20,47	8,53±25,37	
(medijana, IQR)	5,00 (2,37-21,21)	8,63 (4,71-20,85)	17,29 (-17,99, 29,13)	0,923
ΔESVI% (mL, ± SD)	8,91±21,77	8,45±21,23	-1,43±24,27	
(medijana, IQR)	9,07 (3,58-15,15)	10,87 (-8,63, 18,78)	3,77 (-7,02, 17,33)	0,566
ΔLVEF% (%, ± SD)	17,39±14,29	7,52±14,31	11,50±18,72	
(medijana, IQR)	18,33 (9,60-25,00)	6,30 (0,00-14,06)	11,11 (-9,09, 22,22)	0,063
ΔWMSI% (± SD)	-8,26±7,44	-6,54±10,73	-2,14±12,75	
(medijana, IQR)	-9,56 (-12,33, -5,66)	-6,34 (-11,99, -3,74)	-6,25 (-8,94, 4,65)	0,356
Remodelovanje LK	4 (20,0%)	7 (22,6%)	3 (30,0%)	

IQR – interkvartilni opseg, LK – leva komora.

Vrednosti serumskog VEGF-a nisu pokazivale korelaciju sa promenom u vrednostima ehokardiografskih parametara tokom perioda praćenja pacijenata: ΔEDVI% (ρ=0,025, p=0,832), ΔESVI% (ρ=-0,016, p=0,891), ΔLVEF% (ρ=-0,157, p=0,189), ΔWMSI% (ρ=0,694 p=0,225). Nije uočena povezanost pojave remodelovanja leve komore sa vrednostima serumskog VEGF-a (p=1,000) (Tabela 49).

Tabela 49. Ehokardiografske karakteristike pacijenata prema vrednostima cirkulišućeg serumskog VEGF-a.

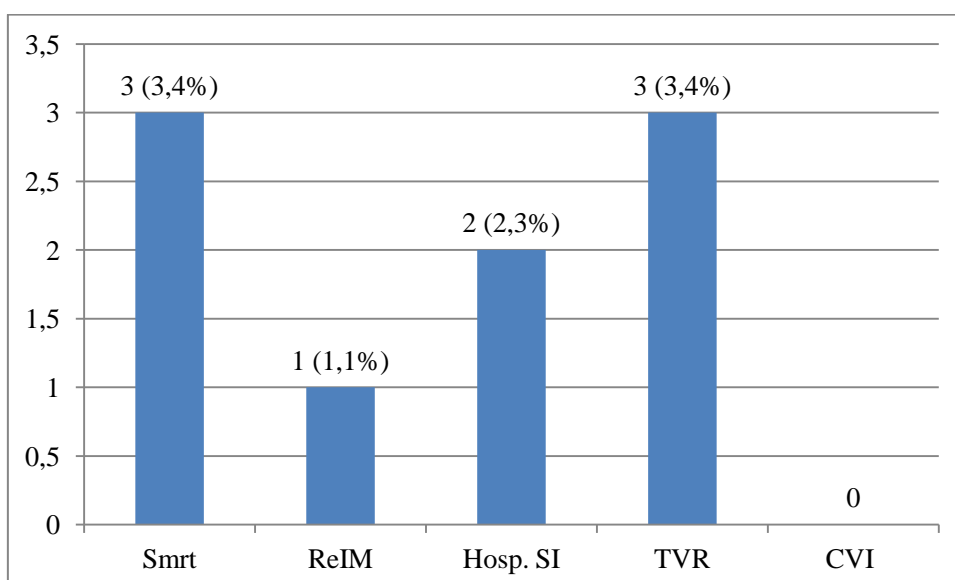
Karakteristike pacijenata	Serumski VEGF (pg/ml)		p
	<179,2 (n=36)	≥179,2 (n=39)	
ΔEDVI% (mL/m ² , ± SD)	11,24±21,67	12,76±18,14	
(medijana, IQR)	8,63 (3,34-21,85)	11,77 (2,99-23,48)	0,718
ΔESVI% (mL, ± SD)	5,07±16,73	9,22±23,88	
(medijana, IQR)	5,74 (-3,55, 13,39)	11,68 (-1,94, 20,27)	0,314
ΔLVEF% (%, ± SD)	15,37±17,00	9,19±14,50	
(medijana, IQR)	12,50 (5,06-25,00)	9,09 (0,00-16,67)	0,159
ΔWMSI% (± SD)	-10,00±10,07	-3,76±9,29	

(medijana, IQR)	-8,97 (-15,01, -5,76)	-6,66 (-8,84, 3,06)	0,316
Remodelovanje LK	12 (33,3%)	13 (33,3%)	1,000

IQR – interkvartilni opseg, LK – leva komora.

4.10. Neželjeni kardiovaskularni događaji (MACCE)

Tokom perioda praćenja od 6 meseci, registrovano je ukupno 9 neželjenih ishoda od interesa: 3 smrtna ishoda, 1 reinfarkt miokarda, 2 hospitalizacije zbog srčane insuficijencije i 3 revaskularizacije infarktne arterije (Grafikon 15).



Grafikon 15. Učestalost glavnih neželjenih srčanih i cerebralnih događaja tokom 6 meseci kliničkog praćenja pacijenata (ReIM – reinfarkt miokarda, Hosp.SI – hospitalizacija usled srčane insuficijencije, TVR – revaskularizacija infarktne arterije, CVI – moždani udar).

5. DISKUSIJA

U ovom radu su analizirani stepen angiogeneze aspiriranog tromba i vrednost cirkulišućeg serumskog VEGF-a kod 88 STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI, kao i njihov uticaj na angiografske i kliničke ishode ovih pacijenata.

Iako je tromb uspešno aspiriran kod 100 pacijenata, kod 12 je materijal izgubljen i/ili razložen tokom kalupljenja, stoga je u konačnu analizu ušlo 88 STEMI pacijenata. Kod većine pacijenata izgubljen trombotični materijal bio je bele boje, tzv. trombocitni tromb, koji se nakon prosvetljavanja u organskom rastvaraču (ksilolu) razložio. U pojedinim slučajevima sačuvani su manji delovi trombotičnog tkiva izgrađeni od fibrina, ali u nedovoljnoj količini za dalju patohistološku analizu ($<1 \text{ mm}^3$).

Trombotični materijal u najvećoj meri bio je izgrađen od eritrocita i očuvanih ćelija krvi, sa znacima lize i/ili organizacije tromba. U 27% slučajeva bio je prisutan materijal iz aterosklerotskog plaka (penaste ćelije, holesterolski kristali, ekstracelularni lipidi, amorfni debris, uz znake svežeg ili starijeg krvarenja).

Poznato je da su beli trombi uglavnom izgrađeni od fibrina i trombocita, dok su crveni trombi želatinozne strukture, i izgledom podsećaju na krvni ugrušak, izgrađeni od fibrina, eritrocita i trombocita (198). Kod STEMI pacijenata sa potpunom okluzijom koronarne arterije češće se sreću crveni trombi (199). Ovo se potvrdilo u našoj grupi ispitanika jer je kod 75% pacijenata aspirirani tromb bio predominantno crvene boje. Slično su uočili Quadros i sar. (68) analizirajući aspirirani materijal kod 113 STEMI pacijenata. U njihovoj kohorti crveni trombi bili su prisutni u 69% slučajeva, uz veći procenat sadržaja eritrocita. Analizirani crveni trombi u našoj populaciji bili su značajno duži, širi, veće ukupne površine i površine hemoragije, kao i manje površine fibrina od belih tromba, što se slaže sa prethodnim rezultatima (68) i mehanizmom trombogeneze (5). Rezultati TAPAS studije su pokazali da su trombi bogati eritrocitima uglavnom veći ($>2 \text{ mm}$) ili umerene veličine (0,5 - 2 mm) (52). Za razliku od istraživanja Quadros i sar. (68) koji su uočili da kod aspiracije belog tromba postoji kraće ishemijsko vreme u odnosu na aspirirani crveni tromb, kod naših pacijenata nismo registrovali značajnu razliku u trajanju ukupnog ishemijskog vremena. Uočili smo tendenciju ka manjem

sadržaju fibrina i većem sadržaju eritrocita sa porastom ukupnog ishemijskog vremena, ali ove korelacije nisu dostigle statističku značajnost. Mogući razlog za neslaganje rezultata leži u delimično različitoj populaciji ispitanika. Quadros i sar. (68) su uključili i pacijente sa prethodnom hirurškom revaskularizacijom miokarda, dok je skoro trećina pacijenata u njihovoj studiji imala prethodni infarkt miokarda (36/113, 32%), što je bio kriterijum za isključivanje iz našeg istraživanja. Drugaćijom mikroskopskog tehnikom (primenom skening elektronske mikroskopije i analizom površine aspiriranog tromba) Silvain i sar. (79) su uočili da se sa povećanjem ishemijskog vremena povećava sadržaj fibrina u trombu, uz istovremeno smanjenje sadržaja trombocita. Registrovano je da svako povećanje ishemijskog vremena za jedan sat udvostručava sadržaj fibrina u trombima bogatim fibrinom, uz smanjenje sadržaja trombocita za 50%. Ova studija nije pronašla da se sadržaj eritrocita povećava sa trajanjem ishemijskog vremena. Međutim, ovde su autori posmatrali samo površinu tromba, dok je u našem istraživanju detaljno analiziran sadržaj tromba na histološkom preseku.

U našoj grupi ispitanika postojala je jasna pozitivna korelacija između sadržaja eritrocita i površine aspiriranog tromba, što se u potpunosti slaže sa prethodnim rezultatima (70). Prisustvo tromba sa različitom površinom hemoragije (manja, umerena i veća površina eritrocita) nije se razlikovalo po većini kliničkih i demografskih karakteristika naših pacijenata, što se slaže sa istraživanjem Yunoki sar. (70) na većem broju STEMI pacijenata (n=178). U našoj studiji je jedino pojava prethodnih epizoda angine pectoris bila češća kod pacijenata sa većim sadržajem eritrocita (41,1%) u poređenju sa trombima sa malom (23,3%) i umerenom površinom hemoragije (10,3%). Moguće je da kod prethodnih ponavljanih bolova u grudima usled epizoda rasta tromba i subokluzije tromba dolazi do akumulacije veće količine eritrocita, što objašnjava veći procenat hemoragije u trombu.

Iako su u našu studiju uključeni STEMI pacijenti kod kojih je bol u grudima trajao do 12 sati, kod više od polovine pacijenata (51/88, 58%) aspirirani tromb je imao histološke karakteristike tromba starijeg od jednog dana. Brojne studije su potvrdile ovaj nalaz (73,77,80,200), što ukazuje na postepen rast tromba tokom nekoliko sati kod većine STEMI bolesnika, ali i tokom nekoliko dana kod oko 20% ovih pacijenata (2). Obdukcioni nalazi osoba koje su imale iznenadnu srčanu smrt ukazuju na postojanje

dugotrajne koronarne tromboze uz organizaciju trombotičnog materijala u oko 70% slučajeva, što implicira da su komplikacije plaka bile klinički „neme“ danima ili nedeljama pre fatalnog događaja (11,12).

Takođe, analizirani aspirirani materijal je kod većine naših pacijenata (58%) pokazivao heterogenost uz polja različite histološke starosti, što su uočili i prethodni istraživači (77,78,80). Ovaj nalaz podržava hipotezu o koronarnoj trombozi kao dinamičnom događaju, gde nakon inicijalne ruptуре plaka i subokluzije koronarne arterije može doći do tranzitorne okluzije, organizacije tromba i zarastanja plaka. Tromb dalje može rasti asimptomatski danima ili nedeljama, uz superponiranje eritrocita na površini tromba, sve dok ne usledi kompletna okluzije koronarne arterije (10,11,201,202). Na taj način se može objasniti čest nalaz svežih trombotičnih elemenata na površini tromba, uz litičke i organizovane strukture u unutrašnjosti tromba (77,191,203,204). Ovu slojevitú strukturu tromba smo uočili i kod naših pacijenata, što potvrđuje epizodni rast tromba pre pojave okluzivne tromboze i početka simptoma. Činjenica da se sveži trombi ne mogu identifikovati kod svih pacijenata može se delom objasniti dezintegracijom veoma fragilnog svežeg materijala prilikom prolaska kroz kateter ili prilikom prebacivanja u bočicu sa fiksativom.

Nalaz histološki starijeg tromba kod naših pacijenata bio je povezan sa dužim ishemijskim vremenom, što potvrđuje rezultate nekoliko prethodnih studija (64,73,78). Kramer i sar. (78) su na 1009 STEMI pacijenata pokazali da su dužina ishemijskog vremena i postojanje hipertenzije nezavisni prediktori aspiracije starijeg tromba. Činjenica da većina STEMI populacije nema predinfarktnu anginu podržava klinički „nemi“ neokluzivni trombotični događaj pre prezentacije okluzivne tromboze. Tako u našoj grupi pacijenata nije registrovana povezanost starosti aspiriranog tromba sa pojavom predinfarktne angine, što se slaže sa rezultatima prethodnog istraživanja (77). Moguće objašnjenje ovog nalaza je da ponavljane subkliničke epizode disrupcije plaka imaju potencijal za prekondicioniranje miokarda, ili da rezultiraju formiranjem kolateralnih krvnih sudova. Stoga pacijenti sa ponavljanim trombotskim subokluzijama mogu imati manje izražene akutne kardiološke simptome u poređenju sa pacijentima gde je ruptura plaka odmah rezultirala superponiranjem luminalnog tromba sa kompletnom okluzijom.

Sveži i stariji trombi se nisu značajno razlikovali prema makroskopskim i mikroskopskim morfološkim karakteristikama (boja tromba, površina celog tromba, površina eritrocita i fibrina u trombu), što se slaže sa rezultatima studije Cambruzzi i sar. (200). Kliničke i proceduralne karakteristike pacijenata nisu se značajno razlikovale prema starosti aspiriranog tromba u našoj populaciji, što je u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija na većem broju ispitanika (73,77). Druga grupa istraživača češće je registrovala stariji tromb kod pušača i osoba sa prethodnim infarktom, dok je nalaz svežeg tromba bio češći kod hipertoničara (64). Angiografske karakteristike naših pacijenata se nisu značajno razlikovale kod pacijenata sa trombima različite histološke starosti, osim što je TIMI 3 protok registrovan značajno češće nakon aspiracije svežeg tromba u odnosu na stariji (67,6% vs. 45,1%). Moguće je da konzistencija svežeg tromba omogućava lakšu i kompletniju aspiraciju u odnosu na starije trombe. Prethodna studija je pokazala da su trombi aspirirani iz LAD češće bili sveži (84), dok kod naših pacijenata nismo videli razliku u starosti tromba na osnovu infarktne arterije.

Aspirirani tromb iz koronarne arterije pokazao se kao odličan model za *in vivo* ispitivanje angiogeneze (75,84). U svom radu sa 120 STEMI pacijenata Li i sar. (84) su pokazali prisustvo CD34⁺CD31⁺ ćelija u skoro svim aspiriranim trombima (98%). Slično tome, u našem istraživanju registrovane su rane endotelne ćelije kod većine pacijenata (69%). Razlika se može objasniti načinom odabira pacijenata, jer su u naše istraživanje uključeni konsekutivni STEMI pacijenti kojima je uspešno aspiriran tromb, dok su Li i sar. iz postojeće baze nasumično izdvojili 120 uzoraka tromba, po 40 iz svake starosne kategorije tromba (svež, litički i organizovani). U našem istraživanju smo uočili da se zasupljenost ranih endotelnih ćelija povećavala sa starošću tromba (54% kod svežih, 75% kod litičkih i 100% kod organizovanih trombova). Takođe, veći stepen organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija (grupisane i kapilarne petlje) registrovan je kod histološki starijih trombova, što se slaže sa zapažanjima Li i sar. (84). Pored toga, broj kapilarnih petlji se povećavao od svežeg ka organizovanom trombu, što je takođe u saglasnosti sa prethodnim rezultatima (84).

Rane endotelne ćelije su bile prisutne na površini tromba i/ili duboko unutar trombotičnog tkiva naših pacijenata, što su uočili i istraživači pre nas (75,85). CD34⁺CD31⁺ ćelije uralasle u trombotično tkivo najčešće su registrovane u

organizovanim trombima, a u manjoj meri kod litičkih i svežih trombova. Uočeno je da je progresija angiogeneze u aspiriranim trombima relativno spor proces (84) jer se značajno povećanje grupisanih i organizovanih CD34⁺CD31⁺ ćelija uočava u organizovanim trombima koji su stari barem 5 dana. Mala angiogenetska aktivnost endotelnih ćelija unutar prvih 5 dana nakon formiranja tromba se može objasniti prostornim promenama u lokalnoj koncentraciji angiogenih faktora poput VEGF-a i bFGF. Waltham i sar. (205) su kod eksperimentalnog modela intravenskog tromba uočili da su koncentracije VEGF-a u trombu značajno veće sedmog dana u poređenju sa prvim danom, i da dostižu maksimalne vrednosti tek 14-21 dana od početka tromboze. Slično je registrovano i za bFGF. Moguće je da koncentracije ovih važnih angiogenetskih činilaca pozitivno korelišu sa progresijom angiogeneze u trombu i da tokom prve nedelje formiranja tromba dolazi do progresivnog povećanja vrednosti VEGF-a i bFGF-a u trombu do vrednosti neophodnih za angiogenezu. Zbog toga smo se odlučili da analiziramo ekspresiju VEGF-a u trombotičnom tkivu.

VEGF je pokazivao predominantno ekstracelularnu ekspresiju, gde su glavni nosioci VEGF imunopozitivnosti bili trombociti, najčešće locirani u regionima kontakta eritrocita i fibrina. Nekoliko prethodnih studija pokazalo je da trombociti u svojim α -granulama sadrže brojne proangiogene faktore, uključujući i VEGF, i da na taj način imaju važnu ulogu u regulaciji angiogeneze (206,207). Moguće je da trombociti zarobljeni u tkivu tromba otpuštaju VEGF, koji dalje privlači i stimuliše diferencijaciju nezrelih endotelnih ćelija. Stoga bi potencijalna uloga trombocita mogla biti u trasiranju i formiranju budućih krvnih sudova u tkivu tromba. U našem istraživanju nismo uočili povezanost obima VEGF ekspresije u trombu i starosti trombotičnog materijala. Međutim, registrovali smo veću površinu VEGF imunopozitivnosti kod tromba sa pojedinačnim i grupisanim CD34⁺CD31⁺ ćelijama, dok je manja površina VEGF imunopozitivnosti zabeležena kod organizovanih formi ranih endotelnih ćelija. Moguće je da je najveća lokalna koncentracija VEGF-a u trombu neophodna za privlačenje nezrelih endotelnih ćelija u trombotično tkivo i njihovo dalje grupisanje, a da koncentracija VEGF-a opada kako se CD34⁺CD31⁺ ćelije organizuju u lumenske strukture.

Važan rezultat ove doktorske disertacije je ko-ekspresija CD34, CD31 i D2-40 molekula na ranim endotelnim ćelijama što predstavlja po prvi put zabeleženu ko-ekspresiju ova tri molekula na membrani iste ćelije u netumorskom tkivu. Do sada je ekspresija D2-40 molekula bila registrovana na limfatičnim endotelnim ćelijama, kao i na vaskularnim endotelnim ćelijama tumora vaskularnog porekla (114). Prema važećoj centrifugalnoj teoriji nastanka limfatičnog sistema, limfatične endotelne ćelije vode poreklo od vaskularnih endotelnih ćelije i nastaju pupljenjem iz kardinalne vene (208). Dalju diferencijaciju karakteriše postepena aktivacija gena sa različitom ekspresijom proteina. Međutim, tokom ranog perioda embriogeneze, ćelije od kojih će nastati i vaskularne i limfatične endotelne ćelije privremeno ekspimiraju markere oba ova ćelijska tipa (209,210). Ova plastičnost vaskularnih i limfatičnih endotelnih ćelija se često uočava i nakon završetka embrionalnog razvoja. Tako su Keuschnigg i sar. (211) pokazali da humane mikrovaskularne endotelijalne ćelijske linije HMEC-1 i TIME ekspimiraju markere i vaskularnih i limfatičnih endotelnih ćelija pokazujući hibridni vaskularno-limfatični endotelni fenotip ukazujući na plastičnost genske ekspresije imortalizovanih endotelnih ćelijskih linija. Takođe, Cooley i sar. (212) su pokazali da je moguća transdiferencijacija vaskularnih i limfatičnih endotelnih ćelija u *in vitro* uslovima, koja je reverzibilna i u velikoj meri zavisna od uslova mikrosredine. Plastičnost vaskularnog i limfatičnog endotela se uočava i u *in vivo* patološkim uslovima, kao što je slučaj kod pacijenata sa Kaposi sarkomom. Tumorske ćelije Kaposi sarkoma ekspimiraju markere specifične za vaskularne i limfatične endotelne ćelije (213). Smatra se da je njihov dvojni fenotip rezultat limfatičnog reprogramiranja vaskularnog endotela Kaposi-sarkoma herpes virusom (214,215). Pretpostavlja se da ovaj virus reaktivira tzv. „utišanu“ (engl. *silenced*) limfatičnu endotelnu diferencijaciju kod vaskularnih endotelnih ćelija. Boscolo i sar. (216) su pokazali ko-ekspresiju vaskularnih markera (CD31 i VE-kadherin) i limfatičnih markera (D2-40, Prox-1 i LYVE-1) na limfatičnim endotelnim ćelijama izolovanim iz limfatičnih malformacija.

Nakon što je uočeno da aspirirani trombotični materijal pokazuje D2-40 imunopozitivnost, primenili smo još dva markera limfatičnog endotela: LYVE-1 i VEGFR3. Poznato je da se ovi molekuli normalno ekspimiraju na vaskularnim endotelnim ćelijama tokom embriogeneze, ali se u postnatalnom periodu njihova ekspresija zadržava samo na endotelu limfatika (117,217). Međutim, u normalnim

uslovima zabeležena je ekspresija LYVE-1 i VEGFR3 na endotelnim ćelijama sinusoidnih kapilara jetre (109,210), što isključuje njihovu limfatičnu specifičnost.

Moguća su dva objašnjenja nalaza ko-ekspresije dva markera vaskularnih endotelnih ćelija (CD34 i CD31) i tri markera limfatičnih endotelnih ćelija (D2-40, LYVE-1 i VEGFR3). Prva pretpostavka je da tokom ranih stadijuma angiogeneze nezrele endotelne ćelije mogu ekspimirati dvojni fenotip vaskularnog i limfatičnog endotela, što se javlja tokom rane embriogeneze (209,210) i u ćelijskim kulturama (211,212). Tako bi se ekspresija D2-40 na ranim vaskularnim endotelnim ćelijama mogla smanjiti (engl. *downregulate*) kako diferencija odmiče u pravcu vaskularnih endotelnih ćelija, odnosno povećati (engl. *upregulate*) tokom diferencijacije limfatičnog endotela, slično smanjenju odnosno povećanju ekspresije drugih markera limfatičnih endotelnih ćelija - LYVE-1 i VEGFR3 (117,218). U našem istraživanju smo uočili da organizacija D2-40/LYVE-1/VEGFR3⁺ ćelija u grupe i kapilarne petlje prati organizaciju i starost trombotičnog materijala, jer su ove forme bile uglavnom prisutne u litičkim i organizovanim trombima. Kakva je dalja sudbina D2-40/LYVE-1/VEGFR3⁺ ćelija ostaje nejasno. Moguće je da dolazi do apoptoze ovih ćelija ili njihove dalje diferencijacije sa smanjenjem ekspresije limfatičnih markera i usmerekvanjem put vaskularne loze. Interesantna je ista organizacija CD34⁺CD31⁺ i D2-40/LYVE-1/VEGFR3⁺ ćelija koja se može tumačiti kao posledica dinamične prirode angiogeneze tokom koje vaskularne i limfatične endotelne ćelije brzo menjanju ekspresiju svojih markera tokom organizacije trombotičnog materijala.

Druga hipoteza podrazumeva da CD34⁺CD31⁺D2-40⁺LYVE-1⁺VEGFR3⁺ ćelije prisutne u aspiriranim koronarnim trombima nastaju od endotelnih progenitorskih ćelija (83) ili vaskularnih progenitorskih ćelija (219) adultnom vaskulogenezom. Na taj način bi CD34⁺CD31⁺D2-40⁺LYVE-1⁺VEGFR3⁺ ćelije mogle privremeno postojati tokom neovaskularizacije tromba, rekapitulirajući molekularne mehanizme vaskulogeneze. Ko-ekspresija markera vaskularnih i limfatičnih endotelnih ćelija se javlja tokom embrionalne vaskulogeneze (210), stoga je moguće da se sličan mehanizam javlja tokom angiogeneze posredovane endotelnim progenitoskim ćelijama (EPC). Aspirirani trombotični materijal nije pokazivao ekspresiju CD64 i CD173 molekula, što ukazuje da

su registrovane endotelne ćelije verovatno zrelija forme ranih endotelnih ćelija, što ne isključuje mogućnost da su EPĆ uključene u proces angiogeneze.

Kako bi ispitali ovu pretpostavku, Li i sar. (84) su prilikom bojenja aspiriranog materijala koristili CD133, kao marker primitivnih EĆ koji bi ih razlikovao od nezrelih formi endotelnih ćelija. Pokazalo se da ko-ekspresija CD34/CD133 molekula postoji kod malog broja trombova (11%), bez značajne razlike u starosti trombotičnog materijala. Moguće je da su EPĆ uključene u angiogenezu tromba u manjem obimu. Većina primitivnih, CD133⁺ ćelija je bila u vidu pojedinačnih ćelija, lociranih u regionima bogatim eritrocitima, što ukazuje na to da su bile „zarobljene“ tokom formiranja tromba.

U našem aspiriranom materijalu ekspresija CD105 uočena je kod malog broja pacijenata (9,1%), dok su Li i sar. (84) detektovali ove ćelije kod većine pacijenata (84%). Ovi autori su uočili da broj CD105⁺ ćelija raste sa starošću tromba, kada dolazi i do njihove prostorne organizacije u grupisane CD105⁺ ćelije i kapilarne petlje. Različiti rezultati su verovatno posledica različitog odabira materijala, jer su Li i sar. koristili po 40 trombova svake starosne kategorije za analizu (svež, litički i organizovani).

Uprkos savremenoj terapiji STEMI i optimalnom lečenju, optimalni protok na nivou koronarne mikrocirkulacije se ne uspostavlja kod 30 – 50% pacijenata. Smanjen ili odsutan protok kroz mikrocirkulaciju i pored uspostavljanja optimalnog epikardnog protoka nosi lošiju prognozu i veći mortalitet STEMI pacijenata (220). Inkompletna rezolucija elevacije ST-segmenta (STR) nakon primarne PCI predstavlja snažan prediktor lošije prognoze STEMI pacijenata (193,221-5). Verouden i sar. (64) su pokazali da se kod aspiracije svežeg tromba češće javlja kompletna STR nego u slučaju starijeg tromba. U ovoj studiji elevacija ST-segmenta se procenjivala 80 ms nakon „J“ tačke, pri čemu je postproceduralni EKG sniman neposredno nakon poslednje injekcije kontrasta. Takođe, istraživači su definisali STR kao $\geq 50\%$ u odnosu na inicijalni EKG. Njihov češći nalaz inkompletne STR kod starijih trombova se uklapa u pretpostavljenu patogenezu tromboze koja počinje nekoliko dana ili nedelja pre manifestacije STEMI (77,78). U tom slučaju asimptomatska disrupcija aterosklerotskog plaka, ranije epizode subkliničke distalne embolizacije i posledična mikrovaskularna opstrukcija mogu

rezultirati smanjenjem miokardne perfuzije (50,52,69,226). Druga studija gde je na isti način definisana kompletna STR nije uočila razliku u kompletnoj EKG reperfuziji između svežih i starijih trombova (80). Međutim, u ovom slučaju je reč o STEMI pacijentima kod kojih je bol u grudima trajao duže (do 24h) i gde je u 15% slučajeva rađena tzv. spašavajuća (engl. *rescue*) PCI. Takođe, EKG je sniman nakon izlaska iz sale za kateterizaciju, ali ne neposredno nakon završene intervencije kao kod Verouden i sar (64).

U našem istraživanju koristili smo definiciju ST-elevacije koja preovlađuje u literaturi, a to je merenje na 60 ms od „J“ tačke (227) uz analizu postproceduralnog EKG-a nakon 60 minuta od završene primarne PCI (48,50,52,65). Kompletna STR bila je definisana kao >70% rezolucije ST-elevacije u odnosu na inicijalni EKG. Međutim, u grupi naših pacijenata nismo registrovali povezanost kompletne STR i starosti aspiriranog tromba (svež/litički/organizovan, odnosno svež/stariji tromb). Istu definiciju STR koristila je grupa autora u svom istraživanju, analizirajući zastupljenost eritrocita na preseku aspiriranog tromba (70). Oni su pokazali da se učestalost kompletne STR ne razlikuje značajno kod trombova sa većim (35,6%), umerenim (40,7%) i manjim saržajem eritrocita (53,3%). Međutim, naši rezultati pokazuju da se kompletna STR češće javlja u grupi gde trombi imaju veću površinu eritrocita (65,5%), a da je nekompletna STR najčešća kod tromba sa umerenom površinom hemoragije (70%). Moguće je da veća polja eritrocita oslikavaju histološki „svežiji“ i mlađi tromb, koji je povezan sa boljom perfuzijom miokarda i većim stepenom STR jer još uvek nije došlo do potpunog oštećenja mikrocirkulacije. Drugo objašnjenje podrazumeva tzv. inflamatornu teoriju, gde veća polja hemoragije prati i veći broj inflamatornih ćelija (prvenstveno neutrofila) u trombu. Tako su Arakawa i sar. (66) pokazali da je inkompletna STR (<50% rezolucije) povezana sa većim brojem neutrofila u trombu. Moguće je da inflamatorne ćelije i aktivirani trombociti u trombu oslobađaju vazoaktivne peptide, koji dalje dovode do mikrovaskularne disfunkcije distalne vaskulature, tzv. funkcionalne mikrovaskularne opstrukcije (228). Lokalna akumulacija neutrofila povezana je sa povećanjem aktivnosti trombocita, što je pokazalo istraživanje Merten i sar. (229). Agregacija neutrofila može biti uključena i u primarnu etiologiju povećane aktivnosti trombocita tokom akutnog koronarnog sindroma. Pokazano je da aktivirani neutrofilni povećavaju agregaciju trombocita i oslobađanje tromboksana (230). Ovi rezultati ukazuju na važnu povezanost

intraluminalnih trombocit-neutrofil agregata i kliničkih ishoda nakon reperfuzione terapije. Agregati trombocita i neutrofila mogu uzrokovati distalnu embolizaciju dovodeći do zapašenja mikrovaskulature, uz aktivaciju inflamatorne kaskade, stvaranje ROS i slobodnih radikala (231). Morfometrijska analiza aspiriranog materijala naših pacijenata je pokazala da je veću površinu hemoragije pratio veći broj inflamatornih ćelija, iako nismo koristili specifične imunohistohemijske markere za neutrofilne granulocite.

Skening elektronska mikroskopija je pokazala da povećavanje sadržaja fibrina na površini tromba, koje ide u prilog starijeg aspiriranog materijala, nije bilo povezano sa pojavom kompletne STR (>70%) (79), što je takođe u saglasnosti sa našim rezultatima.

Perfuzija miokarda angiografski se može proceniti stepenom miokardnog ispiranja (MBG) koji je snažan prediktor ozbiljnih neželjenih srčanih događaja (52,51,232). Uzroci suboptimalne perfuzije miokarda mogu biti mikrovaskularna disfunkcija, reperfuziono oštećenje, edem miokarda ili embolizacija trombotičnim/aterosklerotskim materijalom (233). Yunoki i sar. (70) su pokazali da veći sadržaj eritrocita u trombu nosi veći rizik od suboptimalne perfuzije miokarda nakon primarne PCI. Tako je pokazano da se kod pacijenata čiji trombi sadrže veću površinu pod eritrocitima postproceduralni MBG3 registruje kod 32,2% ispitanika, u poređenju sa 60% pacijenata gde su trombi sadržali malu količinu eritrocita. Na osnovu poznate korelacije o sadržaju eritrocita i neutrofila u trombu (70), manja uspešnost miokardne reperfuzije se još jednom može objasniti delovanjem mijeloperoksidaze i drugih prooksidantnih enzima koji se otpuštaju iz neutrofila. Pokazano je da aktivirani neutrofilni mogu indukovati promene eritrocita, koje vode hiperagregabilnosti (234) i povećanju ekspresije i aktivnosti tkivnog faktora, što uzrokuje trombotično stanje (235). U ovu pretpostavku se uklapaju i rezultati još jedne studije (66) koja je pokazala da pacijenti sa trombima bogatim neutrofilima (>100 neutrofila/0,025 mm² tromba) imaju značajno veći rizik od pojave MBG0/1 nakon primarne PCI (OR=9,43). Naše istraživanje je pokazalo da pojava MBG3 na finalnom angiogramu nije povezana sa sadržajem eritrocita na preseku aspiriranog tromba.

Naši rezultati su pokazali da starost tromba ne utiče na učestalost MBG2/3 i TIMI3 protoka nakon intervencije, što se slaže sa rezultatima Cambuzzi i sar. (200). Takođe, nismo uočili povezanost boje aspiriranog tromba, površine tromba, procentualne zastupljenosti hemoragije i fibrina u trombu sa pojavom MBG2/3 na finalnom angiogramu. Starost tromba nije bila povezana sa pojavom MBG2/3 na angiogramu, što se slaže sa rezultatima Silvain i sar. (79). Njihov nalaz većeg sadržaja fibrina (indikatora starijeg tromba) nije pratila razlika u optimalnoj angiografski procenjenoj miokardnoj reperzufiji (MBG3).

S druge strane, pokazali smo da je prisustvo CD34⁺CD31⁺ ćelija u aspiriranom trombotičnom materijalu povezano sa lošijom perfuzijom miokarda nakon primarne PCI (MBG0/1). Moguće je da ponavljane epizode subokluzije krvnog suda, organizacija tromba sa urastanjem endotelnih i glatkomišićnih ćelija uz intemitentno smanjenje protoka krvi progresivno oštećuju perfuziju miokarda, a da je urastanje CD34⁺CD31⁺ ćelija marker oštećenja mikrocirkulacije. U prilog tome govori naš nalaz povezanosti prisustva CD34⁺CD31⁺ ćelija u trombu sa postojanjem predinfarktne angine. Druga, inflamatorna hipoteza se uklapa u prethodno navedene rezultate (66,70), gde bi novoformirani krvni sudovi u trombu mogli poslužiti u dopremanju novih inflamatornih ćelija (uglavnom neutrofila) u tkivo tromba, što dalje povećava oksidativni stres u trombotičnom materijalu i vodi organizaciji i rekanalizaciji tromba, ali i smanjenoj perfuziji miokarda.

Distalna embolizacija aterotrombotičnim materijalom kod STEMI pacijenata jedan je od važnih razloga inkompletne perfuzije miokarda i lošijeg kliničkog ishoda nakon primarne PCI (52,69,195,236). Embolizacija aterotrombotskim materijalom se može desiti tokom intervencije usled tzv. *crushing* efekta ili fragmentacije materijala u infarktnoj leziji (237,238). Procenjeno je da se angiografski vidljiva distalna embolizacija javlja kod 6-18% STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI (52,69,195,236).

Podaci iz TAPAS studije su pokazali da se kod pacijenata sa distalnom embolizacijom češće registruju trombi bogati eritrocitima u odnosu na pacijente bez distalne embolizacije (50% vs. 15,7%) (69). Slično tome, Yunoki i sar. (190) su registrovali

značajno veća polja eritrocita, brojne inflamatorne ćelije i mala polja trombocita u trombima pacijenata sa distalnom embolizacijom. Naši rezultati su pokazali da sadržaj eritrocita u trombu ne utiče značajno na pojavu distalne embolizacije, ali i da se distalna embolizacija češće viđa kod trombova veće površine, što se slaže sa rezultatima prethodno navedenih studija (69,190).

Istraživanje sa 892 STEMI pacijenata je pokazalo da se angiografski vidljiva distalna embolizacija uočava značajno češće kod pacijenata sa starijim trombom (20% kod litičkih i 16% kod organizovanih) u poređenju sa svežim trombima (11%) (64). Slično su uočili Kramer i sar. (78), da se najveći procenat distalne embolizacije registruje kod litičkog tromba (21,2%), a manje kod pacijenata sa svežim (12,1%) i organizovanim trombima (15,2%). Embolizacija trombom može biti ređa u slučajevima kada je tromb svež i fragilan, ili kada je tromb organizovan, čvršći i povezan sa zidom krvnog suda. Međutim, u našoj populaciji pacijenata nismo uočili povezanost distalne embolizacije sa starošću tromba, prisustvom angiogeneze i stepenom organizacije ranih endotelних ćelija u trombotičnom tkivu. Razlike se mogu objasniti manjim brojem pacijenata obuhvaćenih našom studijom, kao i manjim brojem trombova koji su doveli do distalne embolizacije (12/88, 13,6%) što delimično ograničava poređenje sa drugim studijama.

Prethodne studije su pokazale da su volumen i sastav plaka, naročito volumen nekrotičnog jezgra, povezani sa pojavom angiografski vidljive distalne embolizacije kod STEMI pacijenata (239). Studija sličnog dizajna i sličnog broja ispitanika poput naše (n=81 STEMI) je pokazala da je prisustvo aterosklerotskog plaka u trombotičnom materijalu značajno povezano sa pojavom distalne embolizacije (80), što je potvrđeno i kod naših pacijenata. Moguće je da fragilnost tromba i prisustvo plaka u većoj meri doprinose distalnoj embolizaciji i suboptimalnoj reperfuziji nego starost tromba, što su potvrdila prethodna istraživanja (238,240,241).

Razvijenost kolaterala u seriji naših pacijenata nije bila povezana sa starošću tromba, angiogenezom i stepenom organizacije ranih endotelних ćelija u trombu, kao ni sa obimom hemoragije u trombu, što se slaže sa rezultatima prethodne studije (70).

Za procenu veličine infarkta miokarda koristili smo maksimalne vrednosti kardiospecifičnih enzima (CK i troponin I) tokom hospitalizacije. Aspirirani trombi

različite histološke starosti se nisu značajno razlikovali prema vrednosti maksimalno oslobođenih enzima, što se slaže sa rezultatima istraživanja Kramer i sar. (73) na značajno većem broju pacijenata (n=914). Cambuzzi i sar. (200) su u svoje istraživanje uključili širu grupu konsekutivnih STEMI pacijenata (sa prethodnim infarktom miokarda i hirurškom revaskularizacijom miokarda) kojima je prilikom primarne PCI aspiriran tromb. Kod ukupno 112 STEMI pacijenata nisu ustanovili povezanost maksimalno oslobođenih vrednosti CK-MB i troponina sa starošću tromba.

Prisustvo crvenog ili belog tromba nije uticalo na vrednosti CK_{max} i TnI_{max} kod naših ispitanika, što se podudara sa rezultatima prethodnog istraživanja (68). Takođe, naši rezultati su pokazali da prisustvo angiogeneze u trombu, kao i stepen organizacije $CD34^+CD31^+$ ćelija ne utiče na enzimski procenjenu veličinu infarkta STEMI pacijenata.

Naši rezultati su pokazali da makroskopska boja aspiriranog tromba (predominantno beli ili crveni tromb) ne utiče značajno na pojavu remodelovanja leve komore nakon 6 meseci od STEMI, niti da postoji značajna razlika u procentualnim promenama EDVI, ESVI, LVEF i WMSI. Yunoki i sar. (70) su koristili drugačiju podelu trombotičnog materijala, analizirajući trombe sa manjim, umerenim i većim sadržajem eritrocita. Slično našim rezultatima, registrovali su da nema značajne razlike između ove tri grupe u promeni LVEF nakon 6 meseci praćenja. Međutim, njihovi rezultati su pokazali da je procentualno povećanje EDVI bilo značajno veće u grupi sa većim sadržajem eritrocita u trombu u odnosu na grupu sa umerenim i manjim sadržajem eritrocita. Takođe, ova grupa autora je pojavu remodelovanja leve komore posmatrala kroz procentualno povećanje EDVI, te su rezultati pokazali da je veće remodelovanje leve komore postojalo u grupi sa većim sadržajem eritrocita u odnosu na ostale dve grupe, dok se u našem istraživanju koristila definicija remodelovanja leve komore kao uvećanje EDV za >20%, koja se češće primenjuje u praksi i kliničkim istraživanjima.

Druga grupa autora (66) koja je analizirala trombe prema sadržaju neutrofila uočila je da ovaj histološki parametar ne utiče na pojavu remodelovanja leve komore nakon 6 meseci od STEMI, ali da je u grupi sa većim sadržajem neutrofila registrovano značajno smanjenje LVEF nakon 6 meseci u poređenju sa grupom aspiriranih trombova manjeg

sadržaja neutrofila. Kako se sadržaj inflamatornih ćelija smanjuje sa starošću i organizacijom aspiriranog trombotičnog materijala, naši rezultati su pokazali da se učestalost remodelovanja leve komore, kao i promena ehokardiografskih parametara nakon 6 meseci od STEMI ne razlikuje značajno među pacijentima čiji su trombi bili različite histološke starosti (svež, litički i organizovan, odnosno svež i stariji tromb).

Kod naših pacijenata je postojala tendencija ka boljem oporavku LVEF kod pacijenata sa pojedinačnim ranim endotelnim ćelijama u aspiriranom trombu u odnosu na grupisane i kapilarne petlje CD34⁺CD31⁺ ćelija (p=0,063), dok se ostali ehokardiografski parametri (procenutalna promena EDVI, ESVI i WMSI) nisu značajno razlikovali prema stepenu organizacije angiogeneze. Pregledom dosadašnje literature nismo pronašli studije koje su analizirale povezanost navedenih parametara, ali je moguće da je stepen organizacije angiogeneze u trombu još jedan faktor koji oslikava trajanje ishemije i utiče na oporavak STEMI pacijenata.

Ograničen broj ozbiljnih srčanih i cerebralnih neželjenih događaja u našoj populaciji (ukupno 9) onemogućio je dalje statističke analize i poređenje pacijenata prema različitim histološkim, kliničkim i angiografskim karakteristikama. Međutim, grupa autora (73) je na velikom broju pacijenata pokazala da je tromb stariji od jednog dana nezavisni prediktor dugoročnog mortaliteta. Pretpostavlja se da prisustvo starijeg tromba nosi bitne prognostičke posledice za pacijente sa akutnim infarktom miokarda. Jedno od objašnjenja ovog nalaza je da su pacijenti sa aspiriranim starijim trombom verovatno imali češće asimptomatske redukcije protoka krvi sa spontanom lizom/rekanalizacijom tromba pre početka STEMI u odnosu na pacijente sa svežim trombima (77). Ova privremena smanjenja u protoku krvi zajedno sa distalnom embolizacijom mogu dovesti do mikrovaskularne disfunkcije i ishemije što se može ogledati u inkompletnoj ST-rezoluciji na kraju primarne PCI. S druge strane, Cambuzzi i sar. (200) nisu registrovali razliku u učestalosti MACCE nakon mesec dana od akutnog infarkta miokarda između grupe pacijenata sa svežim i trombima starijim od 24 sata. Slično tome, Quadros i sar (68) su uočili da pacijenti sa aspiriranim crvenim trombom imaju trend ka većoj učestalosti neželjenih kardiovaskularnih događaja nakon 30 dana od primarne PCI (smrtni ishod, reinfarkt miokarda, revaskularizacija miokarda i moždani udar) u poređenju sa pacijentima sa aspiriranim belim trombima (13,9% vs.

4,2%, $p=0,10$). Međutim, analizom pojedinačnih komponenti MACCE-a nije registrovana razlika između ove dve grupe.

Aspirirani trombi različite makroskopske boje, mikroskopske ukupne površine, kao i površine fibrina i hemoragije nisu se značajno razlikovali po vrednostima cirkulišućeg serumskog VEGF-a. Međutim, značajno veće vrednosti serumskog VEGF-a registrovane su kod pacijenata sa organizovanim trombima u poređenju sa svežim. Nasuprot tome, lokalna ekspresija VEGF-a u trombu je pokazivala suprotne rezultate: organizovani trombi su pokazivali manju ekspresiju VEGF-a u odnosu na histološki mlade trombe. Poznato je da VEGF u trombu ekspimiraju uglavnom zarobljeni trombociti i da se najviše VEGF-a oslobađa prilikom inicijalne tromboze, koja često rezultira organizovanjem muralnog tromba i subokluzivnom trombozom (242). Kod velikog broja pacijenata se ishemija miokarda progresivno nastavlja, do konačne okluzije koronarne arterije i prezentacije STEMI. Stoga „lokalna“ VEGF ekspresija u trombu ne mora reflektovati trajanje ishemije, već bi serumski VEGF mogao biti bolji indikator.

Elektrokardiografska i angiografska procena reperfuzije miokarda nije pokazala povezanost STR i MBG sa vrednostima cirkulišućeg serumskog VEGF-a. S druge strane, uočena je povezanost dužeg ishemijskog vremena sa većim vrednostima serumskog VEGF-a. Poznato je da glavni depo VEGF-a u cirkulaciji predstavljaju trombociti, i da nakon njihove aktivacije i degranulacije prilikom tromboze dolazi do pulsog otpuštanja VEGF-a (207). Epizode ponavljane subokluzivne tromboze prati aktivacija sve većeg broja trombocita, čime se može objasniti veća vrednost serumskog VEGF-a. U ove rezultate se uklapa naš nalaz značajno većih vrednosti serumskog VEGF-a kod pacijenata sa trombima starijim od 5 dana (91,9%) u odnosu na litičke (45%) i sveže trombe (56,8%). Vrednost serumskog VEGF-a kod naših pacijenata nije pokazivala povezanost sa stepenom razvijenosti kolaterala na angiogramu. Slično su uočili Kim i sar. (2012), poredeći inicijalnu vrednost, kao i vrednost VEGF-a nakon 24h i 48 h od infarkta miokarda sa stepenom razvijenosti kolaterala.

Moguće je da VEGF kao pokazatelj angiogeneze nije podestan indikator postproceduralne reperfuzije STEMI pacijenata. S druge strane, Kucukardali i sar. (184)

su pokazali da su kod pacijenata sa angiografski kritičnim lezijama vrednosti VEGF-a veće u odnosu na manje izraženu koronarnu bolest. Stoga VEGF može biti koristan kao indikator potrebe za revaskularizacijom kod pacijenata sa koronarnom bolešću srca.

Vrednosti maksimalno oslobođenih kardiospecifičnih enzima (CK i troponin I) nisu pokazale korelaciju sa vrednostima cirkulišućeg serumskog VEGF-a kod naših pacijenata. Ovi rezultati se slažu sa prethodnim studijama (176,179), dok su Kim i sar. (182) pokazali da serijsko merenje VEGF-a unutar 2 dana od STEMI takođe ne pokazuje korelaciju sa maksimalnim vrednostima kardiospecifičnih enzima. Poznato je da nakon inicijalnog skoka VEGF-a usled pulsog oslobađanja iz trombocita dolazi do smanjenja vrednosti ovog angiogenog faktora. Ovome doprinosi kratak biološki poluživot VEGF-a koji kod ljudi iznosi oko 50 minuta (243). Pokazano je da vrednosti VEGF-a progresivno rastu unutar nekoliko dana od infarkta miokarda, dostižući maksimalne vrednosti 7-14 nakon infarkta (173-5,177,180), uz povratak na normalne vrednosti nakon 6 meseci (170).

Kranz i sar. (176) su serijski merili serumski VEGF kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda (prilikom prezentacije pacijenta, nakon 3, 7 i 10 dana), pri čemu nisu uočili korelaciju vrednosti VEGF-a sa CK_{max} . S druge strane, Hojo i sar. (177) su registrovali povezanost vrednosti serumskog VEGF-a merenih nakon 7 i 14 dana od infarkta sa maksimalno oslobođenim vrednostima CK tokom hospitalizacije. Objašnjenje kontradiktornih rezultata može biti u vremenu uzorkovanja cirkulišućeg VEGF-a. Moguće je da inicijalno izmeren VEGF ne korelira sa vrednostima CK i troponina jer ga ne oslobađa ishemijski miokard, već trombociti iz tromba. Pretpostavlja se da inicijalnom skoku VEGF-a više doprinosi stepen aktivacije trombocita, nego apsolutni broj trombocita u trombu. Moguće je da je to razlog zbog koga nismo uočili korelaciju VEGF sa maksimalno oslobođenim vrednostima kardiospecifičnih enzima kod naših pacijenata.

Progresivni porast serumskog VEGF-a nakon infarkta miokarda se može objasniti protektivnom adaptacijom miokarda na ishemijske uslove povećavanjem obima angiogeneze, što podržava korelacija kasnije izmerenih vrednosti VEGF-a sa CK_{max} . Suprotno pretpostavci da VEGF kod pacijenata pre infarkta miokarda može oslikavati

težinu ishemijske, merenje ovog markera nakon infarkta bi moglo biti pokazatelj kompenzatorne postinfarktne angiogeneze. Angiogenska aktivnost nakon akutnog infarkta miokarda često oslikava težinu rezidualne ishemijske miokarda i veličinu infarkta. Stoga bi merenje cirkulišućeg VEGF-a moglo pomoći u određivanju težine ishemijske i planiranja lečenja pacijenata.

Vrednosti cirkulišućeg VEGF-a u našoj populaciji pacijenata nisu pokazivale korelaciju sa procentualnom promenom u vrednostima ehokardiografskih parametara tokom perioda praćenja pacijenata (Δ EDVI%, Δ ESVI%, Δ LVEF%, Δ WMSI%). Takođe, nije uočena razlika u pojavi remodelovanja leve komore kod pacijenata sa višim, odnosno nižim vrednostima serumskog VEGF-a. Prilikom procesa ishemijske i angiogeneze, u ove kompleksne procese uključuju se i drugi angiogeni faktori, za koje je poznato da menjaju dinamiku nakon akutnog infarkta miokarda (169,244-246). Devaux i sar. (247) su pokazali da su niže vrednosti jednog od pripadnika VEGF familije (VEGFB) nakon 4 dana od akutnog infarkta miokarda povezane sa pojavom remodelovanja leve komore nakon 6 meseci. Moguće je da njihovo udruženo delovanje doprinosi angiogenezi, stoga bi merenje većeg broja faktora doprinelo boljem razumevanju mehanizama formiranja novih krvnih sudova.

Dosadašnji rezultati studija koje su ispitivale uticaj vrednosti cirkulišućeg VEGF-a na učestalost neželjenih ishoda dali su kontradiktorne rezultate. Heeschen i sar. (169) su uočili da su povišene vrednosti serumskog VEGF-a kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom povezane sa većom učestalošću smrtnog ishoda ili nefatalnog infarkta miokarda. Suprotno tome, rezultati NAMIS studije (188) pokazali su da niže vrednosti VEGF-a izmerene sedmog dana nakon STEMI nose lošije prognostičke posledice po pacijenta u smislu veće učestalosti MACCE.

Različiti rezultati delom potiču od različite metodologije ove dve studije; dok su Heeschen i sar. (169) analizirali vrednost VEGF-a neposredno nakon početka akutnog koronarnog sindroma, Matsudaira i sar. (188) su se odlučili za merenje vrednosti VEGF-a sedmog dana nakon STEMI, znajući da vrednost ovog angiogenog markera dostiže svoje maksimalne vrednosti 7-14 dana nakon infarkta miokarda (173-5,177,180).

Moguća je dvojna uloga VEGF-a na početku i tokom daljeg toka infarkta miokarda. Poznato je da VEGF ispoljava proaterosklerotsku ulogu kroz povećanje inflamatorne infiltracije i neovaskularizacije plaka (248). Na taj način se mogu objasniti lošiji klinički ishodi kod pacijenata sa višim vrednostima VEGF-a (169). Takođe, hemodinamski poremećaji, obim ishemije miokarda i inflamacija kao posledica akutnog infarkta miokarda mogu uticati na porast ovog markera u cirkulaciji i reflektovati veći prognostički rizik od realnog. S druge strane, VEGF ispoljava pozitivne efekte na preživljavanje vaskularnih endotelnih ćelija i oporavak endotela kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda (249). Kako je VEGF ključni molekul odgovoran za angiogeni odgovor ishemijskih tkiva (250), veće cirkulišuće vrednosti VEGF-a mogu reflektovati sposobnost oporavka infarktne regije, što bi rezultiralo boljim kliničkim ishodima pacijenata (188).

Ograničen broj neželjenih srčanih i cerebralnih događaja među našim pacijentima onemogućio je dobijanje ovih zaključaka u našoj studijskoj populaciji. Za procenu prognostičke uloge VEGF-a potrebna su serijska merenja ovog angiogenog markera.

Važno je napomenuti nekoliko ograničenja ovog istraživanja:

Nemogućnost aspiracije tromba kod svih STEMI pacijenata može biti jedan od izvora pristranosti ovog istraživanja, te se naši rezultati ne odnose nužno na STEMI pacijente lečene pPCI u akutnoj fazi. Takođe, analiziran je materijal STEMI pacijenata koji su upućeni na pPCI, i rezultati ne obuhvataju sve STEMI pacijente.

Kompletan trombotični materijal dobijen aspiracijom tokom primarne PCI nije uvek bio dostupan za patohistološku analizu zbog načina dobijanja materijala i mehaničke manipulacije aspiriranim trombom. Takođe, moguća je kontaminacija tromba ćelijama i supstancama iz ateroma.

Tromb se može endogeno razložiti ili pod dejstvom antitrombocitnih ili fibrinolitičkih lekova.

Moguća je fragmentacija tromba pre PCI ili tokom PCI usled prolaska žice-vodiča ili aspiracionog katetera, dovodeći do distalne embolizacije.

Moguće je da se unutar nekoliko sati od formiranja, tromb prekrije mononuklearnim ćelijama što dalje zaustavlja depoziciju trombocita.

Fragmentisani trombotični materijal se može razložiti prilikom prolaska kroz kateter, filter ili u bočici gdje se prikuplja (ovo može u diskusiju)

Tokom aspiracije tromba je moguće oštećenje trombotičnog tkiva. Međutim, poznato je da trombi imaju dobre elastične karakteristike (71,72), i da je ovo oštećenje manjeg obima. Kako su na histološkim preparatima uočene očuvane ćelije, ovo potvrđuje pretpostavku da je u pitanju ograničeno oštećenje trombotičnog materijala. Takođe, na nekim histološkim preparatima je uočeno oštećenje ivičnog dela tromba (tzv. *crush* efekat), što nije uzeto u obzir prilikom analize starosti tromba.

Histološkom analizom nije obuhvaćen sav materijal (nivo preseka). Zato smo analizirali po 4 preseka sa 7 nivoa kako bismo obuhvatili što više aspiriranog materijala.

Aspiriran trombotični materijal može biti stariji nego što se očekuje na osnovu dužine ishemijskog vremena. Takođe, moguće je superponiranje svežijeg tromba na stariji tromb, što bi potencijalno moglo da zbuni osobu koja analizira preparate (73). Zbog toga smo prilikom analize starosti tromba posmatrali histološki najstariji deo materijala, a analizu su nezavisno obavili jedan histolog i jedan patolog.

Vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a se određivala samo jednom, što ne može da isključi dalje promene ovog markera i njihovu prognostičku vrednost.

Različita vrednost VEGF-a u poređenju sa drugim studijama može poticati i od različitog esaja i proizvođača.

U proces angiogeneze su uključeni i drugi faktori osim VEGF-a, kao što su bazni fibroblastni faktor rasta (bFGF) i angiopoetini (Ang-1 i Ang-2). Moguće je da njihovo udruženo delovanje doprinosi angiogenezi, stoga bi merenje multiplih faktora doprinelo boljem razumevanju mehanizma formiranja novih krvnih sudova.

Relativno mali broj pacijenata koji bi omogućio analizu kliničkih ishoda i dalje statističke analize. Međutim, reč je velikom broju ispitanika za patohistološku studiju ovog tipa.

Monocentričnost studije i izostanak randomizacije, što je viđeno i u drugim studijama ovog tipa.

U početku istraživanja aspiracija tromba bila je vršena kod konsekutivnih STEMI pacijenata, a kasnije kod angiografski vidljivog tromba, u skladu sa trenutno važećim preporukama za primarnu PCI.

6. ZAKLJUČCI

Zaključci našeg ispitivanja uticaja vrednosti cirkulišućeg sereumskog VEGF-a i stepena angiogeneze aspiriranog tromba na angiografske i kliničke ishode 88 STEMI pacijenata lečenih primarnom PCI su sledeći:

- Aspirirani trombi iz koronarnih arterija STEMI pacijenata su kod većine pacijenata (75%) bili predominantno crvene boje.
- Makroskopska boja aspiriranog tromba nije zavisila od dužine trajanja ishemijskog vremena.
- Kod pacijenata sa antecedentnom i predinfarktnom anginom pectoris češće su aspirirani crveni trombi.
- Postojala je pozitivna korelacija površine tromba sa dužinom, širinom tromba i sadržajem eritrocita, uz negativnu korelaciju sa površinom fibrina.
- Postojala je negativna korelacija sadržaja fibrina i dužine ishemijskog vremena, dok se sa povećavanjem ishemijskog vremena nije značajno povećavala hemoragijska komponenta u trombu.
- Kod većine pacijenata je aspiriran tromb histološki stariji od 24h, dok je kod svih pacijenata vreme od pojave bola u grudima do primarne PCI iznosilo do 12h.
- Pristustvo starijih tromba je bilo povezano sa pojavom antecedentne angine, dok nije registrovana povezanost starosti tromba sa pojavom angine 72 h pre STEMI prezentacije.
- Ukupno ishemijsko vreme bilo je značajno duže kod pacijenata sa aspiriranim starijim trombima u odnosu na sveže trombe.
- Crveni i beli trombi se nisu značajno razlikovali prema histološki procenjenoj starosti.
- Pacijenti sa prethodnom pojavom bolova u grudima (72 h pre STEMI) značajno češće su imali trombe bogate eritrocitima. Sadržaj eritrocita u trombu nije bio povezan sa pojavom antecedentne angine.
- Angiogeneza je bila prisutna u većini aspiriranih trombova STEMI pacijenata. Rane endotelne ćelije su najčešće bile u formi grupisanih CD34⁺CD31⁺ ćelija,

ređe su bile prisutne kao pojedinačne ćelije, dok su najređe bile u formi kapilarnih petlji.

- CD34⁺CD31⁺ ćelije su značajno češće bile prisutne u aspiriranim trombima pacijenata sa prethodnom anginom pectoris, dok nije uočena povezanost prisustva angiogeneze tromba sa pojavom antecedentne angine.
- Stepen angiogeneze aspiriranog tromba nije bio povezan sa trajanjem ishemijskog vremena.
- Stepen organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija se povećavao sa starošću tromba. Svi organizovani trombi su pokazivali znake angiogeneze, angiogeneza je registrovana kod 75% litičkih trombova, dok su sveži trombi imali prisutne rane endotelne ćelije u 50% slučajeva.
- CD34⁺CD31⁺ ćelije su bile prisutne na površini tromba u vidu izduženih ćelijskih formacija, ili uralile u trombotično tkivo gde su bile okrugle u slučaju grupisanja, ili izdužene, kod formiranja kapilarnih petlji.
- Periferno locirane CD34⁺CD31⁺ ćelije su bile najzastupljenije u svežim trombima, dok se njihova učestalost smanjivala sa starošću tromba. Suprotno tome, uralile CD34⁺CD31⁺ ćelije su bile najzastupljenije u organizovanim trombima, uz progresivno smanjenje učestalost kod mlađih trombova.
- Registrovana je ko-ekspresija CD34/CD31 i D2-40, LYVE-1 i VEGFR3 molekula na ranim endotelnim ćelijama uralim u trombotično tkivo. Ovo je prvi slučaj prisustva D2-40 imunoreaktivnosti na vaskularnim endotelnim ćelijama u netumorskim i nepatološkim uslovima.
- Broj D2-40⁺ ćelija u trombotičnom materijalu se povećavao sa starošću tromba. Organizaciju CD34⁺CD31⁺ ćelija u trombotičnom materijalu pratila je organizacija D2-40⁺ ćelija.
- Pacijenti sa većim vrednostima cirkulišućeg serumskog VEGF-a imali su duže ishemijsko vreme u odnosu na pacijente sa manjim vrednostima VEGF-a.
- Vrednost serumskog VEGF-a nije zavisila od broja trombocita i leukocita u krvi pri prijemu pacijenata u bolnicu.
- Pacijenti sa većim vrednostima serumskog VEGF-a imali su tendenciju ka većoj površini tromba.

- Kod pacijenata sa organizovanim trombima češće su izmerene više vrednosti serumskog VEGF-a u odnosu na pacijente sa aspiriranim svežim i litičkim trombima.
- Pacijenti sa znacima angiogeneze aspiriranog tromba su imali više vrednosti serumskog VEGF-a u odnosu na pacijente bez CD34⁺CD31⁺ ćelija u trombu.
- Aspiraciju svežeg tromba značajano češće pratila je pojava TIMI 3 protoka nakon aspiracije u odnosu na aspiriran stariji trombotični materijal.
- Kod pacijenata sa znacima angiogeneze u aspiriranom trombu značajno češće je registrovan MBG 0/1 u odnosu na trombe bez prisustva CD34⁺CD31⁺ ćelija.
- Distalna embolizacija je bila značajno češća kod pacijenata sa trombom veće površine, dok nije bilo razlike u procentualnom sadržaju hemoragije i fibrina u trombu. Pojava angiografski vidljive distalne embolizacije nije bila povezana sa starošću tromba i prisustvom angiogeneze u aspiriranom trombu.
- Angiografske karakteristike pacijenata (infarktna arterija, prisustvo višesudovne bolesti, vrednost TIMI protoka, Rentrop razvijenost kolaterala, vrednost MBG i pojava angiografski vidljive distalne embolizacije) nisu se značajno razlikovale u odnosu na izmerene vrednosti cirkulišućeg serumskog VEGF-a.
- Uočena je tendencija ka korelaciji između nižih vrednosti serumskog VEGF-a i većih vrednosti bazalnog SYNTAX skora.
- Stepent STR se nije značajno razlikovao između makroskopski crvenih i belih trombova, i trombova različitih morfometrijskih karakteristika.
- Nije uočena povezanost između prisustva angiogeneze u trombu i stepena STR.
- Maksimalno oslobođene vrednosti kardiospecifičnih enzima (CK, troponin I) nisu pokazivale povezanost sa makroskopskom bojom tromba, histološkom starošću tromba, prisustvom angiogeneze i stepenom organizacije CD34⁺CD31⁺ ćelija, kao ni sa vrednostima cirkulišućeg serumskog VEGF-a.
- Aspiracija tromba predominantno crvene ili bele boje nije bila povezana sa promenom u vrednostima ehokardiografskih parametara (EDVI, ESVI, LVEF, WMSI) i pojavom remodelovanja leve komore nakon 6 meseci od STEMI.
- Promene u vrednostima ehokardiografskih parametara (EDVI, ESVI, LVEF, WMSI), kao i pojava remodelovanja leve komore tokom perioda praćenja nisu se značajno razlikovale prema starosti aspiriranog tromba (svež, litički i

organizovan, odnosno svež i stariji), kao ni prema prisustvu angiogeneze u aspiriranom materijalu.

- Postojala je tendencija ka boljem oporavku LVEF kod pacijenata sa pojedinačnim ranim endotelnim ćelijama u aspiriranom trombu u odnosu na grupisane i kapilarne petlje CD34⁺CD31⁺ ćelija, dok se ostali ehokardiografski parametri (EDVI, ESVI i WMSI) nisu značajno razlikovali prema stepenu organizacije angiogeneze.
- Vrednosti serumskog VEGF-a nisu pokazivale korelaciju sa promenom u vrednostima ehokardiografskih parametara (EDVI, ESVI, LVEF i WMSI) tokom perioda praćenja pacijenata. Nije uočena razlika u pojavi remodelovanja leve komore kod pacijenata sa višim, odnosno nižim vrednostima serumskog VEGF-a.

7. LITERATURA

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation* 2012;126(16):2020–35.
2. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-71.
3. Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36–44.
4. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation* 1992;86:III74–85.
5. Falk E. Coronary thrombosis: pathogenesis and clinical manifestations. *Am J Cardiol* 1991;68:28B–35B.
6. Otsuka F, Yasuda S, Noguchi T, Ishibashi-Ueda H. Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther* 2016;6(4):396–408.
7. Lutgens E, Suylen R-J van, Faber BC, Gijbels MJ, Eurlings PM, Bijnens A-P, et al. Atherosclerotic Plaque Rupture. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2003;23(12):2123–30.
8. Maseri A, Chierchia S, Davies G. Pathophysiology of coronary occlusion in acute infarction. *Circulation* 1986;73:233–9.
9. Mruk JS, Zoldhelyi P, Webster MW, Heras M, Grill D, Holmes D, et al. Does antithrombotic therapy influence residual thrombus after thrombolysis of platelet-rich thrombus? Effects of recombinant hirudin, heparin, or aspirin. *Circulation* 1996;93:792–9.
10. Mann J, Davies MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: Role of healed plaque disruption. *Heart* 1999;82:265-8.
11. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, Virmani R. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 2001;103:934-40.

12. Henriques de Gouveia R, van derWal AC, van der Loos CM, Becker AE. Sudden unexpected death in young adults. Discrepancies between initiation of acute plaque complications and the onset of acute coronary death. *Eur Heart J* 2002;23:1433–40.
13. Kramer MC, Rittersma SZH, de Winter RJ, Ladich ER, Fowler DR, Liang YH, et al. Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:122-32.
14. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ Res* 2014;114(12):1852–66.
15. O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE, Chung MK, de Lemos JA, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians and Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *Catheter Cardiovasc Interv* 2013;82(1):E1-27.
16. Asseburg C, Vergel YB, Palmer S. Assessing the effectiveness of primary angioplasty compared with thrombolysis and its relationship to time delay: a Bayesian evidence synthesis. *Heart* 2007;93:1244–50.
17. Nielsen PH, Maeng M, Busk M, for the DANAMI-2 investigators Primary angioplasty versus fibrinolysis in acute myocardial infarction. Long-term follow-up in the Danish acute myocardial infarction-2 trial. *Circulation* 2010;121:1484–91.
18. De Luca G, Suryapranata H, Zijlstra F. Symptom-onset-to-balloon time and mortality in patients with acute myocardial infarction treated by primary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:991–7.
19. De Luca G, Suryapranata H, Ottervanger JP, Antman E. Time delay to treatment and mortality in primary angioplasty for acute myocardial infarction: every minute of delay counts. *Circulation* 2004a;109:1223–5.
20. De Luca G, van’t Hof AW, de Boer MJ, Ottervanger JP, Hoorntje JC, Gooselink AT, et al. Time-to-treatment significantly affects the extent of ST-segment

- resolution and myocardial blush in patients with acute myocardial infarction treated by primary angioplasty. *Eur Heart J* 2004b;25:1009–13.
21. Terkelsen CJ, Sorensen JT, Maeng M. System delay and mortality among patients with STEMI treated with primary percutaneous coronary intervention. *JAMA* 2010;304:763–71.
 22. Goldberg RJ, Spencer FA, Fox KAA, Brieger D, Steg PG, Gurfinkel E, et al. Prehospital Delay in Patients With Acute Coronary Syndromes (from the Global Registry of Acute Coronary Events [GRACE]). *Am J Cardiol* 2009;103(5):598–603.
 23. Spencer FA, Montalescot G, Fox KAA, et al. Delay to reperfusion in patients with acute myocardial infarction presenting to acute care hospitals: an international perspective. *Eur Heart J* 2010;31:1328–36.
 24. Goff DC Jr., Feldman HA, McGovern PG, Goldberg RJ, Simons-Morton DF, Cornell CE, et al. Rapid Early Action for Coronary Treatment (REACT) Study Group. Prehospital delay in patients hospitalized with heart attack symptoms in the United States: the REACT trial. *Am Heart J* 1999;138:1046–57.
 25. Swaminathan RV, Wang TY, Kaltenbach LA, Kim LK, Minutello RM, Bergman G, et al. Nonsystem reasons for delay in door-to-balloon time and associated in-hospital mortality: a report from the National Cardiovascular Data Registry. *J Am Coll Cardiol* 2013;61(16):1688–95.
 26. Finnegan JR Jr., Meischke H, Zapka JG, Leviton L, Meshack A, Benjamin-Garner R, et al. Patient delay in seeking care for heart attack symptoms: findings from focus groups conducted in five U.S. regions. *Prev Med* 2000;31:205–13.
 27. Leslie WS, Urie A, Hooper J, Morrison Cl. Delay in calling for help during myocardial infarction: reasons for the delay and subsequent pattern of accessing care. *Heart* 2000;84:137–41.
 28. McKinley S, Moser DK, Dracup K. Treatment-seeking behavior for acute myocardial infarction symptoms in North America and Australia. *Heart Lung* 2000;29:237–47.
 29. Feldman HA, Proschan MA, Murray DM, Goff D, Stilyanou M, Dulberg E, et al. Statistical design of REACT (Rapid Early Action for Coronary Treatment), a

- multisite community trial with continual data collection. *Control Clin Trials*. 1998;19:391–403.
30. Zijlstra F, Hoorntje JCA, de Boer M-J, Reiffers S, Miedema K, Ottervanger JP, et al. Long-Term Benefit of Primary Angioplasty as Compared with Thrombolytic Therapy for Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine* 1999;341(19):1413–9.
 31. Morrison LJ, Verbeek PR, McDonald AC, Sawadsky BV, Cook DJ. Mortality and pre-hospital thrombolysis for acute myocardial infarction: A meta-analysis. *JAMA* 2000;283:2686-92.
 32. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty vs. intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003;361:13–20.
 33. Widimský P, Budesinský T, Vorác D. ‘PRAGUE’ study group investigators. Long distance transport for primary angioplasty vs immediate thrombolysis in acute myocardial infarction: final results of the randomized national multicentre trial—PRAGUE-2. *Eur Heart J* 2003;24:94-104.
 34. Bonnefoy E, Lapostolle F, Leizorovicz A, Steg G, McFadden EP, Dubien PY, et al. Primary angioplasty vs. pre-hospital fibrinolysis in acute myocardial infarction: a randomised study. *Lancet* 2002;360:825-9.
 35. Bonnefoy E, Steg PG, Boutitie F, Dubien PY, Lapostolle F, Roncalli J, et al. Comparison of primary angioplasty and pre-hospital fibrinolysis in acute myocardial infarction (CAPTIM) trial: a 5-year follow-up. *Eur Heart J* 2009;30:1598-606.
 36. Steg PG, Bonnefoy E, Chabaud S, Lapostolle F, Dubien PY, Cristofini P, et al. Impact of time to treatment on mortality after pre-hospital fibrinolysis or primary angioplasty: data from the CAPTIM randomized clinical trial. *Circulation* 2003;108:2851-6.
 37. Pinto DS, Frederick PD, Chakrabarti AK, Kirtane AJ, Ullman E, Dejam A, et al. Benefit of transferring ST-segment-elevation myocardial infarction patients for percutaneous coronary intervention compared with administration of onsite fibrinolytic declines as delays increase. *Circulation* 2011;124:2512-21.

38. Sorajja P, Gersh BJ, Cox DA, McLaughlin MG, Zimetbaum P, Costantini C, et al. Impact of multivessel disease on reperfusion success and clinical outcomes in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28(14):1709–16.
39. Park D-W, Clare RM, Schulte PJ, Pieper KS, Shaw LK, Califf RM, et al. Extent, location, and clinical significance of non-infarct-related coronary artery disease among patients with ST-elevation myocardial infarction. *JAMA* 2014;312(19):2019–27.
40. Engstrøm T, Kelbæk H, Helqvist S, Høfsten DE, Kløvgaard L, Holmvang L, et al. Complete revascularisation versus treatment of the culprit lesion only in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and multivessel disease (DANAMI-3—PRIMULTI): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2015;386(9994):665–71.
41. Gershlick AH, Khan JN, Kelly DJ, Greenwood JP, Sasikaran T, Curzen N, et al. Randomized trial of complete versus lesion-only revascularization in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for STEMI and multivessel disease: the CvLPRIT trial. *J Am Coll Cardiol* 2015;65(10):963–72.
42. Wald DS, Morris JK, Wald NJ, Chase AJ, Edwards RJ, Hughes LO, et al. Randomized Trial of Preventive Angioplasty in Myocardial Infarction. *New Engl J Med* 2013;369(12):1115–23.
43. Hlinomaz O. Multivessel coronary disease diagnosed at the time of primary PCI for STEMI: complete revascularization versus conservative strategy: the PRAGUE 13 trial. *EuroPCR*; May 19, 2015; Paris, France.
44. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, et al. 2015 ACC/AHA/SCAI Focused Update on Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention and the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2016;67(10):1235–50.
45. Henriques JP, Zijlstra F, Van't Hof AW, De Boer MJ, Dambrink JH, Gosselink M, et al. Angiographic assessment of reperfusion in acute myocardial infarction by myocardial blush grade. *Circulation* 2003;107:2115-9.

46. Haager PK, Christott P, Heussen N, Lepper W, Hanrath P, Hoffmann R. Prediction of clinical outcome after mechanical revascularization in acute myocardial infarction by markers of myocardial reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:532-8.
47. Costantini CO, Stone GW, Mehran R, Aymong E, Grines CL, Cox DA, et al. Frequency, correlates, and clinical implications of myocardial perfusion after primary angioplasty and stenting, with and without glycoprotein IIb/IIIa inhibition, in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:305-12.
48. Burzotta F, Trani C, Romagnoli E, Mazzari MA, Rebuzzi AG, De Vita M, et al. Manual thrombus-aspiration improves myocardial reperfusion: the randomized evaluation of the effect of mechanical reduction of distal embolization by thrombus-aspiration in primary and rescue angioplasty (REMEDIA) trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(2):371-6.
49. De Luca L, Sardella G, Davidson CJ, De Persio G, Beraldi M, Tommasone T, et al. Impact of intracoronary aspiration thrombectomy during primary angioplasty on left ventricular remodelling in patients with anterior ST elevation myocardial infarction. *Heart* 2006;92(7):951-7.
50. Silva-Orrego P, Colombo P, Bigi R, Gregori D, Delgado A, Salvade P, et al. Thrombus aspiration before primary angioplasty improves myocardial reperfusion in acute myocardial infarction: the DEAR-MI (Dethrombosis to Enhance Acute Reperfusion in Myocardial Infarction) study. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1552-9.
51. Vlaar PJ, Svilaas T, van der Horst IC, Diercks GFH, Fokkema ML, de Smet BJGL, et al. Cardiac death and reinfarction after 1 year in the Thrombus Aspiration during Percutaneous coronary intervention in Acute myocardial infarction Study (TAPAS): a 1-year follow-up study. *Lancet* 2008;371(9628):1915-20.
52. Svilaas T, Vlaar PJ, van der Horst IC, Diercks GFH, de Smet BJGL, van den Heuvel AFM, et al. Thrombus Aspiration during Primary Percutaneous Coronary Intervention. *New Engl J Med* 2008;358(6):557-67.
53. Sardella G, Mancone M, Bucciarelli-Ducci C, Agati L, Scardala L, Carbone I, et al. Thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention

- improves myocardial reperfusion and reduces infarct size: the EXPIRA (Thrombectomy With Export Catheter in Infarct-Related Artery During Primary Percutaneous Coronary Intervention) prospective, randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:309–15.
54. Bavry AA, Kumbhani DJ, Bhatt DL. Role of adjunctive thrombectomy and embolic protection devices in acute myocardial infarction: a comprehensive meta-analysis of randomized trials. *Eur Heart J* 2008;29: 2989–3001.
 55. Steg P, James SK, Atar D, Badano LP, Blomstrom Lundqvist C, Borger MA, et al. ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2012;33:2569–619.
 56. Stone GW, Maehara A, Witzenbichler B, Godlewski J, Parise H, Dambrink JH, et al. Intracoronary abciximab and aspiration thrombectomy in patients with large anterior myocardial infarction: the INFUSE-AMI randomized trial. *JAMA* 2012;307:1817–26.
 57. Fröbert O, Lagerqvist B, Olivecrona GK, Omerovic E, Gudnason T, Maeng M, et al. Thrombus Aspiration during ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *New Engl J Med* 2013;369(17):1587–97.
 58. Lagerqvist B, Fröbert O, Olivecrona GK, Gudnason T, Maeng M, Alström P, et al. Outcomes 1 year after thrombus aspiration for myocardial infarction. *N Engl J Med* 2014;371:1111–20.
 59. Jolly SS, Cairns JA, Yusuf S, Meeks B, Pogue J, Rokoss M, et al. Randomized trial of primary PCI with or without routine manual thrombectomy. *N Engl J Med* 2015;372:1389–98.
 60. Elgendy IY, Huo T, Bhatt DL, Bavry AB. Is aspiration thrombectomy beneficial in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention? Metaanalysis of randomized trials. *Circ Cardiovasc Interv* 2015;8:e002258.
 61. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *Catheter Cardiovasc Interv* 2012;79(3):453–95.

62. Jolly SS, James S, Džavík V, Cairns JA, Mahmoud KD, Zijlstra F, et al. Thrombus Aspiration in ST-Segment–Elevation Myocardial Infarction Clinical Perspective. *Circulation* 2017;135(2):143–52.
63. Huynh T, Perron S, O’Loughlin J, Joseph L, Labrecque M, Tu JV, et al. Comparison of Primary Percutaneous Coronary Intervention and Fibrinolytic Therapy in ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Circulation* 2009;119(24):3101–9.
64. Verouden N, Kramer M, Li X, Meuwissen M, Koch K, Henriques J, et al. Histopathology of aspirated thrombus and its association with ST-segment recovery in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention with routine thrombus aspiration. *Catheter Cardiovasc Interv* 2011;77(1):35–42.
65. Ikari Y, Sakurada M, Kozuma K, Kawano S, Katsuki T, Kimura K, et al. Upfront thrombus aspiration in primary coronary intervention for patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction: report of the VAMPIRE (VAcuum asPIration thrombus REmoval) trial. *JACC Cardiovasc Interv* 2008;1(4):424–31.
66. Arakawa K, Yasuda S, Hao H, Kataoka Y, Morii I, Kasahara Y, et al. Significant association between neutrophil aggregation in aspirated thrombus and myocardial damage in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Circ J* 2009;73(1):139–44.
67. Ali A, Cox D, Dib N, et al. Rheolytic thrombectomy with percutaneous coronary intervention for infarct size reduction in acute myocardial infarction: 30-day results from a multicenter randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:244 – 52.
68. Quadros AS, Cambruzzi E, Sebben J, David RB, Abelin A, Welter D, et al. Red versus white thrombi in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: clinical and angiographic outcomes. *Am Heart J* 2012;164(4):553–60.
69. Fokkema ML, Vlaar PJ, Svilaas T, Vogelzang M, Amo D, Diercks GFH, et al. Incidence and clinical consequences of distal embolization on the coronary angiogram after percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J* 2009;30(8):908–15.

70. Yunoki K, Naruko T, Sugioka K, Inaba M, Iwasa Y, Komatsu R, et al. Erythrocyte-rich thrombus aspirated from patients with ST-elevation myocardial infarction: association with oxidative stress and its impact on myocardial reperfusion. *Eur Heart J* 2012;33:1480-90.
71. Collet JP, Shuman H, Ledger RE, Lee S, Weisel JW. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9133-7.
72. Brown AE, Litvinov RI, Discher DE, Purohit PK, Weisel JW. Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. *Science* 2009;325:741-4.
73. Kramer MC, van der Wal AC, Koch KT, Ploegmakers JP, van der Schaaf RJ, Henriques JP, et al. Presence of older thrombus is an independent predictor of long-term mortality in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2008;118:1810-6.
74. Sato Y, Hatakeyama K, Yamashita A, Marutsuka K, Sumiyoshi A, Asada Y. Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans. *Heart* 2005;91(4):526-30.
75. Hoshiba Y, Hatakeyama K, Tanabe T, Asada Y, Goto S. Co-localization of von Willebrand factor with platelet thrombi, tissue factor and platelets with fibrin, and consistent presence of inflammatory cells in coronary thrombi obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2006;4(1):114-20.
76. Uchida Y, Uchida Y, Sakurai T, Kanai M, Shirai S, Morita T. Characterization of coronary fibrin thrombus in patients with acute coronary syndrome using dye-staining angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(6):1452-60.
77. Rittersma S, van der Wal AC, Koch KT, Piek JJ, Henriques J, Mulder KJ, et al. Plaque instability frequently occurs days or weeks before occlusive coronary thrombosis. *Circulation* 2005;111:1160-5.
78. Kramer MC, Wal AC van der, Koch KT, Rittersma SZ, Li X, Ploegmakers HP, et al. Histopathological Features of Aspirated Thrombi after Primary Percutaneous Coronary Intervention in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction. *PLOS ONE* 2009;4(6):e5817.

79. Silvain J, Collet J-P, Nagaswami C, Beygui F, Edmondson KE, Bellemain-Appaix A, et al. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(12):1359–67.
80. Carol A, Bernet M, Curós A, Rodríguez-Leor O, Serra J, Fernández-Nofrerías E, et al. Thrombus age, clinical presentation, and reperfusion grade in myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2014;23(3):126–30.
81. Wakefield TW, Linn MJ, Henke PK, Kadell AM, Wilke CA, Wroblewski SK, et al. Neovascularization during venous thrombosis organization: a preliminary study. *J Vasc Surg* 1999;30(5):885–92.
82. Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003;58:390-8.
83. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964–7.
84. Li X, Kramer MC, van der Loos CM, Ploegmakers HJP, DE Boer OJ, Koch KT, et al. Early onset of endothelial cell proliferation in coronary thrombi of patients with an acute myocardial infarction: implications for plaque healing. *J Thromb Haemost* 2012;10(3):466–73.
85. Steiner I, Spaček J, Matějková A, Vojáček J, Bis J, Dušek J. Histopathology of aspirated thrombi during primary percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2014;23(5):267–71.
86. Zalewski J, Bogaert J, Sadowski M, Woznicka O, Doulaptsis K, Ntounpanaki M, et al. Plasma fibrin clot phenotype independently affects intracoronary thrombus ultrastructure in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2015;113(6):1258–69.
87. Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol* 2011;193(4):607–18.
88. Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 2001;15(1):1–13.
89. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 22):3683–92.

90. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133(1):157–65.
91. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75(12):2417–26.
92. Tumber T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 2004;303(5656):359–63.
93. Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol* 1991;3(2):175–84.
94. Fiedler U, Christian S, Koidl S, Kerjaschki D, Emmett MS, Bates DO, et al. The Sialomucin CD34 Is a Marker of Lymphatic Endothelial Cells in Human Tumors. *Am J Pathol* 2006;168(3):1045–53.
95. Drew E, Huettner CS, Tenen DG, McNagny KM. CD34 expression by mast cells: of mice and men. *Blood* 2005;106(5):1885–7.
96. Chauhan H, Abraham A, Phillips JRA, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. *J Clin Pathol* 2003;56(4):271–6.
97. Ladeby R, Wirenfeltdt M, Dalmau I, Gregersen R, García-Ovejero D, Babcock A, et al. Proliferating resident microglia express the stem cell antigen CD34 in response to acute neural injury. *Glia* 2005;50(2):121–31.
98. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(23):12551–6.
99. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S. PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2007;27(12):2514–23.
100. Marelli-Berg F, Clement M, Mauro C, Caliguri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci* 2013;126:2343-52.

101. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 1997;151(3):671–7.
102. Metzelaar MJ, Korteweg J, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. Biochemical characterization of PECAM-1 (CD31 antigen) on human platelets. *Thromb Haemost* 1991;66(6):700–7.
103. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* 1995;17(3–4):229–44.
104. Berman ME, Xie Y, Muller WA. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol* 1996;156(4):1515–24.
105. Voermans C, Rood PM, Hordijk PL, Gerritsen WR, van der Schoot CE. Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2000;18(6):435–43.
106. Calapso P, Vitarelli E, Crisafulli C, Tuccari G. Immunocytochemical detection of megakaryocytes by endothelial markers: a comparative study. *Pathologica* 1992;84(1090):215–23.
107. Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer* 2007;96(1):1–5.
108. Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumors. *Br J Cancer* 1999;80:569-78.
109. Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, et al. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res* 2001;61(22):8079–84.
110. Marsee DK, Pinkus GS, Hornick JL. Podoplanin (D2-40) is a highly effective marker of follicular dendritic cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17(2):102–7.

111. Kuroda N, Tanida N, Oonishi K, Inoue K, Ohara M, Mizuno K, et al. Significance of D2-40 expression in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumor. *Med Mol Morphol* 2008;41(2):109–12.
112. Rabban JT, Chen Y-Y. D2-40 expression by breast myoepithelium: potential pitfalls in distinguishing intralymphatic carcinoma from in situ carcinoma. *Hum Pathol* 2008;39(2):175–83.
113. Kuroda N, Katto K, Tamura M, Shiotsu T, Nakamura S, Ohtsuki Y, et al. Immunohistochemical application of D2-40 as basal cell marker in evaluating atypical small acinar proliferation of initial routine prostatic needle biopsy materials. *Med Mol Morphol* 2010;43(3):165–9.
114. Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathology* 2005;46(4):396-402.
115. Bellucci KSW et al: D2-40 immunoreactivity in spindle cell tumors, a specific endothelial marker? *Modern Pathology* 17 (supplement 1):10A (abstract # 27), January 2004.
116. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998;282(5390):946–9.
117. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(8):3566–70.
118. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002;1:219-27.
119. Kopp H-G, Hooper AT, Avezilla ST, Rafii S. Functional heterogeneity of the bone marrow vascular niche. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1176:47–54.
120. Ding B-S, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 2010;468(7321):310–5.
121. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor,

- VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 2000;14(13):2087–96.
122. Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 1999;86(11):2406–12.
123. Banerji S, Ni J, Wang S-X, Clasper S, Su J, Tammi R, et al. LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan. *J Cell Biol* 1999;144(4):789–801.
124. Wu M, Du Y, Gao F. Potential role of LYVE-1 in lymphatic metastasis of cancer. *Tumor* 2013;33(11):1019–22.
125. Wróbel T, Dziegiel P, Mazur G, Zabel M, Kuliczowski K, Szuba A. LYVE-1 expression on high endothelial venules (HEVs) of lymph nodes. *Lymphology* 2005;38(3):107–10.
126. Schledzewski K, Falkowski M, Moldenhauer G, Metharom P, Kzhyshkowska J, Ganss R, et al. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J Pathol* 2006;209(1):67–77.
127. Xu H, Edwards JR, Espinosa O, Banerji S, Jackson DG, Athanasou NA. Expression of a lymphatic endothelial cell marker in benign and malignant vascular tumors. *Hum Pathol* 2004;35(7):857–61.
128. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9: 669–76.
129. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res* 2009;153(2):347–58.
130. Alkim C, Alkim H, Koksall AR, Boga S, Sen I. Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease. *Int J Inflam* 2015;2015:e970890.
131. Chang J-H, Garg NK, Lunde E, Han K-Y, Jain S, Azar DT. Corneal Neovascularization: An Anti-VEGF Therapy Review. *Surv Ophthalmol* 2012;57(5):415–29.

132. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23(5):1011-27.
133. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:259-70.
134. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380(6573):435-9.
135. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
136. Konopka A, Janas J, Piotrowski W, Stępińska J. Concentration of vascular endothelial growth factor in patients with acute coronary syndrome. *Cytokine* 2013;61(2):664-9.
137. Huang K, Andersson C, Roomans GM, Ito N, Claesson-Welsh L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(4):315-24.
138. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005;65:550-63.
139. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313-6.
140. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *Neuroscience* 1999;19:5731-40.
141. Bhardwaj S, Roy H, Heikura T, Yla-Herttuala S. VEGF-A, VEGF-D and VEGF-D (DeltaNDeltaC) induced intimal hyperplasia in carotid arteries. *Eur J Clin Invest* 2005;35:669-76.
142. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 2001;188(3):359-68.

143. Taichman NS, Young S, Cruchley AT, Tayler P, Paleolog E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* 1997;62:397-400.
144. Itaya H, Imaizumi T, Yoshida H, Koyama M, Suzuki S, Satoh K. Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Thromb Haemost* 2001;85(1):171-6.
145. Spector JA, Mehrara BJ, Greenwald JA, Saadeh PB, Steinbrech DS, Bouletreau PJ, et al. Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2001;280(1):C72-80.
146. Viac J, Palacio S, Schmitt D, Claudy A. Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1997;289(3):158-63.
147. Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(4):409-20.
148. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-70.
149. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal Transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Col Spring Harb Perspect Med* 2012;2(7):a006502.
150. Casella I, Feccia T, Chelucci C, Samoggia P, Castelli G, Guerriero R, et al. Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood* 2003;101(4):1316-23.
151. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Müller R, Masella B, et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999;285(5433):1553-8.
152. Selheim F, Holmsen H, Vassbotn FS. Identification of functional VEGF receptors on human platelets. *FEBS Lett* 2002;512(1-3):107-10.
153. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* 2003;10:83-97.

154. Elsman P, van 't Hof AWJ, de Boer MJ, Hoorntje JCA, Suryapranata H, Dambrink JHE, et al. Role of collateral circulation in the acute phase of ST-segment-elevation myocardial infarction treated with primary coronary intervention. *Eur Heart J* 2004;25(10):854–8.
155. Berry C, Balachandran KP, L'Allier PL, Lespérance J, Bonan R, Oldroyd KG. Importance of collateral circulation in coronary heart disease. *Eur Heart J* 2007;28:278-91.
156. Xie Z, Gao M, Batra S, Koyama T. The capillarity of left ventricular tissue of rats subjected to coronary artery occlusion. *Cardiovasc Res* 1997;33:671–6.
157. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8.
158. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington ChH, Esakof DD, Maysky M, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998;98:2800–4.
159. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 1996;270:H1803–11.
160. Hagikura K, Fukuda N, Yokoyama S, Yuxin L, Kusumi Y, Matsumoto T, et al. Low invasive angiogenic therapy for myocardial infarction by retrograde transplantation of mononuclear cells expressing the VEGF gene. *Int J Cardiol* 2010;142: 56- 64.
161. Ye L, Zhang W, Su LP, Haider HK, Poh KK, Galupo MJ, et al. Nanoparticle based delivery of hypoxia-regulated VEGF transgene system combined with myoblast engraftment for myocardial repair. *Biomaterials* 2011; 32: 2424 –31.
162. Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ, Brenchley PE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)* 1998;94:395– 404.

163. Verheul HMW, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, et al. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1997;3:2187–90.
164. Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard M-A, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997;90:4153–61.
165. Kusumanto YH, Dam WA, Hospers GAP, Meijer C, Mulder NH, et al. Platelets and granulocytes, in particular neutrophils form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 2003;6:283–7.
166. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel J-B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 2012;95(2):194–204.
167. Möhle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(2):663–8.
168. Berse B, Brown LF, Water LVD, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992;3:211–20.
169. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;107:524 – 30.
170. Lee KW, Lip GY, Blann AD. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. *Circulation* 2004;110:2355 – 60.
171. Seko Y, Imali Y, Suzuki S, Kamijukkoku S, Hayasaki K, Sakomura Y, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction undergoing reperfusion therapy. *Clin Sci* 1997;92:453–4.

172. Kawamoto A, Kawata H, Akai Y, Katsuyama Y, Takase E, Sasaki Y, et al. Serum levels of VEGF and basic FGF in the subacute phase of myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1998;67:47–54.
173. Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Tanaka H, Bando K, Fukuda N. Serial changes in serum VEGF and HGF in patients with acute myocardial infarction. *Cardiology* 2000;93:168 – 74.
174. Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Sakabe K, Onose Y, Fukuda N. Serum hepatocyte growth factor predicts ventricular remodeling following myocardial infarction. *Circ J* 2002;66:1003-7.
175. Ogawa H, Suefuji H, Soejima H, Nishiyama K, Misumi K, Takazoe K, et al. Increased blood vascular endothelial growth factor levels in patients with acute myocardial infarction. *Cardiology* 2000;93:93–9.
176. Kranz A, Rau C, Kochs M, Waltenberger J. Elevation of vascular endothelial growth factor-A serum levels following acute myocardial infarction: Evidence for its origin and functional significance. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:65-72.
177. Hojo Y, Ikeda U, Zhu Y, Okada M, Ueno S, Arakawa H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *JACC* 2000;35:968–73.
178. Pyda M, Korybalska K, Ksiazek K, Grajek S, Lanocha M, Lesiak M, et al. Effect of heparin on blood vascular endothelial growth factor levels in patients with ST-elevation acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2006;98(7):902–5.
179. Korybalska K, Pyda M, Kawka E, Grajek S, Bręborowicz A, Witowski J. Interpretation of elevated serum VEGF concentrations in patients with myocardial infarction. *Cytokine* 2011;54(1):74–8.
180. Tamura K, Nakajima H, Rakue H, Sasame A, Naito Y, Nagai Y, et al. Elevated circulating levels of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J* 1999;63:357-61.

181. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:2776-9.
182. Kim BH, Ko YG, Her A-Y, Kim J-S, Hwang K-C, Shin D-H, et al. Serial Plasma Levels of Angiogenic Factors in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Korean Circ J* 2012;42(7):464-70.
183. Nakajima K, Tabata S, Yamashita T, Kusuhara M, Arakawa K, Ohmori R, et al. Plasma vascular endothelial growth factor level is elevated in patients with multivessel coronary artery disease. *Clin Cardiol* 2004;27(5):281-6.
184. Kucukardali Y, Aydogdu S, Ozmen N, Yonem A, Solmazgul E, Ozyurt M, et al. The relationship between severity of coronary artery disease and plasma level of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc Revasc Med* 2008;9:66-70.
185. Fleisch M, Billinger M, Eberli FR, Garachemani AR, Meier B, Seiler Ch. Physiologically assessed coronary collateral flow and intracoronary growth factor concentrations in patients with 1- to 3-vessel coronary artery disease. *Circulation* 1990;100:1945-50.
186. Alber HF, Frick M, Dulak J, Dorler J, Zwick R-H, Dichtl W, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) plasma concentrations in coronary artery disease. *Heart* 2005;91:365-6.
187. Hausenloy DJ, Yellon DM. Cardioprotective growth factors. *Cardiovasc Res* 2009;83(2):179-94.
188. Matsudaira K, Maeda K, Okumura N, Yoshikawa D, Morita Y, Mitsuhashi H, et al. Impact of low levels of vascular endothelial growth factor after myocardial infarction on 6-month clinical outcome. Results from the Nagoya Acute Myocardial Infarction Study. *Circ J* 2012;76(6):1509-16.
189. Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001;47:617-23.
190. Yunoki K, Naruko T, Inoue T, Sugioka K, Inaba M, Iwasa Y, et al. Relationship of Thrombus Characteristics to the Incidence of Angiographically Visible Distal Embolization in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial

- Infarction Treated With Thrombus Aspiration. *JACC: Cardiovascular Interventions* 2013;6(4):377–85.
191. Murakami T, Mizuno S, Takahashi Y, Ohsato K, Moriuchi I, Arai Y, et al. Intracoronary aspiration thrombectomy for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1998;82:839–844.
 192. The TIMI Study Group. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial: phase I findings. *N Engl J Med* 1985;312:932-6.
 193. van 't Hof AW, Liem A, de Boer MJ, Zijlstra F. Clinical value of 12-lead electrocardiogram after successful reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Zwolle Myocardial Infarction Study Group. *Lancet* 1997;350:615–619.
 194. Mabin TA, Holmes DR, Smith HC, Vlietstra RE, Bove AA, Reeder GS, et al. Intracoronary thrombus: role in coronary occlusion complicating percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1985;5(2 Pt 1):198–202.
 195. Henriques JPS, Zijlstra F, Ottervanger JP, de Boer M-J, van 't Hof AWJ, Hoorntje JCA, et al. Incidence and clinical significance of distal embolization during primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2002;23(14):1112–7.
 196. Sianos G, Morel M-A, Kappetein AP, Morice M-C, Colombo A, Dawkins K, et al. The SYNTAX Score: an angiographic tool grading the complexity of coronary artery disease. *EuroIntervention* 2005;1(2):219–27.
 197. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015;16(3):233–71.
 198. Srikanth S, Ambrose JA. Pathophysiology of coronary thrombus formation and adverse consequences of thrombi during PCI. *Curr Cardiol Rev* 2012;8(3):168-76.

199. Mizuno K, Satomura K, Miyamoto A, Arakawa K, Shibuya T, Arai T et al. Angioscopic evaluation of coronary-artery thrombi in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992;326: 287-91.
200. Cambruzzi E, Sebben JC, David RB, de Mattos EI, de Melo Bernardi GL, Ioppi J, et al. Histopathological Evaluation of Coronary Thrombi in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva (English Edition)* 2012;20(3):267–73.
201. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003;349:2316–25.
202. Ojio S, Takatsu H, Tanaka T, Ueno K, Yokoya K, Matsubara T, et al. Considerable time from the onset of plaque rupture and/or thrombi until the onset of acute myocardial infarction in humans: coronary angiographic findings within 1 week before the onset of infarction. *Circulation*. 2000;102:2063–9.
203. Nagata Y, Usuda K, Uchiyama A, Uchikoshi M, Sekiguchi Y, Kato H, et al. Characteristics of the pathological images of coronary artery thrombi according to the infarct-related coronary artery in acute myocardial infarction. *Circ J* 2004;68:308 –14.
204. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227–34.
205. Waltham M, Burnand KG, Collins M, Smith A. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are found in resolving venous thrombi. *J Vasc Surg* 2000;32:988–96.
206. Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* 2008;111:1227–33.
207. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang W, Hultenby K, Zhu L, et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood* 2011;117:3907–11.
208. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, Lin F-J, Tsai S, Tsai M-J, et al. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2007;21(19):2422–32.

209. Oliver G, Detmar M. The rediscovery of lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2002;16:773-83.
210. Kang J, Yoo J, Lee S, Tang W, Aguilar B, Ramu S, et al. An exquisite cross-control mechanism among endothelial cell fate regulators directs the plasticity and heterogeneity of lymphatic endothelial cells. *Blood* 2010;116(1):140–50.
211. Keuschnigg J, Karinen S, Auvinen K, Irjala H, Mpindi J-P, Kallioniemi O, et al. Plasticity of blood- and lymphatic endothelial cells and marker identification. *PLoS ONE* 2013;8(9):e74293.
212. Cooley LS, Handsley MM, Zhou Z, Lafleur MA, Pennington CJ, Thompson EW, et al. Reversible transdifferentiation of blood vascular endothelial cells to a lymphatic-like phenotype in vitro. *J Cell Sci* 2010;123(Pt 21):3808–16.
213. Aguilar B, Choi I, Choi D, Chung HK, Lee S, Yoo J, et al. Lymphatic reprogramming by Kaposi sarcoma herpes virus promotes the oncogenic activity of the virus-encoded G-protein-coupled receptor. *Cancer Res* 2012;72(22):5833–42.
214. Hong Y-K, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, et al. Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet* 2004;36(7):683–5.
215. Wang H-W, Trotter MWB, Lagos D, Bourboulia D, Henderson S, Mäkinen T, et al. Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet* 2004;36(7):687–93.
216. Boscolo E, Coma S, Luks VL, Greene AK, Klagsbrun M, Warman ML, et al. AKT hyper-phosphorylation associated with PI3K mutations in lymphatic endothelial cells from a patient with lymphatic malformation. *Angiogenesis* 2015;18(2):151–62.
217. Gordon EJ, Gale NW, Harvey NL. Expression of the hyaluronan receptor LYVE-1 is not restricted to the lymphatic vasculature; LYVE-1 is also expressed on embryonic blood vessels. *Dev Dyn* 2008;237(7):1901–9.

218. Amatschek S, Kriehuber E, Bauer W, Reininger B, Meraner P, Wolpl A, et al. Blood and lymphatic endothelial cell-specific differentiation programs are stringently controlled by the tissue environment. *Blood* 2007;109(11):4777–85.
219. Ferreira LS, Gerecht S, Shieh HF, Watson N, Rupnick MA, Dallabrida SM, et al. Vascular progenitor cells isolated from human embryonic stem cells give rise to endothelial and smooth muscle like cells and form vascular networks in vivo. *Circ Res* 2007;101(3):286–94.
220. Ndrepepa G, Tiroch K, Fusaro M, Keta D, Seyfarth M, Byrne RA, et al. 5-year prognostic value of no-reflow phenomenon after percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(21):2383–9.
221. Brodie BR, Stuckey TD, Hansen C, VerSteeg DS, Muncy DB, Moore S, et al. Relation between electrocardiographic ST-segment resolution and early and late outcomes after primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2005;95:343-8.
222. Buller CE, Fu Y, Mahaffey KW, Todaro TG, Adams P, Westerhout CM, et al. ST-segment recovery and outcome after primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction: Insights from the assessment of pexelizumab in acute myocardial infarction (APEXAMI) trial. *Circulation* 2008;118:1335-46.
223. Claeys MJ, Bosmans J, Veenstra L, Jorens P, De R, Vrints CJ. Determinants and prognostic implications of persistent ST-segment elevation after primary angioplasty for acute myocardial infarction: Importance of microvascular reperfusion injury on clinical outcome. *Circulation* 1999;99:1972–7.
224. Matetzky S, Novikov M, Gruberg L, Freimark D, Feinberg M, Elian D, Novikov I, Di SE, Agranat O, Har-Zahav Y, Rabinowitz B, Kaplinsky E, Hod H. The significance of persistent ST elevation versus early resolution of ST segment elevation after primary PTCA. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1932–8.
225. Verouden NJ, Haeck JDE, Kuijt WJ, Koch KT, Henriques JP, Baan J Jr, et al. Early ST-segment recovery after primary percutaneous coronary

- intervention accurately predicts long-term prognosis after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2010;159:1005-11.
226. Lefevre T, Garcia E, Reimers B, Lang I, di Mario C, Colombo A, et al. X-sizer for thrombectomy in acute myocardial infarction improves ST-segment resolution: Results of the X-sizer in AMI for negligible embolization and optimal ST resolution (X AMINE ST) trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:246–52.
227. Schroder R, Dissmann R, Bruggemann T, Wegscheider K, Linderer T, Tebbe U, et al. Extent of early ST segment elevation resolution: a simple but strong predictor of outcome in 191 patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1994;24(2):384-91.
228. Lerman A, Holmes DR, Herrmann J, Gersh BJ. Microcirculatory dysfunction in ST-elevation myocardial infarction: Cause, consequence, or both? *Eur Heart J* 2007;28:788–97.
229. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 2000;102:1931-6.
230. Li J, Kim K, Barazia A, Tseng A, Cho J. Platelet–neutrophil interactions under thromboinflammatory conditions. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(14):2627–43.
231. Tóth-Zsámboki E, Horváth E, Vargova K, Pankotai E, Murthy K, Zsengellér Z, et al. Activation of poly (ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. *Mol Med* 2006;12: 221 -8.
232. Van 't Hof AW, Liem A, Suryapranata H, Hoorntje JC, de Boer MJ, Zijlstra F. Angiographic assessment of myocardial reperfusion in patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction: myocardial blush grade. *Circulation* 1998;97:2302-6.
233. De Luca G, van ' Hoff A, Ottervanger J, Hoorntje J, Gosselink M, Dambrink JH, et al. Ageing, impaired myocardial perfusion, and mortality in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary angioplasty. *Eur Heart J* 2005;26:622-66.
234. Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M, Nakamura S, Ogawa H, Libby P. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and

- tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1309–14.
235. Marfella R, Esposito K, Giunta R, Coppola G, De Angelis L, Farzati B, et al. Circulating adhesion molecules in humans: role of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Circulation*. 2000;101(19):2247–51.
236. Napodano M, Ramondo A, Tarantini G, Peluso D, Compagno S, Fraccaro C, et al. Predictors and time-related impact of distal embolization during primary angioplasty. *Eur Heart J* 2009;30(3):305–13.
237. Topol EJ, Yadav JS. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. *Circulation* 2000;101:570-80.
238. Kotani J, Nanto S, Mintz GS, Kitakaze M, Ohara T, Morozumi T, et al. Plaque gruel of atheromatous coronary lesion may contribute to the no-reflow phenomenon in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 2002;106:1672-7.
239. Kawaguchi R, Oshima S, Jingu M, et al. Usefulness of virtual histology intravascular ultrasound to predict distal embolization for ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1641– 6.
240. Limbruno U, De Carlo M, Pistoiesi S, Micheli A, Petronio AS, Camacci T, et al. Distal embolization during primary angioplasty: histopathologic features and predictability. *Am Heart J* 2005;150:102–8.
241. Tanaka A, Kawarabayashi T, Nishibori Y, Sano T, Nishida Y, Fukuda D, et al. Noreflow phenomenon and lesion morphology in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2002;105:2148–52.
242. Arisato T, Hashiguci T, Sarker K, Arimura K, Asano M, Matsuo K, et al. Highly accumulated platelet vascular endothelial growth factor in coagulant thrombotic region. *J Thromb Haemost* 2003;1:2589-93.
243. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation* 1996;94:1074–82.

244. Tamura K, Nakajima H, Rakue H, Sasame A, Naito Y, Nagai Y, et al. Elevated Circulating Levels of Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Japanese Circulation Journal* 1999;63(5):357–61.
245. Lee S, Wolf P, Escudero R, Deutsch R, Jamieson S, Thistlethwaite P. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000;342:626-33.
246. Lee KW, Lip GYH, Blann AD. Plasma Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiopoietin Receptor Tie-2, and Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2004;110(16):2355–60.
247. Devaux Y, Vausort M, Azuaje F, Vaillant M, Lair ML, Gayat E, et al. Low Levels of Vascular Endothelial Growth Factor B Predict Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *Journal of Cardiac Failure* 2012;18(4):330-7.
248. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, et al. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001;7:425–9.
249. Zhao T, Zhao W, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A: Role on Cardiac Angiogenesis following Myocardial Infarction. *Microvasc Res* 2010;80(2):188–94.
250. Maharaj ASR, D'Amore PA. Roles for VEGF in the adult. *Microvasc Res* 2007;74(2–3):100–13.

SKRAĆENICE

ACC – Američko udruženje kardiologa

AHA – Američko udruženje za srce

AP – angina pectoris

bFGF – engl. *basic fibroblast growth factor*, bazni fibroblastni faktor rasta

BMS – metalni stent

CK – kreatin kinaza

CK-MB – engl. *myocardial band*, miokardna traka kreatin kinaza

Cx – cirkumfleksna koronarna arterija

DES – stent sa oslobađanjem leka

EKG – elektrokardiogram

EHO - ehokardiografija

EPĆ – endotelne progenitorske ćelije

EĆ – endotelna ćelija

FFR – engl. *fractional flow reserve*, frakciona rezerva protoka

HE – hematoksilin-eozin bojenje

HEV- engl. *high endothelial venules*, venule sa visokim endotelom

IQR – engl. *interquartile range*, interkvartilni opseg

KVB – kardiovaskularne bolesti

LAD – leva prednja descendentna arterija

LBBB – blok leve grane Hisovog snopa

MACCE – glavni neželjeni srčani i cerebralni događaji

MBG – engl. *myocardial blush grade*, stepen miokardnog ispiranja

PCI – perkutana koronarna intervencija

PECAM-1 – engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, adhezioni molekul trombocita za endotelne ćelije-1

RCA – desna koronarna arterija

ReIM – reinfarkt miokarda

STEMI – infarkt miokarda sa elevacijom ST-segmenta

STR – rezolucija ST-segmenta

TEM – transmisiona elektronska mikroskopija

TIMI – engl. *timing in myocardial infarction*

TNF α - engl. *tumor necrosis factor-alpha*, faktor tumorske nekroze-alfa

TnI – troponin I

TVR – revaskularizacija infarktne arterije

SEM – skening elektronska mikroskopija

SI – srčana insuficijencija

VEGF – engl. *vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni faktor rasta

VEGFR – engl. *vascular endothelial growth factor receptor*, receptor za vaskularni endotelni faktor rasta

WMSI – indeks skora pokretljivost leve komore

α SMA – engl. *alpha smooth muscle actin*, alfa glatkomišićni aktin

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Jelena Rakočević je rođena 02.11.1983. godine u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2002/03. godine, a diplomirala u septembru 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,66. Tokom studiranja dobila je pohvalnice kao najbolji student II, III i V godine Medicinskog fakulteta, bila je stipendista grada Beograda kao talentovani student tokom tri godine, stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka dve godine, kao i stipendista Fonda Srbije za Vaše srce tokom dve godine.

Tokom studija učestvovala je na kongresima studenata medicine u zemlji i bila član Studentskog parlamenta tokom VI godine studija. Dr Jelena Rakočević je bila redovan student-demonstrator na Katedri za histologiju i embriologiju, kao i redovan student-demonstrator elektronskog učenja „Retikulum“ katedre za histologiju i embriologiju.

Od marta 2011. do septembra 2012. godine bila je zaposlena u kabinetu za ergometriju Klinike za kardiologiju Kliničkog centra Srbije. Od septembra 2012. godine zaposlena je na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi (2012-2014. godine) i asistent (od 2014. godine).

Završni specijalistički akademski rad pod nazivom “Značaj citohistoloških istraživanja biopsije skeletnog mišića u dijagnozi mitohondrijalnih encefalopatija“ odbranila je u septembru 2013. godine, mentor doc. dr Miloš Bajčetić.

Učesnik je dva aktuelna projekta Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije: br. 41022 - Akutni koronarni sindrom (istraživanje vulnerabilnosti plaka, krvi i miokarda) optimalno lečenje i određivanje prognostičkih faktora, rukovodilac projekta: prof. dr Miodrag Ostojić, i br. 41027 - Ćelijske i molekulske osnove malignih i kardiovaskularnih oboljenja - kliničke implikacije, rukovodilac projekta : Snežana Pejić.

Bila je nacionalni koordinator „Stent for Life“ inicijative za Srbiju u periodu od 2009-2011. godine, učestvovala je kao koordinator tri kliničke studije (COMFORTABLE-AMI, C-CURE i PROTEX).

Dr Jelena Rakočević je autor ili koautor u 8 radova koji su publikovani u časopisima sa CC/SCI liste. Rezultati doktorske disertacije uspešno su publikovani u tri rada (dva iz kategorije M21 i jedan iz kategorije M22), uz usmene prezentacije na Evropskom kongresu udruženja patologa u Beogradu 2015. godine i međunarodnom skupu 2nd European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences "Heart diseases: How new research may lead to new treatments" u Beogradu 2015. godine, i poster prezentaciju na Kongresu evropskog udruženja za aterosklerozu u Glazgovu 2015. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Ракочевић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај нивоа циркулишућег серумског васкуларног ендотелног фактора раста и степена ангиогенезе аспирираног тромба на ангиографски и клинички исход пацијената са акутним инфарктом миокарда са елевацијом СТ сегмента лечених примрном перкутаном коронарном интервенцијом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 12.06.2017.

Ракочевић Јелена

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Ракочевић

Број уписа _____

Студијски програм Кардиологија

Наслов рада Утицај нивоа циркулишућег срчаног васкуларног ендотелног фактора раста и степена ангиогенезе асимптоматског тромба на ангиографски и клинички исход пацијената са акутним инфарктом миокарда са елевацијом СТ сегмента

Ментор Лечених примитом перкутаном коронарном интервенцијом

Доц. др Милица Лабудовић Боровић

Потписани Јелена Ракочевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 12.06.2017.

Јелена Ракочевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај нивоа циркулационог серумског васкуларног ендотелног фактора раста и степена ангиогенезе леукемијског тромба на ангиографски и клинички исход пацијената са акутним инфарктом миокарда са елевацијом СТ сегмента леукемијским перикардним коронарним интервенцијом
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 12.06.2017.

Радомир Јеван

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2) Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.