

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Tomasz Nowakowski

**STRUKTURA SKRZEPU FIBRYNOWEGO I JEGO PODATNOŚĆ NA  
LIZĘ W CHOROBY BUERGERA I MIAŻDŻYCY ZAROSTOWEJ  
TĘTNIC KOŃCZYN DOLNYCH**

*Praca doktorska*

Promotor: dr hab. Anetta Undas

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum UJ  
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Andrzej Szczeklik

Kraków, 2005

*Promotorowi pracy dr hab. Anecie Undas za inspirację, ogromne zaangażowanie i pomoc w realizacji projektu,*

*Panu prof. dr hab. Andrzejowi Szczeklikiowi za życzliwość i cenne rady,*

*Koleżankom i kolegom z II Katedry Chorób Wewnętrznych za pomoc przy realizacji pracy,*

*Rodzinie za zrozumienie i cierpliwość,*

*Serdecznie Dziękuję*

## **SPIS TREŚCI**

<b>1. WSTĘP</b> .....	6
<b>1.1 Miazdżyca zarostowa tętnic kończyn dolnych</b> .....	6
1.1.1 Epidemiologia, patogenezą i obraz kliniczny.....	6
1.1.2 Diagnostyka .....	9
1.1.3 Postępowanie .....	11
<b>1.2 Choroba Buergera</b> .....	14
1.2.1 Występowanie, obraz kliniczny i histologiczny.....	14
1.2.2 Diagnostyka .....	17
1.2.3 Postępowanie .....	18
<b>1.3 Powstawanie skrzepu</b> .....	21
1.3.1 Fibrynogen i jego konwersja do fibryny .....	21
1.3.2 Sieć fibrynowa .....	24
<b>2. ZAŁOŻENIA I CELE BADANIA</b> .....	28
<b>3. BADANI</b> .....	29
<b>4. METODY</b> .....	31
<b>5. ANALIZA STATYSTYCZNA</b> .....	34
<b>6. WYNIKI</b> .....	35
6.1 Porównanie grup chorych i grup kontrolnych .....	35
6.2 Porównanie grup chorych na PAOD i TAO .....	43
6.3 Chorzy na PAOD z arteriografią dotętniczą .....	50
6.4 Chorzy na PAOD dobrani pod względem płci i wieku do chorych na TAO .....	54
<b>7. Dyskusja</b> .....	55
<b>8. WNIOSKI</b> .....	62
<b>9. STRESZCZENIE</b> .....	63
<b>10. PIŚMIENNICTWO</b> .....	68

## SKRÓTY UŻYWANE W PRACY

<b>ABI</b>	- wskaźnik kostkowo-ramienny
<b>ALAT</b>	- aminotransferaza alaniowa
<b>BMI</b>	- wskaźnik masy ciała
<b>cFn</b>	- fibronektyna komórkowa
<b>CRP</b>	- białko C-reaktywne
<b>ELISA</b>	- test immunoenzymatyczny
<b>ET-1</b>	- endotelina 1
<b>Fg</b>	- fibrynogen
<b>FPA</b>	- fibrynopeptyd A
<b>FPB</b>	- fibrynopeptyd B
<b>FXIII</b>	- czynnik XIII krzepnięcia
<b>HDL-C</b>	- cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości
<b>HMG-CoA</b>	- 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzym A
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	- interferon gamma
<b>IL</b>	- interleukina
<b>Ks</b>	- współczynnik przepuszczalności
<b>LDL-C</b>	- cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości
<b>max DD</b>	- maksymalne stężenie D-dimerów w badaniu lizy skrzepu
<b>max <math>\Delta</math>DD</b>	- maksymalny przyrost stężenia D-dimerów w badaniu lizy skrzepu
<b>NO</b>	- tlenek azotu
<b>NMR</b>	- jądrowy rezonans magnetyczny
<b>PAI-1</b>	- inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1
<b>PAOD</b>	- miażdżyca zarostowa tętnic kończyn dolnych
<b>pFn</b>	- fibronektyna osoczowa
<b>PGE<sub>1</sub></b>	- prostaglandyna E <sub>1</sub>

<b>PGI<sub>2</sub></b>	- prostacyklina
<b>ROS</b>	- wskaźnik odbioru naczyniowego
<b>sICAM-1</b>	- rozpuszczalna cząsteczka przylegania międzykomórkowego typu 1
<b>TAFI</b>	- inhibitor fibrylizy aktywowany trombiną
<b>TAO</b>	- zakrzepowo-zarostowe zapalenie naczyń, choroba Buergera
<b>TC</b>	- cholesterol całkowity
<b>TF</b>	- czynnik tkankowy
<b>TG</b>	- triglicerydy
<b>TGFβ</b>	- transformujący czynnik wzrostu beta
<b>TNFα</b>	- czynnik martwicy nowotworów alfa
<b>tPA</b>	- tkankowy aktywator plazminogenu
<b>VCAM-1</b>	- naczyniowa cząsteczka przylegania typu 1
<b>VEGF</b>	- naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna
<b>VLDL-C</b>	- cholesterol frakcji lipoprotein o bardzo małej gęstości
<b>vWF</b>	- czynnik von Willebranda

## 1. WSTĘP

### 1.1 MIAŻDŻYCA ZAROSTOWA TĘTNIC KOŃCZYN DOLNYCH

#### 1.1.1 *Epidemiologia, patogenezą i obraz kliniczny*

Miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych (Peripheral Artery Occlusive Disease – PAOD) jest stosunkowo częstą chorobą naczyń, chociaż uważa się, że dokładna częstość jej występowania jest niedoszacowana, ponieważ rozpoznanie zwykle ustala się w objawowym okresie, czyli w zaawansowanym stadium choroby. Podstawę do rozpoznania PAOD stanowi jej główny objaw - chromanie przestankowe - czyli niedokrwienny ból mięśni kończyny, występujący podczas chodzenia, ustępujący w czasie odpoczynku. W badaniach epidemiologicznych do rozpoznania chromania używa się specjalnych kwestionariuszy np. *The Edinburgh Claudication Questionnaire*, który jest ulepszoną wersją stosowanego wcześniej i zaaprobowanego przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) kwestionariusza Rose (1). Na podstawie chromania częstość PAOD szacuje się od 0,6% w wieku 30-34 lat, ok. 6% w wieku 60 lat do prawie 8% po 70 roku życia (2-6). W oparciu o badania dodatkowe - pomiar ciśnień obwodowych i dystansu chromania na bieżni – odsetek chorych z niedokrwieniem kończyn dolnych wzrasta 3-5-krotnie i przekracza 20 % (3, 5, 7-9).

Częstość występowania PAOD rośnie z wiekiem. W młodszym wieku (<50 roku życia) częściej chorują mężczyźni; stosunek mężczyzn do kobiet wynosi od 1,5 – 2 : 1 do 5:1, podczas gdy po 70 roku życia przewaga mężczyzn zanika i częstość PAOD jest podobna u obu płci (6, 9-11).

Miażdżycę zarostową charakteryzuje się powolnym narastaniem zmian. U 60-70% pacjentów przebieg jest względnie stabilny. Jednak, u co trzeciego chorego dochodzi do pogorszenia ukrwienia i progresji choroby, a u 5% pacjentów konieczna jest amputacja (8, 12, 13).

Najistotniejszym czynnikiem ryzyka PAOD, stwierdzanym u ponad 80% chorych jest palenie tytoniu (7, 14, 15). Korelacja między paleniem tytoniu a PAOD jest silniejsza niż obserwowana w przypadku choroby niedokrwiennej serca (15).

Hipercholesterolemia także wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia PAOD (10, 16, 17). Wydaje się, że jej rola jest mniejsza niż w miażdżycy tętnic wieńcowych, a niektórzy badacze wręcz odmawiają jej znaczenia (18, 19). Jednak skuteczność leczenia modyfikującego stężenie lipidów, zwłaszcza za pomocą statyn, wskazuje, że chorzy na PAOD mogą odnieść korzyść z redukcji poziomu cholesterolu (20-22).

Cukrzyca jest niewątpliwie bardzo silnym czynnikiem ryzyka PAOD, co stwierdzono w wielu badaniach (3, 23, 24). Częstość niedokrwienia kończyn dolnych u mężczyzn z cukrzycą jest 2-3 razy, a wśród kobiet nawet pięciokrotnie większa niż u osób bez cukrzycy (19, 25). Ponadto u chorych na cukrzycę współwystępowanie z miażdżycą cech mikroangiopatii zwiększa ryzyko niepowodzenia

leczenia i powoduje kilkukrotny wzrost częstości amputacji kończyny (26-28).

Do niedokrwienia kończyn dolnych usposabia nadciśnienie tętnicze. Zwiększa ono ryzyko wystąpienia niedokrwienia kończyn dolnych u mężczyzn dwu- a u kobiet czterokrotnie (9, 14). Niekiedy nie stwierdza się tej zależności, bowiem wyższe wartości ciśnienia tętniczego mogą maskować objawy niedokrwienia w wyniku poprawy perfuzji obwodowej (29).

W chromaniu przestankowym, jak również w bezobjawowej miażdżycy kończyn dolnych, stwierdza się podwyższony poziom fibrynogenu. Wykazuje on zależność z zaawansowaniem choroby, szczególnie u mężczyzn palących tytoń (30). Ponadto, podwyższone stężenie fibrynogenu wyraźnie pogarsza rokowanie u pacjentów po epizodzie sercowo-naczyniowym (31). Wiele badań wskazuje, że hiperfibrynogenemia jest niezależnym czynnikiem ryzyka choroby niedokrwiennej serca, zawału i udaru mózgu (31-33).

Wykazano także, iż spośród nielipidowych biomarkerów miażdżycy, podwyższone stężenie białka C-reaktywnego jest najsilniejszym, niezależnym czynnikiem predykcyjnym rozwoju miażdżycy tętnic obwodowych (34). Jednakże nie zaobserwowano dotychczas wpływu zwiększonego stężenia tego markera na przebieg i progresję PAOD.

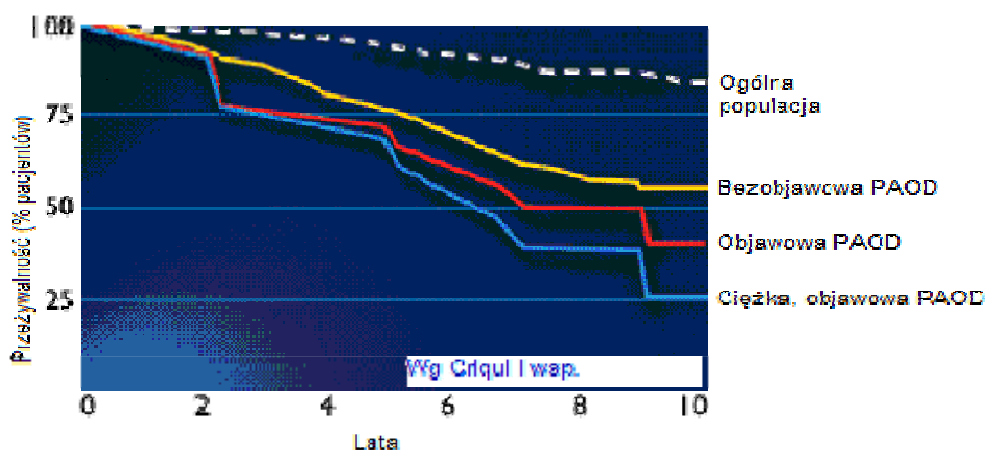
Należy także wspomnieć, że hyperhomocysteinemia stanowi niezależny czynnik ryzyka rozwoju i progresji miażdżycy, zwłaszcza w łożysku naczyń obwodowych, w tym tętnicach kończyn dolnych (35-37).

Dotąd nie stwierdzono, jakie czynniki determinują odmienny przebieg miażdżycy rozwijającej się w różnych naczyniach, ale dominuje pogląd, że u chorych na PAOD kluczową rolę odgrywa palenie tytoniu (7, 14, 15).

Zmiany miażdżycowe pojawiają się głównie w naczyniach mięśniowych i elastycznych dużego i średniego kalibru, powodując zwężenie światła, utrudnienie przepływu, zakrzepy i ostatecznie - niedokrwienie narządów. Według najpopularniejszej teorii R. Rossa (38), miażdżycą jest przewlekła choroba zapalna tętnic. Uszkodzenie śródbłonka przez czynniki infekcyjne, wolne rodniki, zmodyfikowane lipoproteiny i zwiększone siły ścinania (nadciśnienie) prowadzi do dysfunkcji śródbłonka, jego zwiększonej przepuszczalności, ekspresji adhezyn, uwalniania czynników chemotaktycznych i czynników wzrostu. To z kolei wpływa na wzmożone przyleganie monocytów i płytek oraz migrację tych komórek do przestrzeni podśródbłonkowej, w której pojawiły się komórki mięśni gładkich z błony środkowej (39). Pod śródbłonkiem tworzą się komórki piankowate i następuje dalszy rozwój blaszki miażdżycowej. Dysfunkcja śródbłonka manifestuje się zwiększoną ekspresją czynnika tkankowego (TF), cząsteczek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1, selektyna P), endoteliny-1 (ET-1), angiotensyny II, czynnika von Willebranda (vWF), inhibitora aktywatora plazminogenu, cytokin zapalnych jak interleukina 6 (IL-6) i innych (40). Skutkiem tego jest przyleganie leukocytów do ściany naczynia i zwiększona przepuszczalność śródbłonka. Nasilający się proces zapalny prowadzi do uwalniania coraz większych ilości cytokin (takich jak IL-1, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ),

czynników wzrostu i enzymów proteolitycznych, które ostatecznie wywołują ogniskową martwicę. Stymulowane czynnikiem TGF $\beta$  gromadzenie tkanki łącznej i elementów macierzy pozakomórkowej prowadzi do restrukturyzacji blaszki miażdżycowej tak, że ostatecznie powstaje charakterystyczna włóknista pokrywa, pod którą znajduje się rdzeń lipidowy (41). Dalsze nasilenie procesu zapalnego prowadzi do intensywnych nacieków komórkowych, aktywacji metaloproteinaz i pęknięcia pokrywy włóknistej, co pozwala na kontakt krwi z rdzeniem blaszki. Natychmiastowa aktywacja płytek i leukocytów wraz z aktywacją kaskady krzepnięcia *in loco* powoduje częściowe lub całkowite zamknięcie naczynia. Rezultatem tego jest ostre niedokrwienie narządów, objawiające się klinicznie zawałem serca, udarem mózgu lub krytycznym niedokrwieniem kończyny.

Zwiększona śmiertelność wśród pacjentów z miażdżycą obwodową jest niewątpliwie naturalną konsekwencją współwystępowania zmian w innych tętnicach. Najczęstszą przyczyną zgonów chorych na PAOD są zawały serca i udary mózgu. Współwystępowanie choroby niedokrwiennej serca szacuje się na 29-90% w zależności od użytych metod diagnostycznych (3, 29). Wysoki odsetek istotnych zmian w tętnicach wieńcowych stwierdza się w badaniu koronarograficznym (90%), w tym ponad 5 razy częściej niż u osób bez miażdżycy kończyn występuje choroba głównego pnia lewej tętnicy wieńcowej i choroba wielonaczyniowa (42, 43). Współistnienie zmian w tętnicach szyjnych szacuje się na 26-50% przypadków PAOD (44, 45). Zatem objawowe niedokrwienie kończyn dolnych manifestujące się chromaniem przestankowym jest zarówno wskaźnikiem nasilenia miażdżycy, jak również stanowi ważny czynnik rokowniczy, ponieważ wykazuje silną korelację z częstością zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych. Wśród pacjentów z chromaniem przestankowym śmiertelność ta jest trzykrotnie większa niż w populacji osób bez tego objawu (10, 46, 47).



Ryc. 1. Przeżywalność 10-letnia pacjentów z PAOD w stosunku do populacji ogólnej (wg Criqui i wsp. 47)



### 1.1.2 Diagnostyka

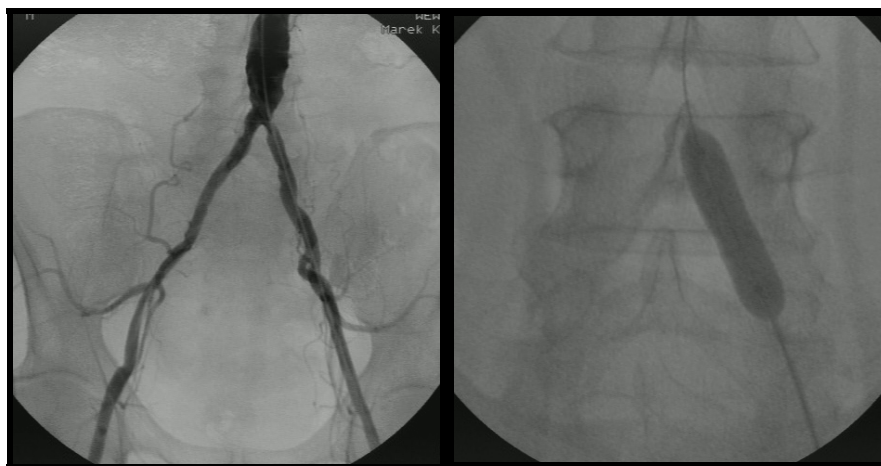
Objawów miażdżycy zarostowej należy poszukiwać u osób obciążonych dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym, zwłaszcza po 50 roku życia, palących papierosy lub cierpiących na cukrzycę (48). Nie wykazano jednak, aby przesiewowe badania w celu wykrycia beobjawowych chorych na PAOD były opłacalne (49).

Do podstawowych metod oceny niedokrwienia kończyn dolnych należy badanie obecności tętna na kończynach. Metoda ta obarczona jest błędem, zależnym od doświadczenia lekarza i wymaga potwierdzenia zobiektywizowanym badaniem. Podstawowym testem służącym do oceny adekwatności ukrwienia kończyn jest wskaźnik kostkowo-ramienny (Ankle-Brachial Index - ABI), czyli iloraz ciśnienia skurczowego na tętnicy piszczelowej tylnej („za kostką”) do ciśnienia skurczowego na tętnicy ramiennej, mierzony metodą dopplerowską. Za prawidłowe przyjmuje się wartości  $> 0,9$ . Chociaż objawy chromania występują zwykle dopiero przy ABI wynoszącym poniżej 0,8 (50), to zwiększone ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych zaobserwowano u pacjentów po 65 roku życia, u których ABI był poniżej 0,9 (51), aczkolwiek nie wszyscy potwierdzają te obserwacje (52). Mimo pewnych ograniczeń szczególnie w przypadkach sztywnych (uwapnionych), mało podatnych na ucisk tętnic u starszych pacjentów oraz u niektórych chorych na cukrzycę, wykazano jednak, że wskaźnik ten ma dużą czułość wynoszącą 95% i swoistość sięgającą 100% w porównaniu do potwierdzonej angiograficznie miażdżycy tętnic obwodowych (7, 53). Korelacja ABI z obrazem arteriograficznym, w zależności od ocenianego segmentu naczyniowego waha się od 70 do 85% (54, 55). Pomiar ABI pomaga w ustaleniu rozpoznania PAOD oraz może służyć do monitorowania progresji choroby lub efektów leczenia. Jeszcze większą wartość diagnostyczną ma pomiar ABI przed i po standardowym wysiłku - czyli marszu na bieżni ruchomej. Jego spadek, często do wartości nieoznaczalnych tuż po zakończeniu marszu, jest znamienny dla PAOD (56, 57). Stosuje się dwa rodzaje testu: o stopniowanym obciążeniu (narastającym nachyleniu bieżni) oraz ze stałym obciążeniem (stała prędkość i nachylenie). W Europie częściej wykonuje się ten ostatni rodzaj testu. Stała prędkość bieżni (3,2 km/h) i nachylenie (10-12°) są dobrze tolerowane przez pacjentów z chromaniem, a jednocześnie pozwalają na prawidłową identyfikację tego objawu u chorych z PAOD w czasie kilku minut trwania testu (58, 59). U chorych na cukrzycę z uwagi na częste zwapnienia w obrębie warstwy środkowej tętnic podudzi (i trudności z właściwą oceną ABI), oznacza się wskaźnik paluch-ramię (*toe-brachial systolic pressure index* – TBSPI, lub TBI) przy użyciu fotopletyzmoigrafii lub tzw. pletyzmografii impedancyjnej (60, 61). Do innych nieinwazyjnych metod oceny niedokrwienia kończyn pomagających w kwalifikowaniu chorych do dalszego leczenia należą: pomiar ciśnień segmentarnych, PVR (*pulse volume recording*), oscylometria i pletyzmografia. Metody te dostarczają cennych informacji uzupełniających pomiar ABI, nie pozwalają jednak na dokładną ocenę zwężenia poszczególnych tętnic, jak również nie zostały wystandaryzowane, co utrudnia

jednoznaczną interpretację ich wyników.

Spośród metod obrazowych najczęściej wykorzystywanymi są: ultrasonografia dopplerowska, angiografia (klasyczna i cyfrowa angiografia subtrakcyjna), a od niedawna również tomografia komputerowa i angiografia rezonansu magnetycznego. Badanie metodą duplex z kolorowym obrazowaniem dopplerowskim stanowi atrakcyjną metodę diagnostyczną i potencjalną alternatywę dla arteriografii (62, 63). Jest badaniem bezpiecznym, pozwala na ocenę zasięgu i nasilenia zmian, prędkości przepływu w tętnicach i gradientów ciśnienia przez zwężenie. Poza brakiem wygodnej archiwizacji wadą badania jest to, że jakość uzyskanych informacji zależy od wprawy i doświadczenia badającego. Trudności spotykane przy ocenie tętnic wynikające z grubości oddzielających tkanek i głębokiego położenia naczyń również stanowią ograniczenie tej metody (64). Ponieważ ocena ciśnień segmentarnych i oscylometria są mniej czasochłonne i tańsze a informacje uzyskane na ich podstawie wystarczają do właściwego kwalifikowania chorych z chromaniem do dalszego leczenia, ultrasonografia całego układu tętniczego nie znajduje uzasadnienia u pacjentów z PAOD (29). Jakość uzyskanych obrazów w angiotomografii, zwłaszcza wielorzędowej, dorównuje angiografii (65, 66) i pozwala w wielu przypadkach na właściwe kwalifikowanie chorych do zabiegów rewaskularyzacyjnych. Podobnie technika rezonansu magnetycznego pozwala na coraz dokładniejszą ocenę naczyń (67), zwłaszcza przy zastosowaniu środków wzmacniających i odpowiedniej technice akwizycji (68). Żadna z tych metod nie jest jednak zalecana w standardach postępowania w niedokrwieniu kończyn.

Złoty standard w diagnostyce obrazowej miażdżycy naczyń, w tym tętnic kończyn dolnych, stanowi arteriografia (tradycyjna, jak i subtrakcyjna) i jest badaniem wymaganym u wszystkich chorych przed zabiegami rewaskularyzacyjnymi. Jej wielką zaletą jest nie tylko dokładność w ocenie stopnia zwężenia naczynia, ale także możliwość jednoczesowego działania terapeutycznego za pomocą angioplastyki balonowej i/lub wszczepienia stentu (ryc. 2).



**Ryc. 2.** Obraz naczyń biodrowych w arteriografii miednicowo-kończynowej. Angioplastyka lewej tętnicy biodrowej wspólnej (rozpięty balon, z prawej; zbiory własne).

Według zaleceń grupy transatlantyckiej (TASC), u pacjentów z chromaniem przestankowym wykonanie angiografii wskazane jest wówczas, gdy podjęto decyzję o leczeniu inwazyjnym w razie wykrycia zmian kwalifikujących się do zabiegu (29).

### **1.1.3 Postępowanie**

Postępowanie u chorych na PAOD zmierza do zapobiegania powikłaniom sercowo-naczyniowym, zahamowania postępu choroby i zmniejszenia objawów niedokrwienia (29, 69). Modyfikacja czynników ryzyka w postaci zmiany trybu życia i sposobu odżywiania, zaprzestania palenia tytoniu, oraz farmakoterapia hiperlipidemii, nadciśnienia i cukrzycy wyraźnie ograniczają ryzyko powikłań miażdżycowych (29, 70, 71).

Podstawowym zaleceniem w chromaniu przestankowym jest regularny wysiłek fizyczny. Wykazano bowiem, iż w znaczny sposób poprawia on bezbólowy i całkowity dystans chodzenia oraz jakość życia chorych (72-74).

W postępowaniu farmakologicznym stosuje się profilaktykę z zastosowaniem leków przeciwplatek z aspiryną na czele, leki hipolipemizujące, a zwłaszcza statyny, oraz leki mogące poprawić ukrwienie kończyn dolnych m.in.: pentoksyfiline, cilostazol, naftydrofuryl, prostanoidy, choć skuteczność tej ostatniej grupy nie została przekonywująco dowiedziona. Trwają badania kliniczne oceniające również skuteczność naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna (*Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF) i zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (*Basic Fibroblast Growth Factor* - bFGF).

Aspirynę zaleca się wszystkim chorym na PAOD, zwłaszcza ze współistniejącym zwężeniem tętnic wieńcowych lub mózgowych; zmniejsza ona śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych o 30% (75, 76), natomiast nie wpływa na dystans chromania. Tiklopidyna okazała się równie skuteczna w redukcji ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych (77, 78), a także wydłużała dystans chromania oraz zmniejszała częstość rewaskularyzacji kończyn dolnych w porównaniu do placebo (79). W badaniu CAPRIE, porównującym skuteczność prewencji wtórnej aspiryny z inną tienopirydyną – kłopidogrelem - wykazano, że kłopidogrel bardziej niż aspiryna zmniejszał ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych, co najwyraźniej było wyrażone w niejednorodnej klinicznie grupie chorych na PAOD (o 23,8%) w porównaniu do osób po udarze mózgu i zawale serca (80).

Skuteczność statyn w PAOD została wykazana w kilku dużych badaniach. W analizie *post hoc* badania 4S (*Scandinavian Simvastatin Survival Study*), poza zmniejszeniem śmiertelności ogólnej, zgonów związanych z chorobą niedokrwinną serca i zawałów serca niezakończonych zgonem, zaobserwowano wyraźne zahamowanie progresji chromania przestankowego u pacjentów z hipercholesterolemią, otrzymujących simwastatynę w prewencji wtórnej (20). W największym

dotychczas przeprowadzonym badaniu z zastosowaniem statyn - HPS (*Heart Protection Study*) potwierdzono, że statyny zmniejszają ryzyko zgonu i powikłań sercowo-naczyniowych zarówno w miażdżycy tętnic wieńcowych, jak i w miażdżycy tętnic obwodowych, niezależnie od poziomu cholesterolu (81). Dwa niedawno przeprowadzone badania wykazały, że statyny wydłużają znamienne dystans chromania przestankowego (21, 22).

Spośród leków poprawiających ukrwienie kończyn dolnych do najczęściej stosowanych należy pentoksyfilina. Zwiększa ona plastyczność erytrocytów, zmniejsza stężenie fibrynogenu i agregację płytek. W wielu badaniach stwierdzono, że pentoksyfilina wydłuża dystans chromania przestankowego (82-84), jednakże nie wszystkie potwierdzały to korzystne działanie (85).

Cilostazol, inhibitor fosfodiesterazy III, jest kolejnym lekiem o działaniu poprawiającym ukrwienie kończyn bezpośrednio rozszerzającym naczynia i hamującym agregację płytek. W kilku opublikowanych randomizowanych badaniach wykazano wydłużenie dystansu chromania o 31-47% u leczonych cilostazolem w porównaniu do osób otrzymujących placebo (86, 87). W jednym z badań, odstawienie tego leku u pacjentów z chromaniem przestankowym powodowało skrócenie dystansu chromania, podczas gdy odstawienie pentoksyfiliny i placebo pozostawało bez wpływu na chromanie (85). Cilostazol stanowi optymalny lek u chorych z nasilonym chromaniem przestankowym, u których wyczerpano inne metody postępowania zachowawczego i brak jest możliwości rewaskularyzacji.

W leczeniu chromania przestankowego stosowany bywa również naftydrofuryl (nieдоступny w Polsce). Lek ten będący antagonistą receptora serotoninowego i zmniejszający agregację płytek, poprzez poprawę metabolizmu tlenowego niedotlenionych tkanek, zwiększa dystans chromania przestankowego w porównaniu z placebo (88). Podobne działanie wykazuje propionyl-L-karnityna (89).

Prostanoidy takie jak prostaglandyna E1 (PGE<sub>1</sub>) i prostacyklina (PGI<sub>2</sub>) hamują adhezję i agregację płytek, rozszerzają naczynia, poprawiają funkcję śródbłonka (poprzez wzrost NO i zmniejszenie poziomu endoteliny-1), hamują proliferację mięśni gładkich naczyń i zwiększają aktywność fibrynolityczną osocza. Te korzystne efekty zachęciły do ich stosowania u pacjentów z niedokrwieniem kończyn. Ponieważ działanie prostaglandyn właściwie polega głównie na poprawie mikrokrążenia znalazły one zastosowanie w leczeniu zaawansowanej miażdżycy (krytycznego niedokrwienia) (90-95). Z uwagi sposób podawania prostaglandyn (dożylnie lub dotętniczo), co w leczeniu przewlekłym jest niepraktyczne, próbowano podawać doustne analogi tych substancji. Ostatnio opublikowano wyniki badania z zastosowaniem doustnej postaci analogu PGI<sub>2</sub> - beraprostu, w którym wykazano wydłużenie bezbólowego (82%) i całkowitego (60%) dystansu chodzenia w stosunku do odpowiednio 53 i 35 % w grupie placebo w ciągu 6 miesięcy (96), co było istotne statystycznie, ale mało istotne z punktu widzenia klinicznego (wydłużenie bezbólowego dystansu

chodzenia o 36 m i całkowitego o 70 m w grupie leczonej beraprostem). Według najnowszych wytycznych siódmej konferencji *American College of Chest Physicians* dotyczących postępowania przeciwzakrzepowego u chorych z niedrożnością tętnic obwodowych, z uwagi na brak przekonujących dowodów nie zaleca się stosowania prostaglandyn u pacjentów z niedokrwieniem kończyn dolnych (76).

W wytycznych grupy transatlantyckiej (TASC) z 2000 roku, zalecenie ich stosowania dotyczy jedynie chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn, u których nie ma możliwości rewaskularyzacji i alternatywą jest amputacja kończyny (29).

Leczenie inwazyjne wewnątrznaczyniowe lub chirurgiczne wskazane jest u pacjentów z chromaniem przestankowym, u których rehabilitacja ruchowa i postępowanie farmakologiczne nie przyniosły poprawy, jak również w ostrym i krytycznym niedokrwieniu kończyn. Postępowanie chirurgiczne zastrzega się dla chorych, u których niemożliwe są techniki endowaskularne. Z uwagi na niezadowalające wyniki odległe przy dużym zaawansowaniu zmian, leczenie chirurgiczne stosuje się u chorych z krótkim dystansem chromania (97, 29), chociaż niektórzy kwestionują jego przydatność u pacjentów z chromaniem przestankowym (98). Operacje na tętnicach proksymalnych (odcinek aortalno-biodrowy), polegające na wszczepieniu zespolenia omijającego, cechują się dużym odsetkiem pierwotnej drożności (80-90%) oraz niewielką śmiertelnością i częstością innych powikłań (1%). Podobny odsetek drożności charakteryzuje interwencje wewnątrznaczyniowe w odcinku biodrowo-udowym we wczesnych okresach obserwacji, jednak wyniki odległe wykazują już tylko około 50-60 % drożności tętnic. Pomimo to w obserwacji odległej nie stwierdzono, aby dystans chromania lub ABI poprawiały się u leczonych inwazyjnie w porównaniu z leczonymi zachowawczo.

W wybranych przypadkach zakrzepicy tętniczej, także w tętnicach kończyn dolnych, stosuje się leki fibrynolityczne, zwykle podawane za pomocą cewnika wewnątrznaczyniowego w obręb skrzepu lub blisko niego w celu zwiększenia skuteczności leczenia i ograniczenia powikłań krwotocznych. Procedura lokalnej fibrylizacji wykonywana jest w stanach nagłych, jako alternatywa chirurgicznej embolektomii i poprzedza angioplastykę z implantacją stentu w miejscu uszkodzonej blaszki miażdżycowej, na której doszło do wytworzenia zakrzepu (99).

## 1.2 CHOROBA BUERGERA

### 1.2.1 Występowanie, objawy kliniczne i obraz histologiczny

Choroba Buergera (choroba von Winiwartera-Buergera, Thrombangiitis Obliterans – TAO) jest rzadką chorobą zapalną naczyń o nieznannej etiologii, występującą przede wszystkim u palaczy tytoniu. Pierwszy przypadek tej choroby u mężczyzny z utrzymującym się od 12 lat owrzodzeniem kończyny i zakończonym ostatecznie jej utratą, opisał w 1879 roku Feliks von Winiwarter (100). W 1908 roku Leo Buerger przedstawił dokładny opis zmian patologicznych w tej chorobie w oparciu o badanie 11 amputowanych kończyn u młodych mężczyzn między 20 a 40 rokiem życia, używając po raz pierwszy terminu zakrzepowo-zarostowe zapalenie naczyń (*thrombo-angiitis obliterans*) (101).

Częstość rozpoznawania TAO zależy od regionu zamieszkiwania badanej populacji oraz w dużej mierze od przyjętych kryteriów diagnostycznych. W Stanach Zjednoczonych częstość rozpoznawania TAO na przestrzeni 40 lat (1947-1986) zmniejszyła się ze 104 do 8 - 12,6 na 100 000 populacji, prawdopodobnie głównie dzięki zaostrzeniu kryteriów diagnostycznych (102, 103). W Polsce częstość ta jest podobna i wynosi ok. 8 na 100 000 mieszkańców (104). Częstość choroby Buergera wśród pacjentów z niedokrwieniem kończyn waha się od 0,5 do 5,6% w krajach europejskich, 45-63 % w Indiach, 16-66% w Japonii i Korei i aż 80% wśród populacji Żydów aszkenazyjskich (102, 103, 105, 106). W Polsce odsetek ten wynosi ok. 3,3 % (107). Duża częstość TAO w południowo-wschodniej Azji wydaje się być częściowo związana z rodzajem tytoniu używanego na tym obszarze (108) i niejasną predyspozycją genetyczną. W chorobie Buergera częściej stwierdza się występowanie antygenów zgodności tkankowej (*human lymphocyte antigen* – HLA) typu A9, A1, B5, B8 i DR4 (109-111), natomiast niezwykle rzadko - HLA B12, uważany przez niektórych autorów za czynnik ochronny (112). Amerykańskie obserwacje jednak nie potwierdzają tej koncepcji (113).

Choroba Buergera występuje typowo przed 45 rokiem życia, głównie u mężczyzn; odsetek kobiet waha się między 11-23 % (103, 114, 115). Uważa się, że wzrastająca częstość tej choroby u kobiet łączy się ze zwiększoną częstością palenia tytoniu.

TAO zajmuje naczynia tętnicze i żyłne małego i średniego kalibru oraz charakteryzuje się występowaniem bogatokomórkowego, zapalnego skrzepu ze stosunkowo ograniczonym naciekiem zapalnym ściany naczyń. U 50% pacjentów stwierdza się zajęcie wyłącznie naczyń kończyn dolnych, u 30-40% niedokrwienie dotyczy kończyn dolnych i górnych, a u 10 % objawy ograniczone są wyłącznie do kończyn górnych (103). Chociaż dla choroby Buergera typowe jest zajęcie naczyń kończyn, to istnieją w literaturze doniesienia o innych lokalizacjach zmian, takich jak tętnice mózgowe, wieńcowe, nerkowe, kręzkowe, płucne czy aorta (116-119).

Obraz anatomopatologiczny zajętych naczyń zależy od czasu trwania i fazy choroby. W jej przebiegu wyróżnia się stadium ostre, pośrednie i przewlekłe. W stadium przewlekłym (zejściowym) stwierdza się w zajętej kończynie zorganizowane zakrzepy i włóknienie naczyń (120, 121). W fazie ostrej obraz histologiczny ma znaczenie diagnostyczne. Spotyka się bowiem, bogatokomórkowy zakrzep zapalny z obecnością mikroropni, wielojądrzastych komórek olbrzymich i leukocytów o wielokształtnych jądrach z wyraźnie mniejszym odczynem zapalnym w obrębie ściany naczyń (122). W okresie pośrednim choroby skrzep ulega stopniowej organizacji w obrębie zajętych tętnic i żył. Cechą charakterystyczną choroby Buergera we wszystkich jej stadiach, odróżniającą ją od miażdżycy i innych chorób zapalnych naczyń, jest nienaruszona struktura błony elastycznej ściany naczynia (123). Dopiero w ostatnich latach, używając technik immunocytochemicznych, zwrócono uwagę na „nowe” cechy histologiczne, typowe dla TAO, rzadko spotykane w miażdżycy i innych chorobach zapalnych, a mianowicie zrekanalizowane naczynia o kształcie podobnym do cebuli, włóknienie przydanki, obrzęk śródbłonna naczyń odżywczych (*vasa vasorum*) oraz przewlekłe zapalenie z obrzękiem na zewnątrz błony sprężystej zewnętrznej tych naczyń (124). Na to, że uszkodzenie mikrokrążenia jest istotnym czynnikiem w patogenezie TAO, jako jedni z pierwszych zwrócili uwagę polscy autorzy (125). Ponadto badacze japońscy stwierdzili, poza opisywanymi wcześniej naciekami komórkowymi w obrębie skrzepu i błony wewnętrznej, złogi immunoglobulin i składowych dopełniacza C3d i C4c wzdłuż zachowanej błony elastycznej ściany naczynia (126). Obserwacje te przemawiają za zapalnym i immunologicznym tłem choroby. Chociaż zakrzepica wydaje się również odgrywać rolę w patofizjologii TAO (127, 128), to jej znaczenie jest wciąż niejasne. Większość doniesień ostatnich lat wskazuje raczej na tło autoimmunologiczne. Przemawia za tym stwierdzana u pacjentów z TAO obecność przeciwciał antyelastynowych (129), oraz obserwacja Adara i wsp, którzy stwierdzili w tej chorobie nadwrażliwość komórkową na kolagen typu I i III z obecnością przeciwciał przeciwkolagenowych (130). Również Eichhorn i wsp. wykazali u pacjentów z chorobą Buergera w aktywnej fazie choroby istotnie podwyższone miana przeciwciał przeciwendotelialnych w porównaniu do grupy kontrolnej oraz pacjentów z TAO w fazie remisji, co sugeruje immunologiczne tło choroby (131). Jednak pytanie, co jest antygenem dla tych różnych autoprzeciwciał, wciąż pozostaje bez odpowiedzi.

Dominującym objawem choroby Buergera jest chromanie zajętych kończyn, choć spotyka się je rzadziej niż w miażdżycy zarostowej (132). Chromanie zwykle rozpoczyna się od stóp i/lub rąk, obejmując proksymalne części kończyn. Później dochodzi do wystąpienia bólów spoczynkowych a w końcu owrzodzeń niedokrwiennych palców rąk i stóp (ryc. 2). Niekiedy jednak, pierwszym objawem mogą być bóle spoczynkowe. W 40% przypadków zmianom tętnicznym towarzyszy zapalenie żył powierzchownych, często o wędrującym charakterze, odzwierciedlające aktywność choroby (102, 103). Podobny jest odsetek chorych, u których występuje objaw Raynaud.

**Ryc. 2.** Zmiany niedokrwienne dystalnych części kończyn u pacjentów z chorobą Buergera (zbiory własne).



Choroba Buergera ulega samoograniczeniu u większości pacjentów po zaprzestaniu palenia. Konieczność amputacji dotyczy jednak większego odsetka pacjentów niż ma to miejsce w miażdżycy zarostowej i sięga blisko 20% (103, 132). Z uwagi na niezwykle rzadkie zajęcie naczyń mózgowych, wieńcowych i trzewnych, przeżywalność pacjentów z chorobą Buergera jest zbliżona do populacji ogólnej i wynosi 97% w ciągu 5 lat a 94% w ciągu 10 lat (103).



### **1.2.2 Diagnostyka**

Chociaż wystąpienie choroby Buergera zdarza się u osób niepalących, to w większości kryteriów diagnostycznych palenie tytoniu aktualne bądź stwierdzone w przeszłości stanowi konieczny warunek rozpoznania tej choroby (103, 113, 115, 133). Kryteria diagnostyczne zaproponowane przez Shionoyę obejmują: 1) palenie tytoniu w wywiadzie, 2) początek choroby przed 50 rokiem życia, 3) zamknięcia tętnic poniżej tętnicy podkolanowej, 4) zajęcie naczyń kończyny górnej lub wędrujące zapalenie żył oraz 5) nieobecność typowych czynników ryzyka miażdżycy z wyjątkiem palenia tytoniu (133). Pewne rozpoznanie choroby można ustalić po stwierdzeniu wszystkich pięciu kryteriów. Mills i Porter zaproponowali inny system, obejmujący duże i małe kryteria choroby, dość rygorystyczne, pozwalające jednak na pewne rozpoznanie choroby z bardzo dużą dokładnością (134). Z kolei Papa i wsp. opracowali skalę punktową, uwzględniającą cechy kliniczne, angiograficzne, histopatologiczne oraz kryteria wykluczające (135). W oparciu o obserwacje 112 chorych Olin przedstawił w 1990 roku następujące kryteria: wiek poniżej 45 roku życia, palenie tytoniu, obecność niedokrwienia dystalnych części kończyny (manifestującego się chromaniem, bólem spoczynkowym, owrzodzeniami lub martwicą) udokumentowanego nieinwazyjnymi badaniami naczyniowymi, wykluczenie chorób autoimmunologicznych, stanów nadkrzepliwości i cukrzycy w badaniach laboratoryjnych, wykluczenie proksymalnego źródła zatorowości w badaniu echokardiograficznym i angiograficznym oraz odpowiednie cechy angiograficzne w zajętych i nie zajętych kończynach (102). Opisano szereg charakterystycznych dla choroby Buergera zmian naczyniowych w badaniu arteriograficznym (ryc. 3) (136, 137). Należą do nich: brak blaszek miażdżycowych i zwapnień, gładki obrys dużych naczyń, częste okluzje tętnic przedramienia z fragmentarycznie drożnymi, krętymi odcinkami, okluzje tętnic palców oraz tętnic podudzia (o prawidłowym wyglądzie) z dobrze rozwiniętymi, korkociągowatymi naczyniami krążenia obocznego, występującymi w stadium przewlekłym choroby. Obraz ten, mimo znacznej swoistości, nie jest jednak patognomoniczny dla choroby Buergera i może występować w przewlekłym niedokrwieniu kończyn w przebiegu miażdżycy, cukrzycy i nawracających dystalnych embolizacji (132). Badanie histologiczne rzadko jest potrzebne do rozpoznania choroby, chyba, że niespełnione są podstawowe kryteria np. objawy pojawiają się po 45 roku życia lub proces zajmuje duże naczynia (114).

**Ryc. 3.** Obraz angiograficzny w chorobie Buergera (zbiory własne).

**A**



A. Niedrożność tętnicy łokciowej oraz okluzyje tętnic właściwych palców ręki po stronie promieniowej.

**B**



B. Zamknięcia naczyń podudzia oraz korkociągowe naczynia krążenia obocznego.

### **1.2.3 Postępowanie**

Jedynym skutecznym, udowodnionym sposobem leczenia zakrzepowo-zarostowego zapalenia naczyń jest zaprzestanie palenia tytoniu (114, 138, 139). Zalecenie to dotyczy zaprzestania konsumpcji tytoniu pod każdą postacią, albowiem choroba może rozwinąć się również u osób żujących lub wdychających tytoń (132, 140, 141). Zaprzestanie używania tytoniu powoduje u większości pacjentów wygojenie owrzodzeń i ustąpienie dolegliwości bólowych. Ocenia się, że aż 94

% chorych dzięki zaprzestaniu palenia tytoniu unika amputacji, podczas gdy kontynuacja palenia przez pacjentów zagrożonych utratą kończyny doprowadza do jednej lub wielu amputacji u 47% z nich (142).

Bóle spoczynkowe i owrzodzenia są wskazaniem do hospitalizacji pacjentów z TAO. Stosuje się wówczas narkotyczne leki przeciwbólowe, a w przypadkach ran zakażonych chirurgicznie ich opracowanie oraz antybiotykoterapię.

Leczenie chirurgiczne w chorobie Buergera nie należy do rutynowego postępowania i rozważa się je tylko w przypadku krytycznego niedokrwienia. Jedynie 10 % pacjentów posiada bowiem odpowiednie warunki anatomiczne umożliwiające pomostowanie, a segmentalne niedrożności tętnic i słaba jakość zmienionych chorobowo żył pogarszają wyniki odległe (132). W największej, 18-letniej obserwacji, 61 chorych na TAO poddanych zabiegowi podpachwinowego pomostowania tętnic, badacze japońscy wykazali sięgający 49% odsetek pięcioletniej drożności operowanych naczyń (143). Inną metodą leczenia chirurgicznego niedokrwienia kończyn opracowaną w Indiach i stosowaną z dużą skutecznością u pacjentów z chorobą Buergera jest przeszczep sieciowy, prawie nie stosowany poza tym krajem (144). Około 20 % chorych na TAO w różnym okresie choroby poddawanych jest zabiegowi sympatektomii (103). Jednak jej rola w łagodzeniu dolegliwości bólowych i zapobieganiu amputacji pozostaje niejasna (114, 145).

W fazie ostrej choroby w celu hamowania progresji zakrzepicy tętniczej stosowana bywa heparyna oraz leczenie przeciwplytkowe za pomocą aspiryny. Brak jest jednak dowodów na skuteczność tego postępowania. Doniesienia na temat leczenia fibrynolitycznego w chorobie Buergera są niezwykle skąpe (146, 147). W artykule Husseina i El Dorriego opisano dotętniczy wlew streptokinazy u 11 pacjentów z krytycznym niedokrwieniem kończyn w przebiegu TAO, określając odsetek powodzenia leczenia wyrażony uniknięciem amputacji bądź zmianą jej poziomu na 58% (146). Więcej jest danych dotyczących leczenia z zastosowaniem analogów prostaglandyn o działaniu wazodylatacyjnym i przeciwplytkowym – PGE<sub>1</sub> (alprostadil, Prostavasin) i PGI<sub>2</sub> (prostacyklina, Iloprost) (148-151). Leki te dość dawno stosowane w leczeniu pacjentów z niedokrwieniem kończyn w przebiegu miażdżycy (90, 91, 93, 94), były przedmiotem badań w chorobie Buergera opublikowanych w 1990 i 1998 roku. Fiessinger i Schafer (150) przeprowadzili randomizowane badanie z podwójnie ślepą próbą, w którym pacjenci losowo otrzymywali dożylną postać iloprostu z doustnym placebo lub aspirynę z dożylną formą placebo w postaci sześciogodzinnego wlewu przez 28 dni. U 88 % pacjentów otrzymujących iloprost zaobserwowano poprawę w stosunku do 21 % wśród osób otrzymujących aspirynę. W badaniu opublikowanym przez europejską grupę badawczą TAO (European TAO Study Group) z udziałem 319 chorych, w którym stwierdzono istotną statystycznie przewagę małych dawek iloprostu nad placebo w zmniejszeniu dolegliwości bólowych, nie wykazano u osób otrzymujących iloprost szybszego gojenia się owrzodzeń (151). Iloprost nie

został dopuszczony do leczenia niedokrwienia kończyn w Stanach Zjednoczonych, chociaż nadal bywa stosowany w Europie.

W ostatnim dziesięcioleciu wprowadzono do leczenia krytycznego niedokrwienia kończyn, w tym w chorobie Buergera, nowe metody leczenia. Stymulator rdzeniowy, stosowano początkowo u chorych na PAOD (152), a następnie coraz częściej wykorzystywano w chorobie Buergera, gdy wyczerpano tradycyjne metody leczenia (153-155). Inną metodą stosowaną w ostatnich latach u pacjentów z krytycznym niedokrwieniem, u których wykorzystano dostępne opcje leczenia jest stymulacja neoangiogenezy za pomocą czynników wzrostowych. W 1998 roku Isner opublikował wyniki leczenia 6 chorych na TAO domięśniowym podaniem genu naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka (VEGF) (156). U 3 pacjentów uzyskano poprawę, jednakże u dwóch mimo zastosowanego leczenia konieczna była amputacja. Te pionierskie metody, podobnie jak ostatnio stosowane w krytycznym niedokrwieniu kończyn przeszczepy macierzystych komórek szpiku (157) oraz komórek progenitorowych (CD34+) otrzymywanych z krwi obwodowej (158), są obiecujące. U chorych na TAO i brakiem innych opcji terapeutycznych, mogą stać się ważnym sposobem postępowania.

### 1.3 POWSTAWANIE SKRZEPU

W warunkach fizjologicznych krzepnięcie krwi umożliwia zahamowanie krwawienia z uszkodzonego naczynia. W chorobowo zmienionych naczyniach aktywacja krzepnięcia sprzyja zakrzepom i zatorom zarówno w układzie tętniczym, jak i żylnym, wiodąc do zawału serca, udaru mózgu, krytycznego niedokrwienia kończyn, a także zakrzepicy żył głębokich lub zatoru płucnego. Powstawanie skrzepu fibrynowego wzmacnia czop płytkowy utworzony w odpowiedzi na uszkodzenie naczynia, czyli hemostazę pierwotną (159).

Proces tworzenia skrzepu fibrynowego przebiega wieloetapowo i oparty jest na kaskadzie reakcji enzymatycznych, prowadzących ostatecznie do katalitycznego rozszczepienia fibrynogenu do fibryny przy udziale trombiny. Konwersja fibrynogenu do fibryny oraz wytwarzanie wiązań krzyżowych między jej monomerami przez aktywny czynnik XIII stanowią końcowy etap krzepnięcia, w którym dochodzi do powstania skrzepu stosunkowo odpornego na uszkodzenia mechaniczne i enzymatyczną degradację (160, 161).

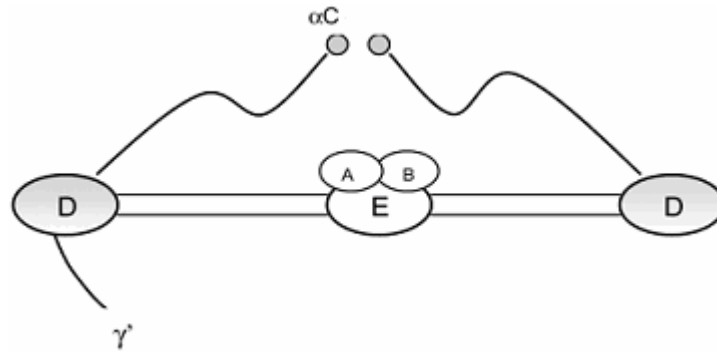
#### ***1.3.1 Fibrynogen i jego konwersja do fibryny***

Fibrynogen (Fg) jest rozpuszczalną glikoproteiną o masie cząsteczkowej 340 kD, składającą się z trzech par łańcuchów polipeptydowych  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$  połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Jego stężenie w osoczu wynosi przeciętnie 2-3 g/l. Fibrynogen powstaje głównie w komórkach wątroby, a także w megakariocytach, komórkach nabłonka, fibroblastach.

Poziom Fg podlega dużym wahaniom biologicznym. Jego synteza w wątrobie jest regulowana przez IL-6 (162). Podczas reakcji ostrej fazy dochodzi do wzrostu jego poziomu. Źródłem IL-6 są makrofagi aktywowane podczas infekcji lub reakcji zapalnej obecnej w ścianie naczynia krwionośnego. Regulacja produkcji i stężenia Fg zależy także od obecności innych cytokin zapalnych oraz stanu metabolicznego organizmu. Substancje takie jak IL-1, IL-6, TNF  $\alpha$ , wolne kwasy tłuszczowe (FFA) oraz wszystkie sytuacje prowadzące do wzrostu stężenia powyższych czynników powodują również wzrost stężenia Fg (163). Podwyższone stężenie Fg spotyka się w zaawansowanym wieku, u płci żeńskiej, palaczy tytoniu, w nadciśnieniu tętniczym, cukrzycy i hypercholesterolemii (164). Stężenie Fg zmniejszają: aktywność fizyczna, redukcja masy ciała i zaprzestanie palenia. Wydaje się, że wahania poziomu fibrynogenu związane z reakcją ostrej fazy wtórną do różnego rodzaju zakażeń i palenia tytoniu mogą mieć znaczenie w rozwoju miażdżycy.

W cząsteczce Fg wyróżnia się 3 domeny czynnościowe - dwie zewnętrzne domeny D i centralną domenę E, które są połączone łańcuchami polipeptydowymi (165). Cząsteczka ta posiada

konstrytutywne miejsca wiązania, które są odsłaniane w wyniku proteolizy Fg przez trombinę, a także w wyniku samego procesu polimeryzacji (np. miejsce wiązania tPA).

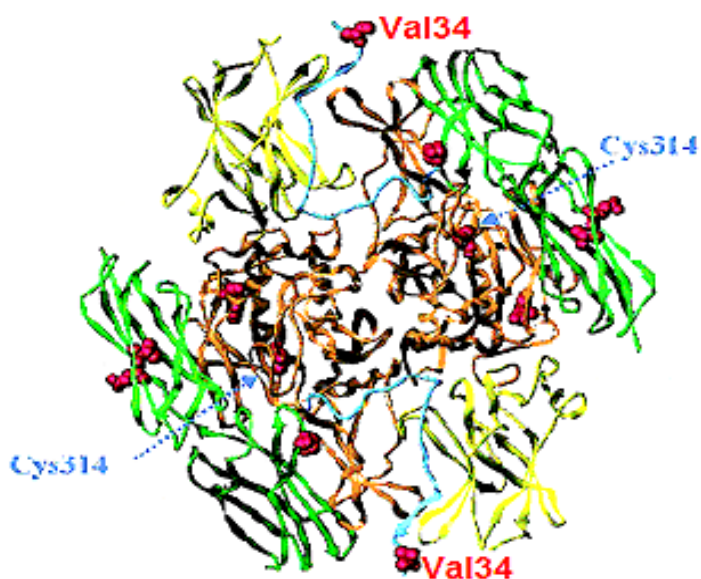


**Ryc. 4.** Funkcjonalna budowa cząsteczki fibrynogenu. E- centralna domena (E) zawierająca fibrynopeptyd A (A) i fibrynopeptyd B (B); D- dystalne domeny D;  $\alpha$ C- C-końcowy fragment łańcucha  $\alpha$ ;  $\gamma'$  – łańcuch gamma zawierający miejsca wiązania dla trombiny i czynnika XIII.

Podstawową funkcją Fg uwarunkowaną budową jego cząsteczki jest udział (wraz z płytkami krwi) w powstawaniu czopa hemostatycznego. Poza tym wpływa on także na lepkość krwi. Poprzez interakcje z receptorami leukocytów i płytek zmienia zdolność tych komórek do adhezji, agregacji i chemotaksji. Fg odgrywa także ważną rolę w procesie gojenia się ran oraz rozwoju i przebudowy tkanek (166). Fg i złogi fibryny oraz produkty jej degradacji mogą brać udział w regulacji angiogenezy, jak również wchodzić w skład białek nieprawidłowej macierzy zewnątrzkomórkowej.

Fibrynogen jest podstawowym substratem dla trombiny, silnej proteazy serynowej o wielorakich funkcjach. Formowanie się skrzepu jest procesem wieloetapowym, rozpoczynającym się od odszczepienia 16 – aminokwasowego fibrynopeptydu A (FPA) z łańcuchów  $A\alpha$  cząsteczki Fg w reakcji katalizowanej przez trombinę. Uwalnianie fibrynopeptydów A z równoczesną ekspozycją dwóch miejsc E(A) na domenach E prowadzi do powstania fibryny I. Podobnie odszczepienie analogicznych fibrynopeptydów B (FPB) od łańcuchów  $B\beta$  prowadzi do odsłonięcia miejsc E(B), które oddziałują z receptorami płytek, fibroblastów i komórek śródbłonna. Uwolnienie fibrynopeptydów odsłania komplementarne względem siebie miejsca w obrębie domen D i E cząsteczek fibrynogenu oraz prowadzi do spontanicznej polimeryzacji monomerów fibryny, poprzez połączenie „koniec do boku” domen D i E. Nakładające się w ten sposób na siebie włókna noszą nazwę protofibryli. Po odszczepieniu FPB, który to proces ma miejsce po upakowaniu włókien w postaci protofibryli, powstaje fibryna II. Uwolnienie FPB umożliwia boczną agregację protofibryli, której stopień wpływa na rozciągliwość skrzepu (167). Dalsza agregacja boczna prowadzi do powstania pęczków włókien o większej grubości, co ze skruceniem włókien tworzących ostatecznie rozgałęzione struktury sieciowe składa się na trójwymiarowy obraz sieci, stanowiącej zrąb skrzepu. Włókna sieci fibrynowej stabilizowane są dodatkowo przez wiązania krzyżowe ( $\gamma$ -glutamyl- $\epsilon$ -lizynowe) między łańcuchami  $\gamma$  i  $\alpha$  fibryny, które warunkują oporność skrzepu na działanie plazminy. Powstają one dzięki aktywności czynnika XIIIa, transglutaminazy aktywowanej przez trombinę.

Czynnik XIII (FXIII) występuje w osoczu w formie zymogenu w stężeniu ok. 70-90 nmol/l i składa się z 2 podjednostek A i 2 podjednostek B połączonych niekowalencyjnie w tetramer o masie cząsteczkowej ok. 320 kD (168, 169). Około 50% aktywności FXIII, polegającej na stabilizacji fibryny, wykazuje dimeryczna forma czynnika zawarta w płytkach krwi i składająca się wyłącznie z podjednostek A (170). Podjednostka A zawiera centrum aktywne enzymu i jest syntetyzowana w hepatocytach, monocytach i megakariocytach, podczas gdy podjednostka B służy jako nośnik podjednostki A i powstaje głównie w wątrobie (171, 172). Dzięki badaniom krystalograficznym, które pozwoliły na dokładniejsze poznanie budowy cząsteczki czynnika XIII, możliwe było bardziej precyzyjne określenie jej funkcji (ryc. 5). Podjednostka A zawiera peptyd aktywacyjny składający się z 37 aminokwasów. Peptyd aktywacyjny jednej podjednostki A zamyka dostęp do centrum aktywnego enzymu zawierającego cysteinę, drugiej podjednostki (173, 174).



**Ryc. 5.** Krystalograficzna rekonstrukcja przestrzennej budowy podjednostki A cząsteczki czynnika XIII. (Weiss MS et al. FEBS Letters 1998<sup>174</sup>, Ariëns RA et al. Blood 2002<sup>180</sup>) Kolorem pomarańczowym oznaczony jest katalityczny rdzeń zawierający w aktywnym miejscu cysteinę (Cys 314 – kolor niebieski). Kolorem błękitnym oznaczony jest peptyd aktywacyjny. Kolorem żółtym i zielonym oznaczono pozostałe domeny podjednostki A. Zaznaczona na rysunku kolorem czerwonym walina (Val34), jest miejscem jednego z najczęstszych polimorfizmów podjednostki A w ogólnej populacji (polimorfizm Val34Leu FXIII).

Aktywacja FXIII polega na usunięciu peptydu aktywacyjnego przez trombinę, a następnie dysocjacji podjednostki A w obecności jonów wapnia. Ważnym kofaktorem aktywacji FXIII są polimery fibryny (175, 176). Kompleks utworzony z trombiny, polimerów fibryny i osoczowego czynnika XIII przyspiesza odszczepienie podjednostki A, co ma istotne znaczenie dla kontroli hemostazy. W czasie aktywacji FXIII podjednostka B dysocjuje od podjednostki A, co umożliwia ekspozycję aktywnych miejsc tej ostatniej i interakcję z fibryną. Tworzenie wiązań krzyżowych przez aktywny FXIII w obrębie sieci fibrynowej przebiega dwuetapowo. Wytworzone wiązania między glutaminą a lizyną

stabilizują sieć fibrynową, czyniąc ją stosunkowo odporną na uszkodzenia mechaniczne i chronią nowo tworzoną fibrynę przed enzymatycznym rozkładem (177, 178).

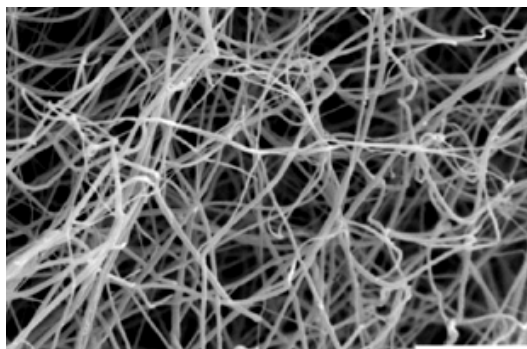
W ostatnich 10 latach badano związek pomiędzy polimorfizmami czynnika XIII a ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych. Spośród najczęściej spotykanych polimorfizmów największe znaczenie dla właściwości sieci fibrynowej wydaje się mieć polimorfizm Val34Leu, w którym tranzycja guaniny w tyminę w pozycji 34 kodonu podjednostki A FXIII powoduje zastąpienie waliny leucyną w peptydzie aktywacyjnym. Zamiana ta zachodzi w miejscu oddalonym o 3 reszty aminokasowe od miejsca działania trombiny na FXIII (tj. pomiędzy arginina w pozycji 37 a glicyną w pozycji 38) i powoduje zmianę aktywności FXIII. Aktywacja wariantu 34Leu FXIII zachodzi bardziej gwałtownie niż Val34 FXIII (179, 180). Również wiązania poprzeczne między łańcuchami  $\gamma$  i  $\alpha$  fibryny pojawiają się wcześniej w obecności wariantu 34Leu FXIII. W ostatnich latach stwierdzono, że z występowaniem allelu 34Leu FXIII wiąże się zmniejszone ryzyko zawału serca (181, 182), niedokrwiennego udaru mózgu (183), jak również zakrzepicy żył głębokich (184).

Poznanie struktury cząsteczki Fg oraz jego zdolności do tworzenia polimerów fibryny pod wpływem trombiny możliwe było dzięki wielorakim metodom chemicznym i fizykochemicznym. Protofibryle mają postać helikalną, która jest najprawdopodobniej konsekwencją symetrii cząsteczki fibrynogenu. Również włókna fibryny wykazują pewien stopień skręcenia i zdolność do ograniczonego przyrostu swych wymiarów. Osiągają one średnicę nie przekraczającą 10 nm. Wynika to najpewniej z ograniczonej rozciągliwości protofibryli budujących strukturę włókna fibrynowego w warstwach powierzchniowych włókna (185).

### **1.3.2 Sieć fibrynowa**

Charakterystyka powstającej sieci fibrynowej ma znaczenie dla aktywacji lizy skrzepu, a przez to dla efektywności procesu krzepnięcia i w konsekwencji powikłań w przebiegu miażdżycy. Najważniejsze czynniki charakteryzujące żel fibrynowy to: stosunek długości włókien do ich grubości (mass-length ratio), przepuszczalność i „upakowanie” sieci fibryny (186, 187). Strukturę sieci fibrynowej poznano stosując techniki mikroskopii świetlnej, elektronowej, konfokalnej 3D (ryc. 6). Mikroskopia elektronowa pozwoliła na wstępną identyfikację rozmiarów włókien, jednakże bez możliwości dokładnego pomiaru ich średnicy. Do tego celu wprowadzono metody badające właściwości żelów fibrynowych. Podstawową właściwością żelu jest jego przepuszczalność. Określa się ją, przepuszczając określony roztwór buforu przez badany żel fibrynowy, a jej wielkość wyraża się tzw. współczynnikiem przepuszczalności, którego miarą jest stała Darcy'ego ( $K_s$ ). Na podstawie tego parametru można następnie wyznaczyć współczynnik masa-długość włókna i podać jego przybliżoną średnicę (188).





**Ryc. 6.** Obraz sieci fibrynowej w mikroskopie elektronowym.

Stwierdzono, że struktura żelu fibrynowego zmienia się w zależności od warunków panujących podczas aktywacji fibrynogenu pod wpływem trombiny. Włókna sieci fibrynowej mogą mieć różną grubość i średnicę, co bezpośrednio przekłada się na stopień upakowania sieci i jej przepuszczalność. Sieć zbudowana z włókien cienkich, o małej średnicy charakteryzuje się małą porowatością i wysokim stopniem upakowania struktury, co przejawia się małą przepuszczalnością. Z kolei żele zbudowane z włókien grubych tworzą pory o dużej średnicy i wykazują znacznie mniejsze upakowanie sieci, co wpływa na zwiększenie przepuszczalności.

Pierwsze badania nad strukturą sieci fibrynowej prowadzono przy użyciu roztworów oczyszczonego Fg, w warunkach statycznych, w których struktura sieci determinowana jest głównie przez stężenie Fg i trombiny. Te dwa elementy niezbędne do powstania sieci fibrynowej warunkują tzw. potencjał krzepliwości środowiska, w którym zachodzą przemiany Fg (189). Zaobserwowano, iż w żelach powstających w środowisku o wzrastających stężeniach Fg lub trombiny dochodzi do znacznej redukcji przestrzeni między włóknami, co wiąże się ze zmniejszeniem liczby porów i skróceniem włókien sieci fibrynowej. Podobny spadek porowatości skrzepu ma miejsce w środowisku o dużej sile jonowej (190). Wartości  $K_s$  określające stopień upakowania struktury sieci, a zatem i liczbę porów, w żelach, które powstały w środowisku o wysokim stężeniu Fg lub trombiny były małe, podobnie jak w żelach powstałych w środowisku o dużym stężeniu jonów sodu. Dane te dotyczą jednak badań z oczyszczonymi białkami, które w niewielkim stopniu odpowiadają warunkom fizjologicznym panującym w naczyniu.

Przy stałych stężeniach Fg i trombiny na strukturę sieci fibrynowej wpływają różne czynniki zawarte w osoczu m.in. stężenie albuminy i fibronektyny. Dlatego zasadnym jest badanie żeli fibrynowych powstałych z osocza, pozwala to bowiem na ocenę ewentualnych interakcji zachodzących między składnikami osocza podczas formowania się sieci fibrynowej. Jak zaznaczono powyżej, na strukturę żelu fibrynowego ma wpływ stężenie Fg (185). Zwiększone stężenie Fg w osoczu powoduje przyspieszone odszczepianie fibrynopeptydu A (191), co powoduje tworzenie gęstej i zbitej sieci fibrynowej (192). Sieć utworzona w warunkach dużego stężenia Fg składa się z

grubych włókien (185), o zmniejszonej wrażliwości na fibrylizację. Fg oddziałuje ponadto na receptor dla plazminogenu, co dodatkowo zmniejsza podatność na lizę. Zmieniona aktywność Fg także może wpływać na strukturę i właściwości sieci fibrynowej (193).

Cienkie włókna, tworzące struktury o wysokim stopniu upakowania powstają w obecności trombospondyny, albuminy lub immunoglobulin dodanych do roztworu Fg. Natomiast w obecności czynnika płytkowego PF4,  $\beta$ -trombomoduliny powstała sieć fibrynowa charakteryzuje się obecnością włókien grubych z tendencją do tworzenia porów o dużej średnicy.

Do innych czynników modyfikujących strukturę skrzepu zalicza się aktywność FXIII i jego polimorfizm Val34Leu (179, 180). Aktywny FXIII 34Leu wpływa na strukturę i właściwości skrzepu w sposób zależny od poziomu Fg (194). W obecności FXIII34Leu skrzep fibrynowy powstaje szybciej i cechuje się cienkimi włóknami, małymi porami i zmniejszoną przepuszczalnością w stosunku do wariantu Val34. Dzieje się tak, ponieważ wczesne tworzenie wiązań krzyżowych fibryny przez FXIII 34Leu w czasie uwalniania fibrynopeptydu A hamuje agregację boczną fibryli, natomiast opóźnione tworzenie wiązań krzyżowych przez FXIII34Val umożliwia większą agregację boczną zanim ostatecznie się one wytworzą (179). Lim i wsp. wykazali, że przy dużych stężeniach fibrynogenu u nosicieli allelu Leu34 tworzą się skrzepy o zwiększonej przepuszczalności i luźniejszej strukturze w stosunku do osób z genotypem Val34Val (194).

Na właściwości skrzepu ma również wpływ szereg białek przyłączanych wiązaniem krzyżowym przez aktywny FXIII do łańcucha  $\alpha$  cząsteczki fibryny. Jedną z nich jest fibronektyna (Fn), glikoproteina pełniąca istotną rolę we wzroście i różnicowaniu komórek (195). W organizmie stwierdza się dwie formy fibronektyny - osoczową (pFn), produkowaną przez wątrobę i należąca do białek ostrej fazy oraz płodową, zwaną również tkankową (cFn), syntetyzowaną przez fibroblasty i inne komórki, wydzielaną do macierzy zewnątrzkomórkowej. Zwiększoną ekspresję cFn stwierdza się w zmienionych chorobowo tętnicach lub uszkodzonych np. balonem (196, 197), co wskazuje, że jest ona markerem uszkodzenia naczyń. Aktywny FXIII przyłącza do fibryny Fn, która zmienia właściwości mechaniczne skrzepu zwiększając grubość włókien i przepuszczalność skrzepu. Ponadto Fn ułatwia migrację i adhezję komórek do włókien skrzepu, przez co przyspiesza proces gojenia ran (198, 199). Z kolei kolagen przyłączany do fibryny stabilizuje macierz zewnątrzkomórkową tworzącą się w miejscu uszkodzenia tkanki.

Wysokie stężenia cholesterolu oraz frakcji lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL) (200) także mogą wpływać na strukturę sieci, czyniąc ją bardziej zbitą.

Ze zdolnością do penetracji struktury sieci fibrynowej wiąże się kolejna, poza przepuszczalnością, cecha skrzepu fibrynowego uwarunkowana m.in. jego budową - podatność na lizę. Najważniejszym enzymem fibrynolitycznym jest plazmina. Najważniejszym aktywatorem jej

zymogenu jest tkankowy aktywator plazminogenu (*tissue plasminogen activator* - tPA), natomiast inhibitorem aktywacji inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) oraz inne inhibitory plazminy i plazminogenezy takie jak  $\alpha_2$  antyplazmina czy TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*). Aktywacja plazminogenu jest zależna od trombiny i ulega przyspieszeniu w obecności usieciowanej fibryny (161). W sieciach utworzonych z cienkich i zbitych włókien działanie fibrynolityczne ulega osłabieniu. Może to wynikać przynajmniej częściowo z ograniczonej penetracji białek układu fibrynolitycznego i redukcji miejsc wiązania dla plazminogenu (200). Collet i wsp. wykazali, że szczególnie zbite żełe fibrynowe o małej przepuszczalności i słabej podatności na fibryrolizę powstają w osoczu pacjentów z zespołem nerczycowym. Stwierdza się u nich wysoki poziom osoczonego Fg i małe stężenie albuminy, co wpływa na współczynnik przepuszczalności i stosunek masa-długość włókna. Struktura gęstej sieci związana była z obniżoną prędkością fibrynolizy po dodaniu t-PA do roztworu. Związek ze zmniejszoną lizą wykazywał tu również podwyższony poziom triglicerydów (201). Wrażliwość skrzepu na lizę może być zmniejszona także przez białka będące inhibitorami fibrynolizy ( $\alpha_2$ - antyplazmina, PAI-1 i PAI-2) przyłączane do włókien fibrynowych (202, 203).

Coraz więcej danych eksperymentalnych i klinicznych wskazuje, że nieprawidłowa struktura skrzepu fibrynowego może odgrywać rolę w wielu jednostkach chorobowych (204). Zmienioną strukturę sieci fibrynowej stwierdza się np. u pacjentów z cukrzycą (205, 206). Ponadto struktura skrzepu fibrynowego wykazuje szczególnie istotne różnice między ludźmi zdrowymi i obciążonymi chorobami układu sercowo-naczyniowego. Zmniejszona przepuszczalność skrzepu fibrynowego wynikająca z obecności gęsto upakowanej sieci, charakteryzuje osoby, u których doszło do rozwoju choroby wieńcowej w stosunkowo młodym wieku (200), zwłaszcza te z zaawansowaną miażdżycą tętnic wieńcowych (186), jak również bliskich krewnych tych osób (207). Dotychczas nie opublikowano danych dotyczących właściwości skrzepu fibrynowego u pacjentów z inną lokalizacją miażdżycy, w tym z PAOD i chorobami zapalnymi naczyń, w tym z chorobą Buergera.

## 2. ZAŁOŻENIA I CELE BADANIA

Dostępne dane sugerują, że gęste upakowanie stosunkowo cienkich włókien fibrynowych wraz ze zmniejszoną podatnością na fibrylizę, charakteryzuje chorych na zaawansowaną miażdżycę tętnic wieńcowych. Nie wiadomo, czy właściwości skrzepu fibrynowego ulegają zmianie u osób z miażdżycą obejmującą pozasercowe łożyska naczyniowe, w tym z miażdżycą zarostową tętnic kończyn dolnych. Ponadto nieznane są również właściwości skrzepu w innych patologiach naczyniowych, takich jak np. choroba Buergera.

Ponieważ zmieniona struktura sieci fibrynowej wpływa na szybkość lizy skrzepu, jego właściwości mogą mieć duże znaczenie w zróżnicowanym przebiegu chorób naczyniowych oraz skuteczności leczenia fibrynolitycznego. Określenie czynników warunkujących strukturę skrzepu fibrynowego nie tylko w miażdżycy, ale także w innych chorobach naczyń, może pomóc wypracować zindywidualizowane podejście do terapii tych schorzeń.

Cele badania, to:

1. Ocena przepuszczalności skrzepu fibrynowego i jego podatności na lizę u chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych o różnym stopniu zaawansowania oraz pacjentów z chorobą Buergera.
2. Określenie czynników determinujących właściwości skrzepu fibrynowego w miażdżycy zarostowej tętnic i chorobie Buergera.

### 3. BADANI

W badaniu wzięło udział 16 kolejnych pacjentów z chorobą Buergera, w stadium remisji, w wieku 38-56 lat oraz 55 chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych w wieku 44-70 lat w stadium II wg Fontaine'a. Wszyscy oni leczyli się w Poradni Chorób Serca i Naczyń II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum UJ.

Przyjęto następujące kryteria włączenia do badania:

- Rozpoznanie miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych na podstawie:
  - wywiadu (chromanie przestankowe - II stopień zaawansowania miażdżycy zarostowej według klasyfikacji Fontaine'a)
  - badania fizykalnego
  - badań nieinwazyjnych: wskaźnik kostka-ramię poniżej 0,8 (dla kończyny o niższej wartości wskaźnika) w spoczynku lub w próbie marszowej na bieżni ruchomej o nachyleniu 10° i stałej prędkości 3,2 km/h (58)
  - badania angiograficznego (szczegóły w rozdziale Metody)
- Rozpoznanie choroby Buergera w oparciu o kryteria opracowane przez Shionoyę i Oliną (102, 133) przy zgodnych danych klinicznych i angiograficznych.

Kryteriami wykluczającymi były:

- wiek > 70 lat
- objawy świeżej infekcji
- choroba nowotworowa w wywiadzie
- niedawno przebyty epizod sercowo-naczyniowy (zawał serca, dławica niestabilna, udar mózgu) lub zabieg operacyjny w okresie krótszym niż 3 miesiące
- choroba współistniejąca jak -
  - niewydolność nerek (stężenie kreatyniny > 177 umol/l)
  - uszkodzenie wątroby (ALAT > 1,5 x górnej granicy normy)
- choroby autoimmunologiczne w wywiadzie
- wątpliwości, co do sprostania przez pacjenta wymogom badania

Grupę kontrolną dla chorych z PAOD stanowiło 30 osób bez objawów miażdżycy, dobranych pod względem wieku, bez objawów świeżej infekcji, choroby nowotworowej z ujemnym wywiadem w kierunku choroby niedokrwiennej serca, chromania przestankowego oraz udaru mózgu. Grupę

kontrolną dla choroby Buergera stanowiło 17 osób zdrowych, palących papierosy, dobranych pod względem płci i wieku.

Oceniając występowanie czynników ryzyka miażdżycy u badanych przyjęto niżej wymienione definicje:

Cukrzycę zdefiniowano w oparciu o kryteria rozpoznawcze Komitetu Ekspertów ds Rozpoznawania i Klasyfikacji Cukrzycy z 1997 roku zatwierdzone przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) w 1999 roku (208, 209).

Nadciśnienie zdefiniowano w oparciu o wytyczne siódmego raportu *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* (JNC7) z 2003 roku (210).

Obciążający wywiad rodzinny definiowano jako nagły zgon lub przebyty zawał serca u krewnego pierwszego stopnia (<65 roku życia dla kobiet i <55 roku życia dla mężczyzn).

Chorobę niedokrwienną serca definiowano jako przebycie zawału serca lub niestabilną dławicę piersiową udokumentowaną w karcie informacyjnej leczenia szpitalnego.

Uwzględniono przewlekle przyjmowane leki, a w ostatecznej analizie wzięto pod uwagę 2 najczęściej stosowane tj. kwas acetylosalicylowy i statyny.

## 4. METODY

W dniu kwalifikacji u wszystkich badanych przeprowadzono badanie lekarskie i oznaczono podstawowe parametry w krwi obwodowej: morfologię krwi, aminotransferazy, kreatyninę, glukozę, elektrolity, pełny lipidogram.

**4.1.** U chorych na miażdżycę zarostową i chorobę Buergera wykonano następujące **badania oceniające zaawansowanie zmian naczyniowych:**

- oznaczenie wskaźnika kostka/ramię przy użyciu manometru oraz przenośnego aparatu dopplerowskiego z głowicą 8 MHz (Dopplex II MD2, Huntleigh Healthcare Ltd, USA)
- test marszowy na bieżni ruchomej (Marquet Electr., USA) przy stałej prędkości przesuwu 3,2 km/h i nachyleniu 10° (58, 59)
- pomiar grubości warstwy wewnętrznej i środkowej tętnic szyjnych metodą ultrasonograficzną na aparacie Acuson Sequoia 512 (USA) z użyciem głowicy linearnej 6 MHz u pacjentów w pozycji leżącej. Określono grubość błony wewnętrznej i środkowej tętnic (kompleks intima-media). Pogrubienie tego kompleksu powyżej 1 mm lub 100% przyrost jego grubości w stosunku do prawidłowych przylegających segmentów ściany naczynia definiowano jako obecność blaszki miażdżycowej (211). Oceniono dystalny odcinek tętnicy szyjnej wspólnej (1 cm od opuszki), opuszkę i proksymalny odcinek tętnicy szyjnej wewnętrznej (1 cm od opuszki) obu stron.
- ocena angiograficznego zaawansowania zmian naczyniowych w kończynach dolnych za pomocą zaadaptowanej do potrzeb tego badania, metody oznaczania wskaźnika „odbioru naczyniowego” („*run-off score*” - ROS)(212). Wartość ROS podano w punktach wg następującego schematu: Naczyniom o najważniejszym znaczeniu dla ukrwienia kończyny, stanowiącym główne pnie - tętnicom biodrowym wspólnym, udowym wspólnym i podkolanowym -przyznano 3 punkty, tętnicy udowej powierzchownej 2 punkty, pozostałym tętnicom 1 punkt. Stopień zwężenia naczynia przedstawiono w skali 4 punktowej: 0 – naczynie bez zwężeń, 1- naczynie zwężone < 50%, 2- naczynie zwężone >50%, 3- naczynie niedrożne. W stosunku do naczyń podudzia zastosowano skalę 3 punktową (0-naczynie niezmiennione, 1-nieregularności ścian i zwężenia, 3-niedrożność). Wskaźnik „*run-off*” stanowi sumę iloczynów stopnia zwężenia i „ważności naczynia”. Arbitralnie przyjęto wartość ROS 27 jako oddzielającą podgrupę chorych na PAOD o „większym” i „mniejszym” zaawansowaniu choroby. ROS oszacowano na podstawie wykonanego w Pracowni Angiografii II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum UJ badania angiograficznego metodą dożylnego

wstrzyknięcia środka cieniującego do żył dołu łokciowego u wszystkich 55 pacjentów z miażdżycą zarostową i zadawalającą technicznie jakością obrazów. U pacjentów kwalifikowanych do przezskórnego leczenia inwazyjnego wykonywano angiografię metodą dotętniczego wstrzyknięcia kontrastu (34 chorych). Wszyscy pacjenci z chorobą Buergera (16 chorych) mieli wykonaną angiografię metodą dotętniczą. Badanie angiograficzne wykonano za pomocą aparatu Philips Integris V 3000 w trakcie diagnostyki obrazowej niedokrwienia kończyn. Ostateczna ocena angiografii była weryfikowana przez angiologa.

#### **4.2. OZNACZENIA LABORATORYJNE**

Krew do badań od pacjentów z miażdżycą zarostową kończyn dolnych oraz chorobą Buergera pobierano dwukrotnie w odstępie 3-6 miesięcy. U osób z grupy kontrolnej krew pobierano jednorazowo. Krew pobierano na czczo, co najmniej 14 godzin po ostatnim posiłku, za pomocą próżniowego zestawu firmy Becton-Dickinson do probówek z wersenianem sodowym, cytrynianem sodowym (3,2%) oraz bez antykoagulantu. Krew wirowano z prędkością 3500 obrotów/min przez 10 minut w temperaturze 4°C, a następnie rozdzielano na próbki o objętości 300 µl i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonywania dalszych analiz.

##### ***Badania podstawowe***

W dniu pobrania oznaczano morfologię pełnej krwi oraz parametry biochemiczne (stężenie glukozy, kreatyniny oraz lipidogram) w surowicy.

Morfologię krwi obwodowej oznaczano w automacie hematologicznym Sysmex K-1000 (ICN, Japonia).

Parametry biochemiczne oznaczano metodami enzymatycznymi w analizatorze Vitros 250 (Johnson & Johnson, USA).

Ponadto zostały oznaczone:

##### ***Wskaźniki stanu zapalnego***

- *Fibrynogen* - metodą koagulometryczną w osoczu cytrynianowym (zestaw Multifibren U, aparat BCT, Behring Coagulation Timer, Dade Behring, Niemcy) oraz nefelometrycznie (Dade Behring, Niemcy).
- *Białko C-reaktywne* - metodą nefelometryczną o wysokiej czułości w surowicy (Dade Behring, Niemcy).
- *Interleukina- 6* - metodą immunoenzymatyczną o wysokiej czułości w osoczu (ELISA, R & D Systems, Wielka Brytania).
- *fibronektyna osoczowa* (pFn) - metodą immunoenzymatyczną w osoczu (ELISA, American Diagnostica Inc, USA).



### **Markery uszkodzenia śródbłonna**

- *Cząsteczka przylegania międzykomórkowego* typu 1 (sICAM-1)- metodą immunoenzymatyczną w osoczu (ELISA, R & D Systems, Wielka Brytania).
- *fibronektyna komórkowa* (cFn)– metodą immunoenzymatyczną w osoczu (ELISA, Adeza Biomedical Inc, USA)

### **Markery fibrynolizy**

- całkowite stężenie antygenu tkankowego aktywatora plazminogenu w osoczu (total t-PA:Ag, ELISA, American Diagnostica Inc, USA)
- całkowite stężenie antygenu inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 w osoczu (PAI-1:Ag, ELISA, American Diagnostica Inc, USA)
- stężenie D-dimerów w osoczu (ELISA, American Diagnostica Inc, USA)

### **Marker generacji trombiny**

fibrynopeptyd A (FPA) metodą ELISA w osoczu (American Diagnostica Inc, USA)

U wszystkich uczestników badania oznaczono dwukrotnie:

#### **a) przepuszczalność skrzepów fibrynowych**

Porowatość żelu fibrynowego określano metodą Millsa i wsp. (207). Wstępnie, polistyrenową rureczkę o długości 2 cm przepłukiwano roztworem fibrynogenu ludzkiego w stężeniu 2 mg/ml (Sigma) i suszono przez 60 min, aby poprawić przyleganie właściwego skrzepu osocza. Skrzep fibrynowy został utworzony w rureczce ze 100 µl osocza cytrynianowego poprzez dodanie 1 U/ml ludzkiej trombiny (Sigma) i 20 mM chlorku wapnia. Następnie skrzep, w ustawionej pionowo rureczce (z zaklejonym dolnym otworem za pomocą Parafilmu), przechowywano w komorze wilgotnej przez 2 godziny (24 °C). Po przepłukaniu buforem przepuszczalność skrzepu określono w oparciu o pomiar objętości buforu [0,05 M Tris-HCl + 0,15 M NaCl, pH 7,5], który przeniknął przez żel przy różnym ciśnieniu hydrostatycznym w ciągu godziny. Następnie przepuszczano przez żel bufor zabarwiony błękitem bromofenolu, aby wykryć ewentualne przecieki buforu. Żele o niejednorodnym wybarwieniu lub przyściennym przecieku nie były uwzględniane w ostatecznej analizie. Przepuszczalność została wyrażona stałą Darcy'ego (188).

$$K_s = Q \times \eta \times L / A \times t \times p$$

$K_s$  - współczynnik przepuszczalności (stała Darcy'ego)

$Q$  - objętość przesączonego płynu (ml) o lepkości  $\eta$  (dyna x sec/cm<sup>2</sup>) w czasie  $t$  (s)

$L$  - długość kolumny żelu (cm)

$A$  - pole przekroju poprzecznego światła rureczki (cm<sup>2</sup>)

$p$  - wartość zastosowanego ciśnienia (dyna/cm) korelująca z odległością między poziomem buforu a górnym brzegiem żelu.

Jednostką  $K_s$  jest  $\text{cm}^2$ . Parametr ten daje pośrednio informacje o rozmiarach porów w sieci fibrynowej i pozwala w przybliżeniu szacować grubość włókien fibrynowych. Przepuszczalność układu zwykle maleje wraz ze spadkiem grubości włókna.

**b) Podatność skrzepu na fibrylizę** oceniono na podstawie seryjnych pomiarów stężenia D-dimerów w buforze przenikającym przez żeło (przygotowane tak, jak podano w punkcie a), do którego dodano rekombinowany t-PA (Boehringer Ingelheim) w stężeniu końcowym  $0,2 \mu\text{mol/l}$  z dodatkiem  $1 \text{ mg/ml}$  albuminy bydlęcej (Sigma). Próbki buforu o wcześniej opisanym składzie pobierano co 20 minut zgodnie z metodą opracowaną przez Colleta i wsp. (201).

W analizie uwzględniono następujące zmienne – czas rozpoczęcia lizy, czyli czas wykrycia po raz pierwszy oznaczalnych stężeń D-dimerów, czas zakończenia lizy, maksymalną szybkość narastania stężenia D-dimerów w początkowej fazie lizy ( $\max \Delta\text{DD}$ ) oraz maksymalne ich stężenie w fazie plateau ( $\max \text{DD}$ ). Po przeciętnie 80-120 min skrzep zapadał się, co uniemożliwiało dalszy pomiar stężenia D-dimerów. Oceniano także czas utrzymywania się integralności skrzepu w rurce.

Ze względu na uznany wpływ na właściwości skrzepu (179, 180) oznaczono **polimorfizm czynnika XIII Val34Leu** metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) wg. Balogha i wsp. (213). Oznaczono 3 warianty alleliczne jak następuje: LL – osoby homozygotyczne pod względem allelu Leu34, VL - heterozygoty o genotypie Val34Leu oraz VV – osoby homozygotyczne pod względem allelu Val34.

## 5. ANALIZA STATYSTYCZNA

Obliczenia wykonano na komputerze IBM PC za pomocą programu *STATISTICA 6.0 PL*. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej z odchyleniem standardowym (SD). Aby porównać zmienne między grupami zastosowano test t Studenta, a przypadku braku rozkładu normalnego test Manna-Whitney'a. Dla sprawdzenia czy rozkład zmiennej jest normalny zastosowano test Shapiro-Wilka. Przy porównaniu trzech grup zastosowano analizę wariancji (ANOVA), a w przypadku braku normalności test Kruskala-Wallisa. Do opisu korelacji między zmiennymi wykorzystano współczynnik korelacji Persony lub Spearmana. Zmienne kategoryczne porównano za pomocą testu Chi-kwadrat ( $\chi^2$ ). Za istotne przyjęto efekty, dla których wartość  $p$  wynosiła  $< 0,05$ .

## 6. WYNIKI

### 6.1 PORÓWNANIE GRUP CHORYCH I GRUP KONTROLNYCH

#### PAOD i grupa kontrolna (PAODK)

W grupie chorych z PAOD stwierdzono częstsze występowanie czynników ryzyka takich jak palenie tytoniu, nadciśnienie, cukrzyca i dyslipidemia. Ponadto pacjenci z PAOD charakteryzowali się zmiernie wyższymi stężeniami markerów stanu zapalnego (Fg, IL-6) oraz różnili się pod względem częstości przyjmowania leków w stosunku do pacjentów z grupy kontrolnej (tabela 1).

**Tab.1.** Porównanie chorych na PAOD z grupą kontrolną (PAODK) pod względem danych demograficznych, czynników ryzyka, wskaźników stanu zapalnego i przyjmowanych leków. Wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi lub wartości bezwzględne (%).

	PAOD	PAODK	WARTOŚĆ P
Mężczyźni, n (%)	48(82,7)	20 (66,67)	0,02
Wiek, (lata)	55(±6,5)	54,4 (±6,5)	0,69
BMI, kg/m <sup>2</sup>	24,2 (±3,5)	26,4 (±3,41)	0,006
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	46 (83,6)	0 (0,0)	0,00001
Cukrzyca, n (%)	10 (18,2)	0 (0,0)	0,014
Palenie tytoniu (akt), n (%)	40 (72,7)	0 (0,0)	0,00001
TC, mmol/l	5,73 (±1,46)	5,0 (±0,77)	0,009
LDL-C, mmol/l	3,46 (±1,31)	2,94 (±0,72)	0,06
HDL-C, mmol/l	1,41 (±0,53)	1,39 (±0,24)	0,51
TG, mmol/l	1,91 (±1,22)	1,3 (±0,36)	0,03
Fibrynogen, g/l	3,57(±0,95)	2,53 (±0,4)	0,000001
CRP, mg/l	3,22 (±5)	1,39 (±0,54)	0,3
IL-6, pg/ml	3,07 (±3,1)	1,59 (±0,73)	0,006
pFn, mg/dl	0,32 (±0,05)	0,34 (±0,08)	0,17
Aspiryna, n (%)	46 (83,6)	0 (0,0)	0,00001
Statyna, n (%)	37 (67,3)	0 (0,0)	0,00001

Celem potwierdzenia stabilności markerów zapalnych u 34 chorych na miażdżycę zarostową wykonano po 3-6 miesiącach powtórne oznaczenie stężenia Fg, CRP i IL-6. Uzyskane wyniki nie

różniły się istotnie statystycznie od parametrów wyjściowych (danych nie pokazano). W grupie PAOD stwierdzono znamienne wyższe stężenia wszystkich analizowanych parametrów krzepnięcia, fibrynolizy oraz dysfunkcji śródbłonka, z wyjątkiem sICAM-1, w stosunku do pacjentów z grupy kontrolnej (tabela 2).

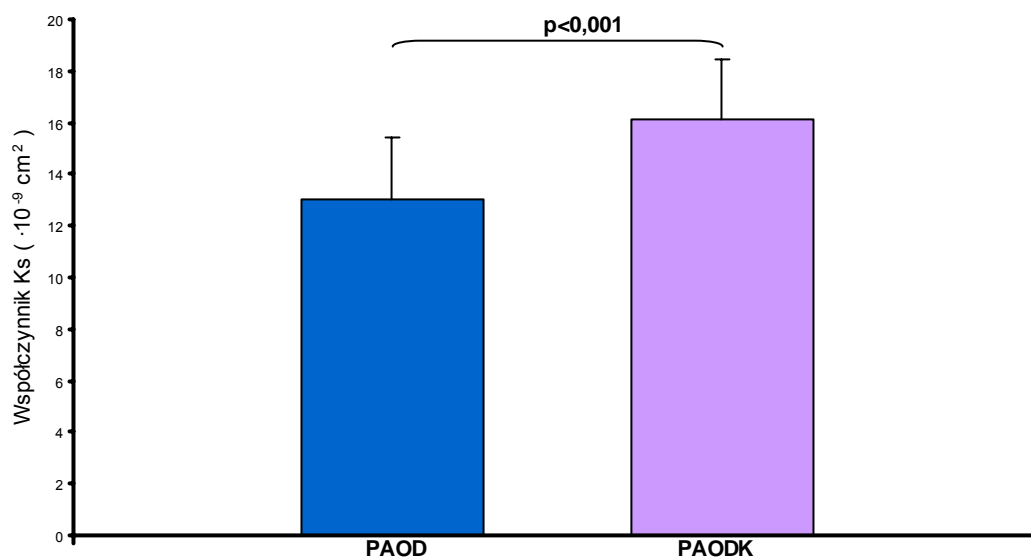
**Tab.2.** Wybrane parametry dysfunkcji śródbłonka, krzepnięcia i fibrynolizy u chorych na PAOD i grupie kontrolnej (PAODK), przedstawione jako średnie z odchyleniami standardowymi.

	PAOD	PAODK	WARTOŚĆ P
cFn, µg/ml	1,71 (±0,34)	1,23 (±0,2)	0,000001
sICAM-1, ng/ml	259,5 (±43)	238,3 (±29)	0,057
tPA, ng/ml	10,1 (±2,43)	5,68 (±1,34)	0,000001
PAI-1, ng/ml	16,5 (±6,7)	8,87 (±2,0)	0,000001
FPA, ng/ml	4,35 (±0,8)	3,21 (±0,74)	0,000001

### ***Badania charakteryzujące skrzep fibrynowy***

#### *Przepuszczalność skrzepów fibrynowych*

Współczynnik przepuszczalności w grupie chorych na PAOD był znamienne mniejszy (o średnio 19%) w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 7).



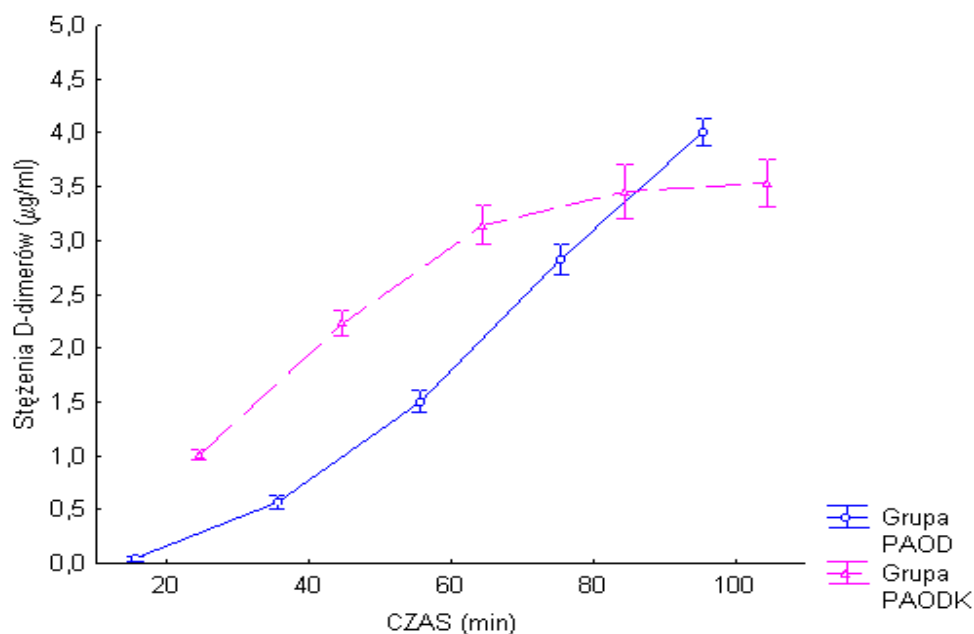
**Ryc. 7.** Przepuszczalność skrzepów fibrynowych w poszczególnych grupach wyrażona średnią wartością współczynnika przepuszczalności (Ks) (±SD), p<0,001. PAOD- pacjenci z PAOD (n=55), PAODK – grupa kontrolna PAOD (n=30).

W grupie PAOD przepuszczalność skrzepu wykazywała odwrotną korelację ze stężeniem Fg ( $r=-0,35$ ;  $p=0,008$ ) oraz stężeniem PAI-1 ( $r=-0,55$ ;  $p=0,00001$ ). Nie stwierdzono zależności między współczynnikiem Ks a wiekiem, profilem lipidowym oraz markerami zapalenia.

W grupie kontrolnej stwierdzono znamienne odwrotną korelację przepuszczalności skrzepu z wiekiem ( $r=-0,74$ ;  $p=0,000003$ ), stężeniem cholesterolu całkowitego ( $r=-0,4$ ;  $p=0,02$ ) i triglicerydów ( $r=-0,55$ ;  $p=0,001$ ) oraz stężeniem Fg ( $r=-0,75$ ;  $p=0,000001$ ) i markerów stanu zapalnego jak CRP ( $r=-0,77$ ;  $p<0,000001$ ) i IL-6 ( $r=-0,59$ ;  $p=0,0005$ ). Przepuszczalność skrzepu wykazywała również odwrotną i silną zależność ze stężeniem fibronektyny komórkowej ( $r=-0,84$ ;  $p<0,000001$ ) i osoczowej ( $r=-0,69$ ;  $p=0,00002$ ).

### Podatność na lizę

Stężenia D-dimerów były znamienne mniejsze w grupie PAOD w stosunku do grupy kontrolnej ( $p<0,000001$ ) od początku pomiaru, czyli od 20 min i utrzymywały się na niższym poziomie do końca obserwacji lizy skrzepu w grupie kontrolnej (ryc. 8). W grupie chorych na miażdżycę później pojawiały się mierzalne stężenia D-dimerów (w 20 min 16% pacjentów z PAOD vs 100% grupy kontrolnej) i później występował ich maksymalny przyrost (max  $\Delta$ DD). Ostatnie mierzalne stężenia D-dimerów stwierdzono u 18 (60%) pacjentów z grupy kontrolnej, podczas gdy w grupie chorych z PAOD mierzalne stężenia D-dimerów stwierdzano do końca obserwacji u wszystkich chorych (120 min, tabela 3).



**Ryc. 8.** Porównanie średnich wartości stężeń D-dimerów ( $\mu\text{g/ml}$ ) w czasie lizy skrzepu pod wpływem rt-PA między pacjentami z PAOD ( $n=55$ ) i grupą kontrolną (PAODK,  $n=30$ ). Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedział ufności. Dla każdego z punktów obserwacji  $p<0,0001$ . Liza skrzepu zakończona w grupie kontrolnej w 100 min.

**Tab. 3.** Liczby pacjentów (%) z PAOD i PAODK z mierzalnymi stężeniami D-dimerów na początku (20, 40 min) i pod koniec (100, 120 min) trwania lizy skrzepu (\*p=0,001).

	20 min *	40 min *	100 min *	120 min
<b>PAOD</b>	9 (16)	49 (89)	55 (100)	55 (100)
<b>PAODK</b>	30 (100)	30 (100)	18 (60)	0

Maksymalny przyrost stężenia D-dimerów w grupie PAOD korelował ze współczynnikiem przepuszczalności ( $r=0,42$ ;  $p=0,001$ ). Podobna zależność występowała w grupie kontrolnej PAODK ( $r=0,55$ ;  $p=0,001$ ). Nie stwierdzono istotnej korelacji między maksymalnym tempem narastania stężenia D-dimerów a innymi ocenianymi parametrami w obu grupach.

#### *Polimorfizm czynnika XIII*

Polimorfizm Val34Leu FXIII oznaczono u 42 pacjentów z PAOD i wszystkich osób w grupie kontrolnej. W grupie chorych na PAOD stwierdzono obecność genotypu LL u 3 chorych (7,1%). Genotyp VL miało 19, a VV 20 pacjentów (odpowiednio 45% i 47%). W grupie kontrolnej genotyp LL stwierdzono u 1 pacjenta (3,3%), u 11 genotyp VL (36,7%), a u 18 genotyp VV (60%).

W porównywanych grupach nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie wariantów allelicznych polimorfizmu FXIII. W obrębie grupy kontrolnej stwierdzono znamienne niższy współczynnik przepuszczalności u nosicieli allelu L (genotypy LL i VL) w stosunku do osób z genotypem VV odpowiednio ( $K_s$  14,4 vs 17,25 x 10<sup>-9</sup> cm<sup>2</sup>,  $p<0,00001$ ). Nie stwierdzono natomiast znamiennej zależności między polimorfizmem FXIII a podatnością na lizę. W grupie chorych na PAOD polimorfizm Val34Leu FXIII nie miał wpływu na badane właściwości skrzepu fibrynowego.

## TAO i grupa kontrolna (TAOK)

Porównywane grupy nie różniły się pod względem cech demograficznych i występowania czynników ryzyka miażdżycy z wyjątkiem aktualnego palenia tytoniu i stężenia fibrynogeny (tabela 4).

**Tab. 4.** Porównanie chorych na TAO z grupą kontrolną (TAOK) pod względem danych demograficznych, czynników ryzyka, wskaźników stanu zapalnego i przyjmowanych leków. Dane przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi lub wartości bezwzględne (%).

	TAO	TAOK	WARTOŚĆ P
Mężczyźni (%)	9 (56,2)	10 (58,8)	0,88
Wiek	45,9 (±5,6)	45,2 (±4,6)	0,67
BMI, kg/m <sup>2</sup>	26,2 (±5,6)	27,7 (±4,68)	0,41
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	2 (12,5)	0	0,14
Cukrzyca, n (%)	0	0	-
Palenie tytoniu (akt), n (%)	6 (37,5)	17 (100)	0,0005
TC, mmol/l	5,15 (±1,12)	5,16 (±0,87)	0,94
LDL-C, mmol/l	2,92 (±0,89)	2,95 (±0,96)	0,92
HDL-C, mmol/l	1,37 (±0,5)	1,37 (±0,2)	0,59
TG, mmol/l	1,8 (±1)	1,77 (±0,78)	0,84
Fibrynogen, g/l	3,64 (±1,23)	2,45 (±0,54)	0,0004
CRP, mg/l	3,43 (±6,7)	1,38 (±0,71)	0,62
pFn, mg/dl	0,46 (±0,06)	0,33 (±0,06)	0,000001
IL-6, pg/ml	3,7 (±3,6)	2,25 (±0,77)	0,36
Aspiryna, n (%)	7 (43,8)	0	0,005
Statyna, n (%)	2 (12,5)	0	0,15

Podobnie jak w grupie chorych na PAOD, u 13 pacjentów z TAO celem oceny stabilności oznaczonych markerów zapalnych wykonano po 3-6 miesiącach powtórne oznaczenie stężenia Fg, CRP i IL-6. Uzyskane wyniki nie różniły się istotnie statystycznie od parametrów wyjściowych (danych nie pokazano).

U pacjentów z TAO stwierdzono większe stężenia tPA, PAI-1 i FPA niż w grupie kontrolnej. Stężenie cFn było ponad dwa razy większe u chorych na TAO niż w grupie kontrolnej, podczas gdy poziomy sICAM-1 były w obu grupach podobne (tabela 5).

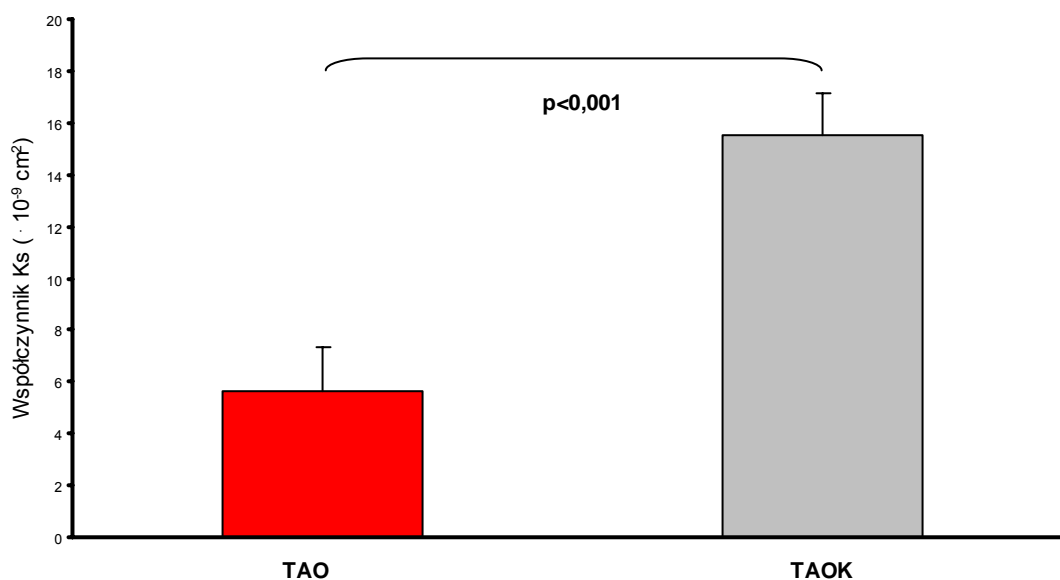
**Tab. 5.** Wybrane parametry uszkodzenia śródblonka, krzepnięcia i fibrynolizy w grupie TAO i grupie kontrolnej (TAOK) (średnie z odchyleniami standardowymi).

	TAO	TAOK	WARTOŚĆ P
cFn, µg/ml	4,47 (±0,47)	1,17 (±0,16)	0,000001
sICAM-1, ng/ml	239,8 (±56)	211,6 (±29,4)	0,24
tPA, ng/ml	10,7 (±2,2)	4,36 (±1,13)	0,000001
PAI-1, ng/ml	18,9 (±5,56)	8,88 (±1,15)	0,000001
FPA, ng/ml	4,12 (±0,6)	2,55 (±0,43)	0,000001

### **Badania charakteryzujące skrzep fibrynowy**

#### *Przepuszczalność skrzepów fibrynowych*

Przepuszczalność skrzepu wyrażona Ks była mniejsza ponad 2 razy u chorych na TAO w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 9).



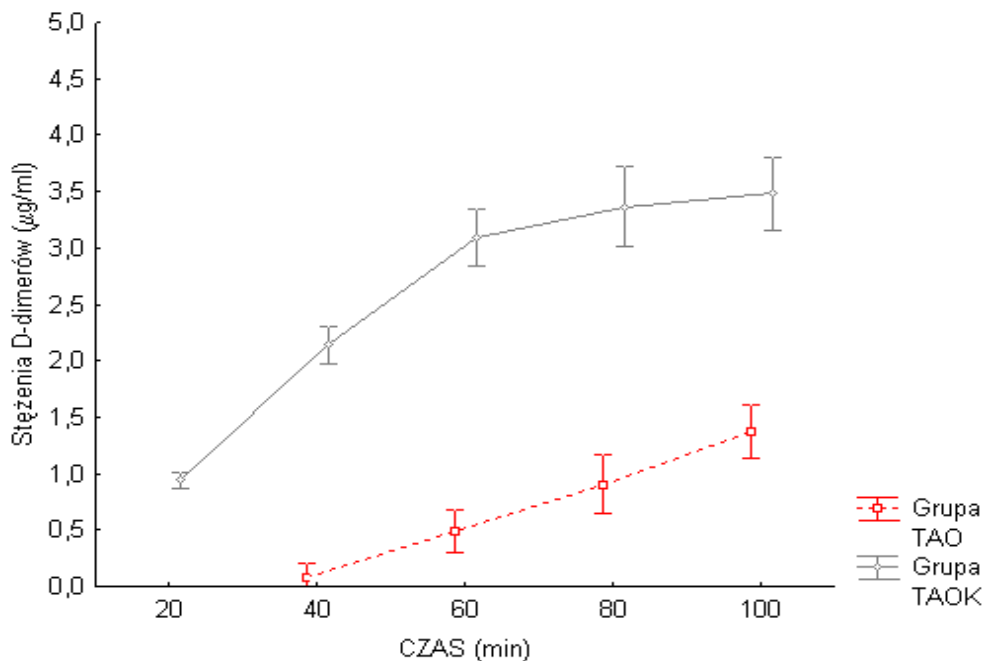
**Ryc. 9.** Przepuszczalność skrzepów fibrynowych w grupie chorych z TAO i TAOK wyrażona średnią wartością współczynnika przepuszczalności (Ks),  $p < 0,001$ . TAO- pacjenci z TAO (n=16), TAOK – grupa kontrolna TAO (n=17).

W grupie TAO współczynnik przepuszczalności wykazywał znamiennej odwrotną korelację ze stężeniem fibronektyny osoczowej ( $r = -0,77$ ;  $p = 0,0004$ ), podczas gdy w grupie kontrolnej (TAOK) stwierdzono odwrotną zależność Ks od stężenia fibrynogenu ( $r = -0,7$ ;  $p = 0,0006$ ) oraz fibronektyny komórkowej ( $r = -0,85$ ;  $p = 0,00001$ ). Pozostałe wskaźniki we krwi obwodowej ani wiek nie wiązały się z wartością Ks w sposób znamiennej.



### Podatność na lizę

Stwierdzono wyraźnie osłabioną lizę skrzepów u pacjentów z TAO. Przebieg lizy skrzepu wyrażony pomiarami stężeń D-dimerów w poszczególnych punktach czasowych w grupie pacjentów z TAO i w grupie kontrolnej przedstawia rycina 10. Maksymalny przyrost stężenia D-dimerów był znacznie mniejszy w grupie chorych z TAO w stosunku do pacjentów z grupy kontrolnej (0,029 vs 0,0625  $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$ ,  $p=0,01$ ). Pierwsze mierzalne stężenia D-dimerów w trakcie lizy skrzepu wystąpiły w grupie kontrolnej już w 20 min, podczas gdy w grupie pacjentów z chorobą Buergera dopiero w 40 min obserwacji lizy. Liza skrzepu zakończyła się w grupie kontrolnej w 80 min u 8 pacjentów (47%) i w 100 min u pozostałych 9 (53%). U chorych z TAO obserwację zakończono po 120 min (tabela 6). W grupie TAO stwierdzono korelację podatności na lizę z przepuszczalnością [max  $\Delta\text{DD}$  ( $r=0,59$ ;  $p=0,01$ )]. W grupie kontrolnej (TAOK) stwierdzono zależność Ks ze stężeniem D-dimerów w 20, 40 i 60 min lizy skrzepu [DD20 ( $r=0,5$ ;  $p=0,02$ ), DD40 ( $r=0,6$ ;  $p=0,01$ ), DD60 ( $r=0,5$ ;  $p=0,02$ )] ale nie maksymalnym ich przyrostem.



**Ryc. 10.** Porównanie średnich wartości stężeń D-dimerów ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) w czasie lizy skrzepu pod wpływem rt-PA między grupami TAO ( $n=16$ ) i TAOK ( $n=17$ ). Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedział ufności. Dla każdego z punktów obserwacji  $p<0,001$ . Liza skrzepu zakończona w grupie kontrolnej w 100 min.

**Tab. 6.** Liczby pacjentów (%) z TAO i TAOK z mierzalnymi stężeniami D-dimerów na początku (20, 40 min) i pod koniec (100, 120 min) trwania obserwacji lizy skrzepu (\* p=0,001)

	20 min	40 min *	100 min *	120 min
<b>TAO</b>	0	5 (31)	16 (100)	16 (100)
<b>TAOK</b>	17 (100)	17 (100)	9 (52)	0

### *Polimorfizm czynnika XIII*

Polimorfizm Val34Leu FXIII oznaczono u wszystkich 17 osób z grupy kontrolnej oraz u 10 chorych na TAO. U pacjentów z chorobą Buergera nie stwierdzono obecności genotypu LL. Czterech chorych miało genotyp VL (40%), a 6 genotyp VV (60%). U osób z grupy kontrolnej również nie stwierdzono genotypu LL. Siedem osób posiadało genotyp VL (41%) a 10 genotyp VV (49%). W obu grupach rozkład wariantów allelicznych FXIII był podobny.

Nie stwierdzono, aby u nosicieli allelu L przepuszczalności skrzepu albo jego podatność na lizę różniły się znamienne statystycznie od wartości w grupie homozygot VV zarówno w grupie TAO, jak i TAOK.

## 6.2 PORÓWNANIE GRUP CHORYCH NA PAOD I TAO

Jak oczekiwano, chorzy na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych byli średnio 10 lat starsi niż ci z chorobą Buergera. W obu grupach dominowali mężczyźni. Jednakże w grupie PAOD przewaga mężczyzn była znacznie większa w porównaniu z TAO. Pacjenci z PAOD w porównaniu z grupą TAO częściej chorowali na nadciśnienie tętnicze i cukrzycę oraz częściej palili papierosy i mieli obciążający wywiad rodzinny. Nie obserwowano różnic między grupami w profilu lipidowym ani stężeniach markerów zapalenia. Ponadto chorzy na PAOD częściej przyjmowali aspirynę i statynę (tabela 7).

**Tab. 7.** Wyjściowa charakterystyka badanych grup pacjentów. W tabeli podano wartości średnie z odchyleniami standardowymi (SD) lub wartości bezwzględne (%).

	PAOD	TAO	WARTOŚĆ P
Mężczyźni, n (%)	48 (82,7)	9 (56,2)	0,0077
Wiek, lata	55(±6,5)	45,9 (±5,6)	0,000004
BMI, kg/m <sup>2</sup>	24,2 (±3,5)	26,2 (±5,6)	0,09
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	46 (83,6)	2 (12,5)	0,00001
Choroba niedokrwienna serca (n)	25 (45,5)	0	0,0001
Cukrzyca, n (%)	10 (18,2)	0	0,07
Obciążający wywiad rodzinny, n (%)	26 (47,3)	2(12,5)	0,01
Palenie tytoniu (akt.), n (%)	40 (72,7)	6 (37,5)	0,01
TC, mmol/l	5,73 (±1,46)	5,15 (±1,12)	0,17
LDL-C, mmol/l	3,46 (±1,31)	2,92 (±0,89)	0,15
HDL-C, mmol/l	1,41 (±0,53)	1,37 (±0,5)	0,87
TG, mmol/l	1,91 (±1,22)	1,8 (±1)	0,92
Fibrynogen, g/l	3,57(±0,95)	3,64 (±1,23)	0,63
CRP, mg/l	3,22 (±5)	3,43 (±6,7)	0,54
IL-6, pg/ml	3,07 (±3,1)	3,7 (±3,6)	0,38
pFn, mg/dl	0,32 (±0,05)	0,46 (±0,06)	0,000001
Aspiryna, n (%)	46 (83,6)	7 (43,8)	0,0019
Statyna, n (%)	37 (67,3)	2 (12,5)	0,0002

### **Wskaźniki niedokrwienia kończyn i miażdżycy w tętnicach zewnątrzczaszkowych**

Porównując obiektywne parametry ukrwienia kończyn między grupami chorych, stwierdzono znamiennej różnicę w dystansie chromania na bieżni ( $p=0,01$ ), nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w wartościach wskaźnika kostka – ramię. Również różnica wartości wskaźnika odbioru naczyniowego (ROS) nie była znamiennej statystycznie, mimo że był on większy u chorych na PAOD o 68 % w stosunku do pacjentów z TAO (tabela 8).

U chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych częściej stwierdzano zmiany w tętnicach szyjnych tj. pogrubienie kompleksu intima-media oraz blaszki miażdżycowe - niż w grupie chorych na TAO ( $p=0,003$ ).

**Tab. 8.** Porównanie zaawansowania zmian naczyniowych w obu grupach chorych (średnie  $\pm$ SD) lub wartości bezwzględne

	<b>PAOD</b>	<b>TAO</b>	<b>WARTOŚĆ P</b>
<b>Dystans chromania na bieżni, m</b>	109,1 ( $\pm$ 79)	49,1 ( $\pm$ 90)	0,01
<b>ABI</b>	0,49 ( $\pm$ 0,16)	0,58 ( $\pm$ 0,22)	0,22
<b>Zaawansowanie zmian w angiografii (wskaźnik „run off”)</b>	22,6 ( $\pm$ 12,4)	15,5 ( $\pm$ 2,9)	0,32
<b>Zmiany w tętnicach szyjnych, n (%)</b>	41 (74)	4 (25)	0,003

#### *Chromanie przestankowe*

Pacjenci z TAO charakteryzowali się krótszym dystansem chromania niż chorzy na PAOD (odpowiednio śr. 49,1 m i 109,1 m). Mężczyźni chorzy na PAOD pokonywali dłuższy dystans niż kobiety ( $p=0,03$ ), podobnie jak pacjenci z nadciśnieniem tętniczym w stosunku do osób bez nadciśnienia ( $p=0,02$ ). W grupie TAO chromanie przestankowe korelowało z przyjmowaniem aspiryny tj. pacjenci otrzymujący kwas acetylosalicylowy charakteryzowali się dłuższym dystansem chromania (śr. 109 m) niż chorzy nie przyjmujący leku (śr. 26 m) ( $p=0,02$ ).

#### *Wskaźnik kostka-ramię*

Średnia wartość ABI była podobna w grupie PAOD w porównaniu do pacjentów z TAO ( $p=0,22$ ). U chorych z PAOD wskaźnik kostka-ramię wykazywał odwrotną zależność ze wskaźnikiem odbioru naczyniowego ( $r=-0,67$ ;  $p=0,01$ ). W grupie TAO, wartość ABI korelowała silnie i ujemnie ze stężeniem ICAM-1 ( $r=-0,9$ ;  $p=0,02$ ). Nie stwierdzono istotnych zależności między wartością ABI a profilem lipidowym lub markerami zapalenia oraz hemostazy zarówno w grupie PAOD, jak i TAO.

### *Wskaźnik odbioru naczyniowego (ROS)*

U pacjentów z PAOD wskaźnik odbioru naczyniowego wykazywał odwrotną korelację z ABI ( $r=-0,67$ ;  $p=0,01$ ). Ponadto stwierdzono zależność między ROS a stężeniem fibronektyny komórkowej ( $r=0,6$ ;  $p=0,02$ ) oraz PAI-1 ( $r=0,89$ ;  $p=0,00004$ ). W grupie TAO nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji wskaźnika ROS z badanymi zmiennymi.

### ***Badania laboratoryjne***

Stężenia cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL, HDL i triglicerydów nie wykazywały istotnych różnic między pacjentami z PAOD i TAO (tabela 7), jak również nie wykazywały znamiennej korelacji z badanymi cechami skrzepu fibrynowego.

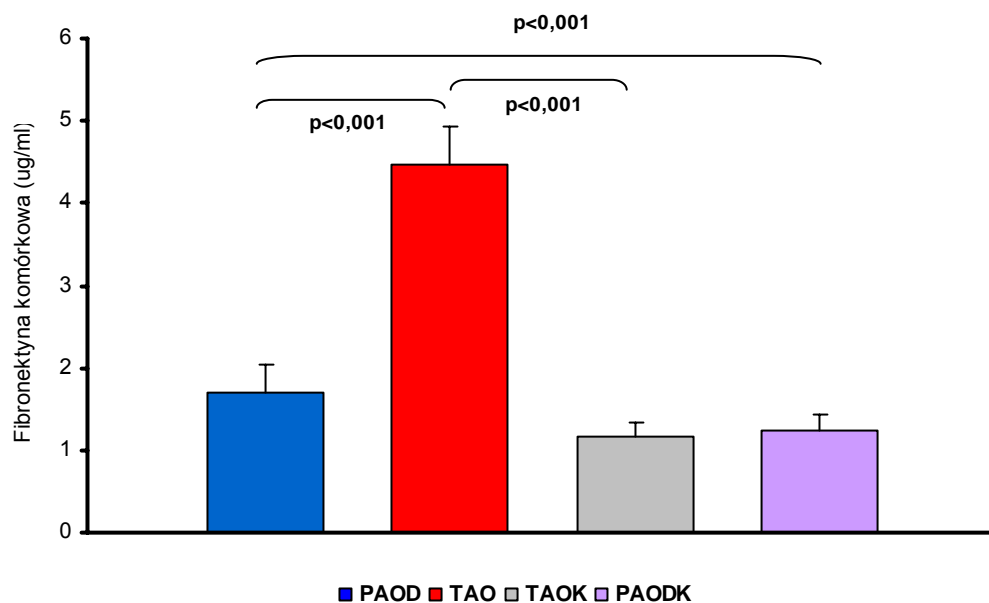
### *Wskaźniki stanu zapalnego*

Średnie stężenia Fg zarówno u pacjentów z PAOD, jak i TAO były stosunkowo wysokie, ale nie różniły się znamienne. Stężenia CRP i IL-6 były podobne w obu grupach i nie różniły się znamienne. Stężenie fibronektyny osoczowej było znamienne większe u chorych na TAO w porównaniu z pacjentami z PAOD ( $p<0,000001$ , tabela 7).

### *Markery uszkodzenia śródbłonna*

Średnie stężenie sICAM-1 w obu grupach chorych było podobne (tabela 9). W grupie chorych z PAOD stężenie sICAM-1 wykazywało odwrotną zależność ze stężeniem IL-6 ( $r=-0,44$ ;  $p=0,01$ ). Ponadto stwierdzono odwrotną zależność tego markera z wartością ABI ( $r=-0,9$ ;  $p=0,02$ ) oraz stężeniem fibronektyny komórkowej ( $r=-0,87$ ;  $p=0,009$ ) u pacjentów z TAO.

Stężenie fibronektyny komórkowej było prawie trzykrotnie wyższe u pacjentów z chorobą Buergera w stosunku do chorych na PAOD ( $p<0,000001$ , ryc. 11). Nie stwierdzono natomiast u chorych na TAO znamiennej korelacji tego markera z żadnym z wskaźników zaawansowania niedokrwienia. W grupie pacjentów z PAOD stężenie cFn wykazywało zależność ze wskaźnikiem odbioru naczyniowego ( $r=0,6$ ;  $p=0,02$ ).



**Ryc. 11.** Stężenie fibronektyny komórkowej w poszczególnych grupach pacjentów (wartości średnie  $\pm$ SD). Pacjenci z PAOD (n=55), TAO (n=16); grupy kontrolne: PAODK (n=30) i TAOK (n=17).

#### Inne badania

Stężenia markera generacji trombiny, fibrynopeptydu A, jak i markerów fibrylizy tPA oraz PAI-1 nie różniły się istotnie między grupami chorych (tabela 9).

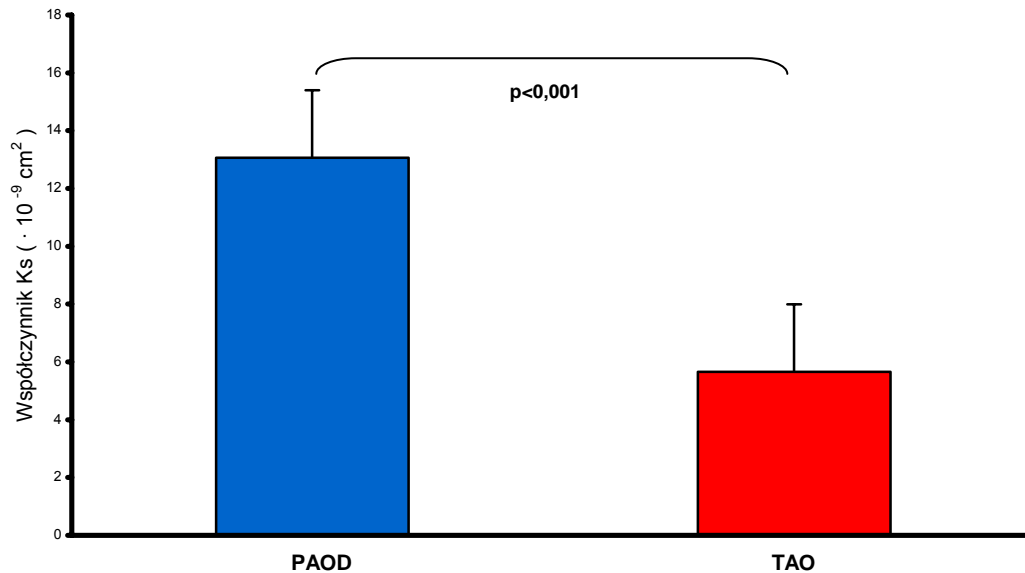
**Tab. 9.** Wybrane parametry krzepnięcia, fibrylizy oraz uszkodzenia śródblonka w badanych grupach chorych. Dane przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi.

	PAOD	TAO	WARTOŚĆ P
cFn, $\mu$ g/ml	1,71 ( $\pm$ 0,34)	4,47 ( $\pm$ 0,47)	<0,000001
sICAM-1, ng/ml	259,5 ( $\pm$ 43)	239,8 ( $\pm$ 56)	0,32
tPA, ng/ml	10,1 ( $\pm$ 2,43)	10,7 ( $\pm$ 2,2)	0,41
PAI-1, ng/ml	16,5 ( $\pm$ 6,7)	18,9 ( $\pm$ 5,56)	0,2
FPA, ng/ml	4,35 ( $\pm$ 0,8)	4,12 ( $\pm$ 0,6)	0,29

## Badania charakteryzujące skrzep fibrynowy

### Przepuszczalność skrzepów fibrynowych

Jak pokazano na ryc. 12, przepuszczalność skrzepów fibrynowych wyrażona współczynnikiem przepuszczalności (Ks) była ponad dwukrotnie mniejsza (o 131%) u chorych na TAO w porównaniu do chorych na PAOD ( $p < 0,000001$ ).



**Ryc. 12.** Przepuszczalność skrzepów fibrynowych w grupach chorych z PAOD i TAO wyrażona średnią wartością współczynnika przepuszczalności (Ks) ( $\pm$ SD),  $p < 0,001$ . PAOD- pacjenci z PAOD ( $n=55$ ), TAO pacjenci z TAO ( $n=16$ ).

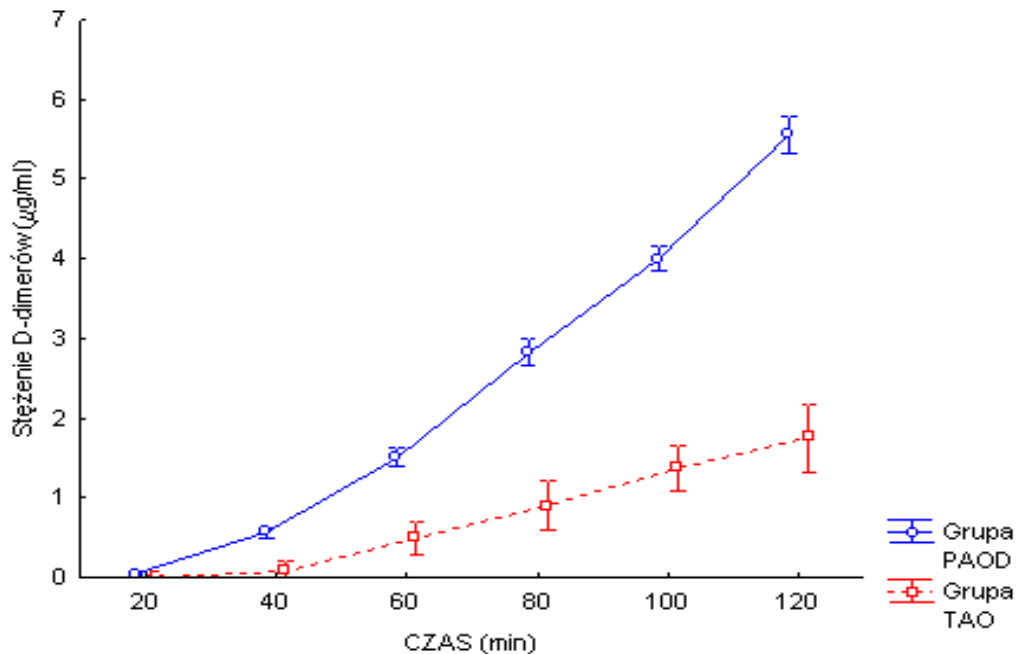
Porównując właściwości skrzepów z zaawansowaniem zmian naczyniowych w grupie chorych na PAOD wykazano odwrotną zależność przepuszczalności skrzepu (Ks) z zaawansowaniem zmian w tętnicach kończyn (ROS) ( $r = -0,5$ ;  $p = 0,00007$ ). Chorzy na PAOD z większym zaawansowaniem zmian w angiografii ( $ROS \geq 27$ ) mieli mniejszą przepuszczalność skrzepów niż osoby o mniej zaawansowanych zmianach ( $ROS < 26$ ) odpowiednio (Ks 11,8 i 13,8  $\times 10^{-9} \text{ cm}^2$ ,  $p = 0,001$ ). Przyjęta arbitralnie wartość 27 stanowiła połowę maksymalnego ROS w grupie PAOD. Korelacja przepuszczalności z dystansem chromania w grupie PAOD nie osiągnęła znamienności statystycznej ( $p = 0,08$ ), natomiast była istotna i silna w grupie chorych z TAO ( $r = 0,9$ ;  $p = 0,002$ ).

W grupie pacjentów z TAO poza dystansem chromania stwierdzono korelację przepuszczalności z podatnością na liżę [max  $\Delta$ DD ( $r = 0,59$ ;  $p = 0,01$ )] oraz przyjmowaniem aspiryny ( $p = 0,03$ ).

W obu grupach nie stwierdzono zależności między właściwościami skrzepu a obecnością zmian w tętnicach szyjnych.

### Podatność na lizę

Podatność na lizę wyrażona maksymalnym przyrostem stężenia D-dimerów była wyraźnie mniejsza w grupie chorych na TAO w stosunku do pacjentów z miażdżycą (0,58 vs 1,7  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,01$ ). W grupie TAO później pojawiły się mierzalne stężenia D-dimerów i ich wartości w trakcie lizy skrzepu były wyraźnie mniejsze niż u pacjentów z PAOD już od 40 min pomiaru (0,029 vs 0,085  $\mu\text{g/ml/min}$ ,  $p=0,000001$ ). Ta znamienna różnica utrzymywała się w kolejnych punktach czasowych aż do końca obserwacji (120 min). Po pierwszych 20 min lizy różnice w stężeniu D-dimerów nie osiągnęły znamienności statystycznej ( $p=0,06$ , tabela 10).



**Ryc. 13.** Porównanie średnich wartości stężeń D-dimerów ( $\mu\text{g/ml}$ ) w czasie lizy skrzepu pod wpływem rt-PA między grupą chorych na PAOD ( $n=55$ ) i TAO ( $n=16$ ). Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedział ufności. Dla każdego z punktów obserwacji  $p<0,001$ . Obserwacja zakończona po 120 min.

**Tab.10.** Liczby pacjentów (%) w poszczególnych grupach chorych z mierzalnymi stężeniami D-dimerów na początku (20, 40 min) i pod koniec (100,120 min) trwania lizy skrzepu. (\* $p=0,001$ )

	20 min	40 min *	100 min	120 min
<b>TAO</b>	0	5 (31)	16 (100)	16 (100)
<b>PAOD</b>	9 (16)	49 (89)	55 (100)	55 (100)

W grupie chorych na PAOD stężenia D-dimerów korelowały z przepuszczalnością skrzepu [max  $\Delta\text{DD}$  ( $r=0,59$ ;  $p=0,01$ ), max DD ( $r=0,88$ ;  $p=0,000006$ )] oraz ABI [max  $\Delta\text{DD}$  ( $r=0,28$ ;  $p=0,03$ )].



Stwierdzono natomiast odwrotną zależność między lizą skrzepu a wskaźnikiem odbioru naczyniowego [max  $\Delta$ DD ( $r=-0,45$ ;  $p=0,0001$ )].

U chorych na TAO podatność na lizę wykazywała zależność od przepuszczalności skrzepu [max  $\Delta$ DD ( $r=0,59$ ;  $p=0,01$ )].

#### *Polimorfizm czynnika XIII*

Polimorfizm Val34Leu FXIII oznaczono u 42 pacjentów z PAOD i 10 chorych na TAO. W grupie PAOD stwierdzono obecność genotypu LL u 3 chorych (7,1%). Genotyp VL obecny był u 19, a VV u 20 pacjentów (odpowiednio 45% i 47 %). W grupie TAO nie stwierdzono obecności genotypu LL. Czterech pacjentów z TAO miało genotyp VL (40%), a 6 genotyp VV (60%).

W porównywanych grupach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem rozkładu wariantów allelicznych FXIII, jak również nie obserwowano wpływu genotypu na badne cechy skrzepu.

### 6.3 CHOROZY NA PAOD Z ARTERIOGRAFIĄ DOTĘTNICZĄ

W obrębie grupy chorych z miażdżycą zarostową wyodrębniono pacjentów (n=34), u których wykonano arteriografię metodą dotętniczego wstrzyknięcia środka cieniującego i osobno analizowano u nich było zaawansowanie zmian naczyniowych w kończynach. Charakterystykę ogólną tej podgrupy (PAOD I.A.) w porównaniu z grupą kontrolną przedstawiono w tabeli 11 .

**Tab. 11.** Wyjściowa charakterystyka grupy pacjentów PAOD I.A. i jej porównanie z grupą kontrolną (PAODK). W tabeli podano wartości średnie ( $\pm$ SD) lub wartości bezwzględne (%).

	PAOD I.A.	PAODK	WARTOŚĆ P
<b>Mężczyźni, n (%)</b>	28(82,3)	20 (66,67)	0,15
<b>Wiek, (lata)</b>	53,7( $\pm$ 6,7)	54,4 ( $\pm$ 6,5)	0,63
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup></b>	24,07 ( $\pm$ 3,2)	26,4 ( $\pm$ 3,41)	0,005
<b>Nadciśnienie tętnicze, n (%)</b>	28 (82,3)	0 (0,0)	0,00001
<b>Cukrzyca, n (%)</b>	5 (18,2)	0 (0,0)	0,03
<b>Palenie tytoniu (akt), n (%)</b>	24 (70,6)	0 (0,0)	0,00001
<b>TC, mmol/l</b>	5,89 ( $\pm$ 1,8)	5,0 ( $\pm$ 0,77)	0,01
<b>LDL-C, mmol/l</b>	3,58 ( $\pm$ 1,6)	2,94 ( $\pm$ 0,72)	0,055
<b>HDL-C, mmol/l</b>	1,44 ( $\pm$ 0,61)	1,39 ( $\pm$ 0,24)	0,7
<b>TG, mmol/l</b>	2,08 ( $\pm$ 1,4)	1,3 ( $\pm$ 0,36)	0,004
<b>Fibrynogen, g/l</b>	3,65 ( $\pm$ 1,1)	2,53 ( $\pm$ 0,4)	0,000001
<b>CRP, mg/l</b>	2,81 ( $\pm$ 3,4)	1,39 ( $\pm$ 0,54)	0,02
<b>IL-6, pg/ml</b>	3,27 ( $\pm$ 3,7)	1,59 ( $\pm$ 0,73)	0,018
<b>pFn, mg/dl</b>	0,319 ( $\pm$ 0,05)	0,34 ( $\pm$ 0,08)	0,07
<b>Aspiryna, n (%)</b>	30 (88,2)	0 (0,0)	0,00001
<b>Statyna, n (%)</b>	24 (70,6)	0 (0,0)	0,00001

Grupa chorych z PAOD I.A. nie różniła się pod względem płci i wieku od grupy kontrolnej. Porównując wyodrębnioną grupę PAOD I.A. z grupą kontrolną, potwierdzono różnice w zakresie analizowanych zmiennych obserwowane pomiędzy całą grupą PAOD i grupą kontrolną (tabela 11). Wykazano wyraźne upośledzenie fibrynolizy oraz zwiększoną generację FPA, a także wyższe poziomy cFn w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 12).

**Tab. 12.** Wybrane parametry uszkodzenia śródbłonka oraz krzepnięcia i fibrynolizy w grupie PAOD I.A. i grupie kontrolnej (PAODK).

	PAOD I.A.	PAODK	WARTOŚĆ P
cFn, µg/ml	1,75 (±0,3)	1,23 (±0,2)	0,000001
sICAM-1, ng/ml	260,7 (±37,8)	238,3 (±29)	0,29
tPA, ng/ml	10,1 (±2,4)	5,68 (±1,34)	0,000001
PAI-1, ng/ml	16,4 (±6,4)	8,87 (±2,0)	0,000001
FPA, ng/ml	4,28 (±0,85)	3,21 (±0,74)	0,000002

Porównując grupę PAOD I.A. z chorymi na TAO, stwierdzono że osoby z pierwszej grupy są starsze, więcej jest wśród nich mężczyzn i częściej w tej grupie występują czynniki ryzyka miażdżycy. Profil lipidowy w obu grupach był podobny, tak jak stężenia markerów zapalenia. W grupie TAO jedynie stężenie pFn było istotnie większe. Aspiryna i statyny były częściej przyjmowane przez chorych z grupy PAOD I.A. (tabela 13).

**Tab. 13.** Porównanie grupy pacjentów z PAOD I.A. z grupą chorych na TAO. W tabeli podano wartości średnie (±SD) lub wartości bezwzględne (%).

	PAOD I.A.	TAO	WARTOŚĆ P
Mężczyźni , n (%)	28(82,3)	9 (56,2)	0,022
Wiek , lata	53,7(±6,7)	45,9 (±5,6)	0,00022
BMI, kg/m <sup>2</sup>	24,07 (±3,2)	26,2 (±5,6)	0,087
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	28 (82,3)	2 (12,5)	<0,00001
Cukrzyca, n (%)	5 (18,2)	0	0,11
Obciążający wywiad rodzinny, n (%)	24 (70,6)	2(12,5)	0,001
Palenie tytoniu (akt.), n (%)	24 (70,6)	6 (37,5)	0,03
TC, mmol/l	5,89 (±1,8)	5,15 (±1,12)	0,13
LDL-C, mmol/l	3,58 (±1,6)	2,92 (±0,89)	0,15
HDL-C, mmol/l	1,44 (±0,62)	1,37 (±0,5)	0,72
TG, mmol/l	2,07(±1,4)	1,8 (±1)	0,49
Fg, g/l	3,65 (± 1,1)	3,64 (±1,23)	0,65
CRP, mg/l	2,81 (±3,3)	3,43 (±6,7)	0,66

	<b>PAOD I.A.</b>	<b>TAO</b>	<b>WARTOŚĆ P</b>
<b>IL-6, pg/ml</b>	3,27 ( $\pm$ 3,7)	3,7 ( $\pm$ 3,6)	0,66
<b>pFn, mg/dl</b>	0,32 ( $\pm$ 0,05)	0,46 ( $\pm$ 0,06)	0,000001
<b>Aspiryna, n (%)</b>	30 (88,2)	7 (43,8)	0,001
<b>Statyna, n (%)</b>	24 (70,6)	2 (12,5)	0,0004

Nie stwierdzono znamienych różnic między grupami PAOD I.A. i TAO w zakresie markerów fibrynolizy i krzepnięcia, a także sICAM-1. Stężenie cFn było ponad dwukrotnie większe u chorych na chorobę Buergera (tabela 14).

**Tab. 14.** Wybrane parametry uszkodzenia śródbłonka, krzepnięcia i fibrynolizy w grupie PAOD I.A. i TAO (średnie z odchyleniami standardowymi).

	<b>PAOD I.A.</b>	<b>TAO</b>	<b>WARTOŚĆ P</b>
<b>cFn, <math>\mu</math>g/ml</b>	1,75 ( $\pm$ 0,34)	4,47 ( $\pm$ 0,47)	0,000001
<b>sICAM-1, ng/ml</b>	260,7 ( $\pm$ 38)	239,8 ( $\pm$ 56)	0,29
<b>tPA, ng/ml</b>	10,1 ( $\pm$ 2,44)	10,7 ( $\pm$ 2,2)	0,4
<b>PAI-1, ng/ml</b>	16,4 ( $\pm$ 6,3)	18,9 ( $\pm$ 5,56)	0,18
<b>FPA, ng/ml</b>	4,28 ( $\pm$ 0,8)	4,12 ( $\pm$ 0,6)	0,5

#### *Zaawansowanie zmian naczyniowych*

Porównanie zaawansowania zmian naczyniowych pomiędzy grupą PAOD z wykonaną dotętniczą arteriografią oraz grupą z TAO przedstawiono w tabeli 15. Nie stwierdzono istotnych różnic badanych zmiennych poza dłuższym dystansem chromania u chorych na PAOD.

**Tab. 15.** Zaawansowanie zmian naczyniowych w grupie PAOD I. A. oraz TAO.

	<b>PAOD I.A.</b>	<b>TAO</b>	<b>WARTOŚĆ P</b>
<b>Dystans chromania, m</b>	98,9 ( $\pm$ 89)	49,1 ( $\pm$ 90)	0,017
<b>ABI</b>	0,51 ( $\pm$ 0,15)	0,58 ( $\pm$ 0,22)	0,16
<b>Wskaźnik „run off”</b>	21,8 ( $\pm$ 10,5)	15,5 ( $\pm$ 2,9)	0,15
<b>Zmiany w tętnicach szyjnych, n (%)</b>	24 (71)	4 (25)	0,15

### ***Badania charakteryzujące skrzep fibrynowy***

Przepuszczalność skrzepów fibrynowych wyrażona współczynnikiem przepuszczalności ( $K_s$ ) była znamienne mniejsza u pacjentów z PAOD I.A. w porównaniu do osób z grupy kontrolnej ( $12,9$  vs  $16,1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2$ ;  $p < 0,000001$ ). Podobnie zachowywała się podatność na lizę, która była u chorych mniejsza niż w grupie kontrolnej [ $\text{max } \Delta\text{DD}$  ( $0,0685$  vs  $0,0785 \mu\text{g/ml/min}$ ,  $p < 0,01$ )].

Zależności między cechami skrzepu (współczynnikiem przepuszczalności i maksymalnym przyrostem stężenia D-dimerów) a badanymi parametrami laboratoryjnymi w grupie pacjentów, u których wykonano arteriografię dotętniczą przedstawiono w tabeli 16.

**Tab. 16.** Zależności między parametrami skrzepu ( $K_s$  i  $\text{max } \Delta\text{DD}$ ) a badaniami laboratoryjnymi w grupie PAOD I.A.

<b>Ks</b>	<b>r</b>	<b>p</b>	<b>max <math>\Delta\text{DD}</math></b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>/run off</b>	-0,4	0,017	<b>/ABI</b>	0,3	0,05
<b>/max <math>\Delta\text{DD}</math></b>	0,3	0,05	<b>/run off</b>	-0,4	0,01
<b>/max DD</b>	0,6	0,00004	<b>/Ks</b>	0,3	0,05
<b>/Fg</b>	-0,5	0,002			
<b>/PAI-1</b>	-0,38	0,02			

#### 6.4 PACJENCI Z PAOD DOBRANI POD WZGLĘDEM PŁCI I WIEKU DO CHORYCH NA TAO

Z uwagi na to, że porównywane grupy chorych różniły się zarówno liczebnością, jak i wiekiem i płcią w celu wyeliminowania potencjalnego wpływu tych czynników na badane właściwości skrzepów fibrynowych, wyodrębniono podgrupę pacjentów z PAOD dobranych do grupy chorych na TAO pod względem płci i wieku. Zarówno przepuszczalność skrzepów, jak i podatność na lizę były znamienne mniejsze w grupie TAO w porównaniu do dobranej pod względem płci i wieku grupy PAOD o podobnej liczebności, potwierdzając znikomą przepuszczalność skrzepów i ich dużą oporność na lizę u chorych na TAO. Te oraz inne istotne statystycznie różnice między wybraną podgrupą chorych (PAOD 18) a pacjentami z TAO przedstawiono w tabeli 17. Potwierdzono, że pacjenci z chorobą Buergera charakteryzują się znacznie większymi stężeniami fibronektyny osoczowej i komórkowej; dla tego ostatniego parametru różnica między chorymi z TAO i PAOD była niemal trzykrotna.

**Tab. 17.** Istotne różnice między dobraną pod względem liczebności, płci i wieku grupą PAOD (n=18) i grupą pacjentów z TAO (n=16)

	PAOD 18	TAO	WARTOŚĆ P
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	15 (83)	2 (12,5)	0,00004
Palenie tytoniu (akt.), n (%)	13 (±72)	6 (37,5)	0,04
IL-6, pg/ml	2,5 (±3,2)	3,7 (±3,6)	0,04
pFn, mg/dl	0,31 (±0,05)	0,46 (±0,06)	0,000001
cFn, µg/ml	1,59 (±0,34)	4,47 (±0,47)	0,000001
Ks, (x 10 <sup>-9</sup> cm <sup>2</sup> )	12,8 (±1,73)	5,65 (±1,9)	0,000001
Max DD, ng/ml	5,6 (±0,94)	1,75 (±0,29)	0,000001
Max ΔDD, ng/ml/min	0,083 (±0,017)	0,029 (±0,005)	0,000001

## 7. DYSKUSJA

Przedstawione wyniki wskazują na istotne różnice we właściwościach skrzepu fibrynowego, tj. jego przepuszczalności i podatności na lizę, między chorymi na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych oraz chorobę Buergera. Szczególnie mała przepuszczalność skrzepu charakteryzowała pacjentów z TAO w porównaniu z grupami kontrolnymi, jak i chorymi na miażdżycę zarostową. Ponadto przepuszczalność skrzepu wiązała się z zaawansowaniem miażdżycy u pacjentów z PAOD.

W badaniu wykazano, że przepuszczalność żeli fibrynowych jest mniejsza u osób rozpoznaną PAOD i TAO niż u osób zdrowych w podobnym wieku. Zjawisko małej przepuszczalności żeli opisane tutaj jest podobne do obserwowanego u mężczyzn z miażdżycą tętnic wieńcowych, którzy doznali zawału serca w młodym wieku (186, 200). Natomiast po raz pierwszy w tej pracy wykazano, że dotyczy ono także chorych na PAOD i zakrzepowo-zarostowe zapalenie naczyń. Warto podkreślić, że współczynnik przepuszczalności (Ks) u pacjentów z TAO był szczególnie mały (3-krotnie mniejszy niż w grupie kontrolnej), co najpewniej oznacza, że sieć fibrynowa u pacjentów z chorobą Buergera cechuje się szczególnie gęsto upakowanymi włóknami fibrynowymi. Obserwowane wartości Ks były mniejsze od tych opisywanych u chorych na miażdżycę tętnic wieńcowych (200) oraz u pacjentów z zespołem nerczycowym, którzy także cechują się niską przepuszczalnością żeli (214). Wyniki mogą sugerować obecność cieńszych, zbitych włókien skrzepu zwłaszcza u chorych na TAO, ale dopiero analiza za pomocą mikroskopii elektronowej, konfokalnej lub NMR mogłaby potwierdzić tę hipotezę.

Czynniki modulujące właściwości skrzepów obejmują czynniki wrodzone/genetyczne oraz środowiskowe, które działają poprzez zróżnicowane mechanizmy m.in. zmiany stężeń fibrynogenu i trombiny. Zmniejszona przepuszczalność skrzepów u pacjentów z PAOD była niezależna od wieku, płci, czynników ryzyka takich jak aktualne palenie tytoniu, hyperlipidemia, nadciśnienie i cukrzyca czy współwystępowania choroby niedokrwiennej serca i zmian w tętnicach szyjnych. W grupie TAO również nie obserwowano zależności Ks od cech demograficznych i czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Wpływ cukrzycy na strukturę skrzepu i jego właściwości opisywany w literaturze (205, 206) nie uwidocznił się w zaawansowanej objawowej miażdżycy kończyn, co może sugerować, że choroba naczyń „maskuje” wpływ cukrzycy na właściwości skrzepu. Zależność ta mogła też nie być widoczna z powodu stosunkowo małej liczebności chorych na cukrzycę (n=10) wśród pacjentów z miażdżycą. Podobnie nie zaobserwowano wpływu lipidemii na strukturę i właściwości skrzepu wśród pacjentów z miażdżycą, stwierdzono natomiast taką zależność u osób z grupy kontrolnej. Stężenie cholesterolu całkowitego i triglicerydów wykazywało tu silną odwrotną

korelację z przepuszczalnością skrzepu. Podobną zależność między stężeniem triglicerydów a przepuszczalnością skrzepu stwierdzili Fatah i wsp. (200) u osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną dla chorych na zawał serca.

Jak oczekiwano, stwierdzono zależności właściwości skrzepu od stężenia Fg w grupie PAOD. Zależności właściwości skrzepu od stężenia Fg są zgodne z obserwacjami Fatah i wsp. (200) i Millsa i wsp. (207). Stężenie Fg, z którego powstaje fibryna jest bowiem najistotniejszym czynnikiem wpływającym na strukturę sieci fibrynowej. Przy jego dużych stężeniach w osoczu odszczepianie fibrynopeptydu A zachodzi szybciej (191) i tworzące się sieci charakteryzują się zbitymi, gęsto upakowanymi włóknami (192).

Do czynników, które wykazywały zależność z przepuszczalnością skrzepu u chorych na PAOD należało także stężenie PAI-1. Obie grupy chorych wykazywały znamienne wyższe stężenia analizowanych parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy w stosunku do osób z grup kontrolnych. Brak jest obserwacji dotyczących nieprawidłowości generacji trombiny i układu fibrynolizy u pacjentów z TAO. Natomiast donoszono o podwyższonych stężeniach antygenu tPA oraz PAI-1 u osób z chromaniem przestankowym zwłaszcza ciężkim (<200 m) w stosunku do osób stanowiących grupę kontrolną (215). Podwyższone stężenia PAI-1 stwierdzane u chorych z PAOD w przedstawianej pracy, towarzyszyły niskiej przepuszczalności skrzepu, co może mieć związek ze zwiększoną ekspresją zapalnych cytokin. Fatah i wsp. (200) wykazali podobną korelację z białkiem ostrej fazy orozomukoidem. W literaturze nie znaleziono danych na temat wpływu CRP lub IL-6 na strukturę skrzepów fibrynowych. Wobec roli przypisywanej CRP w miażdżycy (34), wpływ tego białka na strukturę skrzepu może mieć znaczenie w patogenezie tej choroby i jej powikłań zakrzepowych. W przedstawianej pracy wykazano taką zależność u osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną PAOD. Współczynnik przepuszczalności wykazywał odwrotną korelację nie tylko ze stężeniem Fg, ale również CRP, IL-6 oraz pFn. Obserwacja ta może wskazywać, że wpływ markerów zapalnych na strukturę i właściwości sieci fibrynowych widoczny jest u osób zdrowych, ale w przypadku zaawansowanych zmian naczyniowych (PAOD), a zwłaszcza zapalnych (TAO), jest trudniejszy do wykrycia wobec obecności wielu czynników zakłócających np. PAI-1. W grupie pacjentów z TAO przepuszczalność skrzepów wykazywała ujemną korelację ze stężeniem fibronektyny osoczowej będącej markerem stanu zapalnego. Dotychczas w piśmiennictwie nie opisywano takiej zależności. Stężenie pFn u pacjentów z chorobą Buergera było znamienne podwyższone w stosunku do chorych z PAOD i grup kontrolnych. Jednak najbardziej zaskakująca obserwacja dotyczy fibronektyny komórkowej, która wydaje się w świetle przedstawionych danych ważną determinantą właściwości skrzepu. Dotąd nie opublikowano danych o wpływie tego białka na porowatość skrzepów fibrynowych. Okazało się, że stężenie fibronektyny komórkowej było 2,5 raza większe od wartości obserwowanych u pacjentów z PAOD i prawie 4 -krotnie większe niż w grupie



kontrolnej. Zwiększona ekspresja fibronektyny komórkowej jest najpewniej wyrazem działania na naczynie czynników uszkodzających, co w przypadku choroby Buergera może być związane z procesem zapalnym i uszkodzeniem śródbłonna. Obserwacja ta zdaje się potwierdzać inne doniesienia przemawiające za zapalnym charakterem tego schorzenia (125, 129-131). Zależność między stężeniem fibronektyny komórkowej a przepuszczalnością w grupie chorych na TAO nie osiągnęła znamienności statystycznej ( $p=0,06$ ), mimo tak dużej różnicy stężeń tego markera między badanymi grupami, co wynika najpewniej z małej liczby osób uwzględnionych w analizie. Przepuszczalność skrzepu wykazywała odwrotną zależność ze stężeniem fibronektyny komórkowej w obu grupach kontrolnych, ale nie u pacjentów z PAOD i TAO. Prawdopodobnie w PAOD i TAO istnieją inne czynniki zakłócające (np. Fg, aspiryna), nieobecne w grupach kontrolnych i ewentualny wpływ cF<sub>n</sub> ulega zamaskowaniu.

Istnieją dane wskazujące, że porowatość skrzepu zwiększa się pod wpływem małych dawek aspiryny u osób zdrowych. Williams i Fatah (216) wykazali wzrost Ks o 65% u zdrowych osób, przyjmujących 75 mg kwasu acetylosalicylowego dziennie (w porównaniu do 22% wzrostu u osób otrzymujących 320 mg aspiryny). W tym badaniu żadna z osób z grupy kontrolnej nie przyjmowała aspiryny, co uniemożliwiło weryfikację obserwacji badaczy z Instytutu Karola w Sztokholmie. Co ciekawe, 7 osób z grupy TAO przyjmowało ASA w dawce 75-150 mg/dz i stosowanie tego leku w tej grupie wiązało się z większym wskaźnikiem przepuszczalności. Obserwacja ta może świadczyć o tym, iż pacjenci z TAO mogą odnieść korzyść z przyjmowania aspiryny. Przyjmowanie kwasu acetylosalicylowego nie zmieniało przepuszczalności skrzepu w grupie chorych z PAOD. Oczywiście dla potwierdzenia potencjalnej roli aspiryny w terapii TAO niezbędne są badania kliniczne.

Biorąc pod uwagę liczne korzystne działania statyn, w tym przeciwzakrzepowe (217), można było przypuszczać, że leczenie statynami zmienia właściwości skrzepu. Jednak przedstawione wyniki wskazują, że przyjmowanie statyn przez pacjentów z PAOD i TAO nie miało wpływu na współczynnik Ks. Ocena wpływu statyn na skrzep nie była celem pracy i przy dużej liczbie czynników zakłócających w porównywanych grupach stwierdzenie istotnej różnicy w wartościach Ks było mało prawdopodobne. Hipoteza o wpływie statyn na strukturę skrzepu zasługuje jednak na weryfikację w dużym badaniu.

Rozkład wariantów allelicznych polimorfizmu Val34Leu FXIII u chorych z PAOD i TAO nie wykazywał istotnych statystycznie różnic. Obecność Leu34 nie miała wpływu na przepuszczalność i lizę skrzepu. Obserwacja ta jest zbieżna z obserwacją Millsa i wsp. badającego krewnych osób z chorobą wieńcową (207). Autorzy ci wysunęli wniosek, że silny wpływ stężenia fibrynogenu na strukturę skrzepu, jak również szeroki zakres jego stężeń u badanych może maskować związek pojedynczego polimorfizmu ze zmienioną strukturą skrzepu. Wydaje się również, że zależność ta może być niewidoczna z powodu zbyt małej liczebności badanych grup. Wśród osób

z grupy kontrolnej PAOD jednakże stwierdzono, iż występowanie allelu L (genotyp LL i VL FXIII) wiązało się z mniejszą przepuszczalnością skrzepu niż u nosicieli wariantu VV, jak to obserwowali u osób zdrowych będących nosicielami allelu 34Leu FXIII Äriens i wsp. (179). Niewątpliwie polimorfizm Val34Leu FXIII jest ważnym genetycznym czynnikiem determinującym właściwości skrzepów fibrynowych.

Mała porowatość i przepuszczalność skrzepu u pacjentów z PAOD korelowała z podatnością na lizę. Skrzepy fibrynowe o małej przepuszczalności trudniej poddawały się lizie pod wpływem t-PA, co manifestowało się późniejszym w stosunku do grupy kontrolnej rozpoczęciem lizy, wolniejszym narastaniem stężenia D-dimerów i dłuższym czasem trwania lizy. W grupie chorych na TAO rozpuszczalność żeli fibrynowych była jeszcze niższa i charakteryzowała się powolnym narastaniem D-dimerów, osiągających stężenia typowe dla początkowej fazy lizy u osób z grup kontrolnych w momencie, gdy ta była już u nich zakończona (załamanie się skrzepu przed 80 min obserwacji). Zależność między porowatością skrzepu a podatnością na lizę potwierdzono w wielu obserwacjach (187, 193, 200, 201). Pojedyncze, cienkie włókna ulegają szybszej lizie niż włókna grube, jednakże to przestrzenna struktura skrzepu a nie grubość pojedynczych włókien determinuje szybkość jego lizy (218). Dlatego sieci fibrynowe u pacjentów z PAOD i TAO wykazujące mniejszą przepuszczalność, która jak wiadomo, koreluje z grubością i stopniem upakowania włókien, ulegają wolniejszemu rozkładowi niż skrzepy osób zdrowych z grup kontrolnych. Zjawisko to, związane z gęstym upakowaniem włókien, może wynikać z utrudnionego transportu czynników fibrynolitycznych w obręb sieci oraz uwięzieniem i nagromadzeniem powstałych D-dimerów, co wpływa na opóźnienie procesu lizy (193, 219). Może także wynikać z aktywacji nowych cząsteczek Fg przez trombinę związaną z produktami rozkładu fibryny, i w ten sposób chronioną przed działaniem jej inhibitorów (220).

Przepuszczalność żelu wytworzonego z osocza cytrynianowego oceniana w tej pracy została opracowana przez Millsa i wsp. (207) z Uniwersytetu w Leeds w Wielkiej Brytanii, jednego z najlepszych ośrodków badań nad fibryną i czynnikami modyfikującymi jej właściwości. M. Blombäck i jej zespół pracujący w Instytucie Karola w Sztokholmie stosuje odmienną metodę, w której osocze dializowane jest *in vitro* w obecności buforu (200). Równie pracochłonna i wymagająca dużego doświadczenia metoda oceny podatności na lizę wprowadzona przez Colleta i wsp. (201) nie jest wolna od ograniczeń. Jednak pomiar podstawowego markera fibrynolizy, D-dimerów, wydaje się bliższy sytuacji fizjologicznej niż inne stosowane fizykochemiczne analizy. Można też oceniać turbidymetrycznie żele przygotowane z osocza w obecności rtPA, określając ich absorbancję (221). Wiele opublikowanych danych analizujących strukturę skrzepu pochodzi z badań *in vitro* z zastosowaniem oczyszczonych białek i często w bardzo zróżnicowanych stężeniach - chlorku wapnia i trombiny, które mają silny, nieliniowy wpływ na przepuszczalność skrzepu. Wybór modelu dla

oceny właściwości skrzepu i podatności na lizę niewątpliwie może wpływać na uzyskane wyniki. Zaletą przedstawionego tutaj badania jest wykonanie analiz w stosunkowo dużej grupie chorych na miażdżycę zarostową i równie licznych grupach kontrolnych.

Do oceny niedokrwienia kończyn w grupach chorych, użyto zarówno metod nieinwazyjnych tzn. pomiaru dystans chromania na bieżni ruchomej i wskaźnika kostkowo-ramiennego, jak i metody obrazowej - arteriografii. Ponieważ zmienność ABI nie zawsze koreluje z oceną czynnościową (61, 222), zaawansowanie niedokrwienia zostało określone obiema metodami nieinwazyjnymi, z uwagi na ich wzajemne uzupełnianie się. Dystans chromania oceniono na bieżni ruchomej z najczęściej stosowanymi parametrami - stałą prędkością przesuwu 3,2 km/h i nachyleniem 10 ° (58, 59). Ten sposób oceny niedokrwienia wybrano z uwagi na dobrą tolerancję obciążenia, jak również, z powodu braku istotnych różnic pomiędzy wartościami testu marszowego wykonywanego ze stałą prędkością a testami ze stopniowanym wysiłkiem oraz zmieniającym się nachyleniem bieżni (59, 223, 224). Grupa chorych na PAOD była zróżnicowana pod względem zaawansowania choroby, ocenianego długością dystansu chromania na bieżni ruchomej oraz ABI i różniła się znamienne od grupy pacjentów z TAO w zakresie dystansu chromania przestankowego, ale nie ABI. Zarówno dystans chromania jak i wskaźnik kostkowo-ramienny nie wykazywały zależności z obserwowanymi cechami skrzepu. Zależności te były natomiast widoczne przy zastosowaniu obrazowania do oceny zaawansowania miażdżycy.

Do najczęstszych obrazowych metod oceny zaawansowania zmian w tętnicach należą ultrasonograficzna i angiograficzna. Ostatnio, dzięki postępowi w obrazowaniu naczyń techniką rezonansu magnetycznego, możliwa jest również diagnostyka tętnic kończyn tą metodą ze skutecznością nieznacznie mniejszą od arteriografii (67, 68). Tomografia komputerowa, zwłaszcza wielorzędowa, ma jeszcze większą skuteczność w diagnostyce naczyń obwodowych, porównywalną z arteriografią (65, 66, 225). Z uwagi jednak na dostępność tych badań, jak również brak możliwości jednoczesnego działania terapeutycznego, najbardziej powszechną metodą diagnostyczną pozostaje angiografia tętnic kończyn. Ocena zwężenia w arteriografii ma charakter przybliżony. Poza jakością techniczną uzyskanych obrazów, wynikającą między innymi ze stopnia rozcieńczenia środka cieniującego i interferencji sąsiadujących narządów, utrudniają ją poszerzenia postenotyczne oraz ekscentryczne zwężenia nie obejmujące całego obwodu naczynia. Ponadto na ocenę zwężenia wpływa również umiejscowienie zdrowych odcinków naczyń, względem których jest ona wykonywana. Bezpośrednim dowodem istotności zwężenia jest inwazyjna ocena gradientu ciśnień przez zwężenie oraz ultrasonografia wewnątrznacyniowa. Najczęściej jednak ocena zwężeń dokonywana jest przez porównanie miejsca zwężonego do miejsca uznanego za prawidłowe w tym samym naczyniu (226). W przedstawianej pracy wykorzystano ocenę zaawansowania zmian w tętnicach kończyn dolnych w oparciu o radiologiczną metodę szacowania odbioru naczyniowego u

pacjentów poddanych zabiegom pomostowania tętnic obwodowych (212). Niezaprzeczalną zaletą tej metody jest jej prostota i możliwość przedstawienia zaawansowania zmian naczyniowych za pomocą liczby, co pozwala na przeprowadzenie porównań. Wskaźnik odbioru naczyniowego wyrażony iloczynem stopnia zwężenia naczynia (0-brak zwężenia, 1- zwężenie <50%, 2- zwężenie > 50%, 3- niedrożność) i „ważności” naczynia (punkty 1-3) wykazywał znamienne, odwrotną korelację ze wskaźnikiem kostka-ramię. Ponadto pozwolił na zróżnicowanie grupy chorych z PAOD na pacjentów z dużym (ROS  $\geq 27$ ) i mniejszym (ROS <26) zaawansowaniem zmian. Wartość 27 stanowiła połowę maksymalnego ROS w grupie chorych z PAOD i została przyjęta w tej pracy arbitralnie, aby ułatwić analizę ilościową. U pacjentów z ROS  $\geq 27$  punktów przepuszczalność skrzepów była znamienne niższa (o 14,3%) od stwierdzanej u chorych z mniejszym zaawansowaniem zmian w tętnicach. Na zależność tę nie wpływały wiek, płeć ani czynniki ryzyka miażdżycy. Podobną korelację stwierdzono w odniesieniu do podatności na liżę. Tak więc, stopień zaawansowania miażdżycy wyrażony ROS wykazywał zależności z obiema właściwościami skrzepu fibrynowego - przepuszczalnością i podatnością na liżę. Spostrzeżenie to jest zbieżne z obserwacją, w której stwierdzono zależność między nasileniem zmian w angiografii tętnic wieńcowych i cechami skrzepu u pacjentów, po zawale serca (186).

Zastrzeżenie może budzić technika badania, jaką wybrano do oceny angiograficznego zaawansowania zmian tzn. cyfrowa angiografia subtrakcyjna (DSA) z dożylnym wstrzyknięciem środka cieniującego. Podejście to stosuje się od wielu lat do przeglądowej oceny zmian tętnic kończyn dolnych i w zależności od ocenianego odcinka drzewa naczyniowego charakteryzuje się ono czułością sięgającą 66-93% i ponad 90% swoistością (227, 228, 229). Metoda ta ma swoje ograniczenia, których część wymieniono wcześniej, wynikające z większego stopnia rozcieńczenia środka cieniującego w krążeniu, słabszej widoczności naczyń odcinka aortalno-biodrowego spowodowanego obecnością gazów jelitowych oraz naczyń podudzia z powodu ich mniejszego kalibru. Ponadto technika ta wymaga podawania większych objętości środka cieniującego niż w przypadku badania dotętniczego. Zaletą badania jest natomiast jego mała inwazyjność i możliwość wykonania w warunkach ambulatoryjnych. Wielorzędowa tomografia komputerowa jest w tym wypadku badaniem o większej dokładności, ale mniej dostępnym. W przeprowadzonej pracy w celu zminimalizowania błędów oceny zaawansowania zmian naczyniowych do badania włączono jedynie pacjentów z zadowalającą technicznie jakością obrazów oraz uproszczono sposób oceny zwężenia stosowany w ocenie odbioru naczyniowego (212), w stosunku do naczyń podudzia do skali 3 punktowej ( 0- naczynie niezmiennione, 2- nieregularności ścian i zwężenia, 3- niedrożność naczynia). Ponadto u 34 chorych z PAOD zakwalifikowanych do leczenia endowaskularnego, u których wykonano angiografię dotętniczną, osobno oceniono zwężenia. Zwężenia oceniane w badaniu metodą dożylnego wstrzyknięcia kontrastu zostały potwierdzone w badaniu dotętnicznym w 100%. Z powodu mniejszej

liczebności chorych z wykonanym dotętnicznym badaniem angiograficznym, różnica dotycząca płci między chorymi na PAOD a grupą kontrolną przestała być istotna, podobnie jak różnica częstości występowania zmian w tętnicach szyjnych między chorymi na PAOD i TAO. Pozostałe porównania i najistotniejsze korelacje obserwowane w grupie 55 chorych z miażdżycą zarostową z badaniem DSA metodą dożylnego wstrzyknięcia środka cieniującego stwierdzono również w podgrupie weryfikowanej badaniem dotętnicznym. Należy jednak podkreślić, że mimo istotnych korelacji z badaniami nieinwazyjnymi (ABI), metoda ta nie należy do standardowego sposobu weryfikowania zmian, na co wskazuje sposób rekrutowania chorych, obejmujący jedynie osoby z zadawalającymi technicznie obrazami angiograficznymi oraz konieczność modyfikacji oceny zwężenia naczyń podudzi.

Komentarza wymaga również kwalifikacja chorych do grupy TAO. Jak przedstawiono we wstępie, kryterium przemawiającym za rozpoznaniem TAO według większości badaczy jest niewystępowanie, poza paleniem, tzw. klasycznych czynników ryzyka miażdżycy. U 2 osób z chorobą Buergera rozpoznano nadciśnienie tętnicze, które jako czynnik ryzyka miażdżycy powinno stanowić jedno z kryteriów wykluczających. Jednakże stwierdzono, iż rozwinęło się ono po wielu latach od rozpoznania choroby i nie miało wpływu na zmianę oceny całego obrazu klinicznego. Wszyscy chorzy na TAO włączeni do obserwacji spełniali kryteria diagnostyczne Shionoy'i (133), które należą do najczęściej stosowanych w diagnostyce tej choroby.

Podsumowując należy podkreślić, że obniżona przepuszczalność skrzepów fibrynowych związana z ich strukturą oraz mniejsza podatność na lizę opisywane u pacjentów po zawale serca z zaawansowaną chorobą wieńcową charakteryzują również chorych z zaawansowaną, objawową miażdżycą zarostową tętnic kończyn dolnych. Ponadto stwierdzono, że mniejsza przepuszczalność żeli cechuje osoby o większym zaawansowaniu PAOD w ocenie angiograficznej. Przepuszczalność skrzepu u tych chorych koreluje ujemnie z wyższymi stężeniami Fg oraz PAI-1, co może tłumaczyć także mniejszą podatność na lizę. Po raz pierwszy stwierdzono również, że szczególnie mała przepuszczalność skrzepów fibrynowych i zmniejszona podatność na lizę w porównaniu do osób zdrowych, jak i chorych na PAOD, charakteryzuje pacjentów z chorobą Buergera. To nowo opisanie zjawisko nie wydaje się wynikać ze słabszej aktywności fibrynolitycznej ani zwiększonej generacji trombiny. Ciekawa jest również obserwacja znamienne zwiększonego stężenia fibronektyny komórkowej u tych chorych w porównaniu do grupy kontrolnej i do chorych na PAOD. Mogłoby to wskazywać na przydatność tego markera w różnicowaniu TAO z miażdżycą zarostową tętnic kończyn dolnych.

Konieczne są jednak dalsze badania w większych grupach chorych na PAOD i TAO w celu potwierdzenia tych wstępnych obserwacji, które nie tylko wskazują na nowe mechanizmy patogenetyczne, ale też mogą mieć implikacje kliniczne.

## 8. WNIOSKI

1. Chorobę Buergera charakteryzuje mała przepuszczalność skrzepów fibryny w porównaniu zarówno do osób zdrowych, jak i chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych. Skrzepy fibrynowe w tej ostatniej grupie są również mniej porowate w porównaniu do grupy kontrolnej.
2. Zarówno w chorobie Buergera, jak i w miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych stwierdza się upośledzenie podatności skrzepów na lizę w porównaniu do grup kontrolnych.
3. Przepuszczalność skrzepów fibrynowych u chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych wiąże się ze stężeniem fibrynogenu i aktywnością inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1, a w przypadku choroby Buergera z dystansem chromania i stężeniem fibronektyny osoczowej.
4. Chorych na zaawansowaną miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych charakteryzują mniej przepuszczalne i mniej podatne na lizę skrzepy fibrynowe zarówno w porównaniu z osobami zdrowymi, jak i z chorymi o mniejszym zaawansowaniu choroby.
5. W chorobie Buergera zwiększone jest stężenie fibronektyny komórkowej; może ona stanowić jeden z markerów różnicujących tę chorobę od miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych.

## 9. STRESZCZENIE

Końcowe etapy procesu krzepnięcia, polegające na konwersji fibrynogenu do fibryny oraz wytwarzaniu wiązań krzyżowych między jej monomerami przez aktywny czynnik XIII, prowadzą do powstania skrzepu stosunkowo odpornego na uszkodzenia mechaniczne i enzymatyczną degradację. Usieciowanie fibryny, grubość jej włókien oraz wrażliwość na działanie plazminy, zależą od wielu czynników środowiskowych i genetycznych.

Dostępne dane wskazują, że nieprawidłowa struktura skrzepu fibrynowego może odgrywać rolę w wielu jednostkach chorobowych, w tym w zaawansowanej chorobie wieńcowej. Nie wiadomo, czy zmniejszona przepuszczalność i oporność na lizę występują także u chorych na miażdżycę rozwijającą się w innych łóżyskach naczyniowych, w tym miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych. Nie badano również właściwości skrzepu w chorobach zapalnych naczyń takich jak choroba Buergera.

Celem badania była ocena właściwości skrzepu fibrynowego (przepuszczalności i podatności na lizę) i określenie czynników determinujących architekturę skrzepu fibrynowego u chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych o różnym stopniu zaawansowania oraz chorobę Buergera.

W badaniu wzięło udział 55 kolejnych pacjentów z miażdżycą zarostową tętnic kończyn dolnych w wieku od 44 do 70 lat i 16 pacjentów z chorobą Buergera w wieku 38 do 56 lat. Grupy kontrolne dobrane pod względem wieku liczyły odpowiednio 30 i 17 osób.

W grupach pacjentów z miażdżycą zarostową i chorobą Buergera oceniono stopień zaawansowania niedokrwienia kończyn za pomocą pomiaru dystansu chromania na bieżni ruchomej oraz wskaźnika kostkowo-ramiennego. Ponadto oceniono zaawansowanie zmian naczyniowych kończyn dolnych w badaniu angiograficznym za pomocą wskaźnika odbioru naczyniowego („*run off score*”) oraz obecność zmian w tętnicach szyjnych badaniem ultrasonograficznym. U wszystkich pacjentów oznaczono w surowicy krwi: profil lipidowy, fibrynogen, białko C-reaktywne (CRP), stężenia interleukiny 6 (IL-6), cząsteczki przylegania międzykomórkowego 1 (ICAM-1), fibronektyny osoczowej i komórkowej, stężenie fibrynopeptydu A (FPA), antygeny tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA), antygeny inhibitora plazminogenu typu 1 (PAI-1) i D-dimerów. Ponadto badano przepuszczalność skrzepów fibrynowych z osocza cytrynianowego wyrażając ją współczynnikiem przepuszczalności Ks (stała Darcy'ego). Podatność skrzepów na lizę oceniono na podstawie seryjnych pomiarów stężenia D-dimerów w buforze przenikającym przez żele, do którego dodano rekombinowany t-PA według metody Colleta i wsp. Oznaczono także polimorfizm Val34Leu czynnika XIII.

W analizie porównawczej, w obrębie chorych na miażdżycę zarostową kończyn dolnych wyodrębniono podgrupę z dotętniczym badaniem angiograficznym (n=34) oraz podgrupę dobraną pod względem płci i wieku do chorych z zakrzepowo-zarostowym zapaleniem naczyń (n=18). Dla obu podgrup przeprowadzono oddzielne porównania i korelacje.

Przepuszczalność skrzepów fibrynowych pacjentów z chorobą Buergera była ponad dwukrotnie mniejsza niż chorych na miażdżycę zarostową kończyn (zarówno w całej grupie jak i w podgrupie z wykonaną angiografią dotętniczą i tej dobranej pod względem płci i wieku do pacjentów z chorobą Buergera). W grupie chorych na miażdżycę zarostową stwierdzono także znamienne mniejszy Ks (o 14,3%,  $p=0,001$ ) u pacjentów z większym zaawansowaniem zmian w badaniu angiograficznym (arbitralnie przyjęta wartość „run off”  $\geq 27$ ) w porównaniu do chorych z mniejszym zaawansowaniem miażdżycy („run off”  $< 26$ ). Przepuszczalność skrzepów w grupie pacjentów z chorobą Buergera znamienne korelowała z maksymalną szybkością narastania stężeń D-dimerów ( $r=0,59$ ;  $p=0,01$ ), dystansem chromania ( $r=0,9$ ;  $p=0,002$ ) i przyjmowaniem aspiryny ( $p=0,03$ ) oraz wykazywała odwrotną zależność ze stężeniem fibronektyny osoczowej ( $r=-0,77$ ;  $p=0,0004$ ). Przepuszczalność skrzepów w grupie chorych na miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych natomiast korelowała znamienne z maksymalną szybkością narastania stężeń D-dimerów ( $r=0,42$ ;  $p=0,001$ ) oraz ze stężeniem fibrynogenu ( $r=-0,35$ ;  $p=0,008$ ) i PAI-1 ( $r=-0,55$ ;  $p=0,00001$ ). W grupie TAO stężenie fibronektyny komórkowej było ponad 3 krotnie większe niż w grupie kontrolnej [ $4,47 (\pm 0,47)$  vs  $1,17 (\pm 0,16)$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $p<0,000001$ ] i ponad dwukrotnie większe niż u chorych z PAOD [ $4,47 (\pm 0,47)$  vs  $1,71 (\pm 0,34)$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $p<0,00001$ ].

W grupie kontrolnej TAO stwierdzono istotną statystycznie odwrotną zależność przepuszczalności skrzepu ze stężeniem fibrynogenu ( $r=-0,7$ ;  $p=0,0006$ ) oraz stężeniem fibronektyny komórkowej ( $r=-0,85$ ;  $p=0,00001$ ). W obrębie grupy kontrolnej PAOD przepuszczalność skrzepu wykazywała znamienne zależność z jego podatnością na lizę ( $r=0,55$ ;  $p=0,001$ ). Ponadto stwierdzono w tej grupie znamienne odwrotną korelację przepuszczalności skrzepu z wiekiem ( $r=-0,74$ ;  $p=0,000003$ ), stężeniem cholesterolu całkowitego ( $r=-0,4$ ;  $p=0,02$ ) i triglicerydów ( $r=-0,55$ ;  $p=0,001$ ) oraz stężeniem markerów stanu zapalnego jak Fg ( $r=-0,75$ ,  $p=0,000001$ ), CRP ( $r=-0,77$ ;  $p<0,000001$ ) i IL-6 ( $r=-0,59$ ;  $p=0,0005$ ). Przepuszczalność skrzepu wykazywała także odwrotną zależność ze stężeniem fibronektyny komórkowej ( $r=-0,84$ ;  $p<0,000001$ ) i osoczowej ( $r=-0,69$ ;  $p=0,00002$ ). W grupie kontrolnej PAOD stwierdzono ponadto zależność Ks od polimorfizmu czynnika XIII Val34Leu. Nosiciele allelu Leu34 charakteryzowali się mniejszą wartością Ks niż osoby homozygotyczne pod względem allelu Val34 ( $p<0,000001$ ).

Podatność na lizę była również mniejsza w grupie chorych na chorobę Buergera w stosunku do pacjentów z miażdżycą zarostową i grup kontrolnych ( $p<0,00001$ ). W obu grupach chorych



wykazywała ona znamiennej zależność z przepuszczalnością skrzepów.

W badaniu wykazano, że obniżona przepuszczalność skrzepów fibrynowych oraz mniejsza podatność na lizę opisywane u pacjentów z miażdżycą tętnic wieńcowych i ich rodzin, charakteryzują również pacjentów z zaawansowaną, objawową miażdżycą zarostową kończyn dolnych. Właściwości skrzepu zależały także od zaawansowania tej choroby. Po raz pierwszy stwierdzono również, że szczególnie mała przepuszczalność skrzepów fibrynowych i znikoma podatność na lizę w porównaniu do osób zdrowych, jak i chorych na PAOD, charakteryzuje pacjentów z chorobą Buergera. To nowo opisanie zjawisko może mieć znaczenie w patogenezie tej choroby i nie wydaje się wynikać ze słabszej aktywności fibrynolitycznej ani zwiększonej generacji trombiny. Wyraźnie zwiększone stężenie fibronektyny komórkowej u osób z chorobą Buergera w porównaniu do grupy kontrolnej i chorych na PAOD, może być przydatne w różnicowaniu tej choroby z miażdżycą zarostową tętnic kończyn dolnych.

## SUMMARY

The final steps of the coagulation process, which involve conversion of fibrinogen to fibrin and cross-linking of fibrin fibers by activated factor XIII, lead to the formation of a compact clot resistant to mechanical and enzymatic degradation. Fibrin network architecture, fibrin fiber thickness and susceptibility to plasmin depend on a number of environmental and genetic factors. Available data indicate that abnormal fibrin clot structure may be important in several diseases including advanced coronary artery disease. It is not known if decreased permeability and resistance for lysis of the clots can also be found in patients with atherosclerosis developing in other vascular beds such as those with peripheral artery occlusive disease (PAOD). There have been no studies regarding fibrin clots in the inflammatory artery diseases like Buerger disease either.

The aim of the study was to evaluate fibrin clot properties, such as permeability and susceptibility to fibrinolysis, and identify factors which influence these variables in patients with peripheral atherosclerotic occlusive disease and Buerger disease.

We enrolled to the study 55 consecutive patients with PAOD aged 44 to 70 and 16 patients with Buerger disease aged 38 to 56 years. Control groups consisted of 30 and 17 healthy age-matched volunteers, respectively.

In both patient groups the severity of the lower extremity ischaemia was assessed by using the ankle-brachial index and claudication distance measurement on the walking treadmill. Furthermore, the run-off score was used for the evaluation of severity of stenoses of the arteries based on the results in the intravenous angiographic examination, and ultrasound examination of the extracranial arteries for evaluation of the atheromatous lesions was performed. In all patients, blood samples were drawn for the measurement of lipids, concentration of fibrinogen, C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), plasma and cellular fibronectin, fibinopeptide A, tissue plasminogen activator antigen (tPA), plasminogen activator inhibitor-1 antigen (PAI-1) and D-dimers. Fibrin clots obtained from citrate plasma samples were used for the measurement of clot permeation, expressed by the permeability coefficient,  $K_s$  (Darcy constant). The susceptibility to fibrinolysis of the clots was assessed by serial measurements of D-dimers in the buffer percolating through fibrin gels after addition of recombinant tPA according to the method by Collet et al. The factor XIII Val34Leu polymorphism was also determined. Among patients with PAOD, a subgroup in which intraarterial angiographic examination was performed (n=34), along with that serving as aged- and sex-matched comparator to the Buerger disease group were selected. For both these subgroups comparisons and correlations were made separately.

The permeability of the fibrin clots of patients with Buerger disease was above twofold lower than in PAOD patients (in the whole group as well as in the both subgroups: with intraarterial angiography

and aged- and sex-matched to the Buerger disease patients). In PAOD patients with angiographically more advanced disease (run-off score  $\geq 27$ ) the Ks coefficient was significantly lower (by 14.3%,  $p=0.001$ ) in comparison to those with milder disease (run-off score  $< 26$ ). In the Buerger disease group, the clot permeability showed a significant correlation with the maximum velocity of the increase in D-dimer levels ( $r=0.59$ ;  $p=0.01$ ), claudication distance ( $r=0.9$ ;  $p=0.002$ ) and aspirin use ( $p=0.03$ ) and inversely correlated with plasma fibronectin concentrations ( $r=-0.77$ ;  $p=0.0004$ ). The clot permeability in patients with PAOD significantly correlated with the maximum velocity of the increase in D-dimer levels ( $r=0.42$ ;  $p=0.001$ ), fibrinogen concentration ( $r=-0.35$ ;  $p=0.008$ ) and PAI-1 ( $r=-0.55$ ;  $p=0.00001$ ). In the Buerger disease group, cellular fibronectin levels were more than three-fold higher than in the control group (4.47 vs 1.17  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p<0.000001$ ) and twofold higher than in the PAOD group (4.47 vs 1.71  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p<0.0001$ ).

There was a statistically significant inverse correlation between clot permeability and fibrinogen concentrations ( $r=-0.7$ ;  $p=0.0006$ ) and cellular fibronectin levels ( $r=-0.85$ ;  $p=0.00001$ ) in the TAO control group. In the PAOD control group, clot permeability correlated with susceptibility to fibrinolysis ( $r=0.55$ ;  $p=0.001$ ). Furthermore, there were inverse associations between clot permeability and age ( $r=-0.74$ ;  $p=0.00003$ ), total cholesterol concentration ( $r=-0.4$ ;  $p=0.02$ ), triglycerides ( $r=-0.55$ ;  $p=0.001$ ) and inflammatory markers such as fibrinogen ( $r=-0.75$ ;  $p=0.00001$ ), CRP ( $r=-0.77$ ;  $p=0.000001$ ) and IL-6 ( $r=-0.59$ ;  $p=0.0005$ ) was shown. Clot permeability was also inversely correlated with cellular ( $r=-0.84$ ;  $p<0.000001$ ) and plasma fibronectin levels ( $r=-0.69$ ;  $p=0.00002$ ). There was also a correlation between Ks and factor XIII Val34Leu polymorphism in the PAOD control group, but not in both patient groups. The Leu34 carriers had lower the Ks coefficient than individuals homozygous with the Val34 allele ( $p<0.00001$ ).

The susceptibility to fibrinolysis was also decreased in patients with Buerger disease as compared to those with PAOD and controls ( $p<0.000001$ ). There was a significant association of this parameter with clot permeability.

In conclusion, this study demonstrates that decreased permeability and hypofibrinolysis of fibrin clots, previously described in patients with coronary artery disease and their relatives, also characterize patients with symptomatic, advanced peripheral artery occlusive disease. These properties of the clot correlate with the severity of the disease. For the first time, it has also been shown that exceptionally low permeability of the fibrin clots and hypofibrinolysis (compared to healthy controls and patients with PAOD) occur in patients with Buerger disease. This new described phenomenon might be involved in the pathogenesis of Buerger disease and shows no association with plasma fibrinolytic activity or thrombin generation. Markedly increased levels of cellular fibronectin in patients with Buerger disease could be useful in the differentiation of this disease from peripheral atherosclerotic occlusive disease.

## 10. PIŚMIENICTWO

1. Leng GC, Fowkes FGR. The Edinburgh claudication questionnaire: an improved version of the WHO/Rose questionnaire for use in epidemiological surveys. *J Clin Epidemiol.* 1992; 45: 1101-1109.
2. De Backer IG, Kornitzer M, Sobolski J, Denolin H. Intermittent claudication: epidemiology and natural history. *Acta Cardiol.* 1979; 34: 115-124.
3. Criqui MH, Denenberg JO, Langer RD, Fronck A. The epidemiology of peripheral arterial disease: importance of identifying the population at risk. *Vasc Med.* 1997; 2: 221-226.
4. Meijer WT, Hoes AW, Rutgers D, Bots M, Hofman A, Grobbee D. Peripheral Arterial Disease in the Elderly. The Rotterdam Study. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 185-192.
5. Murabito JM, D'Agostino RB, Silbershatz H, Wilson WF. Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Study. *Circulation.* 1997; 96: 44-49.
6. Schroll M, Munck O. Estimation of peripheral arteriosclerotic disease by ankle blood pressure measurements in a population study of 60-year-old men and women. *J Chronic Dis.* 1981; 34: 261-269.
7. Fowkes FG. The measurement of atherosclerotic peripheral disease in epidemiological surveys. *International Journal of Epidemiology.* 1988; 17: 248-254.
8. Second European Consensus Document on Chronic Critical Leg Ischemia. *Circulation.* 1991; 81 suppl. IV 1- 26.
9. Fowkes FG, Housley E, Cawood EH, Macintyre CC, Ruckley CV, Prescott RJ. Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol.* 1991; 20: 384-392.
10. Reunanen A, Takkunen H, Aromaa A. Prevalence of intermittent claudication and its effects on mortality. *Acta Med Scand.* 1982; 211: 249-256.
11. Vogt MT, Wolfson SK, Kuller LH. Lower extremity arterial disease and the aging process: a review. *J Clin Epidemiol.* 1992; 45: 529-542.
12. Dormandy J, Mahir M, Ascady G, Balsano F, De Leeuw P, Blombery P, Bousser MG, Clement D, Coffman J, Deutshinoff A. Fate of the patient with chronic leg ischaemia. *J Cardiovasc Surg.* 1989; 30: 50-57.
13. Hertzner NR. The natural history of peripheral vascular disease. Implications for its management. *Circulation.* 1991; 83(2 Suppl): 12-19.
14. Hughson WG, Mann JI, Garrod A. Intermittent claudication: prevalence and risk factors. *Br Med J.* 1978; 1: 1379-1381.
15. Federman DG, Trent JT, Froelich CW, Demirovic J, Kirsner RS. Epidemiology of peripheral vascular disease: a predictor of systemic vascular disease. *Ostomy Wound Manage.* 1998; 44: 58-62, 64, 66.
16. Kannel WB. Risk factors for atherosclerotic cardiovascular outcomes in different arterial territories. *J Cardiovasc Risk.* 1994; 1: 333-339.
17. Murabito JM, Evans JC, Nieto K, Larson MG, Levy D, Wilson PW. Prevalence and clinical correlates of peripheral arterial disease in the Framingham Offspring Study. *Am Heart J.* 2002; 143: 961-965.

18. Zimmerman BR, Palumbo PJ, O'Fallon WM, Ellefson RD, Osmundson PJ, Kazmier FJ. A prospective study of peripheral occlusive arterial disease in diabetes, III: initial lipid and lipoprotein findings. *Mayo Clinic Proc.* 1981; 56: 233-242.
19. Criqui MH, Browner D, Fronck A, Klauber MR, Coughlin SS, Barrett-Connor E, Gabriel S. Peripheral arterial disease in large vessels is epidemiologically distinct from small vessel disease: an analysis of risk factors. *Am J Epidemiol.* 1989; 129: 1110-1119.
20. Pedersen TR, Kjekshus J, Pyorala K, Olsson AG, Cook TJ, Musliner TA, Tobert JA, Haghfelt T. Effect of simvastatin on ischemic signs and symptoms in the Scandinavian simvastatin survival study (4S). *Am J Cardiol.* 1998; 81: 333-335.
21. Mondillo S, Ballo P, Barbati R, Guerrini F, Ammataro T, Agricola E, Pastore M, Borrello F, Belcastro M, Picchi A, Nami R. Effects of simvastatin on walking performance and symptoms of intermittent claudication in hypercholesterolemic patients with peripheral vascular disease. *Am J Med.* 2003; 114: 359-364.
22. Mohler ER III, Hiatt WR, Creager MA. Cholesterol reduction with atorvastatin improves walking distance in patients with peripheral arterial disease. *Circulation.* 2003; 108: 1481-1486.
23. Gordon T, Kannel WB. Predisposition to atherosclerosis in the head, heart, and legs: the Framingham study. *JAMA.* 1972; 221: 661-666.
24. Stout RW. Diabetes, atherosclerosis and aging. *Diabetes Care.* 1990; 13(suppl 2): 20-23.
25. Standle E, Steigler H, Janka H. Cerebral and peripheral vascular disease. Mogensen CE, Standle E. *Prevention and treatment of diabetic late complications.* New York. De Gruyter, 1989: 169-198.
26. Diabetes-related amputations of lower extremities in the Medicare population: Minnesota, 1993-1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1998; 47: 649-652.
27. Golledge J. Lower-limb arterial disease. *Lancet.* 1997; 350: 1459-65.
28. Jonason T, Ringqvist I. Factors of prognostic importance for subsequent rest pain in patients with intermittent claudication. *Acta Med Scand.* 1985; 218: 27-33.
29. Management of peripheral arterial disease. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC): chronic critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 19 Suppl A: 144-243.
30. Fowkes FG. Fibrinogen and peripheral arterial disease. *Eur Heart J.* 1995; 16 Suppl A: 36-40.
31. Kannel WB, D'Agostino RB, Belanger AJ, Sibershatz H, Toftler GT. Long-term influence of fibrinogen on initial and recurrent cardiovascular events in men and women. *Am J Cardiol.* 1996; 78: 90-92.
32. Lee AJ, Lowe GD, Woodward M, Tunstall-Pedoe H. Fibrinogen in relation to personal history of prevalent hypertension, diabetes, stroke, intermittent claudication, coronary heart disease, and family history: the Scottish Heart Health Study. *Br Heart J.* 1993; 69: 338-342.
33. Vorster HH. Fibrinogen and women's health. *Thromb Res.* 1999; 95: 137-154.
34. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA.* 2001; 285: 2481-2485.

35. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, Wong PW, Coull B, Inahara T, Mukerjee D, Sexton G, Upson B. Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*. 1989; 79: 1180-1188.
36. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*. 1991; 324: 1149-1155.
37. Domagala TB, Undas A, Libura M, Szczeklik A. Pathogenesis of vascular disease in hyperhomocysteinaemia. *J Cardiovasc Risk*. 1998; 5: 239-247.
38. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 115-126.
39. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973; 180: 1332-1339.
40. Chlopicki S, Gryglewski RP. Farmakologia śródbłonka. *Kardiol Pol*. 2002; 57, suppl IV: 5-15.
41. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995; 92: 1355-1374.
42. Aronow WS, Ahn C. Prevalence of coexistence of coronary artery disease, peripheral arterial disease, and atherothrombotic brain infarction in men and women > or = 62 years of age. *Am J Cardiol*. 1994; 74: 64-65.
43. Sukhija R, Yalamanchili K, Aronow WS. Prevalence of left main coronary artery disease, of three- or four-vessel coronary artery disease, and of obstructive coronary artery disease in patients with and without peripheral arterial disease undergoing coronary angiography for suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2003; 92: 304-305.
44. Hennerici M, Aulich A, Sanderman W, Freud H. Incidence of asymptomatic extracranial arterial disease. *Stroke*. 1981; 12: 750-758.
45. Von Kemp K, van den Brande P, Peterson T, Waegeneers S. Screening for concomitant disease in peripheral vascular patients. Results of a systematic approach. *Int Angiol*. 1997; 16: 114-122.
46. Jenes R, Gaardsting O, Hougaard Jensen K, Baekgaard N, Tonnesen KH, Schroeder T. Fate in intermittent claudication: outcome and risk factors. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986; 293: 1137-1140.
47. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, Browner D. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med*. 1992; 326: 381-386.
48. Schainfeld RM. Management of Peripheral Arterial Disease and Intermittent Claudication. *J Am Board Fam Pract*. 2001; 14: 443-50.
49. Walsh JJ Jr, Cofelice M, Lumpkin D, Kerstein MD. Is screening for vascular disease a valuable proposition? *J Cardiovasc Surg*. 1988; 29: 306-309.
50. Carter SA. Role of pressure measurements in vascular disease. In: Bernstein EF, ed. *Noninvasive Diagnostic Techniques in Vascular Disease*. St Louis, Mo: CV Mosby Co; 1985: 514-544.
51. Newman AB, Shemanski L, Manolio TA, Cushman M, Mittelmark M, Polak JF, Powe NR, Siscovick D. Ankle-Arm Index as a Predictor of Cardiovascular Disease and Mortality in the Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 538-545.

52. Resnick HE, Lindsay RS, McDermott MM, Devereux RB, Jones KL, Fabsitz RR, Howard BV. Relationship of High and Low Ankle Brachial Index to All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality. The Strong Heart Study. *Circulation*. 2004; 109: 733-739.
53. Bernstein EF, Fronck A: Current status of non-invasive tests in the diagnosis of peripheral arterial disease. *Surg Clin North Am*. 1982; 62: 473-487.
54. McLafferty RB, Moneta GL, Taylor LM Jr, Porter JM. Ability of ankle-brachial index to detect lower-extremity atherosclerotic disease progression. *Arch Surg*. 1997; 132: 836-40.
55. Gale SS, Scissons RP, Salles-Cunha SX, Dosick SM, Whalen RC, Pigott JP, Beebe HG. Lower extremity arterial evaluation: are segmental arterial blood pressures worthwhile? *J Vasc Surg*. 1998; 27: 831-838.
56. Strandness DE Jr. Exercise testing in the evaluation of patients undergoing direct arterial surgery. *J Cardiovasc Surg*. 1970; 11: 192-200.
57. Strandness DE Jr. Hemodynamics of the normal arterial and venous system. In: Strandness DE Jr, ed. *Duplex Scanning in Vascular Disorders*. New York, NY: Raven Press; 1993: 45-79.
58. Cachovan M. Functional evaluation of intermittent claudication. *Vasa*. 1997; 26: 185-189.
59. Chaudhry H, Holland A, Dormandy J. Comparison of graded versus constant treadmill test protocols for quantifying intermittent claudication. *Vasc Med*. 1997; 2: 93-97.
60. Strandness DE Jr, Bell JW. Peripheral vascular disease: diagnosis and objective evaluation using a mercury strain gauge. *Ann Surg*. 1965; 161(suppl): 1-35.
61. Orchard TJ, Strandness DE Jr. Assessment of peripheral vascular disease in diabetes: report and recommendations of an international workshop sponsored by the American Diabetes Association and the American Heart Association, September 18-20, 1992, New Orleans, Louisiana. *Circulation*. 1993; 88: 819-828.
62. Kohler TR, Nance DR, Cramer MM, Vandenburghe N, Strandness DE Jr. Duplex scanning for diagnosis of aortoiliac and femoropopliteal disease: a prospective study. *Circulation*. 1987; 76: 1074-1080.
63. Jager KA, Phillips DJ, Martin RL, Hanson C, Roederer GO, Langlois YE, Ricketts HJ, Strandness DE Jr. Noninvasive mapping of lower limb arterial lesions. *Ultrasound Med Biol*. 1985; 11: 515-521.
64. Malek G. Ultrasonografia. In: Pasiński T, Gacjong Z, Torbicki A, Szmidt J eds. *Angiologia, PZWL*. 2004; 107-108.
65. Rubin GD, Schmidt AJ, Logan LJ, Sofilos MC. Multi-detector row CT angiography of lower extremity arterial inflow and runoff: initial experience. *Radiology*. 2001; 221: 146-158.
66. Ota H, Takase K, Igarashi K, Chiba Y, Haga K, Saito H, Takahashi S. MDCT Compared with Digital Subtraction Angiography for Assessment of Lower Extremity Arterial Occlusive Disease: Importance of Reviewing Cross-Sectional Images. *AJR* 2004; 182: 201-209.
67. Ho KY, Leiner T, de Haan MW, van Engelshoven JM. Peripheral MR angiography. *Eur Radiol*. 1999; 9: 1765-1774.
68. Rofsky NM, Adelman MA. MR Angiography in the Evaluation of Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease. *Radiology*. 2000; 214: 325-338.

69. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy-I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ*. 1994; 308: 81-106.
70. Quick CRG, Cotton LT. The measured effect of stopping smoking on intermittent claudication. *Br J Surg*. 1982; 69(suppl): 24-26.
71. Hirsch AT, Treat-Jacobson D, Lando HA, Hatsukami DK. The role of tobacco cessation, antiplatelet and lipid-lowering therapies in the treatment of peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 1997; 2: 243-251.
72. Hiatt WR, Regensteiner JG, Hargarten ME, Wolfel EE, Brass EP. Benefits of exercise conditioning for patients with peripheral arterial disease. *Circulation*. 1990; 81: 602-609.
73. Gardner AW, Poehlman ET. Exercise rehabilitation programs for the treatment of claudication pain. A meta-analysis. *JAMA*. 1995; 274: 975-980.
74. Regensteiner JG, Gardner A, Hiatt WR. Exercise testing and exercise rehabilitation for patients with peripheral arterial disease: status in 1997. *Vasc Med*. 1997; 2: 147-155.
75. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Prevention of death, myocardial infarction and stroke by antiplatelet therapy in high-risk patients. *BMJ*. 2002; 324: 71-86.
76. Clagett GP, Sobel M, Jackson MR, Lip GY, Tangelder M, Verhaeghe R. Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004; 126 (3 Suppl): 609-626.
77. Janzon L, Bergqvist D, Boberg J, Boberg M, Eriksson I, Lindgarde F, Persson G, Almgren B, Fagher B, Kjellstrom T. Prevention of myocardial infarction and stroke in patients with intermittent claudication; effects of ticlopidine. Results from STIMS, the Swedish Ticlopidine Multicentre Study. *J Intern Med*. 1990; 227: 301-308.
78. Blanchard J, Carreras LO, Kindermans M. Results of EMATAP: a double-blind placebo-controlled multicentre trial of ticlopidine in patients with peripheral arterial disease. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1994; 35: 523-528.
79. Balsano F, Coccheri S, Libretti A, Nenci GG, Catalano M, Fortunato G, Grasselli S, Violi F, Hellemans H, Vanhove P. Ticlopidine in the treatment of intermittent claudication: a 21-month double-blind trial. *J Lab Clin Med*. 1989; 114: 84-91.
80. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet*. 1996; 348: 1329-1339.
81. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002; 360: 7-22.
82. Porter JM, Cutler BS, Lee BY, Reich T, Reichle FA, Scogin JT, Strandness DE. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *Am Heart J*. 1982; 104: 66-72.
83. Lindgarde F, Jelnes R, Bjorkman H, Adielsson G, Kjellstrom T, Palmquist I, Stavenow L. Conservative drug treatment in patients with moderately severe chronic occlusive peripheral arterial disease. Scandinavian Study Group. *Circulation*. 1989; 80: 1549-1556.



84. Hood SC, Moher D, Barber GG. Management of intermittent claudication with pentoxifylline: meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ*. 1996; 155: 1053-1059.
85. Dawson DL, DeMaioribus CA, Hagino RT, Light JT, Bradley DV Jr, Britt KE, Charles BE. The effect of withdrawal of drugs treating intermittent claudication. *Am J Surg*. 1999; 178: 141-146.
86. Dawson DL, Cutler BS, Meissner MH, Strandness DE Jr. Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudication: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind trial. *Circulation*. 1998; 98: 678-686.
87. Dawson DL, Cutler BS, Hiatt WR, et al. A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *Am J Med*. 2000; 109: 523-530.
88. Kieffer E, Bahnini A, Mouren X, Gamand S. A new study demonstrates the efficacy of naftidrofuryl in the treatment of intermittent claudication. Findings of the Naftidrofuryl Clinical Ischemia Study (NCIS). *Int Angiol*. 2001; 20: 58-65.
89. Hiatt WR, Regensteiner JG, Creager MA, Hirsch AT, Cooke JP, Olin JW, Gorbunov GN, Isner J, Lukjanov YV, Tsitsiashvili MS, Zabelskaya TF, Amato A. Propionyl-L-carnitine improves exercise performance and functional status in patients with claudication. *Am J Med*. 2001; 110: 616-622.
90. Szczeklik A, Nizankowski R, Skawinski S, Szczeklik J, Gluszko P, Gryglewski RJ. Successful therapy of advanced arteriosclerosis obliterans with prostacyclin. *Lancet*. 1979; 1: 1111-1114.
91. Nizankowski R, Krolikowski W, Bielatowicz J, Szczeklik A. Prostacyclin for ischemic ulcers in peripheral arterial disease. A random assignment, placebo controlled study. *Thromb Res*. 1985; 37: 21-28.
92. Thum J, Caspary L, Creutzig A, Alexander K. Intra-arterial and intravenous administration of prostaglandin E1 cause different changes to skin microcirculation in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Vasa*. 1998; 27: 100-105.
93. Hossmann V, Auel H, Rucker W, Schror K. Prolonged infusion of prostacyclin in patients with advanced stages of peripheral vascular disease: a placebo-controlled cross-over study. *Klin Wochenschr*. 1984; 62: 1108-1114.
94. Kowal-Gierczak B, Kurzawska-Mielecka M, Czarnacki M. Prostaglandin E1 in the treatment of chronic ischemia of the extremities. *Pol Arch Med Wewn*. 1990; 84: 321-327.
95. Belcaro G, Laurora G, Nicolaides AN, Agus G, Cesarone MR, DeSanctis MT, Incandela L, Ricci A, Cazaubon M, Ippolito E, Barsotti A, Vasdekis S, Ledda A, Iacobitti P, Christopoulos D, Errichi BM, Helmis H, Cornelli U, Ramaswami G, Bucci M, Ferrari PG, Corsi M, Pomante P, Mezzanotte L, Geroulakos G, et al. Treatment of severe intermittent claudication with PGE1- a short-term vs a long-term infusion plan- a 20 week, European randomized trial-analysis of efficacy and costs. *Angiology*. 1998; 49: 885-894.
96. Lievre M, Morand S, Besse B, Fiessinger JN, Boissel JP. Oral Beraprost sodium, a prostaglandin I(2) analogue, for intermittent claudication: a double-blind, randomized, multicenter controlled trial. Beraprost et Claudication Intermittente (BERCI) Research Group. *Circulation*. 2000; 102: 426-31.
97. Jensen LP. Intermittent claudication. Conservative treatment, endovascular repair or open surgery for femoropopliteal disease. *Ann Chir Gynaecol*. 1998; 87: 137-140.
98. Phillips MJ, Cowan AR, Johnson CD. Intermittent claudication should not be treated by surgery. *Ann R Coll Surg Engl*. 1997; 79: 264-267.

99. Schwarzenberg H. Local fibrinolysis of peripheral arterial occlusions. *Rofo*. 1998; 169: 227-235.
100. von Winiwarter F. Ueber eine eigenthumliche form von endarteritis und endophlebitis mit gangran des fusses. *Arch Klin Chir*. 1879; 23: 202-226.
101. Buerger L. Thrombo-angiitis obliterans: a study of the vascular lesions leading to presenile spontaneous gangrene. *Am J Med Sci*. 1908; 136: 567-580.
102. Olin JW. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *N Engl J Med*. 2000; 343: 864-869.
103. Mills JL, Porter JM. Buerger's disease (thromboangiitis obliterans). *Ann Vasc Surg*. 1991; 5: 570-572.
104. Wysokinski WE, Kwiatkowska W, Sopian-Raczkowska B, Czarnacki M, Doskocz R, Kowal-Gierczak B. Sustained classic clinical spectrum of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Angiology*. 2000; 51: 141-150.
105. Cachovan M. Epidemiologie und geographisches Verteilungsmuster der Thromboangiitis obliterans. In: Heidrich H, ed. *Thromboangiitis Obliterans. Morbus Winiwarter-Buerger*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme, 1988: 31-36.
106. Matsushita M, Nishikimi N, Sakurai T, Nimura Y. Decrease in prevalence of Buerger's disease in Japan. *Surgery* 1998; 124:498-502. *J Cardiovasc Surg*. 1978; 19: 69-76.
107. Nielubowicz J, Rosnowski A, Pruszyński B, Przetakiewicz Z, Potemkowski A. Natural history of Buerger's disease. *J Cardiovasc Surg*. 1980; 21: 529-540.
108. Mills JL. Buerger's disease: Current status. *Vasc Med Rev*. 1994; 5: 139-150.
109. McLoughlin GA, Helsby CR, Evans CC, Chapman DM. Association of HLA-A9 and HLA-B5 with Buerger's disease. *Br Med J*. 1976; 2: 1165-1166.
110. Smolen JS, Youngchaiyud U, Weidinger P, Kojer M, Endler AT, Mayr WR, Menzel EJ. Autoimmunological aspects of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Clin Immunol Immunopathol*. 1978; 11: 168-177.
111. Gulati SM, Singh KS, Thusoo TK, Saha K. Immunological studies in thromboangiitis obliterans. *J Surg Res*. 1979; 27: 287-293.
112. de Moerloose PH, Jeannot M, Mirimanoff P, Bouvier CA. Evidence for an HLA-linked resistance gene in Buerger's disease. *Tissue Antigens*. 1979; 14: 169-173.
113. Mills JL, Taylor LT, Porter JM. Buerger's disease in the modern era. *Am J Surg*. 1987; 54: 123-129.
114. Olin JW, Young JR, Graor RA, Ruschhaupt WF, Bartholomew JR. The changing clinical spectrum of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Circulation* 1990; 82: Suppl IV: 3-8.
115. Lie JT. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) in women. *Medicine*. 1987; 66: 65-72.
116. Donatelli F, Triggiani M, Nascimbene S, Basso C, Benussi S, Chierchia SL, Thiene G, Grossi A. Thromboangiitis obliterans of coronary and internal thoracic arteries in a young woman. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997; 113: 800-802.
117. Rosen N, Sommer I, Knobel B. Intestinal Buerger's disease. *Arch Pathol Lab Med*. 1985; 109: 962-963.

118. Lie JT. Visceral intestinal Buerger's disease. *Int J Cardiol.* 1998; 66: Suppl 1: 249-256.
119. Michail PO, Filis KA, Delladetsima JK, Koronarchis DN, Bastounis EA. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) in visceral vessels confirmed by angiographic and histological findings. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998; 16: 445-448.
120. Lie JT. Diagnostic histopathology of major systemic and pulmonary vasculitic syndromes. *Rheum Dis Clin North Am.* 1990; 16: 269-292.
121. Shionoya S, Leu HJ, Lie JT. Buerger's disease (thromboangiitis obliterans). In: Stehbens WE, Lie JT, eds. *Vascular pathology.* London: Chapman & Hall Medical, 1995: 657-678.
122. Lie JT. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) revisited. *Pathol Annu.* 1988; 23:257-291.
123. Olin JW, Lie JT. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). In: Loscalzo J, Creager MA, Dzau VJ, eds. *Vascular medicine.* 2nd ed. Boston: Little, Brown, 1996: 1033-1049.
124. Kurata A, Franke FE, Machinami R, Schulz A. Thromboangiitis obliterans: classic and new morphological features. *Virchows Arch.* 2000; 436: 59-67.
125. Majewski W, Marszalek A, Staniszewski R, Majewski P, Zapalski S, Biczysko W. Clinical and morphological aspects of Buerger's disease. *Int Angiol.* 1997; 16: 239-244.
126. Kobayashi M, Ito M, Nakagawa A, Nishikimi N, Nimura Y. Immunohistochemical analysis of arterial wall cellular infiltration in Buerger's disease (endarteritis obliterans). *J Vasc Surg.* 1999; 29: 451-458.
127. McKusick VA, Harris WS, Ottesen OE, Goodman RM, Shelley WM, Bloodwell RD. Buerger's disease-a distinct clinical and pathologic entity. *JAMA.* 1962; 181: 5-12.
128. Kinare SG, Kher YR, Rao G, Sen PK. Pattern of occlusive peripheral vascular disease in India. (clinicopathological study of 79 cases). *Angiology.* 1976; 27: 165-180.
129. Horsch AK, Brechemier D, Robert L, Horsch S. Antielastin antibodies in thrombangiitis obliterans (Winiwarter-Buerger disease). *Verh Dtsch Ges Inn Med.* 1977; 83: 1758-1761.
130. Adar R, Papa MZ, Halpern Z, Mozes M, Shoshan S, Sofer B, Zinger H, Dayan M, Mozes E. Cellular sensitivity to collagen in thromboangiitis obliterans. *N Engl J Med.* 1983; 308: 1113-1116.
131. Eichhorn J, Sima D, Lindschau C, Turowski A, Schmidt H, Schneider W, Haller H, Luft FC. Antiendothelial cell antibodies in thromboangiitis obliterans. *Am J Med Sci.* 1998; 315: 17-23.
132. Mills JL Sr. Buerger's disease in the 21st century: diagnosis, clinical features, and therapy. *Semin Vasc Surg.* 2003; 16: 179-189.
133. Shionoya S. Diagnostic criteria of Buerger's disease. *Int J Cardiol.* 1998; 66:S243-S245.
134. Mills JL, Porter JM. Buerger's disease: a review and update. *Semin Vasc Surg.* 1993; 6: 14-23.
135. Papa MZ, Rabi I, Adar R. A point scoring for the clinical diagnosis of Buerger's disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996; 11: 335-339.
136. McKusick VA, Harris WS, Ottesen OE, et al. Buerger's disease: A distinct clinical and pathologic entity. *JAMA.* 1962; 181: 93-100.
137. Rivera R. Roentgenographic diagnosis of Buerger's disease. *J Cardiovasc Surg.* 1973; 14: 40-46.

138. Corelli F. Buerger's disease: cigarette smoker disease may always be cured by medical therapy alone: uselessness of operative treatment. *J Cardiovasc Surg.* 1973; 14: 28-36.
139. Hooten WM, Bruns HK, Hays JT. Inpatient treatment of severe nicotine dependence in a patient with thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Mayo Clin Proc.* 1998; 73: 529-532.
140. Joyce JW. Buerger's disease (thromboangiitis obliterans). *Rheum Dis Clin North Am.* 1990; 16: 463-470.
141. Lie JT. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) and smokeless tobacco. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 812-813.
142. Olin JW. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). In: Rutherford RB, ed. *Vascular Surgery.* 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000: 350-64.
143. Sasajima T, Kubo Y, Inaba M, Goh K, Azuma N. Role of infrainguinal bypass in Buerger's disease: an eighteen-year experience. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997; 13: 186-192.
144. Talwar S, Jain S, Porwal R, Laddha BL, Prasad P. Pedicled omental transfer for limb salvage in Buerger's disease. *Int J Cardiol.* 2000; 72: 127-132.
145. Lau H, Cheng SWK. Buerger's disease in Hong Kong: a review of 89 cases. *Aust N Z J Surg* 1997; 67: 264-269.
146. Hussein EA, el Dorri A. Intra-arterial streptokinase as adjuvant therapy for complicated Buerger's disease: early trials. *Int Surg.* 1993; 78: 54-58.
147. Kubota Y, Kichikawa K, Uchida H, Nishimine K, Hirohashi R, Ohishi H. Superselective urokinase infusion therapy for dorsalis pedis artery occlusion in Buerger's disease. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 1997; 20: 380-382.
148. Pardy BJ, Lewis JD, Eascott MS. Preliminary experience with prostaglandins E1 and I2 in peripheral vascular disease. *Surgery.* 1980; 88: 826-832.
149. Clifford PC, Martin MF, Dieppe PA, Sheddon EJ, Baird RN. Prostaglandin E1 infusion for small vessel arterial ischaemia. *J Cardiovasc Surg.* 1983; 24: 503-508.
150. Fiessinger JN, Schafer M. Trial of iloprost versus aspirin treatment for critical limb ischaemia of thromboangiitis obliterans: The TAO study. *Lancet.* 1990; 335: 555-557.
151. The European TAO Study Group. Oral iloprost in the treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease): A double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1998; 15: 300-307.
152. Broseta J, Barbera J, de Vera JA, Barcia-Salorio JL, Garcia-March G, Gonzalez-Darder J, Rovaina F, Joanes V. Spinal cord stimulation in peripheral arterial disease. A cooperative study. *J Neurosurg.* 1986; 64: 71-80.
153. Swigris JJ, Olin JW, Mekhail NA. Implantable spinal cord stimulator to treat the ischemic manifestations of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *J Vasc Surg.* 1999; 29: 928-935.
154. Chierichetti F, Mambrini S, Bagliani A, Odero A. Treatment of Buerger's disease with electrical spinal cord stimulation-review of three cases. *Angiology.* 2002; 53: 341-347.
155. Pace AV, Saratzis N, Karokis D, Dalainas D, Kitas GD. Spinal cord stimulation in Buerger's disease. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61: 1114.

156. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg.* 1998; 28: 964-973.
157. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002; 360: 427-435.
158. Kudo FA, Nishibe T, Nishibe M, Yasuda K. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34+) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Int Angiol.* 2003; 22: 344-348.
159. Kopeć M, Łopaciuk S. Hemostaza fizjologiczna. In: Łopaciuk S, ed. *Zakrzepy i Zatory.* 2nd ed. PZWL, 2002: 19.
160. Blombäck B. Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis. *Thromb Res.* 1996; 83: 1-75.
161. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 936: 11-30.
162. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990; 265: 621-636.
163. Vasse M, Paysant J, Soria J, Collet JP, Vannier JP, Soria C. Regulation of fibrinogen biosynthesis by cytokines, consequences on the vascular risk. *Haemostasis.* 1996; 26 (Suppl 4): 331-339.
164. Koenig W. Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update. *Thromb Haemost.* 2003; 89: 601-609.
165. Weisel JW, Stauffacher CV, Bullitt E, Cohen C. A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science.* 1985; 230: 1388-1391.
166. Blombäck B. Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res.* 1996; 83: 1-75.
167. Brummel KE, Butenas S, Mann KG. An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. *Biol Chem.* 1999; 274: 22862-22870.
168. Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA. Human factor XIII from plasma and platelets: molecular weights, subunit structures, proteolytic activation, and cross-linking of fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem.* 1973; 248: 1395-1407.
169. Chung SI, Lewis MS, Folk JE. Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminases (activated blood coagulation factor XIII) to their subunit structures. *J Biol Chem.* 1974; 249: 940-950.
170. McDonagh J, McDonagh RP Jr, Delage JM, Wagner RH. Factor XIII in human plasma and platelets. *J Clin Invest.* 1969; 48: 940-946.
171. Weisberg LJ, Shiu DT, Conkling PR, Shuman MA. Identification of normal human peripheral blood monocytes and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII a-chain. *Blood.* 1987; 70: 579-582.

172. Nagy JA, Kradin RL, McDonagh J. Biosynthesis of factor XIII A and B subunits. *Adv Exp Med Biol.* 1988; 231: 29-49.
173. Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC. Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 7296-7300.
174. Weiss MS, Metzner HJ, Hilgenfeld R. Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function. *FEBS Lett.* 1998; 423: 291-296.
175. Lewis SD, Janus TJ, Lorand L, Shafer JA. Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates. *Biochemistry.* 1985; 24: 6772-6777.
176. Greenberg CS, Achyuthan KE, Fenton JW. Factor XIIIa formation promoted by complexing of alpha-thrombin, fibrin, and plasma factor XIII. *Blood.* 1987; 69: 867-871.
177. Folk JE. Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed epsilon-(gamma-glutamyl) lysine bond formation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1983; 54: 1-56.
178. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* 1991; 5: 3071-3077.
179. Ariëns RAS, Philippou H, Nagaswami Ch, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood.* 2000; 96: 988-995.
180. Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphism. *Blood.* 2002; 100: 743-754.
181. Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 8-13.
182. Wartiovaara U, Perola M, Mikkola H, Totterman K, Savolainen V, Penttilä A, Grant PJ, Tikkanen MJ, Vartiainen E, Karhunen PJ, Peltonen L, Palotie A. Association of FXIII Val34Leu with decreased risk of myocardial infarction in Finnish males. *Atherosclerosis.* 1999; 142: 295-300.
183. Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood.* 2000; 95: 586-591.
184. Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood.* 1999; 93: 906-908.
185. Blomback B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Aslund N. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 997: 96-110.
186. Fatah K, Hamsten A, Blomback B, Blomback M. Fibrin gel network characteristics and coronary heart disease: relations to plasma fibrinogen concentration, acute phase protein, serum lipoproteins and coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1992; 68: 130-135.
187. Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM. The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J Biol Chem.* 1992; 267: 24259-24263.
188. Carr ME, Shen LL, Hermans J. Mass-length ratio of fibrin fibers from gel permeation and light scattering. *Biopolymers.* 1977; 16: 1-15.

189. Blomback B, Carlsson K, Fatah K, Hessel B, Procyk R. Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res.* 1994; 75: 521-538.
190. Carr ME. Fibrin formed in plasma is composed of fibers more massive than those formed from purified fibrinogen. *Thromb Haemost.* 1988; 59: 535-539.
191. Okada M, Blomback B. Factors influencing fibrin gel structure studied by flow measurement. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408: 233-253.
192. Blomback B. Fibrinogen structure, activation, polymerization and fibrin gel structure. *Thromb Res.* 1994; 75: 327-328.
193. Collet JP, Soria J, Mirshahi M, Hirsch M, Dagonnet FB, Caen J, Soria C. Dusart syndrome: a new concept of the relationship between fibrin clot architecture and fibrin clot degradability: hypofibrinolysis related to an abnormal clot structure. *Blood.* 1993; 82: 2462-2469.
194. Lim BC, Ariens RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet.* 2003; 361: 1424-1431.
195. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem.* 1988; 57: 375-413.
196. Labat-Robert J, Szendroi M, Godeau G, Robert L. Comparative distribution patterns of type I and III collagens and fibronectin in human arteriosclerotic aorta. *Pathol Biol.* 1985; 33: 261-265.
197. Clausell N, de Lima VC, Molossi S, Liu P, Turley E, Gotlieb AI, Adelman AG, Rabinovitch M. Expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. *Br Heart J.* 1995; 73: 534-539.
198. Chow TW, McIntire LV, Peterson DM. Importance of plasma fibronectin in determining PFP and PRP clot mechanical properties. *Thromb Res.* 1983; 29: 243-248.
199. Okada M, Blomback B, Chang MD, Horowitz B. Fibronectin and fibrin gel structure. *J Biol Chem.* 1985; 260: 1811-1820.
200. Fatah K, Silveira A, Tornvall P, Karpe F, Blomback M, Hamsten A. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age. *Thromb Haemost.* 1996; 76: 535-540.
201. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Montalescot G, Weisel JW. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed. Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1354-1361.
202. Sakata Y, Aoki N. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J Clin Invest.* 1980; 65: 290-297.
203. Ritchie H, Lawrie LC, Crombie PW, Mosesson MW, Booth NA. Cross-linking of plasminogen activator inhibitor 2 and alpha 2-antiplasmin to fibrin(ogen). *J Biol Chem.* 2000; 275: 24915-24920.
204. Scott EM, Ariens RA, Grant PJ. Genetic and environmental determinants of fibrin structure and function. Relevance to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1-9.
205. Nair CH, Azhar A, Wilson JD, Dhall DP. Studies on fibrin network structure in human plasma. Part II—Clinical application: diabetes and antidiabetic drugs. *Thromb Res.* 1991; 64: 477-485.

206. Jorneskog G, Egberg N, Fagrell B, Fatah K, Hessel B, Johnsson H, Brismar K, Blomback M. Altered properties of the fibrin gel structure in patients with IDDM. *Diabetologia*. 1996; 39: 1519–1523.
207. Mills JD, Ariens RA, Mansfield MW, Grant PJ. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation*. 2002; 106: 1938-1942.
208. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997; 20: 1183-1197.
209. Report of WHO Consultation: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. World Health Organization 1999.
210. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. JNC 7 Express U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute. NIH Publication No. 03-5233, 2003.
211. Lemne C, Jogestrand T, de Faire U. Carotid Intima-Media Thickness and Plaque in Borderline Hypertension. *Stroke*. 1995; 26: 34-39.
212. Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, Johnston KW, Porter JM, Ahn S, Jones DN. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: Revised version. *J Vasc Surg*. 1997; 26: 517-538.
213. Balogh I, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, Haramura G, Pfliegler G, Mikkola H, Muszbek L. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood*. 2000; 96: 2479-2486.
214. Collet JP, Mishal Z, Lesty C, Mirshahi M, Peynet J, Baumelou A, Bensman A, Soria J, Soria C. Abnormal fibrin clot architecture in nephritic patients is related to hypofibrinolysis: influence of plasma biochemical modifications. *Thromb Haemost*. 1999; 82: 1482-1489.
215. Killewich LA, Gardner AW, Macko RF, Hanna DJ, Goldberg AP, Cox DK, Flinn WR. Progressive intermittent claudication is associated with impaired fibrinolysis. *J Vasc Surg*. 1998; 27: 645-650.
216. Williams S, Fatah K, Hjemdahl P, Blomback M. Better increase in fibrin gel porosity by low dose than intermediate dose acetylsalicylic acid. *Eur Heart J*. 1998; 19: 1666-1672.
217. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Statins and blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 287-294.
218. Collet JP, Lesty C, Montalescot G, Weisel JW. Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots. *J Biol Chem*. 2003; 278: 21331–21335.
219. Diamond SL, Anand S. Inner clot diffusion and permeation during fibrinolysis. *Biophys J*. 1993; 65: 2622-2643.
220. Weitz JI, Leslie B, Hudoba M. Thrombin binds to soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin-antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin-independent inhibitors. *Circulation*. 1998; 97: 544-552.
221. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Elevated prothrombin results in clots with an altered fiber structure: a possible mechanism of the increased thrombotic risk. *Blood*. 2003; 101: 3008-3013.



222. McDermott MM, Mehta S, Liu K, Guralnik JM, Martin GJ, Criqui MH, Greenland P. Leg symptoms, the ankle-brachial index, and walking ability in patients with peripheral arterial disease. *J Gen Intern Med.* 1999; 14: 173-181.
223. Cachovan M, Rogatti W, Woltering F, Creutzig A, Diehm C, Heidrich H, Scheffler P. Randomized reliability study evaluating constant-load and graded-exercise treadmill test for intermittent claudication. *Angiology.* 1999; 50: 193-200.
224. Gardner AW, Skinner JS, Cantwell BW, Smith LK. Progressive vs single-stage treadmill tests for evaluation of claudication. *Med Sci Sports Exerc.* 1991; 23: 402-408.
225. Ofer A, Nitecki S, Linn S, Epelman M, Fischer D, Karram T, Litmanovich D, Schwartz H, Hoffman A, Engel A. Multidetector CT Angiography of Peripheral Vascular Disease: A Prospective Comparison with Intraarterial Digital Subtraction Angiography. *AJR* 2003; 180: 719-724.
226. Rowiński O, Kulisiewicz P. Angiografia. In Pasierski T, Gaciong Z, Torbicki A, Szmidi J, eds. *Angiologia*, PZWL, 2004: 115-125.
227. Sumner DS, Porter DJ, Moore DJ, Winders RE. Digital subtraction angiography: intravenous and intra-arterial techniques. *J Vasc Surg.* 1985; 2: 344-353.
228. Harries S, Vaughan CJ, Torrie EP, Galland RB. An evaluation of intravenous digital subtraction angiography in assessing lower limb ischaemia. *Eur J Vasc Surg.* 1991; 5: 205-207.
229. Wilson NM, Chan O, Thomas ML, Browse NL. Intravenous digital subtraction angiography in the management of peripheral vascular disease. *J Cardiovasc Surg.* 1991; 32: 747-752.