

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Jan Brożek

Wpływ kwasu acetylosalicylowego na stabilność skrzepu w zależności od polimorfizmu Val34Leu czynnika XIII

praca doktorska

Promotor: dr hab. med. Anetta Undas

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CM UJ
Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Andrzej Szczeklik

Kraków, 2005

Spis treści

Wprowadzenie	5
Fibrynogen i fibryna.....	5
Czynnik XIII	12
Kwas acetylosalicylowy i jego działanie	19
Założenia i cel pracy	23
Badani	24
Metody	25
Ustalenie polimorfizmu Val34Leu cz. XIII.....	25
Krzepnięcie pełnej krwi w modelu zależnym od czynnika tkankowego.....	26
Aktywacja cz. XIII	29
Stężenie dimerów γ w skrzepach.....	29
Aktywność płytkowego cz. XIIIa.....	30
Przepuszczalność żelu fibrynowego	30
Tworzenie fibryny i fibrynoliza	34
Analiza statystyczna.....	35
Wyniki	36
Charakterystyka modelu	36
Czynnik XIIIa i XIIIaA	38
Dimery γ w skrzepach	40
Aktywność płytkowego cz. XIIIa.....	43
Struktura skrzepu	43
Podatność skrzepu na fibrynolizę	47
Dyskusja	50
Wnioski	55
Streszczenie	56
English summary	58
Podziękowania	60
Piśmiennictwo	61

Skróty i objaśnienia

A – powierzchnia
ASA – kwas acetylosalicylowy
COX – cyklooksygenaza
cz. XIII – czynnik XIII
cz. XIII A – podjednostka A czynnika XIII
cz. XIII Aa – aktywowana podjednostka A czynnika XIII
 d_f – średnica włókna
 ϵ – porowatość
 η – lepkość
 φ – ułamek objętościowy
FPA – fibrynopeptyd A
FPB – fibrynopeptyd B
 K_S – przepuszczalność, współczynnik przepuszczalności, stała Darcy'ego
L – długość
MALDI-TOF – spektrometria mas typu czasu przelotu
OD – gęstość optyczna
P – ciśnienie
PAI-2 – inhibitor aktywatora plazminogenu typu 2
PG – prostaglandyna
Q – przepływ objętościowy
 $t_{50\%}$ – czas 50% fibrylizy, w którym gęstość optyczna żelu zmniejsza się o połowę w porównaniu z wartością maksymalną
TAFI – inhibitor fibrylizy aktywowany przez trombinę
TAT – kompleksy trombina-antytrombina
TNK-tPA – tenekteplaza
tPA – tkankowy aktywator plazminogenu
TXA₂ – tromboksan A₂
V – objętość
 V_{\max} – maksymalna szybkość fibrylizy
 $V_{p\max}$ – maksymalna szybkość polimeryzacji fibryny

Skróty jedno i trzyliterowe nazw aminokwasów

A	Ala	alanina
B	Asx	kwas asparaginowy lub asparagina
C	Cys	cysteina
D	Asp	kwas asparaginowy
E	Glu	kwas glutaminowy
F	Phe	fenyloalanina
G	Gly	glicyna
H	His	histydyna
I	Ileu	izoleucyna
K	Lys	lizyna
L	Leu	leucyna
M	Met	metionina
N	Asn	asparagina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	seryna
T	Thr	treonina
V	Val	walina
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tyrozyna
Z	Glx	kwas glutaminowy lub glutamina
X		jakikolwiek

Wprowadzenie

Fibrynogen i fibryna

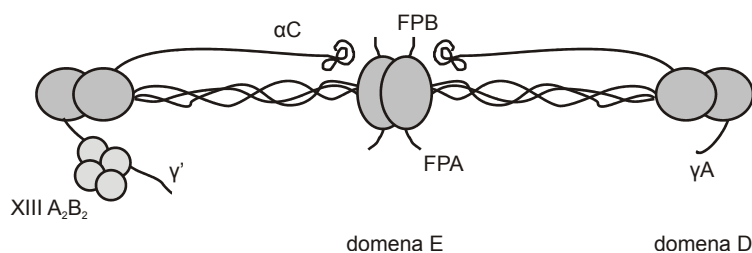
Fibrynogen i fibryna odgrywają kluczową rolę w procesie krzepnięcia krwi i utrzymywaniu hemostazy oraz biorą udział w procesach zapalnych, gojeniu ran (1) i rozwoju nowotworów (2).

Stężenie fibrynogenu w ludzkim osoczu wynosi przeciętnie 1,5–3,5 g/l i podlega dużym wahaniom biologicznym związanym np. z wiekiem, masą ciała, dietą, aktywnością fizyczną, a nawet z porą roku (3). Fibrynogen jest syntetyzowany głównie w hepatocytach (4). Dawniej sądzono, że fibrynogen może powstawać również w megakariocytach, ale obecnie przeważa pogląd, że dostaje się do megakariocytów i płytek jedynie na drodze endocytozy z osocza (5).

Fibrynogen jest rozpuszczalną glikoproteiną składającą się z dwóch symetrycznych podjednostek (6), które zawierają po 3 łańcuchy polipeptydowe oznaczone jako $A\alpha$, $B\beta$ i γ . Litery A i B oznaczają fibrynopeptydy umiejscowione na końcu aminowym łańcuchów α i β , które są odcinane przez trombinę w chwili konwersji fibrynogenu do fibryny. Geny dla wszystkich 3 łańcuchów fibrynogenu znajdują się na chromosomie 4. Sekwencja aminokwasów łańcuchów $A\alpha$, $B\beta$ i γ jest podobna (7). Łańcuch $A\alpha$ zbudowany jest z 610 aminokwasów (masa $\sim 67\ 000$ Da), łańcuch $B\beta$ – z 461 aminokwasów (masa $\sim 52\ 000$ Da) i łańcuch γ – z 411 aminokwasów (masa $\sim 46\ 000$ Da), co sprawia, iż łączna masa dimeru wynosi około 330 000 do 340 000 Da (7, 8). Łańcuch γ występuje w dwu wariantach: γA i γ' . Łańcuch γ' powstaje podczas alternatywnej transkrypcji genu łańcucha γ , w wyniku której ostatnie 4 aminokwasy końca karboksylowego zostają zastąpione 20 innymi aminokwasami (9) i stanowi 8–10% łańcuchów γ fibrynogenu (10). Około 15% cząsteczek fibrynogenu krążących w osoczu stanowią heterodimery $\gamma A/\gamma'$ (10). W obrębie łańcucha γ' znajduje się miejsce wiązania podjednostek B cz. XIII i miejsce wiązania trombiny (11).

Około 1% cząsteczek fibrynogenu krążących we krwi osób dorosłych posiada wydłużony łańcuch $A\alpha$ (α_E) tworząc cząsteczkę fibrynogenu o masie 420 000 Da (tzw. fibrynogen-420), którego fizjologiczne znaczenie jest na razie niejasne (12).

Cząsteczka fibrynogenu ma symetryczną strukturę o długości około 45–50 nm (13-15) (rys. 1). Końce aminowe wszystkich 6 łańcuchów są ciasno zwinięte, tworząc symetryczną, globularną domenę centralną E o średnicy około 5 nm stabilizowaną 5



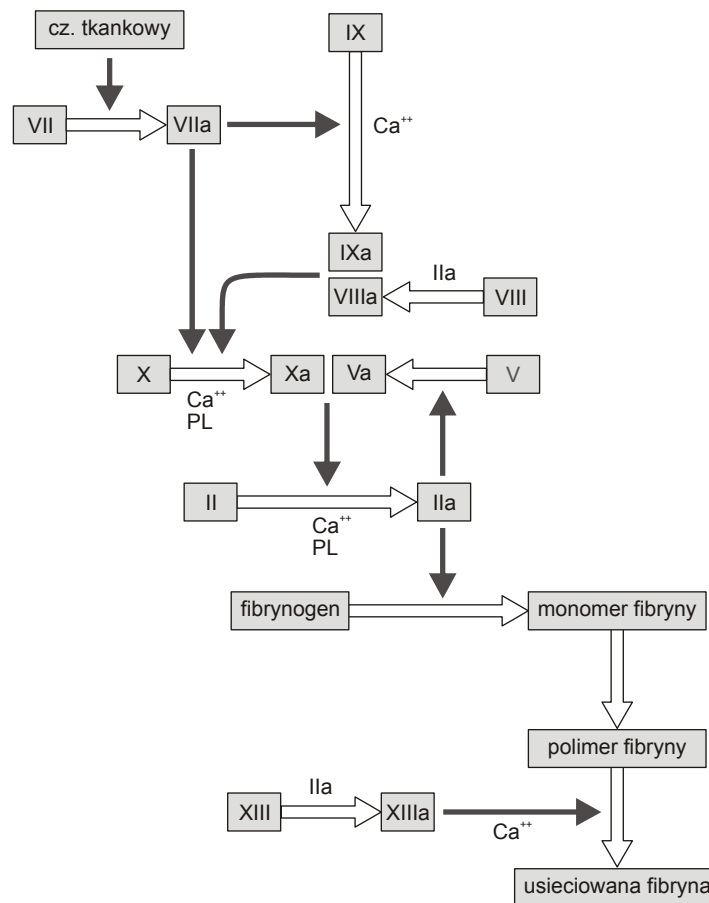
Rysunek 1. Schemat cząsteczki fibrynogenu.

Rysunek przedstawia heterodimer złożony z łańcuchów $\gamma A/\gamma'$. Do łańcucha γ' przyłączony jest cz. XIII złożony z dwóch podjednostek A i 2 podjednostek B. Opis w tekście.

Rysunek 2. Schemat krzepnięcia zależnego od czynnika tkankowego.

Cz. VIIa w połączeniu z cz. tkankowym aktywuje cz. X.
Cz. Xa łącznie z kompleksem cz. tkankowego i cz. VIIa aktywuje cz. IX. Na początku cz. Xa słabo aktywuje protrombinę, ale nawet małe ilości trombiny aktywują cz. V i VIII. Cz. VIIIa i IXa katalizują bardzo wydajną aktywację cz. X, a cz. Xa i Va tworzą bardzo wydajną protrombinazę konwertującą protrombinę do trombiny.

Ca⁺⁺ – jony wapnia;
PL – fosfolipidy błon komórkowych.
Jasne strzałki obrazują przejście czynników krzepnięcia z formy nieaktywnej w aktywną, a ciemne – oddziaływania pomiędzy poszczególnymi czynnikami układu krzepnięcia.



parami symetrycznych wiązań dwusiarczkowych. W obrębie domeny E znajdują się fibrynopeptydy A i B (16). Końce karboksylowe łańcucha B β i γ zwijają się w globularne struktury tworzące zewnętrzną domenę D o średnicy około 6,5 nm. Spiralne regiony wszystkich 3 łańcuchów zwijają się w podłużną strukturę o średnicy około 0,8–1,5 nm łączącą domenę E z domeną D (16). Końce karboksylowe łańcucha A α tworzą domenę α C, która zawija się z powrotem w kierunku centralnej domeny E.

Przekształcanie fibrynogenu w fibrynę jest złożonym procesem zachodzącym w kilku etapach. W najprostszym, klasycznym ujęciu, powstawanie fibryny rozpoczyna się, kiedy trombina odszczepia od fibrynogenu dwie pary fibrynopeptydów i powstaje monomer fibryny. Monomery fibryny polimeryzują spontanicznie tworząc włókna fibryny, które następnie są stabilizowane przez aktywowany cz. XIIIa.

Do powstania fibryny konieczna jest nawet niewielka ilość trombiny. Trombina jest enzymem proteolitycznym pełniącym liczne funkcje w ustroju, strukturalnie i czynnościowo podobnym do innych proteaz serynowych. Większość badaczy zgadza się, że aktywacja układu krzepnięcia na drodze zależnej od czynnika tkankowego jest fizjologicznym mechanizmem generacji trombiny i utrzymywania hemostazy (17) (rys. 2). Proces ten zachodzi na powierzchni błon komórkowych, co sprawia, że reakcje powstawania kluczowych enzymów układu krzepnięcia (aktywnego cz. IX, X i trombiny) przebiegają ponad 100 000 razy szybciej. Podstawowym substratem trombiny jest fibrynogen, w

którym hydrolizuje ona wiązania pomiędzy Arg16 a Gly17 łańcucha $A\alpha$ i pomiędzy Arg14 a Gly15 łańcucha $B\beta$ (18), odszczepiając od cząsteczki fibrynogenu po 2 fibrynopeptydy A (FPA) i B (FPB).

Odszczepienie 16-aminokwasowego FPA z końca aminowego łańcucha $A\alpha$ zachodzi szybciej niż odszczepienie FPB i rozpoczyna proces tworzenia fibryny, odsłaniając miejsce polimeryzacji E_A w obrębie domeny E (19). Każde miejsce E_A łączy się z komplementarnym miejscem wiązania D_a przy końcu karboksylowym łańcucha γ w obrębie domeny D sąsiedniej cząsteczki fibrynogenu (20). Odszczepienie FPA jest konieczne, aby cząsteczki fibrynogenu mogły układać się „bok do boku” tworząc oligomer fibryny – protofibryłę (19).

Odszczepienie 14-aminokwasowego fibrynopeptydu B z końca aminowego łańcucha $B\beta$ rozpoczyna się przed zakończeniem odszczepiania FPA (21), ale zachodzi wolniej (21, 22).

Tempo odszczepiania FPB znacznie się zwiększa po rozpoczęciu tworzenia żelu, prawdopodobnie wskutek zmiany struktury przestrzennej łańcucha $B\beta$ ułatwiającej interakcję z trombiną lub przyłączanie jonów wapnia (23). Odszczepienie FPB odsłania miejsce polimeryzacji E_B w obrębie domeny E, które łączy się z komplementarnym miejscem wiązania D_b przy końcu karboksylowym łańcucha β w obrębie domeny D sąsiedniej cząsteczki fibryny (20). Uwolnienie FPB nie jest konieczne, aby cząsteczki fibrynogenu agregowały ze sobą, ale wzmacnia oddziaływanie pomiędzy domenami D sąsiednich cząsteczek (24). Cząsteczki fibryny pozbawione dwóch FPA połączone wiązaniami $E_A : D_a$ przyjęło się nazywać fibryną I, natomiast cząsteczki pozbawione obu fibrynopeptydów A i B – fibryną II. Zmiana

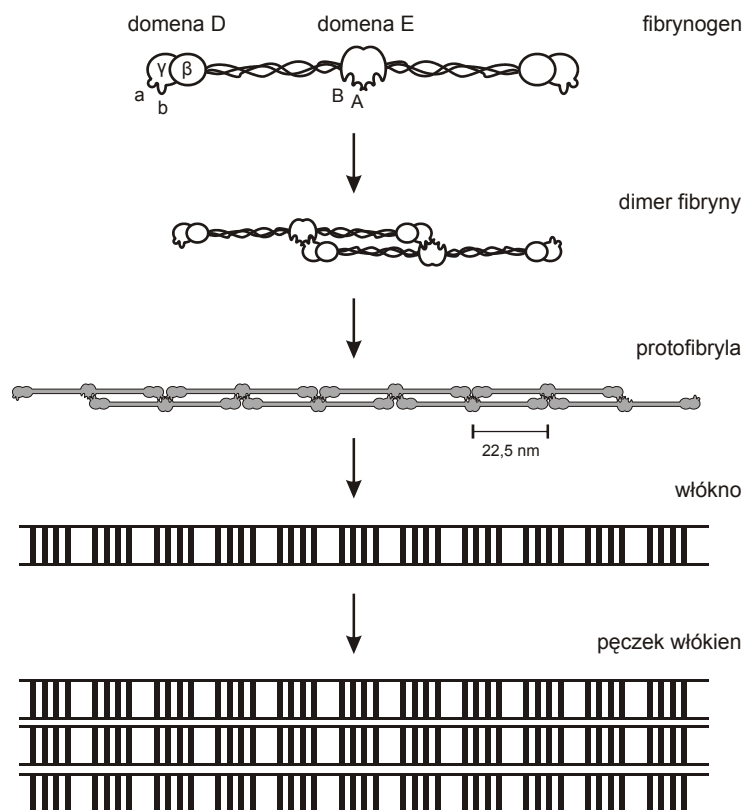
struktury przestrzennej fibrynogenu, po połączeniu domen D i E sąsiednich cząsteczek, prawdopodobnie ułatwia oddziaływania pomiędzy domenami αC sąsiednich cząsteczek i pozwala utworzyć polimery αC (25).

Rysunek 3 przedstawia schemat tworzenia fibryny. Polimery fibryny powstałe po odszczepieniu FPA przez trombinę tworzą protofibryłę o grubości około dwukrotnie większej od cząsteczek fibrynogenu i są skręcone wokół swojej osi długiej (26). Protofibryle agregują ze sobą dwojako: „bok do boku”, tworząc włókno fibryny na „przekroju” złożone z 4 cząsteczek fibryny albo „koniec do końca”, tworząc odgałęzienie składające się z 3 protofibryli (27) (rys. 4). Im wolniej odszczepiają się fibrynopeptydy, tym częściej tworzą się rozgałęzienia (28), które sprawiają, że sieć jest „gęstsza” i mniej porowata (29). Protofibryle łączą się po 14–22 tworząc grubsze włókna o średnicy około 85 ± 13 nm (30, 31). Powstałe włókna fibryny są także skręcone wokół osi długiej, co sprawia, że w miarę przyłączania kolejnych protofibryli i zwiększania średnicy włókna, protofibryle znajdujące się na obwodzie są poddawane coraz większym naprężeniom. Włókna przestają się poszerzać w chwili, kiedy energia naprężenia przekroczy energię wiązania (32). Ostatnim etapem tworzenia fibryny jest agregacja 85-nm włókien w większe pęczki.

Powstawanie fibryny w roztworze prawdopodobnie rozpoczyna się od tworzenia agregatów monomerów fibryny lub oligomerów fibryny I w wielu miejscach jednocześnie (23). W takich jądrach

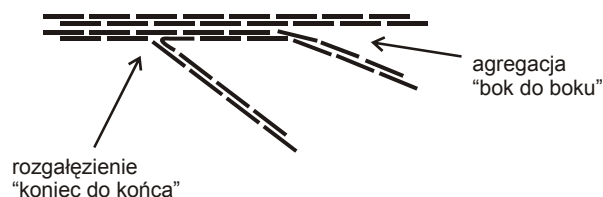
Rysunek 3. Schemat tworzenia sieci fibryny.

Po odszczepieniu fibrynopeptydów, cząsteczki fibryny agregują tworząc protofibryłę. Włókno fibryny powstaje poprzez połączenie protofibryli. Włókna złożone z 14–22 protofibryli łączą się tworząc pęczki włókien. Schemat zmodyfikowany na podstawie pracy J. Weisela i wsp. (30).



Rysunek 4. Schemat agregacji protofibryli.

Protofibryle złożone z cząsteczek fibryny (kreski) agregują „bok do boku” tworząc grubsze włókna albo „koniec do końca” tworząc rozgałęzienia sieci.



tworzenia fibryny powstają polimery szybko wydłużające się w różnych kierunkach w przestrzeni. Łączą się one następnie z innymi jądrami i włóknami oraz zatrzymują wodę formując żel fibrynowy. Udział cz. XIII w powstawaniu jąder tworzenia fibryny jest także prawdopodobny: polimery fibrynogenu, w których łańcuchy $A\alpha$ i γ są połączone wiązaniami krzyżowymi, są obecne w osoczu w chwili powstawania żelu (33) i mogą być zaczątkiem jąder tworzenia sieci w wielu kierunkach w przestrzeni.

W chwili powstawania żelu fibrynowego (odpowiadającej czasowi krzepnięcia) tylko nieznaczna część fibrynogenu jest wbudowana w strukturę fibryny, ale porowatość dojrzałego żelu po kilku godzinach zależy bezpośrednio od czasu krzepnięcia, czyli od stężenia trombiny. Sieć powstająca w chwili rozpoczęcia tworzenia żelu najpewniej służy za szkielet, do którego przyłączają się kolejne cząsteczki fibrynogenu pozostające w roztworze (23).

Włókna fibryny, powstające wielogniskowo, łączą się ze sobą tworząc trójwymiarową strukturę dojrzałego żelu. Strukturę sieci fibryny najczęściej badano za pomocą mikroskopu skaningowego, ale ze względu na potrzebę odwodnienia fibryny i procedurę przygotowywania próbek, obrazy z mikroskopu elektronowego pokazują sieć zniekształconą i zapadniętą (23, 34).

Niezniesztalone, ale za to mniej dokładne obrazy sieci fibrynowej można obserwować za pomocą trójwymiarowej mikroskopii konfokalnej. Obrazy uzyskane z mikroskopu konfokalnego przedstawiają sieć fibryny jako uporządkowaną strukturę zbudowaną z prostych włókien fibryny o nieznacznie zmiennej średnicy, które rozchodzą się w różnych kierunkach i przecinają w przestrzeni. Włókna spotykają się często w miejscach tworzących gęstsze węzły, które być może odpowiadają jądom powstawania fibryny (23).

Struktura fibryny i fibrynoliza

Właściwości żelu fibrynowego, takie jak sztywność, grubość włókien, wielkość porów sieci, gęstość wiązań krzyżowych i giętkość włókien pomiędzy rozgałęzieniami są zdeterminowane warunkami, w których powstaje sieć fibrynowa (23).

Znaczenie struktury sieci dla jej podatności na fibrynolizę było dotychczas oceniane w niewielu badaniach. Fibrynoliza rozpoczyna się hydrolizą wiązania pomiędzy arginina 560 a walina 561 w cząsteczce plazminogenu przez tkankowy aktywator plazminogenu (tPA), w wyniku której powstaje plazmina (35). Reakcja ta zachodzi 100–1000 razy szybciej na powierzchni fibryny (36). Plazmina jest aktywną endopeptydazą hydrolizującą wiązania pomiędzy arginina i lizyna różnych białek. Plazmina specyficznie hydrolizuje około 60 spośród 362 wiązań pomiędzy arginina i lizyna w obrębie cząsteczki fibryny (37).

Struktura sieci wpływa na liczbę miejsc wiązania tPA z fibryną – grube włókna posiadają więcej miejsc wiązania tPA (38). Obserwowano też, że aktywacja plazminogenu przez tPA i tworzenie plazminy są wprost proporcjonalne do grubości włókien fibryny (39), a stężenie plazminy było większe w skrzepach zbudowanych z grubych, w porównaniu z cienkimi włóknami (40).

W kilku badaniach oceniano fibrynolizę po dodaniu czynników trombolitycznych do już utworzonych skrzepów (41-44). Podejście takie, może mieć implikacje kliniczne, ponieważ rozpuszczenie skrzepu jest podstawowym celem leczenia fibrynolitycznego w celu udrożnienia zamkniętego naczynia. Niemniej, nawet bez dodania zewnętrznego czynnika trombolitycznego, te same mechanizmy, które zapoczątkowują kaskadową reakcję krzepnięcia, aktywują także fibrynolizę. Polimeryzacja fibrynogenu i fibrynoliza zwykle zachodzą jednocześnie (23). W kilku badaniach oceniano spektrofotometrycznie tworzenie się żelu fibrynowego i jego lizę po zmieszaniu fibrynogenu, plazminogenu, tPA i trombiny (39, 45-47). Większość doniesień sugeruje, że sieć fibryny zbudowana z ciasno ułożonych, cienkich włókien (mały stosunek masy do długości włókna) jest mniej podatna na fibrynolizę (39, 45, 48, 49). Obserwacje te potwierdza mniejsza podatność na fibrynolizę żelu utworzonego w obecności fibrynogenu Dusart (48, 50) i Chapel Hill III (51) (mutacja $\Delta\alpha$ Arg554Cys), które są zbudowane z niezwykle cienkich włókien. Ponadto badania podatności na lizę skrzepów utworzonych z różnorodnych cząsteczek rekombinowanego fibrynogenu potwierdziły, że grubość włókna jest jednym z najistotniejszych czynników warunkujących szybkość fibrynolizy (52).

Wydaje się jednak, że upakowanie włókien w jednostce objętości i konfiguracja przestrzenna sieci mają większy wpływ na szybkość fibrynolizy niż sama średnica włókna. Analizując obrazy uzyskane dzięki dynamicznej mikroskopii konfokalnej, Collet i wsp. zauważyli, że fibrynoliza pojedynczych, cienkich włókien zachodzi szybciej niż włókien grubych (38), ale szybkość czoła lizy skrzepu utworzonego w osoczu zbudowanego z cienkich, ciasno upakowanych włókien była mniejsza, w porównaniu ze skrzepami zbudowanymi z grubych luźno ułożonych włókien, niezależnie od ilości dodanego czynnika fibrynolitycznego (38, 53). Collet i wsp. (38, 54) oraz Veklich i wsp. (53) potwierdzili, że plazmina przecina w poprzek pojedyncze włókna fibryny, a nie trawi ich na obwodzie, jak sądzono wcześniej (39, 44). Jeżeli plazmina przecina włókna fibryny w określonych miejscach, to fibrynoliza sieci utworzonej z grubych, luźno ułożonych włókien będzie zachodziła szybciej, ponieważ jest w niej mniej włókien do przecięcia.

Żel utworzony z grubych włókien, pomiędzy którymi znajdują się większe pory, ma także większą przepuszczalność (29, 55-57), w związku z czym różne makrocząsteczki łatwiej dyfundują do wnętrza skrzepu (58). Przypuszcza się, że może to być kolejnym z mechanizmów tłumaczących większą oporność na fibrylizę żelu o małym współczynniku przepuszczalności (23).

W związku z powyższym, wydaje się, że istnieje kilka mechanizmów, które mogą tłumaczyć oporność na fibrylizę sieci utworzonej z cienkich włókien: wolniejsza aktywacja plazminogenu, trudniejsza dyfuzja czynników fibrynolitycznych do wnętrza sieci i wolniejsze trawienie licznych włókien przez plazminę.

Czynniki genetyczne i środowiskowe a struktura skrzepu

Struktura sieci fibryny zależy także od innych czynników. Skrzepy utworzone w roztworze zawierającym zwiększone stężenie fibrynogenu są większe i gęstsze (55, 59, 60), co zmniejsza ich podatność na deformację i fibrylizę (61). Zwiększone stężenie fibrynogenu, podobnie jak zwiększone stężenie trombiny, przyspieszają odszczepianie fibrynopeptydu A (62), co wiąże się z utworzeniem gęstszej sieci fibryny z większą liczbą wiązań krzyżowych (59). W dwóch badaniach obserwowano, że żel fibrynowy utworzony w osoczu uzyskanym od osób ze zwiększonym stężeniem fibrynogenu we krwi był mniej przepuszczalny w porównaniu z żelem utworzonym przy prawidłowym stężeniu fibrynogenu (59, 63), chociaż Antovic i wsp. obserwowali, że zależność ta zniknęła po zastosowaniu ASA (64).

Struktura sieci fibrynowej jest zaburzona w wielu dysfibrynogenemiach, np. w obecności fibrynogenu Dusart (48, 50) i Chapel Hill III (51) (mutacja $A\alpha$ Arg554Cys) oraz fibrynogenu Caracas II (mutacja $A\alpha$ Ser434Asn) (65) lub Bicêtre II (mutacja γ Asn308Lys) (56).

Polimorfizm, czyli zmienność genetyczna „prawidłowych” cząsteczek fibrynogenu również może wpływać na strukturę skrzepu. Dotychczas opisano 2 polimorfizmy, które wydają się

modyfikować strukturę sieci fibryny: A α Thr312Ala (większa średnica włókien fibryny u nosicieli allelu Ala312 (66)) i B β Arg448Lys (mniejsza przepuszczalność i gęstsza struktura skrzepu u nosicieli allelu Lys448 (63)). Znaczenie tego drugiego polimorfizmu jest jednak poddawane w wątpliwość (67).

Struktura sieci fibryny w skrzepie zmienia się w wielu chorobach, u których podłoża leżą miażdżyca i tendencja prozakrzepowa, m.in. w zawale serca lub w cukrzycy (68, 69). U chorych po zawale serca przebyłym w stosunkowo młodym wieku i u chorych na zaawansowaną chorobę wieńcową obserwowano zmniejszoną przepuszczalność skrzepów i mniejszy stosunek masy do długości włókna fibryny (59, 70, 71). Podobne właściwości miały skrzepy utworzone w osoczu uzyskanym od zdrowych krewnych pierwszego stopnia osób chorych na przedwczesną chorobę wieńcową (72). Zjawisko to obserwowano, pomimo że chorzy otrzymywali ASA, którego stosowanie zwiększa przepuszczalność skrzepu (73-75) i prawdopodobnie ułatwia fibrylizę (49, 76) (p. dalej).

U chorych na cukrzycę typu 1 skrzepy są mniej porowate i mniej przepuszczalne, chociaż nie obserwowano zmiany w stosunku masy do długości włókien, a efekt ten był niezależny od stężenia fibrynogenu (68, 69). W badaniach przeprowadzonych *in vitro*, dodanie glukozy do osocza także prowadziło do tworzenia się ciaśniej upakowanej i mniej przepuszczalnej sieci fibryny (69). Postulowano, że efekt ten zależy od glikozylacji fibrynogenu. U chorych na cukrzycę stosowanie doustnych leków hipoglikemizujących lub insuliny wydaje się zwiększać podatność na fibrylizę, chociaż obserwacje te są niejednoznaczne (69). Dodanie metforminy do osocza *in vitro* zmniejszało przepuszczalność i średnicę włókien fibryny (77).

Na strukturę sieci fibryny może też wpływać zwiększone stężenie cholesterolu całkowitego (78) lub cholesterolu frakcji LDL (59). Obserwowano ujemną korelację pomiędzy przepuszczalnością żelu fibrynowego a stężeniem triglicerydów (70) lub białka ostrej fazy – orozomukoidu (59). Skrzepy utworzone w obecności homocysteiny *in vitro* miały grubsze włókna i bardziej zbitą strukturę (79).

Żel fibrynowy utworzony w osoczu chorych na zespół nerczycowy, z małym stężeniem albuminy w osoczu, był mniej przepuszczalny i bardziej odporny na fibrylizę (80), co potwierdziły obserwacje *in vitro* (81), chociaż niektórzy autorzy obserwowali odwrotną zależność (82). Podobnie, rozbieżne spostrzeżenia poczyniono badając wpływ immunoglobulin na przepuszczalność i podatność żelu na fibrylizę: u chorych ze szpiczakiem mnogim i u zdrowych osób po przetoczeniu preparatu immunoglobulin dożylnie czas fibrylizy wydłużył się i zmniejszył się stosunek masy do długości włókna (83), chociaż w jednym badaniu *in vitro* przepuszczalność i stosunek masy do długości zwiększyły się po dodaniu immunoglobulin do osocza (82). Przyłączenie fibronektyny do sieci fibrynowej zwiększa jej przepuszczalność i stosunek masy do długości włókna (82, 84).

W miarę zwiększania stężenia wapnia w osoczu lub w roztworze oczyszczonego fibrynogenu zwiększa się stosunek masy do długości włókna fibryny (57, 85) i przepuszczalność żelu (86). Podobny efekt wywiera zwiększanie stężenia jonów cynku (87).

Stosunek masy do długości włókna i przepuszczalność żelu fibrynowego zmniejszają się także wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu (85, 88). Postulowano, że przyczyną tego efektu może być obrzęk włókien fibryny (23).

Czynnik XIII

Struktura i właściwości cz. XIII

Czynnik XIII układu krzepnięcia (czynnik stabilizujący fibrynę, transglutaminaza osoczowa lub fibrynoligaza) jest zymogenem przekształcanym w aktywną transglutaminazę przez trombinę w obecności jonów wapnia. Cz. XIII jest jedynym enzymem układu krzepnięcia niebędącym proteazą serynową.

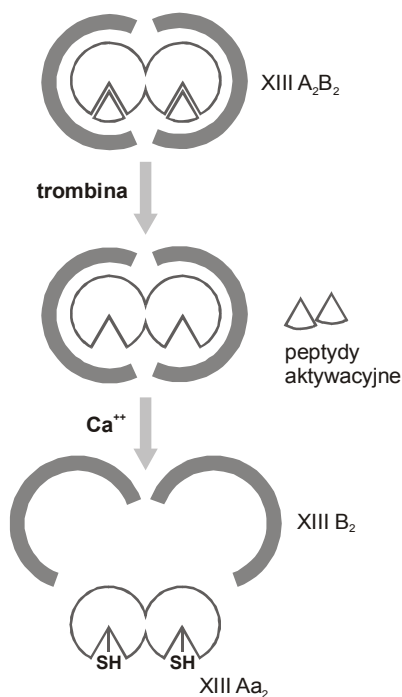
Osoczowy cz. XIII utworzony jest z dwóch różnych podjednostek polipeptydowych A i B, krążących we krwi w postaci tetrameru złożonego z dwóch łańcuchów A i dwóch łańcuchów B (A_2B_2) połączonych silnymi wiązaniami niekowalencyjnymi (89). Masa cząsteczkowa kompleksu wynosi około 325 800 Da: łańcuch A – 83 200 Da i łańcuch B – 79 700 Da (90, 91). Tetramer A_2B_2 krąży w osoczu przyłączony do łańcucha γ' fibrynogenu (92), a także prawdopodobnie w postaci wolnych podjednostek B albo kompleksów B_2 (93). Stężenie tetrameru A_2B_2 w osoczu oszacowano na około 21,6 mg/l (94), a stężenie wolnych podjednostek B na około 14–18 mg/l (95, 96).

Gen dla podjednostki A zlokalizowano na chromosomie 6 (97), a kolejność aminokwasów, które koduje, jest unikalna i nie ma cech wspólnych z innymi białkami, z wyjątkiem homologicznej sekwencji Gly-Gln-Cys-Trp w obrębie centrum aktywnego charakterystycznej dla proteaz cysteinowych (90). Sekwencja aminokwasów łańcucha A jest zmienna, co jest związane z kilkoma polimorfizmami i prawdopodobnie z degradacją łańcucha w obrębie końca karboksylowego (18). Podjednostka A ma budowę globularną (98) i jest syntetyzowana w hepatocytach, megakariocytach i monocytach (99-101). Aktywność katalityczna cz. XIII i miejsce wiązania jonów wapnia znajdują się w obrębie podjednostki A, która i posiada 9 wolnych grup sulfhydrylowych, z których jedna znajduje się na Cys314 w centrum aktywnym. Gen dla łańcucha B zlokalizowano na chromosomie 1 (102).

Podjednostka B jest syntetyzowana w hepatocytach (101). Podjednostka B ma strukturę płaską (98) i składa się z 10 powtarzających się homologicznych sekwencji około 60 aminokwasów połączonych 4 mostkami dwusiarczkowymi zwanymi β_2 glikoproteiną I, a około 8,5% jej masy stanowią węglowodany (103).

Dokładna struktura tetrameru A_2B_2 nie jest znana, chociaż wiadomo, że podjednostki A wiążą się ze sobą niekowalencyjnie, a podjednostki B zawijają się dookoła podjednostek A (101). Uważa się, że podjednostka B jest nośnikiem chroniącym podjednostkę A przed proteolizą (104, 105).

Cz. XIII wewnątrz komórek występuje w formie dimeru A_2 i znajduje się przede wszystkim w płytkach (89), megakariocytach (106) i monocytach (107, 108). Około 50% potencjalnej aktywności cz. XIII w osoczu bogatopłytkowym zlokalizowane



Rysunek 5. Aktywacja czynnika XIII.

Trombina odcina peptyd aktywacyjny z podjednostki A, a zmiany struktury przestrzennej tetrameru (XIII A₂B₂) pod wpływem jonów wapnia odsłaniają grupy sulfhydrylowe centrum aktywnego podjednostek A (XIII Aa₂) i powodują dysocjację podjednostek B (XIII B).

jest w płytkach (109). Płytkowy i osoczowy cz. XIII A mają taką samą sekwencję aminokwasów i takie same właściwości immunochemiczne (103, 110).

Aktywacja cz. XIII

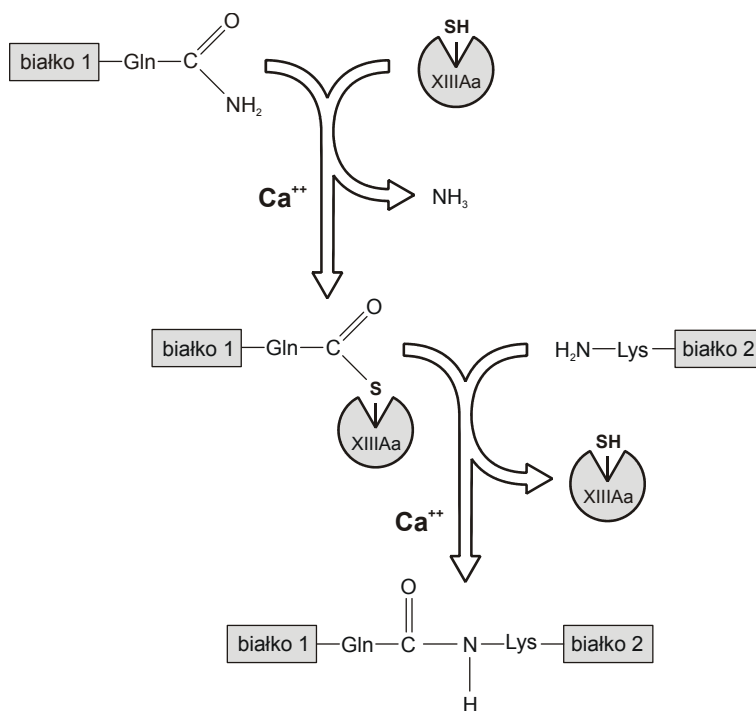
Właściwości katalityczne cz. XIII, zarówno osoczowego (A₂B₂), jak i płytkowego (A₂), ujawniają się po aktywacji przez trombinę i zmianie struktury przestrzennej pod wpływem jonów wapnia (104, 105) (rys. 5). W pierwszym etapie trombina hydrolizuje wiązanie pomiędzy Arg37 i Gly38 końca aminowego podjednostki A odcinając 37-aminokwasowy peptyd aktywacyjny o masie około 4500 Da (103). Obecność polimerów fibryny przyspiesza około 100–1000-krotnie aktywację cz. XIII przez trombinę (111–113). Odszczepienie peptydu aktywacyjnego osłabia oddziaływania pomiędzy podjednostkami A i B (114). W obecności jonów wapnia podjednostki B dysocjują i jednocześnie odsłaniają Cys314 w centrum aktywnym, umożliwiając powstanie w pełni czynnego enzymu (105). Po dysocjacji, podjednostki B krążą we krwi, natomiast ponad 90% podjednostek A pozostaje związanych z fibryną (115). Cz. XIII A aktywowany przez trombinę wiąże się z fibryną w obrębie domeny αC, co wpływa na strukturę przestrzenną i dodatkowo przyspiesza dysocjację podjednostek B (116).

Rola czynnika XIII w układzie krzepnięcia

Cz. XIII katalizuje reakcję transglutaminacji, w której wyniku tworzy się wiązanie amidowe pomiędzy grupą γ-karbonylową glutaminy a ε-aminową lizyny z równoczesnym uwolnieniem amoniaku (118) (rys. 6). Podstawową fizjologiczną czynnością aktywowanego cz. XIII A jest tworzenie dimerów łańcuchów γ (~93 000 Da) i polimerów łańcuchów α fibryny (p. niżej). Cz. XIII wiąże też α₂-antyplazminę (119) i fibronektynę z fibryną

Rysunek 6. Reakcja transglutaminacji katalizowana przez czynnik XIII Aa.

Tworzenie wiązania amidowego pomiędzy glutaminą i lizyną dwóch białek.



(120) i z kolagenem (121). Ponadto cz. XIII Aa tworzy wiązania krzyżowe pomiędzy wieloma innymi białkami: kolagenem, cz. von Willebranda, cz. V, inhibitorem fibrynolizy aktywowanym przez trombinę (TAFI), inhibitorem aktywatora plazminogenu typu 2 (PAI-2), aktyną i miozyną (117) (tab.1).

Cz. XIII Aa katalizuje tworzenie wiązań krzyżowych pomiędzy łańcuchami γ ułożonych linijnie dwóch sąsiednich cząsteczek fibryny, umacniając boczną agregację protofibryli (122) (rys. 3). Aktywacja cz. XIII A i tworzenie wiązań krzyżowych zachodzą jednocześnie z odszczepieniem fibrynopeptydu A z łańcucha α fibrynogenu (21). W obrębie domen D cząsteczki fibrynogenu, przy końcu karboksylowym łańcucha γ , znajdują się 2 miejsca ułatwiające przyleganie domen D sąsiednich cząsteczek fibryny i tworzenie wiązań krzyżowych (123). W obecności cz. XIII Aa tworzą się dwa przeciwrownoległe wiązania izopeptydowe, łączące domeny D dwóch cząsteczek fibryny pomiędzy Gln398 lub Gln399 łańcucha γ jednej cząsteczki i Lys406 drugiej cząsteczki (123). Po utworzeniu wiązań krzyżowych pomiędzy dwoma łańcuchami γ powstają dimery γ fibryny. Znacznie wolniej powstają bardziej złożone wiązania krzyżowe pomiędzy łańcuchami γ tworząc trimery i tetramery γ (124, 125). Ponieważ tylko 1 lizyna w pozycji 406 łańcucha γ bierze udział w tworzeniu wiązań krzyżowych, należy przyjąć, że trimery i tetramery γ prawdopodobnie powstają przez ponowne wykorzystanie tego samego miejsca wiązania (15).

Wiązania krzyżowe pomiędzy łańcuchami α tworzą się wolniej niż pomiędzy łańcuchami γ (15). Na podstawie badań w układzie białek oczyszczonych *in vitro* zaproponowano, że cz. XIII Aa katalizuje powstawanie wiązań pomiędzy glutaminą w pozycji 221, 237, 328 i 366 (126, 127), a lizyną w pozycji 208, 219, 224, 418, 427, 429, 446, 448, 508, 539, 556, 580, 583, 601 i 606 łańcucha α (93, 128). Wciąż nie wiadomo, które z tych aminokwasów biorą udział w tworzeniu wiązań krzyżowych *in vivo*, kiedy fibrynogen

Tabela 1. Substraty dla cz. XIII Aa. Zmodyfikowane na podstawie pracy R. Ariënsa i wsp. (117).

Substrat	Substancje, z którymi się wiąże	Znane lub potencjalne działanie
Fibrynogen/fibryna (łańcuch γ)	Łańcuch γ i α	Stabilizacja skrzepu
Fibrynogen/fibryna (łańcuch α)	Łańcuch γ i α	Stabilizacja skrzepu
α_2 -antyplazmina	Łańcuch α (Lys303)	Oporność na fibrylizację
TAFI	Fibryna, TAFI	Oporność na fibrylizację
PAI-2	Łańcuch α (Lys148, Lys230, Lys413)	Oporność na fibrylizację
Fibronektyna	Fibryna, kolagen, fibronektyna	Migracja komórek do wnętrza skrzepu, gojenie ran
Kolagen	Fibryna, fibronektyna	Stabilizacja macierzy zewnątrzkomórkowej
Cz. von Willebranda	Fibryna, kolagen	Przyleganie płytek do skrzepu
Witronektyna	Fibryna	nieznane
Trombospondyna	Fibryna	nieznane
Cz. V	Fibryna, płytki	Zwiększona generacja trombiny na powierzchni skrzepu
Aktyna	Fibryna	Retrakcja skrzepu, stabilizacja cytoszkieletu płytek
Miozyna	Miozyna	Retrakcja skrzepu, stabilizacja cytoszkieletu płytek
Winkulina	Fibryna	Retrakcja skrzepu, stabilizacja cytoszkieletu płytek
integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibryna	Stabilizacja płytek w skrzepie

PAI-2 – inhibitor aktywatora plazminogenu typu 2; TAFI – inhibitor fibrylizacji aktywowany przez trombinę

współzawodniczy z innymi cząsteczkami o przyłączenie do lizyny. Liczba potencjalnych miejsc tworzenia wiązań krzyżowych umożliwia powstawanie złożonych połączeń pomiędzy sąsiednimi domenami αC . Uważa się, że liczba utworzonych wiązań pomiędzy łańcuchami α , a nie pomiędzy łańcuchami γ , modyfikuje podatność na fibrylizację i wpływa na mechaniczne właściwości fibryny (129). Wiązania krzyżowe pomiędzy łańcuchami α przypuszczalnie ułatwiają łączenie się protofibrilli w grubsze pęczki włókien, a utworzona w ten sposób sieć zwiększa oporność fibryny na trawienie przez plazminę (34). Cz. XIII Aa katalizuje także tworzenie niewielkiej liczby wiązań pomiędzy łańcuchami α i γ (124), nawet jeszcze przed uwolnieniem FPA, tworząc połączenia α - γ i $A\alpha$ - γ (33). Chociaż polimery fibryny są podstawowymi substratami dla cz. XIII Aa, wykazano, że katalizuje on również przyłączanie cząsteczek fibrynogenu do fibryny (130, 131).

Kolejną cząsteczką będącą substratem dla cz. XIII Aa jest α_2 -antyplazmina (119) – ważny inhibitor plazminy *in vivo*. Cz. XIII Aa łączy α_2 -antyplazminę z fibryną, co odgrywa szczególną rolę w

regulacji fibrylizacji (132). Przyłączanie fibronektyny do łańcucha α zwiększa przepuszczalność i podatność sieci fibrynowej na lizę (120, 133, 134), zmienia jej właściwości mechaniczne (84) oraz zwiększa przyleganie i migracje komórek do wnętrza skrzepu (135). Pozostałe substraty cz. XIII Aa – inhibitor fibrylizacji aktywowany przez trombinę (TAFI) (136) i aktywator plazminogenu typu 2 (137) oraz inne substancje, którym przypisuje się znane lub postulowane działanie biologiczne, przedstawia tabela 1.

Polimorfizmy cz. XIII A

Dotychczas opisano 5 polimorfizmów podjednostki A cz. XIII. Pierwszy polimorfizm pojedynczych nukleotydów, polegający na transwersji G→T, czyli zamianie pojedynczego nukleotydu guaniny na tyminę w łańcuchu DNA, a w jej wyniku zamianie aminokwasu waliny na leucynę w pozycji 34 podjednostki A czynnika XIII (Val34Leu), występuje u około 25–30% osób rasy białej, 13–17% osób pochodzących z Afryki i Azji Południowej i tylko u 1% Japończyków (138-140). Polimorfizm Val34Leu, jako jedyny ze znanych dotychczas polimorfizmów cz. XIII A, ma potwierdzone znaczenie czynnościowe i wiąże się ze zmianą szybkości aktywacji cz. XIII A, modyfikacją struktury fibryny i prawdopodobnie ze zwiększonym ryzykiem zakrzepowym (p. dalej).

Polimorfizm Tyr204Phe występuje u 1–3% osób i prawdopodobnie wiąże się z poronieniami nawykowymi (141), polimorfizm Pro546Leu występuje u około 21% osób i być może zwiększa ryzyko udaru mózgu (142), a polimorfizmy Val650Ile i Glu651Gln występują odpowiednio u 6% i 27% osób i dotychczas nie donoszono o jakimkolwiek ich znaczeniu klinicznym. Nie wykazano też, aby te 4 polimorfizmy wpływały na aktywność cz. XIII (143).

Znaczenie polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A

Aktywacja cz. XIII A Leu34, zarówno osoczowego, jak i płytkowego, przebiega około 2,5-krotnie szybciej niż wariantu Val34Val niezależnie od interakcji między podjednostkami A i B (144-147). Końcowa aktywność obu wariantów homozygotycznych jest jednak taka sama (148). Mechanizm przyspieszonej aktywacji wariantu Leu34 cz. XIII A przez trombinę jest nieznany, chociaż wyniki badań sugerują, że może za nią odpowiadać zmiana struktury przestrzennej (146, 149), ponieważ interakcja między trombiną a podjednostką A cz. XIII zachodzi głównie w odcinku pomiędzy Val/Leu34 a Arg37 peptydu aktywacyjnego (150). Odcięcie peptydu aktywacyjnego w przypadku wariantu Leu34 cz. XIII A zachodzi mniej więcej równocześnie z odszczepieniem fibrynopeptydu A, natomiast w przypadku wariantu Val34 później, równocześnie z odszczepieniem fibrynopeptydu B (145). Ponieważ w chwili uwolnienia FPA powstają cienkie protofibryle, które jednocześnie z odszczepieniem FPB stopniowo agregują tworząc grubsze włókna fibryny (30, 151), cz. XIII Aa Leu34 katalizuje tworzenie wiązań krzyżowych w sieci fibryny złożonej z cieńszych włókien, wcześniej hamując agregację protofibryli i tworzenie włókien grubszych. Rzeczywiście, skrzep powstały w obecności cz. XIII Aa

Leu34 zbudowany jest z cieńszych włókien, ma mniejsze pory i mniejszą przepuszczalność w porównaniu ze skrzepem powstałym w obecności cz. XIII Val34Val (145).

W 2003 roku Lim i wsp. zaobserwowali, że u nosicieli allelu Val34 przepuszczalność zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia fibrynogenu, a u homozygot Leu34Leu pozostaje stała (63) i zasugerowali, że obserwowany w badaniach klinicznych wpływ polimorfizmu Val34Leu cz. XIII na ryzyko zakrzepicy tętniczej lub żyłnej, może być wynikiem złożonych interakcji pomiędzy czynnikiem genetycznym i czynnikami środowiskowymi. Trumbo i wsp. zauważyli, że reakcja hydrolizy peptydu aktywacyjnego katalizowana przez trombinę zachodzi około 6-krotnie szybciej w obecności cz. XIII Leu34 w porównaniu z Val34Val (147). Zaproponowali oni, że cz. XIII Leu34 jest „przedwcześnie” aktywowany, zanim pojawi się odpowiednie stężenie substratu – fibryny I, i wcześniej inaktywowany, a w konsekwencji, tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy cząsteczkami fibryny byłoby zakończone przedwcześnie.

Polimorfizm Val34Leu cz. XIII i ryzyko zakrzepicy

W wielu badaniach kliniczno-kontrolnych zaobserwowano, że polimorfizm Val34Leu cz. XIII wpływa na ryzyko zakrzepicy żyłnej i tętniczej. Paradoksalnie, wyniki tych badań sugerują, że nosiciele allelu Leu34 mogą być obciążeni mniejszym ryzykiem zawału serca (139, 152-165) lub zakrzepicy żył głębokich (146, 154, 157, 166-169), w porównaniu z osobami homozygotycznymi pod względem allelu Val34 (rys. 7 i 8). Niektórzy autorzy postulują, że zmienne wyniki badań klinicznych wskazujące na istnienie albo brak zależności pomiędzy polimorfizmem Val34Leu cz. XIII a ryzykiem zawału serca lub zakrzepicy żyłnej, wynikają z geograficznej różnicy w częstości występowania tej mutacji (138).

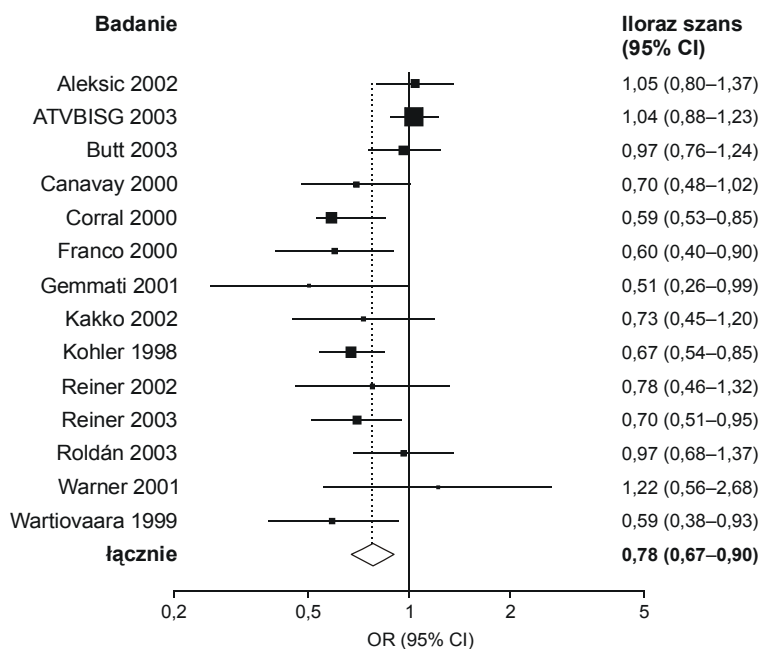
Podobny efekt obserwowano w dwóch badaniach przeprowadzonych wśród chorych na udar niedokrwienny mózgu (OR ~0,6) (159, 170). Pojedyncze doniesienie łączy polimorfizm Val34Leu cz. XIII z korzystnym wpływem na ryzyko zakrzepicy tętnicy centralnej siatkówki (171). Polimorfizmowi Val34Leu cz. XIII przypisywano natomiast niekorzystny wpływ na ryzyko krwawienia śródczaszkowego (159, 172), chociaż w innych badaniach nie potwierdzono tego spostrzeżenia (173, 174). W niedawno opublikowanym doniesieniu z badania Women's Health Initiative nie stwierdzono zależności pomiędzy polimorfizmem Val34Leu cz. XIII, a ryzykiem zakrzepicy żyłnej u kobiet stosujących hormonalną terapię zastępczą (175).

Polimorfizm Val34Leu cz. XIII i kwas acetylosalicylowy

W 2003 roku Undas i wsp. wykazali, że w porównaniu z homozygotami Val34Val, u nosicieli allelu Leu34 zymogen cz. XIII zanikał, a aktywowany cz. XIIIa pojawiał się szybciej we krwi wypływającej ze standardowych nacięć (176). W ten sposób wcześniejsze obserwacje potwierdzono *in vivo*. Ponadto stwierdzono, że u zdrowych nosicieli allelu Leu34, w porównaniu z homozygotami Val34Val, stosowanie ASA w dawce 75 mg/d

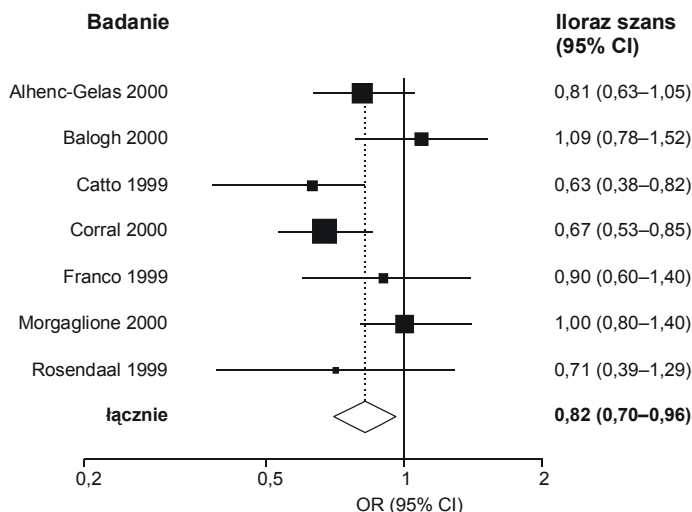
Rysunek 7. Ryzyko zawału serca u nosicieli allelu Leu34 w porównaniu z homozygotami Val34Val cz. XIII A.

OR – iloraz szans;
CI – przedział ufności



Rysunek 8. Ryzyko zakrzepicy żył głębokich u nosicieli allelu Leu34 w porównaniu z homozygotami Val34Val cz. XIII A.

OR – iloraz szans;
CI – przedział ufności



przez 7 dni silniej upośledzało aktywację cz. XIII A *in vivo*, do tego stopnia, że po zastosowaniu ASA aktywacja cz. XIII A Val34Val była szybsza w porównaniu z cz. XIII A Leu34. Obserwacja ta, w połączeniu z doniesieniami o wpływie ASA i polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A na przepuszczalność skrzepu (63, 73, 74, 145), zrodziła hipotezę, że przepuszczalność żelu fibrynowego i jego podatność na lizę po zastosowaniu ASA, przynajmniej w części, zależą od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A. Zjawisko to mogłoby tłumaczyć obserwowaną w badaniach klinicznych mniejszą szansę posiadania allelu Leu34 przez chorych na zawał serca, udar niedokrwienny mózgu lub zakrzepicę żył głębokich, ponieważ znaczny odsetek chorych biorących udział w badaniach stosował ASA.

Kwas acetylosalicylowy i jego działanie

Wpływ ASA na cyklooksygenazę

Najlepiej poznanym mechanizmem działania ASA jest zdolność zahamowania aktywności cyklooksygenazowej izoform 1 i 2 syntazy prostaglandyny H, zwanych COX-1 i COX-2 (177-179). Enzymy te katalizują pierwszy etap biosyntezy prostanoidów, czyli utlenianie kwasu arachidonowego do pośredniczących w dalszej syntezie prostaglandyn G_2 i H_2 . PGH_2 jest bezpośrednim prekursorem PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 i tromboksanu A_2 . COX-1 i COX-2 różnią się m.in. sposobem regulacji aktywności katalitycznej, ekspresją w różnych liniach komórkowych i odmienną lokalizacją w komórce. Mechanizm molekularny działania ASA polega na nieodwracalnym hamowaniu aktywności ludzkiej COX-1 poprzez acetylację strategicznie położonej Ser529 (180) i COX-2 poprzez acetylację Ser516, co uniemożliwia przyłączenie substratu do miejsca katalitycznego enzymu (181). ASA jest około 150–200-krotnie silniejszym inhibitorem COX-1 niż COX-2 (182). Niedawno Chandrasekharan i wsp. opisali trzecią izoformę ludzkiej cyklooksygenazy – COX-3, będącą wariantem COX-1 powstałym w wyniku odmiennej translacji (183).

W płytkach krwi i komórkach śródbłonka u człowieka z PGH_2 powstają przede wszystkim odpowiednio TXA_2 i PGI_2 (prostacyklina) (179). Tromboksan A_2 ma silne działanie proagregacyjne i kurczące naczynia krwionośne, natomiast PGI_2 hamuje agregację płytek i rozszerza naczynia (179). Synteza TXA_2 zależy przede wszystkim od aktywności COX-1 w płytkach. Dlatego w warunkach fizjologicznych wystawienie płytek na działanie ASA osłabia ich zdolność agregacji, chociaż nie znosi go całkowicie (184). Prostacyklina w komórkach śródbłonka powstaje zarówno za pośrednictwem COX-1, jak i za pośrednictwem COX-2, nawet w większych ilościach także w warunkach fizjologicznych (185). Może to odpowiadać za stałą biosyntezę PGI_2 przy stosowaniu ASA w dawce 30–100 mg dziennie *in vivo*, niezależnie od przejściowego zahamowania COX-1 (186). Po jednorazowej ekspozycji na ASA wyjściowa aktywność COX-1 w śródbłonku powraca po kilku godzinach dzięki ponownej syntezie (187).

ASA jest szybko wchłaniany w żołądku i w początkowym odcinku jelita cienkiego (188). Maksymalne stężenie ASA w osoczu obserwuje się po 30–40 minutach po zażyciu standardowej tabletki ASA i po 3–4 godzinach po zażyciu tabletki powlekanej dojelitowej. Efekt przeciwpłytkowy standardowej tabletki ASA jest widoczny po około 1 godzinie od zażycia leku (189). Biodostępność ASA w standardowej postaci wynosi około 40–50% niezależnie od dawki i jest znacznie mniejsza po zażyciu tabletek powlekanych dojelitowych (190). Przeciwpłytkowe działanie ASA w przeważającej mierze nie zależy od biodostępności leku, ponieważ acetylacja płytkowej COX-1 zachodzi przed przedostaniem się ASA do krążenia systemowego (190).

Czas półtrwania ASA w krążeniu systemowym wynosi około 15–20 minut (191) i wynika z szybkiej deacetylacji. Pomimo szybkiego

usuwania ASA z krążenia lek wywołuje trwale upośledzenie funkcji płytek zależnej od TXA₂, ponieważ nieodwracalnie inaktywuje COX-1 (177). ASA inaktywuje COX-1 również w megakariocytach (178, 192, 193), a skoro średni czas życia płytki wynosi około 10 dni i 10% populacji płytek ulega wymianie każdego dnia (194, 195), dawkowanie ASA raz dziennie pozwala utrzymać trwałą blokadę produkcji TXA₂ w płytkach.

Działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe ASA wynika przede wszystkim z blokowania COX-2 i wymaga częstszego stosowania leku w większej dawce, ponieważ komórki jądrzaste szybko resyntetyzują COX-2.

Działanie przeciwzakrzepowe ASA niezależne od TXA₂

Efekt przeciwzakrzepowy ASA może wykraczać poza zdolność do inaktywacji płytkowej COX-1. Zaproponowano kilka mechanizmów mogących mieć potencjalny wpływ na krzepnięcie krwi. Pierwszym z nich jest efekt antagonistyczny do witaminy K, chociaż wymaga on stosowania dużej dawki ASA i nie ujawnia się przy dawkach <1,5 g/24h (196). Drugim mechanizmem jest upośledzenie generacji trombiny po podaniu 300–500 mg ASA (197-199), być może w wyniku interakcji z fosfolipidami płytek. Nie jest wykluczone, że działanie przeciwtrombinowe ASA jest wtórne do upośledzenia czynności płytek związanej z zahamowaniem produkcji TXA₂. Dotychczas nie opublikowano danych wiążących zahamowanie powstawania TXA₂ z generacją trombiny, zachodzącą przede wszystkim właśnie na powierzchni płytek. U zdrowych mężczyzn stwierdzono zmniejszenie generacji trombiny w miejscu uszkodzenia mikronaczyń skóry już po zastosowaniu 75 mg ASA (200). Efektu tego nie obserwowano u chorych ze zwiększonym stężeniem cholesterolu całkowitego we krwi (201).

Donoszono również o wpływie ASA na modyfikację oddziaływań pomiędzy płytkami a granulocytami obojętnochłonnymi (202) lub erytrocytami (203, 204), rolę w ochronie śródbłonka przed stresem oksydacyjnym *in vitro* (205) lub poprawę dysfunkcji śródbłonka u chorych na miażdżycę (206). Dotychczas w żadnym z proponowanych wyżej efektów przeciwzakrzepowych ASA niezależnych od TXA₂ nie wyjaśniono molekularnego mechanizmu ani nie wykazano zależności efektu od dawki.

Duże korzyści kliniczne ze stosowania ASA (p. niżej) wydają się niewspółmierne do roli TXA₂, który jest tylko jednym z kilku związków wywołujących agregację płytek, i to nie najsilniejszym. Trombina i kolagen wywołują agregację płytek poddanych działaniu ASA. Do obserwowanych efektów klinicznych prawdopodobnie przyczynia się również działanie ASA niezależne od wpływu na syntezę TXA₂.

Acetylacja fibrynogeny i innych białek osocza

Kolejnym mechanizmem przeciwzakrzepowego działania ASA może być acetylacja białek układu krzepnięcia. Dotychczas jedynie *in vitro* wykazano, że stosowanie ASA wiąże się ze zwiększeniem przepuszczalności żelu fibrynowego utworzonego w dializowanym osoczu (74, 207) lub z oczyszczonym fibrynogenem po dodaniu

trombiny, cz. XIII i CaCl₂ (73). Co ciekawe, w obu układach zaobserwowano, że stosowanie ASA w dawce mniejszej (tj. 75 mg), w porównaniu z dawką większą (tj. 320 mg), miało większy wpływ na przepuszczalność powstałego żelu fibrynowego (73, 74). Fatah i wsp. donosili o zwiększeniu przepuszczalności żelu fibrynowego utworzonego w dializowanym osoczu u mężczyzn ze stabilną chorobą wieńcową stosujących ASA, ale ich wyniki nie były jednoznaczne (75). W badaniach z użyciem mikroskopu konfokalnego A. Antovic i wsp. obserwowali, że stosowanie ASA w małej dawce wiązało się z powstawaniem grubszych, włókien, mniej regularnie ułożonych w sieci fibryny o większych porach (64). Na podstawie badań spektrofotometrycznych żelu fibrynowego, ta sama grupa badaczy potwierdziła, że zastosowanie ASA w dawce 75 i 160 mg zwiększa grubość włókien fibryny (73) i zwróciła uwagę na zwiększoną podatność żelu fibrynowego na fibryrolizę po podaniu ASA (49). Obserwacja ta potwierdziła wcześniejsze pojedyncze doniesienie, że ASA zwiększa podatność na fibryrolizę (76).

Przypuszcza się, że ASA acetyluje grupy ε-aminowe lizyn w cząsteczce fibrynogenu, chociaż obserwacje te poczyniono *in vivo* stosując duże dawki ASA (650 mg co 12 h) (76) lub w niefizjologicznych, zasadowych warunkach *in vitro* (208). Badając fragmenty cząsteczek fibrynogenu preinkubowanego z ASA, za pomocą spektrometrii mas, wykazano, że w wielu przypadkach masa fragmentu po inkubacji zwiększała się o 42 Da, co było charakterystyczne dla acetylacji reszt lizynowych (209). Zauważono, że modyfikacja niektórych reszt lizynowych zachodziła częściej i, że pewne aminokwasy biorące udział w tworzeniu wiązań krzyżowych stawały się niedostępne (209). Acetylowanie fibrynogenu prawdopodobnie modyfikuje rozkład ładunków i strukturę przestrzenną cząsteczki fibrynogenu, zmieniając strukturę powstającej fibryny (23, 76).

Stwierdzono, że ASA acetyluje także inne białka układu krzepnięcia, np. antytrombinę (210), a także albuminę (211, 212) oraz lipidy i kwasy nukleinowe (208). Acetylacją białek błony komórkowej może być odpowiedzialna za zmianę jej płynności; obserwowano usztywnienie błon pod wpływem ASA *in vitro* (213) i *in vivo* (214, 215), a efekt ten nie zależał od wpływu ASA na cyklooksygenazę (214).

Korzyści ze stosowania ASA w chorobach sercowo-naczyniowych

W licznych badaniach klinicznych wykazano, że niezależnie od płci, ASA jest skuteczny zarówno w pierwotnej (216, 217), jak i we wtórnej prewencji incydentów sercowo-naczyniowych (218).

U chorych obciążonych zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym przewlekłe leczenie przeciwplatek zmniejsza ryzyko zarówno zawału serca, jak i udaru mózgu o około 20%, a zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych o 15% (218). Na tej podstawie autorzy wytycznych VII Konferencji Leczenia Przeciwwzakrzepowego i Trombolitycznego American College of Chest Physicians (ACCP) zalecają stosowanie ASA do końca życia u wszystkich chorych na stabilną chorobę wieńcową (219).

U chorych na świeży zawał serca z uniesieniem odcinka ST lub inną postacią ostrego zespołu wieńcowych, stosowanie ASA zmniejsza ryzyko zgonu, ponownego zawału serca i udaru mózgu (220, 221). Na tej podstawie autorzy wytycznych American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) i ACCP zalecają stosowanie ASA najszybciej jak to jest możliwe i kontynuację leczenia do końca życia u wszystkich chorych na ostry zespół wieńcowy (219, 222, 223).

U chorych na świeży udar niedokrwienny mózgu stosowanie ASA zapobiegało 11 zgonom lub ponownym udarom niedokrwiennym mózgu wśród każdych 1000 chorych, ale jednocześnie było przyczyną wystąpienia 2 dodatkowych udarów krwotocznych mózgu, z czego wynika, że stosowanie ASA w świeżym udarze niedokrwiennym mózgu zapobiega około 9 zgonom lub ponownym udarom u każdych 1000 leczonych osób (224, 225). Obecnie zaleca się stosowanie ASA u wszystkich chorych na świeży udar niedokrwienny mózgu, u których nie można zastosować leczenia trombolitycznego i u wszystkich chorych z przejściowym niedokrwieniem lub udarem niedokrwiennym mózgu w wywiadzie (226).

Korzyść ze stosowania ASA w prewencji pierwotnej incydentów sercowo-naczyniowych jest mniej pewna, chociaż wyniki badań sugerują, że stosowanie ASA może zmniejszyć ryzyko pierwszego zawału serca lub udaru niedokrwiennego mózgu, jednocześnie zwiększając ryzyko poważnego krwawienia (216, 217). Obecnie zaleca się rozważenie stosowania ASA w prewencji pierwotnej jedynie u chorych obciążonych umiarkowanym i dużym ryzykiem incydentu wieńcowego (ryzyko >10% w ciągu następnych 10 lat) i małym ryzykiem krwawienia (219, 227) lub u chorych na cukrzycę (228).

U części chorych z tak zwaną „opornością na ASA” lek ten jest mało skuteczny, podobnie jak to ma miejsce w przypadku innych leków stosowanych w prewencji i leczeniu chorób sercowo-naczyniowych. Hipotezę „oporności na ASA” sformułowano na podstawie obserwacji pochodzących z badań klinicznych, w których oporność na ASA definiowano w różny sposób. Oporność kliniczna to nieskuteczność ASA w zapobieganiu powikłaniom zakrzepowym miażdżycy, natomiast oporność laboratoryjna polega na braku przedłużenia czasu krwawienia, stosunkowo niewielkim zmniejszeniu produkcji TXA₂ (wyjątkowo rzadko – jego zwiększeniu) lub słabym upośledzeniu czynności płytek *in vitro* (229). Zaproponowano przynajmniej 3 potencjalne mechanizmy oporności na ASA, która może wynikać z: 1) przejściowej ekspresji COX-2 w nowo powstałych płytkach w przypadku zwiększonej ich produkcji (230), 2) syntezy TXA₂ poza płytkami krwi, np. przez makrofagi w płytkach miażdżycowych, które resyntetyzują COX-2 po jej zablokowaniu przez ASA (231) lub 3) jednoczesnego stosowania innych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (np. ibuprofenu), które mogą upośledzać nieodwracalną acetylację COX-1 przez ASA (232, 233). Sugerowano również związek między opornością na ASA a polimorfizmami genetycznymi, m.in. genu COX-1 i integryn β₃ (234). Kliniczne znaczenie oporności na ASA oceniano na podstawie obserwacji, których interpretacja jest utrudniona z powodu małej wiarygodności zastosowanej metodyki, tzn. opisów serii przypadków, małej liczby badanych i zaobserwowanych

incydentów sercowo-naczyniowych i ocenie oporności na ASA na podstawie pojedynczych wskaźników laboratoryjnych (235-238).

Występowanie incydentów sercowo-naczyniowych u chorych przewlekle stosujących ASA należałoby raczej nazywać „niepowodzeniem leczenia” niż „opornością na ASA” (229). Konieczne jest opracowanie standardowych metod laboratoryjnej oceny oporności na ASA, bez których koncepcja ta pozostaje teoretyczną możliwością o niepewnym znaczeniu klinicznym (239). Ze względu na powszechne stosowanie ASA w prewencji chorób sercowo-naczyniowych, wyjaśnienie przyczyn zmiennej skuteczności tego leku, może mieć znaczenie kliniczne i pozwolić np. na wyodrębnienie chorych, którzy odniosą korzyść ze stosowania większej dawki ASA lub innego leku przeciwplatekowego.

Założenia i cel pracy

Wyniki niedawno przeprowadzonych badań klinicznych, w których oceniano związek pomiędzy czynnikami genetycznymi a ryzykiem zakrzepicy tętniczej lub żyłnej sugerują, że polimorfizm Val34Leu cz. XIII A, który stosunkowo często występuje w populacji europejskiej, wiąże się ze zmniejszeniem ryzyka zawału serca, udaru mózgu i zakrzepicy żył głębokich. Paradoksalnie, wyniki badań podstawowych mające wyjaśnić mechanizm tego efektu wskazują, że struktura skrzepu powstającego w obecności allelu Leu34 cz. XIII A jest mniej podatna na fibrylizację. Niedawno Undas i wsp. wykazali, że kwas acetylosalicylowy silniej hamuje aktywację cz. XIII A u nosicieli allelu Leu34, w porównaniu z homozygotami Val34Val, *in vivo* (176). Niniejsza praca jest kontynuacją tych poszukiwań, ponieważ dotychczas nie badano wpływu ASA na strukturę skrzepu w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A.

Cel ogólny

Czy i jak polimorfizm Val34Leu cz. XIII A modyfikuje wpływ ASA na poszczególne etapy konwersji fibrynogenu i na właściwości fizykochemiczne usieciowanej fibryny?

Cele szczegółowe

Jaki jest wpływ polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A i jednorazowego zastosowania 300 mg ASA na aktywację cz. XIII A i powstawanie usieciowanej fibryny?

Czy przepuszczalność żelu fibrynowego i jego podatność na lizę po zastosowaniu ASA zależy od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A?

Czy stosowanie ASA wpływa na powstawanie dimerów γ fibryny w obecności osoczowego i płytkowego cz. XIII A w zależności od polimorfizmu Val34Leu?

Badani

W badaniu wzięło udział 9 zdrowych ochotników: 3 osoby z genotypem Val34Val, 3 osoby z genotypem Val34Leu i 3 osoby z genotypem Leu34Leu cz. XIII A, które wybrano spośród 41 zdrowych osób w wieku 30–45 lat. Wszyscy aktualnie nie palili tytoniu i nie stosowali żadnych leków co najmniej przez 4 tygodnie. Charakterystykę badanych osób przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wyjściowa charakterystyka badanej grupy.

	kwartyle		
	25	50	75
Liczba osób [N]		9	
Kobiety [N]		4	
Wiek [lata]	30	35	37
Krwinki czerwone [$\times 10^9/l$]	4,48	4,52	4,90
Krwinki białe [$\times 10^6/l$]	4,8	5,2	6,3
Płytki [$\times 10^6/l$]	187	221	256
Fibrynogen [g/l]	2,19	2,54	3,34
Cholesterol całkowity [mmol/l]	3,5	4,5	5,2
Cholesterol frakcji LDL [mmol/l]	1,9	2,4	3,1
Cholesterol frakcji HDL [mmol/l]	1,2	1,4	1,5
Triglicerydy [mmol/l]	0,9	1,1	1,2
INR	0,95	0,96	1,01
APTT [s]	30,8	33,2	34,3

Kryteria wykluczające z udziału w badaniu stanowiły: nietolerancja lub inne przeciwwskazania do stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, brak agregacji płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym po zastosowaniu 1200 $\mu\text{mol/l}$ kwasu arachidonowego stwierdzony w dniu eksperymentu, zakrzepica żylna lub tętnicza oraz skaza krwotoczna w wywiadzie.

Wszyscy uczestnicy zostali poinformowani o celach eksperymentu i wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu. Protokół badania został zaopiniowany pozytywnie przez Komisję Bioetyczną Collegium Medicum UJ 24 kwietnia 2003 roku – nr KBET/404/B/2003.

Po badaniu podmiotowym i przedmiotowym, u wszystkich osób oceniliśmy morfologię krwi obwodowej i oznaczyliśmy stężenie fibrynogenu w osoczu metodą nefelometryczną (Dade Behring, Niemcy), czas protrombiny wyrażony jako międzynarodowy współczynnik znormalizowany (Dade Behring, Niemcy), czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (Dade Behring, Niemcy) i

lipidogram. Morfologię pełnej krwi żyłnej oznaczaliśmy standardowymi metodami w laboratorium diagnostycznym II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dodatkowo, przed przystąpieniem do eksperymentu, w osoczu bogatopłytkowym uzyskanym od badanych osób wykonaliśmy pomiar agregacji płytek krwi (Chrono-log Aggro-meter, Chrono-log Corp., PA, USA) po dodaniu 1200 $\mu\text{mol/l}$ kwasu arachidonowego (Sigma) w celu potwierdzenia ich prawidłowej funkcji.

Metody

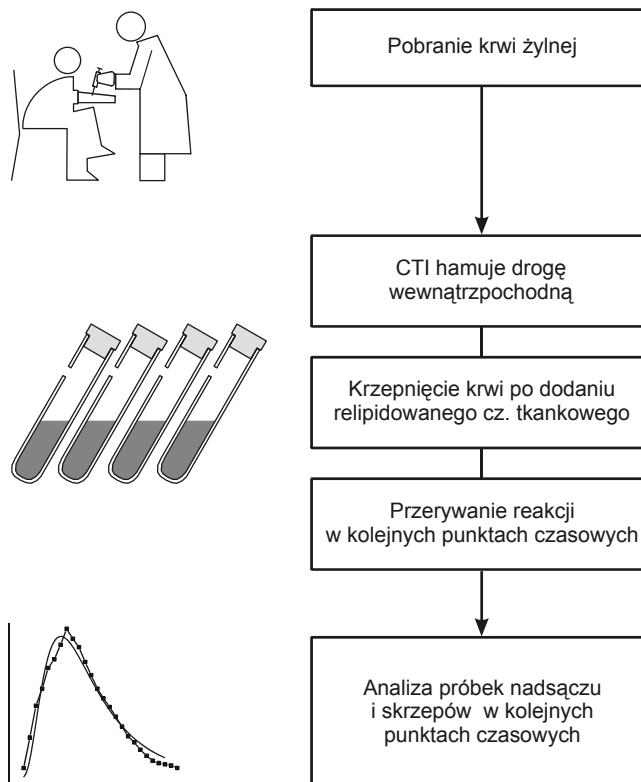
Ustalenie polimorfizmu Val34Leu cz. XIII

Kwas dezoksyrybonukleinowy uzyskiwaliśmy z leukocytów. Polimorfizm Val34Leu cz. XIII ustaliliśmy badaniem polimorfizmów fragmentów restrykcyjnych (RFLP) w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) na podstawie techniki opracowanej przez Balogha i wsp. (146). W liczącym 114 par zasad fragmencie eksonu 2 i intronu B podjednostki A cz. XIII (w sekwencji kodującej walinę w pozycji 34) stworzyliśmy podczas amplifikacji nowe miejsce restrykcyjne dla enzymu restrykcyjnego *CfoI* za pomocą niekomplementarnego przeciwsensownego startera. Podczas PCR zastosowaliśmy oligonukleotydy o następującej sekwencji: 5'-ACTTCCAGGACCGCCTTTGGAGGC-3' (starter sensowny) i 5'-GTTGACGCCCCGGGGCACCCG-3' (starter przeciwsensowny). Podkreślona guanina na końcu 3' w starterze przeciwsensownym nie jest komplementarna do prawidłowej sekwencji kodującej podjednostkę A cz. XIII, w której w tym miejscu znajduje się adenina. Wprowadzenie niekomplementarnej guaniny w odwrotnym starterze pozwala stworzyć nowe miejsce restrykcyjne dla *CfoI* (GCG/C), które nie powstanie w obecności allelu Leu (GCTC), ponieważ zmiana guaniny na tyminę powoduje utratę miejsca trawienia tym enzymem restrykcyjnym.

W próbkach DNA homozygot Val34Val po trawieniu enzymem restrykcyjnym *CfoI* uzyskiwaliśmy fragment o długości 94 par zasad. U homozygot Leu34Leu produkt amplifikacji pozostawał niestrawiony, a u heterozygot Val34Leu wykazać można było obecność zarówno niestrawionego produktu amplifikacji o długości 114 par zasad, jak i strawionego fragmentu o długości 94 par zasad. Produkty amplifikacji rozdzielaliśmy na żelu poliakrylamidowym za pomocą zautomatyzowanego systemu elektroforezy z detekcją fluorescencyjną (ALFexpress, Pharmacia Biotech, Szwecja) (146, 176).

Rysunek 9. Schemat postępowania w modelu krzepnięcia pełnej krwi żyłnej zależnym od czynnika tkankowego.

Opis w tekście.



Krzepnięcie pełnej krwi w modelu zależnym od czynnika tkankowego

Procesy prowadzące do powstawania skrzepu badaliśmy w nieznacznie zmodyfikowanym modelu krzepnięcia zależnym od czynnika tkankowego wg M. Randa i wsp. (240), opracowanym w laboratorium prof. Kennetha G. Manna na uniwersytecie stanu Vermont w Burlington, USA, którego szczegóły przedstawiamy na rysunku 9. Eksperyment przeprowadzaliśmy dwukrotnie: wyjściowo i po 4 godzinach od zażycia 300 mg ASA (Polopiryna S[®], Polpharma, Polska) doustnie.

Reakcje krzepnięcia badaliśmy w polistyrenowych probówkach o wymiarach 15 × 100 mm z wywierconym w ścianie otworem o średnicy 5 mm, zatkanym polipropylenowym korkiem. Probówki układaliśmy otworem do góry na kołysce laboratoryjnej (KL-942, JW Electronic, Polska), wahającej się nieprzerwanie z częstotliwością około 20 cykli/minutę w temperaturze 37 °C utrzymywanej za pomocą lampy emitującej światło podczerwone (Infraphil HP 3616/01, Philips, Holandia).

Do każdej probówki wkraplaliśmy 2 pmol/l rekombinowanego ludzkiego czynnika tkankowego połączonego z 25 nmol/l fosfolipidów (fosfatydylocholina 75% + fosfatydyloseryna 25% – PCPS; dar profesora K.G. Manna z University of Vermont, Burlington, VT, USA) i 50 µg/ml inhibitora trypsyny z kukurydzy (*corn trypsin inhibitor* – CTI; dar profesora K.G. Manna), będącego inhibitorem aktywowanego czynnika kontaktu (cz. XIIa) i wewnątrzpochodnego szlaku aktywacji krzepnięcia. Aktywność czynnika tkankowego potwierdzaliśmy metodą opisaną przez Brummel i wsp. (241).

Po założeniu stazy, około 10 cm powyżej dołu łokciowego, do żyły łokciowej wprowadzaliśmy igłę typu „motylek” o średnicy 1,1 mm (19 G). Po pobraniu do strzykawki bez antykoagulantu około 3 ml krwi żyłnej, w której następnie oznaczaliśmy stężenie lipidów w surowicy, do pipety automatycznej (Stepper 411, Socorex, Szwajcaria) wyposażonej w jednorazową strzykawkę o pojemności 50 ml (Ecostep, Socorex, Szwajcaria) bez antykoagulantu pobieraliśmy 20 ml krwi żyłnej i natychmiast (w ciągu ≤ 30 sekund) wkrapaliśmy po 1 ml przez otwór w ścianie do 16 probówek. Czas krzepnięcia oceniał ten sam badacz wykonujący wszystkie eksperymenty przyjmując zań czas formowania się widocznego skrzepu licząc od chwili wkropienia krwi do probówki.

Reakcję krzepnięcia w kolejnych probówkach przerywaliśmy w 0; 1; 2; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 8; 9; 10; 12; 14; 16; 18 i 20 minucie dodając do nich po 1 ml mieszaniny antykoagulantów zawierającej 50 mmol/l EDTA (Sigma) i 20 mmol/l benzamidyny (Sigma) w HEPES (pH 7,4) oraz 50 μ mol/l D-Phe-Pro-Arg chlorometyloketonu (Calbiochem) w 0,01 N HCl. Pierwsza probówka (minuta 0) zawierała antykoagulanty już przed wkropieniem do niej krwi.

Otwór w probówce zaklejaliśmy następnie taśmą parafinową (Parafilm M, SPI Supplies, USA) i powstałe skrzepy oddzielaliśmy od nadsącza wirując je z przyspieszeniem 2000 g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Próbkę nadsącza przenosiliśmy do probówek typu Eppendorf i przechowywaliśmy w temperaturze -80 °C. Skrzepy płukaliśmy i przechowywaliśmy również w temperaturze -80 °C.

Kompleksy trombina-antytrombina

W celu scharakteryzowania przebiegu reakcji krzepnięcia przy stężeniu cz. tkankowego 2 pmol/l, w nadsączu uzyskanym w kolejnych minutach krzepnięcia, przed i po podaniu ASA, ocenialiśmy powstawanie kompleksów trombina-antytrombina (TAT), aktywację protrombiny i konwersję fibrynogenu do fibryny (21, 240).

Stężenie TAT w nadsączu w każdej minucie krzepnięcia oznaczaliśmy za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (Enzygnost TAT, Dade-Behring, Niemcy) zgodnie z zaleceniami producenta i wprowadzaliśmy poprawkę ze względu na hematokryt i rozcieńczenie próbki przez dodanie roztworu antykoagulantów (242).

Tworzenie kompleksów TAT zachodzi w trzech fazach: inicjacji, propagacji i plateau (243, 244), tworząc charakterystyczną „sigmoidalną” krzywą zależności stężenia od czasu. Ponieważ nie wszystkie krzywe w naszym doświadczeniu osiągnęły fazę plateau, ich różny kształt nie pozwalał na zastosowanie jednego modelu (245) opisującego każdą z nich i obliczenie maksymalnej prędkości tworzenia kompleksów TAT w fazie propagacji – obecnie najchętniej stosowanej miary szybkości ich tworzenia (240, 246). Z tego powodu różnice w dynamice tworzenia kompleksów trombina-antytrombina przed i po zastosowaniu ASA w zależności od polimorfizmu cz. XIIIa, porównaliśmy obliczając tak zwane średnie całkowite stężenie TAT, czyli pole pod eksperymentalną krzywą zależności stężenia TAT od czasu, jako łączną miarę efektu działania ASA, podobnie jak to opisano we

wcześniejszych publikacjach (199, 247). Obliczenia wykonaliśmy za pomocą programu Origin v7.0 (OriginLab Corp., MA, USA). Obserwację tę potwierdziliśmy porównując różnice stężenia kompleksów TAT w poszczególnych punktach czasowych stosując analizę wariancji dla klasyfikacji dwuczynnikowej.

Aktywacja protrombiny

Produkty aktywacji protrombiny w poszczególnych próbkach, uzyskanych po przerwaniu krzepnięcia w kolejnych minutach po dodaniu cz. tkankowego przed i po podaniu ASA, rozdzielaliśmy elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym o liniowym gradiencie 4–12% w obecności dodecylosiarczanu sodowego (SDS-PAGE) po dodaniu czynnika redukującego (1% 2 β -merkaptoetanolu) według zmodyfikowanej (240) procedury Laemmli'ego (248). Aby umożliwić porównanie pomiędzy poszczególnymi oznaczeniami, na żel nanosiliśmy standardy protrombiny i produktów jej aktywacji wyprodukowane w laboratorium prof. K. G. Manna w Burlington, VT, USA. Transfer rozdzielonych białek na membranę z nitrocelulozy (Bio-Rad, USA) przez 3 h przy natężeniu prądu 250 mA prowadziliśmy metodą „pólsuchą” (249). Białka znakowaliśmy oślim przeciwciałem poliklonalnym przeciw ludzkiej pretrombinie 1 łączącym się z protrombiną, pretrombiną 1, pretrombiną 2, fragmentem 2 protrombiny i łańcuchem B trombiny (Division of Hematology Research, Mayo Clinic, MN, USA) (250) w stężeniu 7,5 μ g/ml. Kompleks białka z przeciwciałem uwidacznialiśmy stosując wtórne przeciwciała kozie przeciwko końskim IgG znakowane peroksydazą chrzanową (Southern Biotech, AL, USA). Substratem emitującym światło był Luminol (NEN Life Science Products, USA). Klisze wywołaliśmy w procesorze klisz rentgenowskich Kodak X-OMAT M35A (Eastman Kodak, USA) według opisanej wcześniej procedury (240) i skanowaliśmy w płaskim skanerze z możliwością rejestracji światła przechodzącego przez kliszę (Eversmart Jazz, CreoScitex, Kanada). Analizę densytometryczną wykonaliśmy za pomocą programu ImageJ v.1.32j (National Institutes of Health, MD, USA).

Fibrynopeptydy

Obecność i stężenie fibrynopeptydów FPA i FPB w kolejnych minutach krzepnięcia oznaczaliśmy za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) metodą opisaną szczegółowo przez K. Brummel i wsp. (21). Ostatecznej identyfikacji peptydów o czasie retencji spodziewanym dla FPA i FPB dokonywaliśmy w Instytucie Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego za pomocą spektrometrii mas typu czasu przelotu (MALDI-TOF) wg metody opisanej również przez K. Brummel i wsp. (21).

Fibrynogen

Próbki nadsącza ocenialiśmy metodą SDS-PAGE bez czynnika redukującego. Aby umożliwić porównania pomiędzy poszczególnymi oznaczeniami na żel nanosiliśmy mieszaninę standardowych białek wielkocząsteczkowych (14–200 kDa) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) i standard fibrynogenu (300 ng na ścieżkę). Białka znakowaliśmy mysim przeciwciałem monoklonalnym Fbgn2E specyficznie łączącym się z łańcuchem

α ludzkiego fibrynogenu (dar prof. K.G. Manna, University of Vermont, USA). W części eksperymentów użyliśmy przeciwciała Fbgn3A, które ma bardzo zbliżone powinowactwo do fibrynogenu jak Fbgn2E. Przeciwciała stosowaliśmy w stężeniu 3 μ g/ml. Kompleksy fibrynogenu z przeciwciałem uwiadcznialiśmy stosując wtórne przeciwciała kozie przeciwko mysim IgG w rozcieńczeniu 1:12 000 znakowane peroksydazą chrzanową (Southern Biotech, AL, USA). Następnie postępowaliśmy jak przy oznaczaniu produktów aktywacji protrombiny metodą Western blot.

Aktywacja cz. XIII

Aktywację cz. XIII ocenialiśmy również za pomocą SDS-PAGE. Na żel nanosiliśmy standard cz. XIII lub XIIIa w ilości 50 ng na studzienkę (dar dr Richarda Jenny'ego z Haematologic Technologies, VT, USA). Białka znakowaliśmy króliczym przeciwciałem poliklonalnym D4679 łączącym się z cz. XIII (dar dr Gerry'ego Lassera z ZymoGenetics, WA, USA), w stężeniu 7,5 μ g/ml. Kompleks cz. XIII i XIIIa z przeciwciałem uwiadcznialiśmy stosując wtórne przeciwciała kozie przeciwko króliczym IgG i IgM znakowane peroksydazą chrzanową (Southern Biotech, AL, USA). Następnie postępowaliśmy jak przy oznaczaniu produktów aktywacji protrombiny metodą Western blot.

Stężenie dimerów γ w skrzepach

Oddzielone od nadsącza skrzepy, utworzone w kolejnych probówkach w modelu krzepnięcia zależnego od czynnika tkankowego, analizowaliśmy według metody opisanej przez T. Tamaki (251) w modyfikacji K. Brummel i wsp. (21). Nierozpuszczalne skrzepy płukaliśmy 3-krotnie w soli fizjologicznej (0,15 mol/l NaCl) i następnie pozostawialiśmy w soli fizjologicznej na 24 godziny, aby usunąć elementy morfotyczne krwi i inne rozpuszczalne elementy. Skrzepy następnie płukaliśmy w wodzie destylowanej, liofilizowaliśmy i ważyliśmy. Suche skrzepy z pierwszych 3 probówek, w których pojawił się skrzep przed i po podaniu ASA, rozpuszczaliśmy w moczniku (4 mol/l), SDS (10%) i 2 β -merkaptioetanolu (10%). Wcześniejsze eksperymenty wykazały, że w tym modelu, powstawanie dimerów γ jest bardzo szybkie i po 1–2 minut stężenie kompleksu w skrzepie jest stałe (21). Próbki rozpuszczonych skrzepów (końcowe stężenie fibryny około 2,5 mg/ml) rozdzielaliśmy za pomocą SDS-PAGE o liniowym gradiencie 4–12%. Białko znakowaliśmy za pomocą przeciwciała monoklonalnego 2G10-1 specyficznie łączącego się z dimerem γ fibryny (dar B. Kudryka z New York Blood Center, NY, USA) w stężeniu końcowym 5 μ g/ml. na żel nanosiliśmy jednocześnie standard rozpuszczonej fibryny przygotowany w laboratorium prof. K. G. Manna w Burlington, VT, USA.

Żele wybarwialiśmy błękitem Coomassie w celu potwierdzenia prawidłowego ważenia i rozpuszczenia skrzepów. Analizę densytometryczną wykonaliśmy podobnie jak opisano powyżej (p. oznaczanie fibrynogenu).

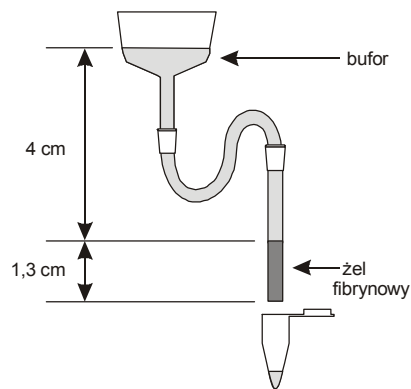
Aktywność płytkowego cz. XIII A

Czynnik XIII A z płytek izolowaliśmy metodą opracowaną przez Soo Il Chung i wsp. (118, 252). Od dwóch zdrowych mężczyzn w wieku 23 lat, homozygotycznych pod względem polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A, pobraliśmy po 200 ml krwi żyłnej przed i 4 godziny po zażyciu 300 mg ASA. Płytki 3-krotnie płukaliśmy w buforze TAE (10 mmol/l octan Tris i 1 mmol/l EDTA; pH 7,5). Przeplukane płytki w 100 ml TAE homogenizowaliśmy przez 3 minuty w temperaturze 0 °C. Homogenat wirowaliśmy z przyspieszeniem 105 000 g przez 1 godzinę w temperaturze 4 °C. Nadsącz oczyszczaliśmy chromatograficznie w kolumnie 2,5 × 25 cm zawierającej dietyloaminoetyl i celulozę (DE52, Whatman plc., Wielka Brytania). Cz. XIII A precypitowaliśmy dodając 24,3 g siarczanu amonu (NH₄)₂SO₄ na 100 ml roztworu. Precypitat uzyskiwaliśmy wirując zawiesinę z przyspieszeniem 14 600 g przez 30 minut, rozpuszczaliśmy go w 2–4 ml 10 mmol/l octanu Tris (pH 7,5) zawierającego 0,3 mol/l NaCl i 1 mmol/l EDTA i filtrowaliśmy w 6% żelu agarozowym w kolumnie 2,5 × 96 cm (Bio-Gel A-5m, (Bio-Rad, CA, USA) w 4 °C. Czynniki XIII A ponownie precypitowaliśmy dodając siarczan amonu. Precypitat dializowaliśmy w buforze (pH 7,4) zawierającym 0,05 mol/l cytrynianu sodowego i 0,15 mol/l NaCl. W elektroforezie w żelu poliakrylamidowym po barwieniu błękitem Coomassie wyizolowany w ten sposób z płytek cz. XIII A tworzył pojedynczy prążek odpowiadający oczyszczonemu standardowi. Stężenie cz. XIII A ocenialiśmy spektrofotometrycznie (Cary 300, Varian, CA, USA).

Wpływ ASA na tworzenie się skrzepu w obecności płytkowego cz. XIII A ocenialiśmy według metody opisanej przez U. Wartiovaare i wsp. (144). Do oczyszczonego płytkowego cz. XIII A (200 nmol/l) dodawaliśmy 6 μmol/l ludzkiego fibrynogenu (Sigma, MO, USA), 0,5 U/ml ludzkiej trombiny (Sigma, MO, USA) i 1,6 mmol/l CaCl₂ w 50 mmol/l HEPES, 100 mmol/l NaCl, pH 7.5 at 37 °C. Próbkę mieszaniny pobieraliśmy wyjściowo i po 2, 4 i 6 minutach. Reakcję przerywaliśmy dodając jednakową objętość dwukrotnie stężonego buforu do SDS-PAGE, po czym przez 5 minut próbki poddawaliśmy działaniu temperatury 95 °C. Próbki zawierające fibrynę w stężeniu 5 ng/ml rozdzielaliśmy za pomocą SDS-PAGE w 4–12% żelu poliakrylamidowym. Dimery γ w żelu identyfikowaliśmy za pomocą przeciwciała monoklonalnego 2G10-1, tak jak opisaliśmy powyżej. Użyliśmy również standardu rozpuszczonej fibryny przygotowanego w laboratorium prof. K. G. Manna.

Przepuszczalność żelu fibrynowego

Przepuszczalność żelu fibrynowego ocenialiśmy za pomocą zmodyfikowanej (65, 77, 145) metody opracowanej przez B. Blombäck i M. Okadę (62, 253). Polistyrenową rurkę o długości 20 mm i średnicy 2,8 mm przeplukiwaliśmy fibrynogendem w stężeniu 2 g/l w buforze TBS (Tris-HCl 50 mmol/l i NaCl 0,15 mol/l [pH 7,4]) z dodatkiem 0,05 U/ml ludzkiej trombiny (Sigma) i pozostawialiśmy w 25 °C przez 60 minut, a następnie przeplukiwaliśmy samym buforem. Wewnętrzną powierzchnię



Rysunek 10. Schemat pomiaru przepuszczalności żelu fibrynowego.

rukki pokrywaliśmy cienką warstwą fibryny aby zwiększyć przyleganie do ścian formowanego w niej następnie żelu fibrynowego i zapobiec zapadaniu się żelu oraz przepływaniu buforu pomiędzy ścianą rurki a żelem (57), ponieważ żel fibrynowy utworzony w osoczu jest znacznie delikatniejszy niż żel utworzony z oczyszczonego fibrynogenu i łatwo zapada się w plastikowych rurkach (254). Utworzona cienka warstwa fibryny nie wpływa na pomiar przesączania przez uformowany następnie żel fibrynowy (57, 88). Tak przygotowaną rurkę, z jednym końcem zaklejonym Parafilmem®, wypełnialiśmy 20 µl nadsącza zmieszanim z 80 µl TBS, do których dodawano 1 U/ml ludzkiej trombiny i 15 mmol/l chlorku wapnia (CaCl₂). Rurkę umieszczaliśmy w wilgotnej komorze w temperaturze 25 °C na 2 godziny w pozycji pionowej. Po usunięciu Parafilmu® rurkę z żelem fibrynowym przepłukiwaliśmy TBS. Górny otwór rurki łączyliśmy poliuretanowym przewodem ze zbiornikiem buforu, który przesączał się przez żel pod ciśnieniem 4 cm H₂O (rys. 10). Przesączony w ciągu 1 godziny bufor zbieraliśmy, ważyliśmy i mierzyliśmy jego objętość.

Po zakończeniu pomiaru rurkę przepłukiwaliśmy 0,02% błękitem bromofenolu (Sigma) aby potwierdzić prawidłowe przyleganie żelu do ścian (65, 88). W dalszej analizie uwzględnialiśmy tylko te z żeli, w których zabarwiony bufor przesączał się równomiernie i nie stwierdziliśmy przecieku barwnika pomiędzy żelem a ścianą rurki. Na podstawie doświadczeń K. Brummel i wsp. (21) założyliśmy, że w próbkach nadsącza uzyskanych w pierwszych 3 minutach krzepnięcia, stężenie fibrynogenu będzie wystarczające, aby było możliwe utworzenie w nich stabilnego skrzepu. Pomiarów wykonywaliśmy dwukrotnie w każdej próbce nadsącza otrzymanej po 0, 1, 2 i 3 minutach krzepnięcia.

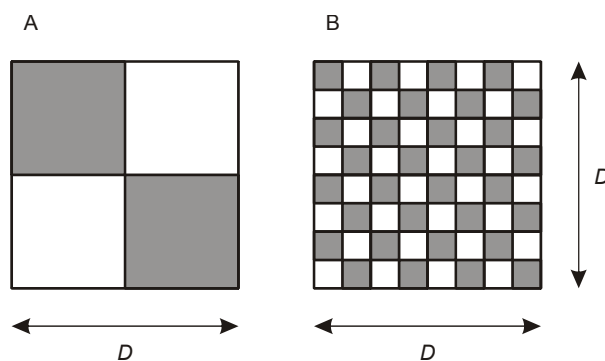
Przepływ jednofazowy cieczy rzeczywistej przez materiał porowaty, jakim jest żel fibrynowy, można opisać w następujący sposób:

$$[1] \quad \frac{\Delta P}{\Delta L} = \frac{\eta \cdot Q}{K_s}$$

gdzie ΔP jest lokalnym spadkiem ciśnienia, ΔL – długością ośrodka porowatego, η – lepkością cieczy, Q – przepływem objętościowym i K_s – przepuszczalnością materiału. Wyrażenie [1] jest jedną z form do dziś najczęściej stosowanego półempirycznego prawa sformułowanego przez francuskiego inżyniera Henri Darcy'ego na podstawie eksperymentów dotyczących zaopatrzenia w wodę publicznych fontann w stolicy

Rysunek 11. Schematyczne przedstawienie zależności między przepuszczalnością a porowatością ośrodka.

Żel utworzony z grubych włókien (A) ma większą przepuszczalność niż żel utworzony z cienkich włókien (B) w tej samej jednostce objętości, chociaż oba mają taką samą porowatość ε .



Burgundii – Dijon (255). Przepływ objętościowy Q jest objętością cieczy V przepływającej przez prostopadły do przepływu przekrój o powierzchni A w czasie t . Chcąc oszacować przepuszczalność (stałą przepuszczalności Darcy'ego) dla żelu fibrynowego w naszym eksperymencie, po odpowiednim przekształceniu równania Darcy'ego, otrzymujemy:

$$[2] \quad K_s = \frac{V \cdot \eta \cdot L}{A \cdot t \cdot \Delta P}$$

gdzie V jest objętością buforu o lepkości η (10^{-2} poise'a) przesączonego przez żel o długości L (1,3 cm) i powierzchni przekroju A w czasie t pod ciśnieniem ΔP . Tradycyjną jednostką przepuszczalności jest cm^2 . Przepuszczalność oszacowana na podstawie prawa Darcy'ego nie zależy od różnicy ciśnień ΔP (48, 65, 256).

Dwufazowy żel fibrynowy składa się z uwodnionych włókien fibryny otoczonych płynem. Przepuszczalność żelu fibrynowego określa średnica włókien fibryny (d_f) i jej porowatość (ε), czyli stosunek przestrzeni wolnej (V_V) do całkowitej objętości żelu (V_T).

$$[3] \quad \varepsilon = \frac{V_V}{V_T}$$

Przy tym samym stężeniu fibryny żel utworzony z cienkich włókien ma znacznie mniejszą przepuszczalność – stwarza większy opór przepływu, w porównaniu z żelem utworzonym z włókien grubych, co schematycznie przedstawia rysunek 11 (257).

Zakładając, iż włókna fibryny w żelu przypominają nieregularnie upakowane długie i proste pręty, znając przepuszczalność żelu można oszacować średnią średnicę włókna i stosunek masy do długości włókien fibryny. Carman i Kozeny (258, 259) przekształcili równanie Darcy'ego wiążąc przepuszczalność z porowatością ośrodka (ε) i średnicą włókien fibryny (d_f).

$$[4] \quad K_s = \frac{d_f^2}{k} \frac{\varepsilon^3}{(1-\varepsilon)^2}$$

Stała Kozeny'ego k odzwierciedla krętość i kształt drogi pokonywanej przez płyn w materiale porowatym. Jej wielkość ustalono doświadczalnie na około 10, modelując przepływ cieczy przez włókna grafitu, wełny, bawełny, celulozy i innych polimerów (260-263). Signer i Egli (264) uproszcili równanie [4] dla żelu fibrynowego uwzględniając ułamek objętościowy włókien

fibryny w żelu, czyli część objętości żelu zajęta przez uwodnione włókna fibryny

$$[5] \quad \varphi = 1 - \varepsilon,$$

i zaproponowali, że przepuszczalność żelu fibrynowego zależy od średnicy włókien i ułamka objętościowego fibryny w żelu jak:

$$[6] \quad K_s = \frac{d_f^2}{k} \cdot \varphi$$

a stąd

$$[7] \quad d_f^2 = k \cdot K_s \cdot \varphi$$

Jak wynika z równania [7] średnią średnicę włókna fibryny można oszacować znając przepuszczalność żelu i ułamek objętościowy uwodnionych włókien fibryny. Ułamek objętościowy fibrynogenu z definicji jest równy:

$$[8] \quad \varphi = \frac{c_{Fbg}}{(\rho_{Fbg} \cdot \omega_{Fbg})}$$

gdzie c_{Fbg} jest stężeniem fibrynogenu, ρ_{Fbg} – gęstością fibrynogenu i ω_{Fbg} – ułamkiem masowym fibryny we włóknie. Stężenie fibrynogenu w nadsączu obliczano znając jego wyjściowe stężenie w surowicy po wprowadzeniu poprawki na rozcieńczenie próbki i hematokryt. Ułamek objętościowy fibryny można obliczyć znając objętość suchej fibryny i stopień jej uwodnienia. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach przepuszczalności żelu fibrynowego (48, 55), przyjęliśmy na podstawie prac Scheragi (22), że gęstość fibrynogenu wynosi $1,35 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, chociaż w innych źródłach wielkość tę szacowano na $1,379 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (265) albo $1,395 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (13). Na podstawie obserwacji rozpraszania neutronów Larsson i wsp. (266) i Marguerie i wsp. (267) oszacowali, że w uwodnionym włóknie na 1 g fibrynogenu lub fibryny przypada 2 albo 6 g wody. Blombäck i wsp. (55) potwierdzili, że uwodnienie 6 g wody na 1 g fibryny najlepiej odpowiada danym doświadczalnym uzyskanym w pomiarach turbidymetrycznych i mikroskopowych. Na podstawie pomiarów przepuszczalności materiałów porowatych o znanej średnicy włókien dokonanych przez Emerslebena (262), Blombäck i wsp. (55) ustalili, że zależność przepuszczalności od ułamka objętościowego włókien fibryny opisuje funkcja logarytmiczna:

$$[9] \quad K_{Sref} = 2,266 \cdot 10^{-6} \cdot \varphi^{-1,3736}$$

gdzie K_{Sref} jest referencyjną wartością przepuszczalności dla referencyjnego włókna o średnicy $d_{ref} = 0,01 \text{ cm}$. Przyjmując, że

$$[10] \quad K_{Sref} \cdot d^2 = K_s \cdot d_{ref}^2$$

otrzymali oni z równania [7] zależność

$$[11] \quad d^2 = 44,13 \cdot K_s \cdot \varphi^{1,3736}$$

Carr i wsp. (88) przyjęli, że całkowita długość włókna w jednostce objętości (l) wynosi

$$[12] \quad l_t = \varphi \cdot \left(\frac{\pi \cdot d^2}{4} \right)^{-1}$$

a stosunek masy do długości (μ) włókna fibryny w żelu jest wprost proporcjonalny do stężenia fibrynogenu i odwrotnie proporcjonalny do całkowitej długości włókna w jednostce objętości:

$$[13] \quad \mu = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot c_{Fbg}}{4 \cdot \varphi}$$

gdzie d jest średnicą włókna w centymetrach, c_{Fbg} – stężeniem fibrynogenu w gramach na mililitr, a φ – ułamkiem objętościowym fibryny we włóknie. Stosunek masy do długości włókna tradycyjnie wyraża się w daltonach na centymetr. Przy przeliczaniu gramów na daltony przyjęliśmy liczbę Avogadro równą $6,022 \cdot 10^{23}$.

Tworzenie fibryny i fibrynoliza

Rozproszenie wiązki światła przechodzącego przez roztwór fibrynogenu/fibryny zwiększa się podczas polimeryzacji żelu fibrynowego i zmniejsza się podczas fibrynolizy. Zjawisko rozproszenia światła przez włókna fibryny ocenialiśmy turbidymetrycznie metodą opisaną przez A. Wolberg i wsp. (47). Żel fibrynowy tworzył się bezpośrednio w studzience polistyrenowej płytki, w której mieszałyśmy 10 μ l nadsącza i 90 μ l buforu HBS (20 mmol/l HEPES i 0,15 mol/l NaCl [pH 7,4]) zawierającego 10 mmol/l CaCl_2 i 1 nmol/l ludzkiej trombiny (Hematologic Technologies, VT, USA). Pomiaru gęstości optycznej dokonywaliśmy co 1 minutę wykorzystując czytnik płytek (MRX Revelation, DYNEX Technologies, VA, USA) przy długości fali 405 nm w temperaturze pokojowej. Na podstawie krzywej zależności gęstości optycznej od czasu obliczaliśmy maksymalną szybkość polimeryzacji fibryny ($V_{p_{max}}$), zdefiniowaną jako tangens największego kąta nachylenia stycznej do krzywej w fazie polimeryzacji, oraz największą gęstość optyczną po osiągnięciu maksymalnej polimeryzacji (OD_{max}). Gęstość optyczna, wyrażona w arbitralnych jednostkach, jest miarą rozproszenia światła w żelu fibrynowym i ściśle koreluje z grubością włókien polimeru fibryny, stosunkiem masy do długości włókien i przepuszczalnością sieci fibrynowej (60, 268, 269).

Fibrynolizę ocenialiśmy w podobnym układzie z tym, że wraz z trombiną do buforu dodawaliśmy dodatkowo 1 μ g/ml ludzkiego tkankowego aktywatora plazminogenu (Hematologic Technologies, VT, USA). Gęstość optyczną rejestrowaliśmy co 5 sekund aż do chwili powrotu do wartości wyjściowej przed dodaniem enzymów.

Dopasowanie odpowiedniej krzywej opisującej zależność gęstości optycznej od czasu, podobnie jak w przypadku tworzenia kompleksów TAT i innych zależności stężenia produktu reakcji enzymatycznych od czasu, wymaga stworzenia odpowiedniego modelu opisanego równaniami różniczkowymi, ponieważ modele tych reakcji nie mogą być prosto redukowane do jednego równania (269). Z tego powodu przyjęło się w literaturze

opisywanie reakcji polimeryzacji i fibrylizacji wielkościami możliwymi do oszacowania bez tworzenia odpowiedniego modelu. Na podstawie eksperymentalnej krzywej zależności gęstości optycznej od czasu można oszacować tak zwany czas 50% fibrylizacji ($t_{50\%}$), w którym gęstość optyczna żelu fibrynowego zmniejszyła się o połowę w porównaniu z największą gęstością optyczną (270, 271) oraz maksymalną szybkość fibrylizacji ($V_{l_{max}}$), czyli minimalne nachylenie stycznej do krzywej turbidymetrycznej w fazie lizy (39). Aby je precyzyjnie i powtarzalnie oszacować, do danych eksperymentalnych można dopasować odpowiednią krzywą standardową, której parametry nie muszą odpowiadać rzeczywistym parametrom reakcji, ale jej kształt powinien najprecyzyjniej odzwierciedlać przebieg punktów wyznaczonych doświadczalnie (272). Po próbie dopasowania kilkudziesięciu krzywych za pomocą programu komputerowego TableCurve2D v5.01 (Systat Software Inc., CA, USA) wykorzystującego metody regresji nieliniowej Levenberga i Marquardta, wybraliśmy te, które najlepiej odpowiadały danym doświadczalnym. Zależności gęstości optycznej od czasu podczas polimeryzacji fibryny najlepiej odpowiadała funkcja stopniowego wzrostu pierwszego rzędu (współczynnik determinacji $R^2 \geq 0,992$), a podczas fibrylizacji – funkcja Pearsona ($R^2 \geq 0,990$).

Wartości gęstości optycznej podczas fibrylizacji poddaliśmy transformacji liniowej odejmując od nich wartość wyjściową. Maksymalną szybkość polimeryzacji fibryny ($V_{p_{max}}$) albo fibrylizacji ($V_{l_{max}}$) określaliśmy na podstawie, odpowiednio maksimum i minimum, pierwszej pochodnej funkcji opisującej daną krzywą.

Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiliśmy jako medianę i przedział pomiędzy 25 a 75 percentylem, z wyjątkiem opisu aktywacji protrombiny gdzie przedstawiliśmy średnie \pm odchylenie standardowe lub 95% przedział ufności, aby ułatwić porównanie z innymi pracami poruszającymi ten temat, w których niezmiennie przedstawiano wyniki jakoś średnie i stosowano parametryczne testy istotności statystycznej. Tam gdzie było to uzasadnione, ze względu na odpowiednią liczebność grupy, różnicę pomiędzy podgrupami wyodrębnionymi ze względu na polimorfizm Val34Leu cz. XIIIa ocenialiśmy za pomocą analizy wariancji Kruskala i Wallisa. Różnicę pomiędzy homozygotami Val34Val a nosicielami allelu Leu ocenialiśmy za pomocą testu U Manna i Whitney'a. Wpływ ASA na poszczególne parametry niezależnie od polimorfizmu cz. XIIIa ocenialiśmy za pomocą testu kolejności par Wilcoxon. Oceniając zmianę poszczególnych parametrów pod wpływem ASA sprawdzaliśmy niezależność obserwowanego efektu od wartości wyjściowej obliczając korelację pomiędzy różnicą wartości po i przed podaniem ASA, a średnią z tych wartości. W przypadku braku korelacji, za miarę efektu przyjmowaliśmy bezwzględną różnicę pomiarów po i przed podaniem ASA, natomiast w przypadku istotnej korelacji, dokonywaliśmy transformacji logarytmicznej wartości pomiarów przed i po podaniu ASA, za miarę efektu przyjmując logarytm ilorazu wartości po i przed zażyciem ASA. Korelację pomiędzy zmiennymi ciągłymi przedstawiliśmy jako ρ Spearmanna.

Obliczenia wykonaliśmy za pomocą programu Statistica 6.0 (StatSoft, OK, USA), a metaanalizę badań klinicznych – za pomocą programu StatsDirect 2.4.4 (StatsDirect, Wielka Brytania).

Wyniki

Charakterystyka modelu

Przebieg reakcji krzepnięcia w obecności 2 pmol/l czynnika tkankowego był prawie identyczny z tym opisanym przy stężeniach 12,5–25 pmol/l (273).

Wyjściowo czas krzepnięcia wynosił $6,2 \pm 1,6$ minuty i nie różnił się znamiennej pomiędzy podgrupami wyodrębnionymi ze względu na polimorfizm cz. XIIIa, chociaż obserwowaliśmy nieznamienną tendencję do krótszego czasu krzepnięcia u nosicieli allelu Leu34 w porównaniu z homozygotami Val34Val (różnica: 1,7 minuty; 95% CI: od -0,8 do 4,2). Po podaniu ASA wśród wszystkich badanych czas krzepnięcia skrócił się o 0,8 minuty (95% CI: 0,2 do 1,4) nie wykazując zależności pomiędzy zastosowaniem ASA a fenotypem cz. XIIIa.

Kompleksy trombina-antytrombina

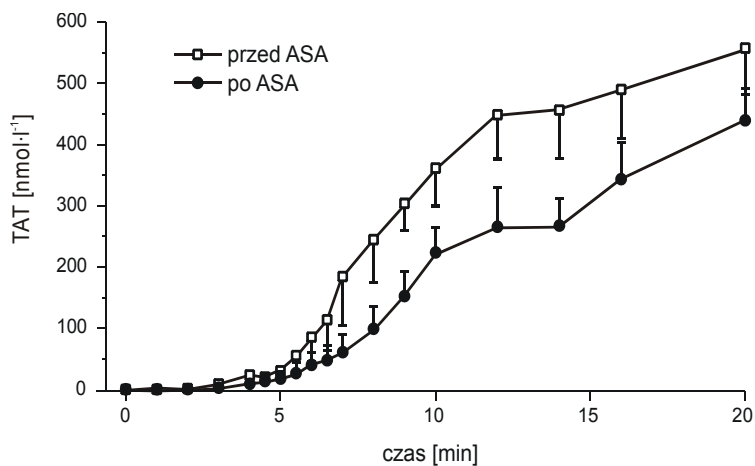
U trzech osób, po jednej z fenotypem Val34Val, Val34Leu i Leu34Leu, krzywa zależności TAT od czasu nie osiągnęła fazy plateau. U tych osób w 20 minucie największe stężenie TAT wynosiło odpowiednio: 554 nmol/l, 569 nmol/l i 760 nmol/l.

Zgodnie z oczekiwaniem, wyjściowo pole powierzchni pod krzywą zależności TAT od czasu nie różniło się istotnie pomiędzy grupami wyodrębnionymi ze względu na polimorfizm Val34Leu cz. XIII. Po podaniu ASA pole to zmniejszyło się średnio o 41% (96% CI: 12–76), a wielkość zmiany również nie zależała od polimorfizmu cz. XIIIa (rys. 12). W analizie wariancji dla klasyfikacji dwuczynnikowej również wykazaliśmy znamiennej wpływ stosowania ASA na stężenie TAT ($p = 10^{-7}$).

Produkty aktywacji protrombiny

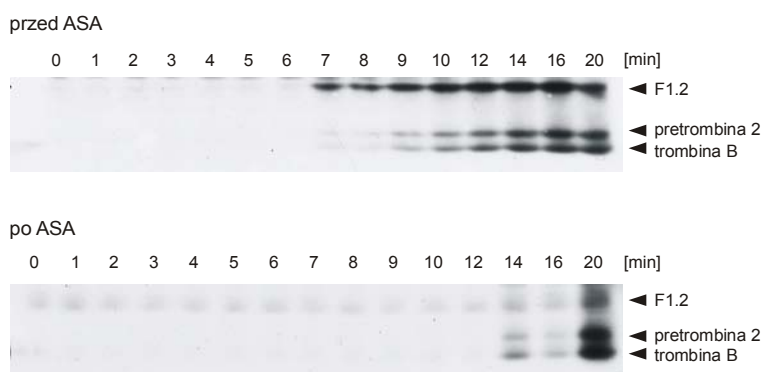
Przebieg aktywacji protrombiny, przed i po podaniu ASA, był podobny do wcześniej opisanego (240). Przykładowy immunoblot przedstawia rysunek 13.

Wyjściowo pretrombina 2 pojawiła się w roztworze po $7,2 \pm 2,0$ minuty, a po podaniu ASA po $9,3 \pm 1,6$ minuty (różnica: -2,2 minuty; 95% CI: od -4,3 do -0,1). Podobnie łańcuch B trombiny pojawił się wyjściowo w roztworze po $7,0 \pm 2,3$ minutach, a po podaniu ASA po $9,3 \pm 2,3$ minuty (różnica: -2,3 minuty; 95% CI: od -4,0 do -0,6). Nie obserwowaliśmy zależności pomiędzy czasem pojawienia się pretrombiny 2 albo łańcucha B trombiny a polimorfizmem Val34Leu cz. XIIIa.



Rysunek 12. Średnie stężenie kompleksów TAT przed i po podaniu ASA.

Słupki oznaczają błąd standardowy (n = 9).



Rysunek 13. Aktywacja protrombiny w modelu krzepnięcia zależnym od cz. tkankowego.

Fibrynopeptydy

Pośród wszystkich 9 osób biorących udział w eksperymencie, tylko u 5 wyjściowo obserwowaliśmy stężenie FPA $\geq 1 \mu\text{mol/l}$, co pozwalało na wiarygodną ocenę ilościową. Wyjściowo mediana stężenia FPA u osób z fenotypem Val34Val wynosiła $1,0 \mu\text{mol/l}$, Val34Leu – $1,4 \mu\text{mol/l}$, a Leu34Leu – $1,6 \mu\text{mol/l}$. Po podaniu ASA stężenie FPA u wszystkich badanych było $<1 \mu\text{mol/l}$. Zmiana stężenia FPA po podaniu ASA była większa u nosicieli allelu Leu w porównaniu z homozygotami Val34Val. W żadnej z próbek nie stwierdziliśmy FPB i des-Arg FPB w stężeniu, które można by wykryć za pomocą stosowanej metody.

Za pomocą MALDI-TOF potwierdziliśmy obecność FPA, skróconej formy FPA bez końcowej alaniny (des-ALA FPA) i fosforylowanej formy FPA (P-FPA) w próbkach nadsącza (rys. 14).

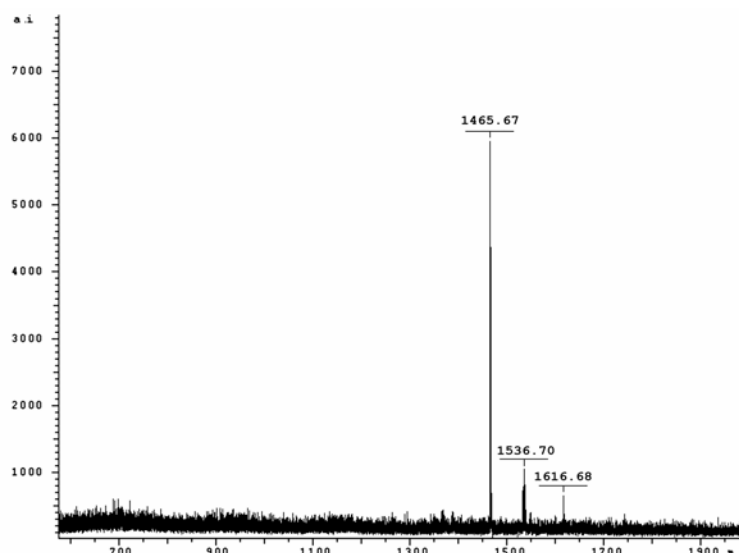
Fibrynogen

Przykładowy przebieg proteolizy fibrynogenu przedstawia rysunek 15. Wyjściowo fibrynogen zanikał w roztworze po $5,8 \pm 2,2$ minutach, a po podaniu ASA po $7,6 \pm 2,4$ minutach (różnica: $-1,8$ minuty; 95% CI: od $-2,5$ do $-1,0$). Nie obserwowaliśmy zależności pomiędzy prędkością zanikania fibrynogenu w roztworze a polimorfizmem Val34Leu cz. XIIIa.

Rysunek 14. Fibrynopeptyd A uwidoczniony za pomocą MALDI-TOF.

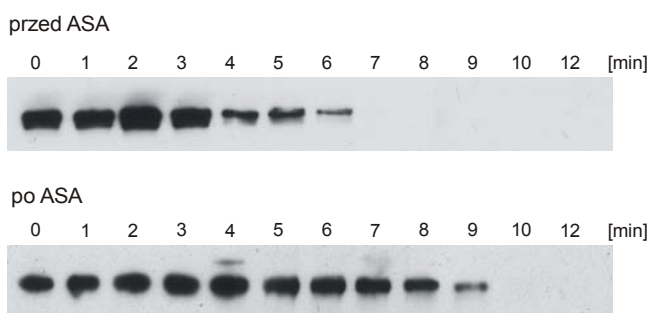
FPA (masa: 1536,70),
des-Ala FPA (masa: 1465,67)
i P-FPA (masa: 1616,68).

m/z – stosunek masy (m) do ładunku (z); a.i. – bezwzględna intensywność sygnału



Rysunek 15. Przykładowy immunoblot zanikania fibrynogenu w roztworze.

Liczby nad zdjęciem oznaczają kolejne minuty od rozpoczęcia krzepnięcia przed i po podaniu ASA.



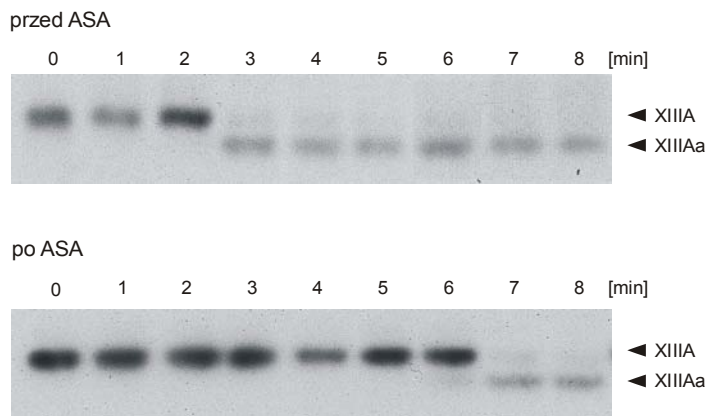
Czynnik XIII A i XIII Aa

Rysunek 16 przedstawia zanik prążka o masie 83 kDa i pojawianie się prążka o masie 79 kDa, które migrowały podobnie jak oczyszczone standardy cz. XIII A i cz. XIII Aa.

U wszystkich osób, przed zastosowaniem ASA cz. XIII A nie wykrywaliśmy po 2 minutach (1,0–4,0), natomiast po ASA zymogenu nie wykrywaliśmy po 6 minutach (5,0–6,0). Różnica ta była istotna statystycznie ($p = 0,008$), przy czym wyjściowo cz. XIII A zanikał szybciej u nosicieli allelu Leu (mediana 1 minuta) w porównaniu z homozygotami Val (mediana 4 minuty). Różnica po podaniu ASA była większa u nosicieli allelu Leu niż u homozygot Val34Val (3,0 vs 4,5 minuty; rys. 17A).

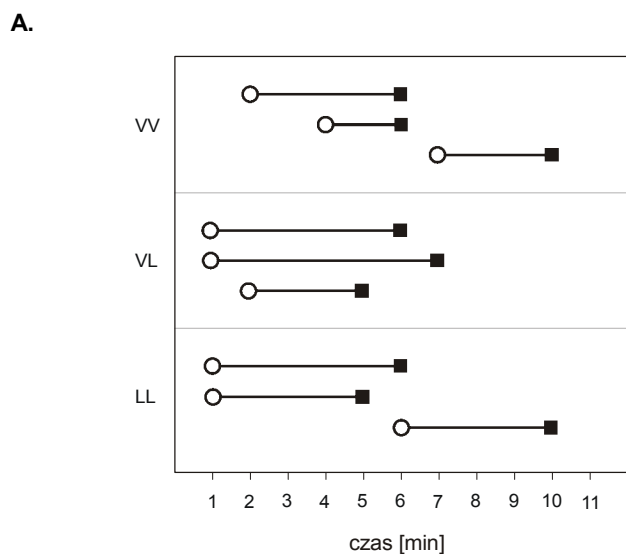
U wszystkich osób, przed zastosowaniem ASA aktywną formę cz. XIII A (XIII Aa) pojawiała się po 2 minutach (1,0–4,0), natomiast po ASA pojawiała się po 6 minutach (5,0–7,0). Różnica ta była istotna statystycznie ($p = 0,008$), przy czym wyjściowo cz. XIII Aa pojawiał się szybciej u nosicieli allelu Leu (mediana 1 minuta) w porównaniu z homozygotami Val (mediana 4 minuty). Różnica po podaniu ASA była podobna u nosicieli allelu Leu i u homozygot Val34Val (mediana 3 minuty; rys. 17B).

Czas zanikania cz. XIII A w nadsączu korelował z długością fazy inicjacji wyznaczonej z krzywych zależności stężenia TAT – wskaźnika produkcji trombiny, od czasu (ρ Spearmana = 0,48; $p = 0,04$) (rys. 18).



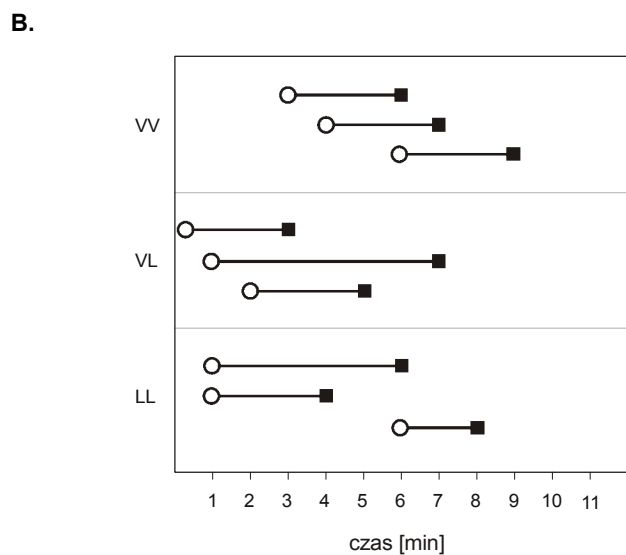
Rysunek 16. Przykładowy immunoblot przedstawiający aktywację cz. XIII A w modelu krzepnięcia zależnym od cz. tkankowego.

Zanikanie zymogenu XIII A i pojawianie się aktywnej formy XIII Aa w nadsączu.

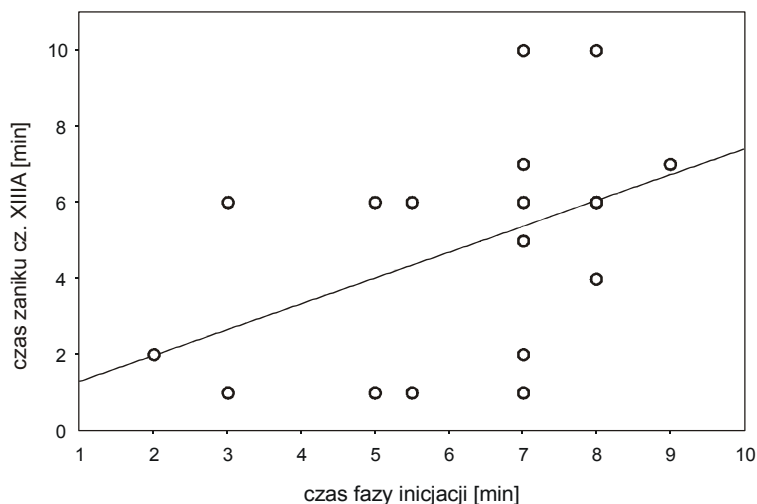


Rysunek 17. Czas zaniku zymogenu i pojawiania się aktywnej formy cz. XIII A w roztworze.

Zanik cz. XIII A (A) i pojawianie się cz. XIII Aa (B) przed (kółka) i 4 h po zażyciu ASA (kwadraty) u wszystkich 9 osób w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A.



Rysunek 19. Korelacja pomiędzy czasem fazy inicjacji wyznaczonej z krzywych zależności stężenia TAT a czasem zaniku cz. XIIIa w nadsączu.



Dimery γ w skrzepach

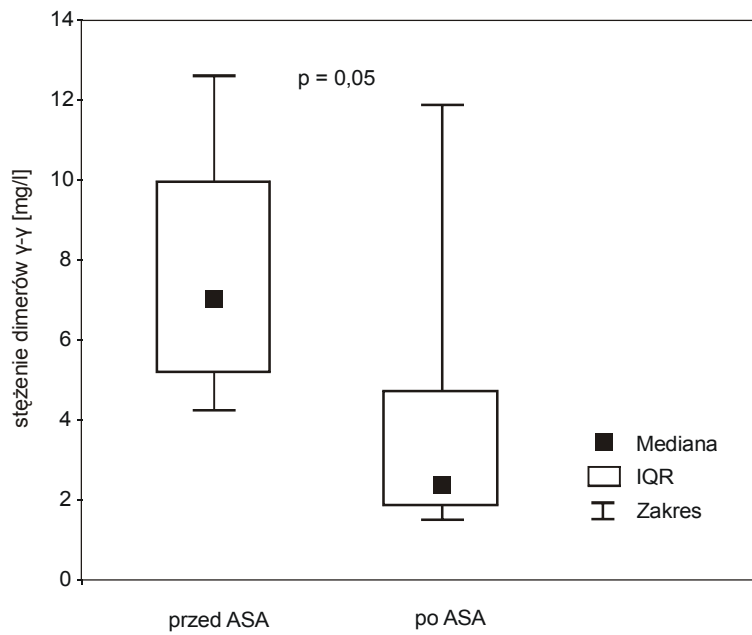
Na podstawie barwienia błękitem Coomassie potwierdziliśmy prawidłowe zważenie i rozpuszczenie skrzepów do około 2,5 mg/ml.

Przed zastosowaniem ASA, skrzep pojawiał się w probówkach średnio po 6 minutach (3,0–7,0), a po podaniu ASA – po 8 minutach (5,0–8,0) ($p = 0,03$). Wpływ ASA na czas tworzenia się skrzepu był taki sam, niezależnie od polimorfizmu Val34Leu cz. XIIIa.

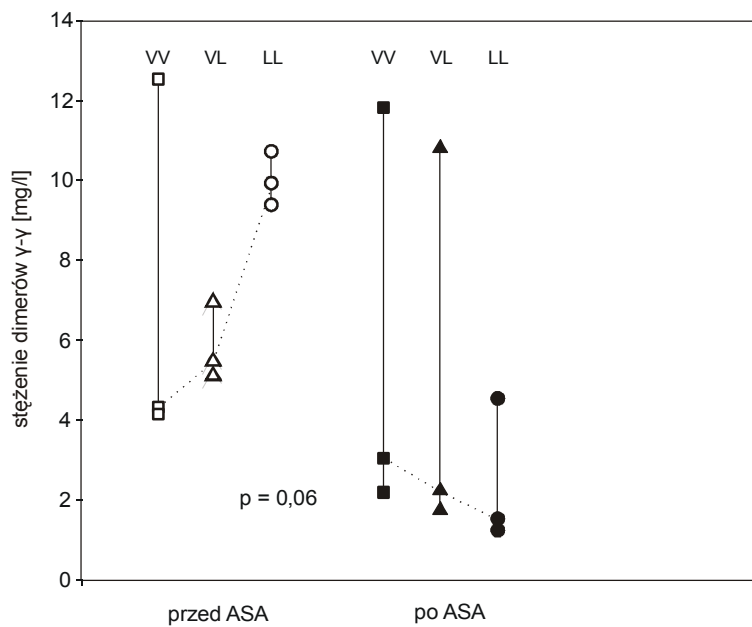
U wszystkich badanych łącznie, stężenie dimerów γ w rozpuszczonych skrzepach wynosiło wyjściowo 7,04 mg/l (5,19–9,96), a po podaniu ASA zmniejszyło się o 66% ($p = 0,05$; rys. 19A) i wynosiło 2,39 mg/l (1,86–4,72). Wyjściowo stężenie dimerów γ było o 84% większe u nosicieli allelu Leu w porównaniu z homozygotami Val34Val (8,06 mg/l *vs* 4,41 mg/l). Zmiana stężenia dimerów γ pod wpływem ASA była większa u nosicieli allelu Leu, tak, że średnie stężenie dimerów γ po podaniu ASA było mniejsze u nosicieli allelu Leu w porównaniu z homozygotami Val34Val (2,1 mg/l *vs* 3,2 mg/l). Zmiana stężenia dimerów γ była największa u homozygot Leu34Leu (85%), pośrednia u heterozygot (64%) i najmniejsza u homozygot Val34Val (25%) ($p = 0,06$; rys. 19B).

Stężenie dimerów γ w rozpuszczonych skrzepach przed podaniem ASA wzrastało z prędkością 1,88 mg/l/min (1,17–2,33), a po podaniu ASA – 0,67 mg/l/min (0,52–1,48) ($p = 0,02$; rys. 20A). Nie obserwowaliśmy statystycznie istotnej zależności pomiędzy wpływem ASA na tempo tworzenia dimerów γ a polimorfizmem Val34Leu cz. XIIIa (rys. 20B).

Obecność dimerów γ ocenialiśmy też w nadsączu i nie wykryliśmy ich w stężeniu pozwalającym na uwidocznienie za pomocą metody Western blot (dane niepokazane).

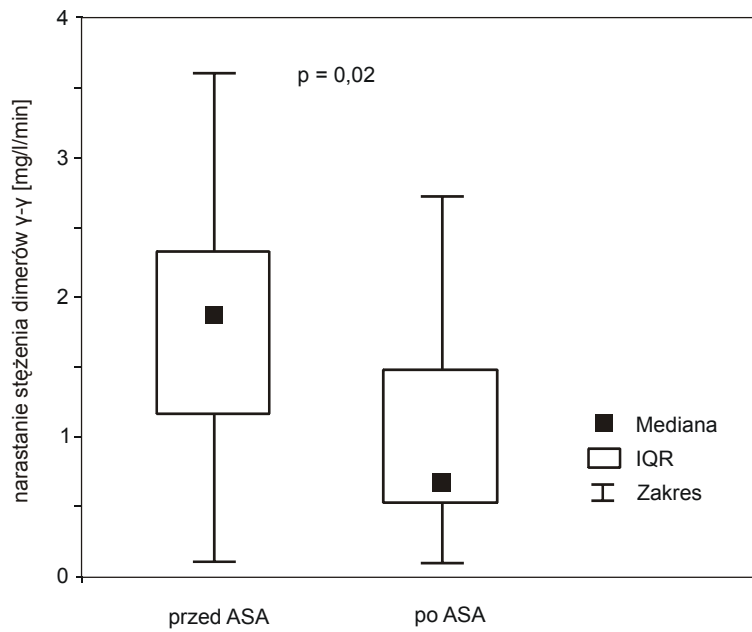


Rysunek 19A. Wpływ podania 300 mg ASA na stężenie dimerów γ w rozpuszczonych skrzepach.

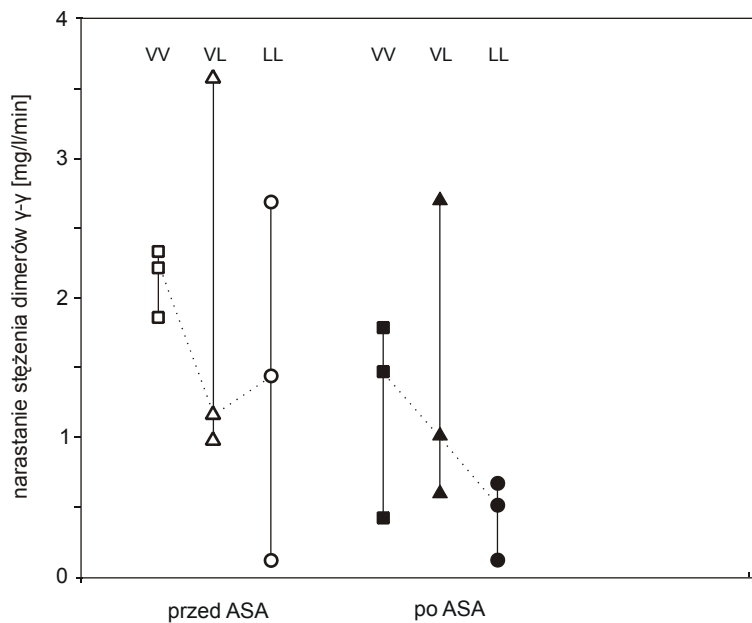


Rysunek 19B. Wpływ podania 300 mg ASA na stężenie dimerów γ w rozpuszczonych skrzepach w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII.

Rysunek 20A. Maksymalna prędkość narastania stężenia dimerów γ w skrzepach przed i po podaniu 300 mg ASA.

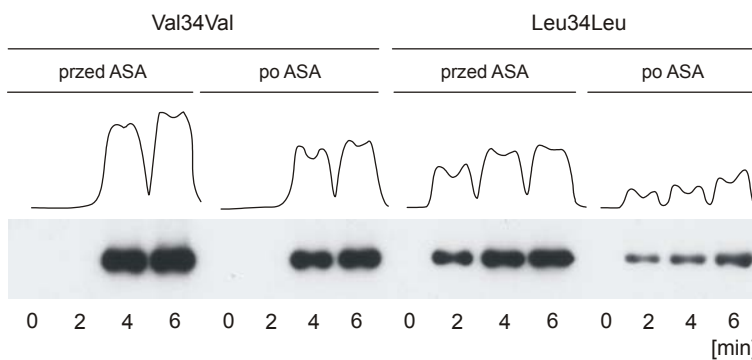


Rysunek 20B. Maksymalna prędkość narastania stężenia dimerów γ w skrzepach przed i po podaniu 300 mg ASA w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIIIa.



Rysunek 21. Dimery γ fibryny utworzone w obecności płytkowego cz. XIIIa.

Linie przedstawiają gęstość optyczną prążków odpowiadającą względnemu stężeniu dimerów γ wyjściowo (0) i po 2, 4 i 6 minutach od dodania trombiny przed i po podaniu 300 mg ASA doustnie.



Aktywność płytkowego cz. XIII A

W oczyszczonym układzie, w którym do mieszaniny ludzkiego fibrynogenu, trombiny i jonów wapnia dodaliśmy wyizolowany z płytek cz. XIII A, dimery γ fibryny wyjściowo tworzyły się wolniej u homozygoty Val34Val niż u homozygoty Leu34Leu (rys. 21). Czas tworzenia się dimerów γ w skrzepach utworzonych w obecności cz. XIII A wyizolowanego z płytek 4 h po podaniu ASA nie różnił się od czasu tworzenia skrzepu przed podaniem ASA. Stężenie dimerów γ w skrzepach utworzonych w obecności cz. XIII A wyizolowanego z płytek 4 h po podaniu ASA, w porównaniu ze skrzepami utworzonymi przed podaniem ASA, było o około 35% mniejsze u homozygoty Val34Val i o około 68% mniejsze u homozygoty Leu34Leu.

Struktura skrzepu

Przepuszczalność żelu fibrynowego

Oznaczenia przepuszczalności były wysoce powtarzalne (współczynnik zmienności wynosił średnio 1,8%; błąd standardowy: $\pm 0,5$).

Przed podaniem ASA przepuszczalność żelu fibrynowego utworzonego w nadsączu, zarówno wyjściowo, jak i po 1, 2 i 3 minutach krzepnięcia, była znamienne większa wśród osób z fenotypem Val34Val w porównaniu z osobami Val34Leu i Leu34Leu (rys. 22). Wyjściowa przepuszczalność żelu fibrynowego u homozygot Val34Val wynosiła $4,23 \times 10^{-9}$ cm², u heterozygot Val34Leu – $3,87 \times 10^{-9}$ cm² i u homozygot Leu34Leu – $3,62 \times 10^{-9}$ cm². Przepuszczalność żelu fibrynowego utworzonego w nadsączu po 1, 2 i 3 minutach, kiedy część czynników krzepnięcia została zużyta, była odpowiednio większa (rys. 22).

Wśród wszystkich badanych osób przepuszczalność żelu fibrynowego po 0, 1, 2 i 3 minutach krzepnięcia, zwiększyła się znamienne 4 godziny po podaniu ASA w porównaniu z wartością wyjściową ($p \leq 0,0002$). U wszystkich badanych przed zapoczątkowaniem krzepnięcia przepuszczalność wynosiła $3,97 \times 10^{-9}$ cm² (3,72–4,19), a po podaniu ASA – $5,32 \times 10^{-9}$ cm² (5,01–5,47).

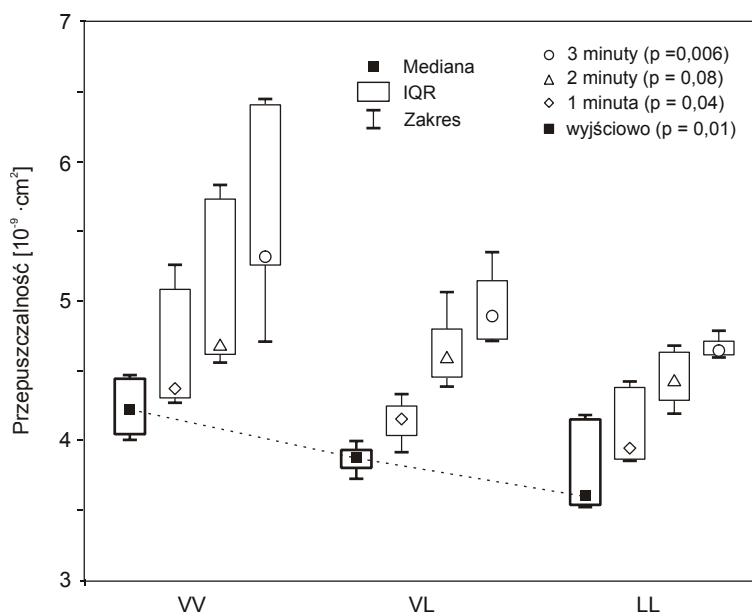
Polimorfizm Val34Leu cz. XIII A istotnie wpływał na zwiększenie przepuszczalności po zastosowaniu ASA: zmiana przepuszczalności była największa u osób z fenotypem Leu34Leu (51%), mniejsza u heterozygot (34%) i najmniejsza u homozygot Val34Val (21%) ($p = 0,001$). Po podaniu ASA u homozygot Leu34Leu obserwowaliśmy większą przepuszczalność żelu fibrynowego w porównaniu z osobami z heterozygotami lub homozygotami Val34Val (rys. 23). Takie same zależności zaobserwowaliśmy oceniając wpływ ASA i polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A na przepuszczalność żelu utworzonego w nadsączu otrzymanym po przerwaniu reakcji krzepnięcia po 1, 2 i 3 minutach ($p \leq 0,002$; dane niepokazane).

Przed podaniem ASA średnica włókien fibryny, zarówno wyjściowo, jak i po 1, 2 i 3 minutach krzepnięcia, nie różniła się

Rysunek 22. Współczynnik przepuszczalności żelu fibrynowego utworzonego w nadsączu wyjściowo i po 1, 2 i 3 minutach krzepnięcia przed podaniem ASA w zależności od genotypu cz. XIIIa.

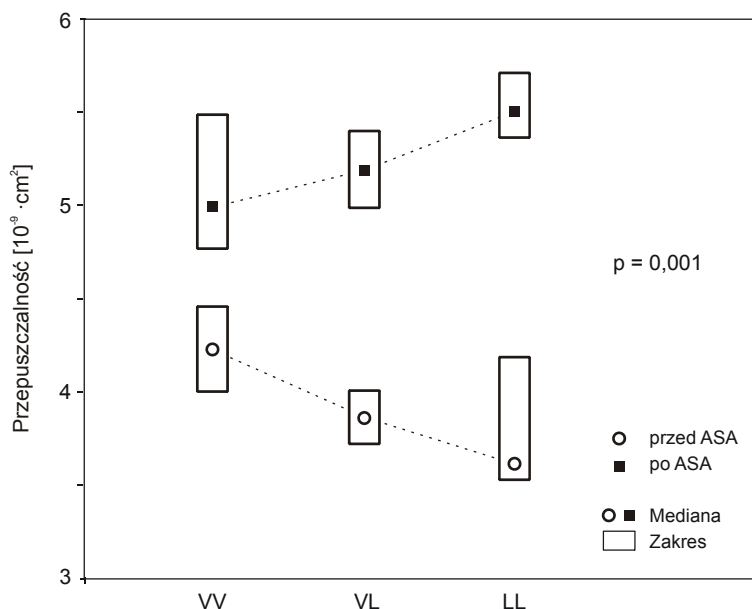
Przepuszczalność zwiększała się w miarę zmniejszającego się stężenia fibrynogenu w kolejnych próbkach.

VV – homozygoty Val34Val
 VL – heterozygoty
 LL – homozygoty Leu34Leu



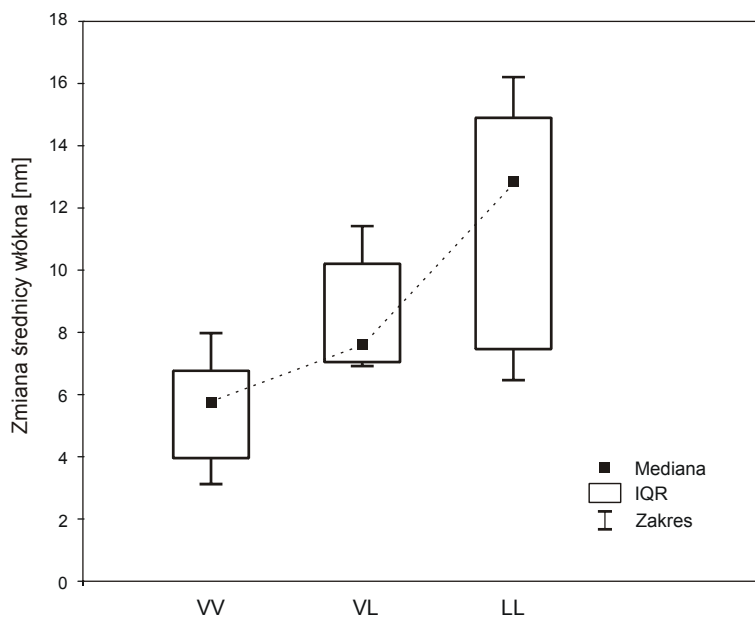
Rysunek 23. Współczynnik przepuszczalności żelu fibrynowego przed i po zażyciu ASA w zależności od genotypu cz. XIIIa.

VV – homozygoty Val34Val
 VL – heterozygoty
 LL – homozygoty Leu34Leu



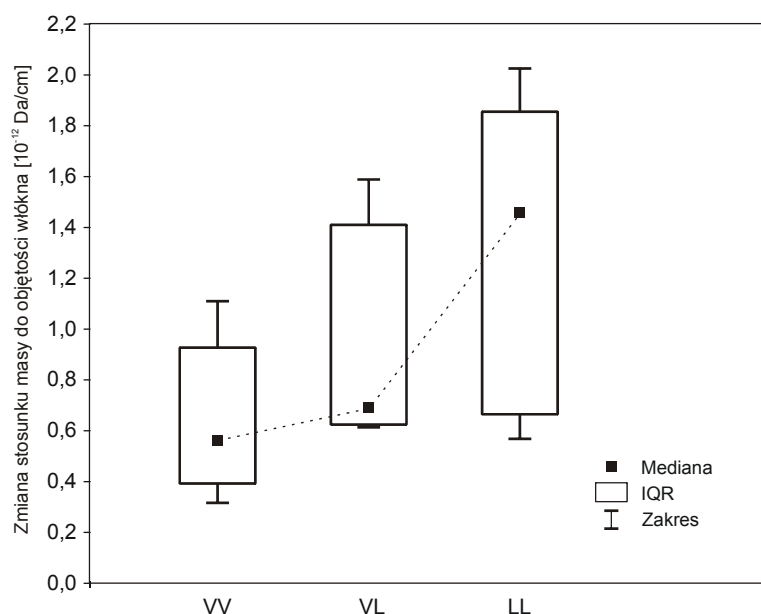
między podgrupami wyodrębnionymi w zależności od genotypu cz. XIIIa. U wszystkich badanych osób średnica włókien fibryny po 0, 1, 2 i 3 minutach krzepnięcia, zwiększyła się znamienne 4 godziny po podaniu ASA w porównaniu z wartością wyjściową ($p = 0,0002$). U wszystkich badanych przed zapoczątkowaniem krzepnięcia średnica włókien fibryny wynosiła 52,4 nm (45,6–61,1), a po podaniu ASA – 55,4 nm (49,5–68,2).

Polimorfizm Val34Leu cz. XIIIa istotnie wpływał na zwiększenie średnicy włókien fibryny po zastosowaniu ASA: zmiana średnicy włókien fibryny była największa u osób z fenotypem Leu34Leu (23%), mniejsza u heterozygot (17%) i najmniejsza u homozygot Val34Val (11%) ($p = 0,0015$) (rys. 24). Takie same zależności zaobserwowaliśmy oceniając wpływ ASA i polimorfizmu Val34Leu cz. XIIIa na średnicę włókien fibryny w żelu



Rysunek 24. Zmiana średnicy włókien fibryny pod wpływem ASA w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A.

VV – homozygoty Val34Val
 VL – heterozygoty
 LL – homozygoty Leu34Leu



Rysunek 25. Zmiana stosunku masy do długości włókien fibryny pod wpływem ASA w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A.

VV – homozygoty Val34Val
 VL – heterozygoty
 LL – homozygoty Leu34Leu

utworzonym w nadsączu otrzymanym po przerwaniu reakcji krzepnięcia po 1, 2 i 3 minutach ($p \leq 0,003$; dane niepokazane).

Podobną zależność pomiędzy zastosowaniem ASA a polimorfizmem cz. XIII A zaobserwowaliśmy obliczając stosunek masy do długości włókien fibryny. Przed podaniem ASA stosunek masy do długości włókien, zarówno wyjściowo, jak i po 1, 2 i 3 minutach krzepnięcia, nie różnił się między podgrupami wyodrębnionymi w zależności od genotypu cz. XIII A. Wśród wszystkich badanych osób stosunek masy do długości włókien po 0, 1, 2 i 3 minutach krzepnięcia, zwiększył się znacząco 4 godziny po podaniu ASA w porównaniu z wartością wyjściową ($p = 0,0002$). U wszystkich badanych przed zapoczątkowaniem krzepnięcia stosunek masy do długości włókien wynosił $2,50 \times 10^{-12}$ Da/cm (1,89–3,41), a po podaniu ASA – $2,95 \times 10^{-12}$ Da/cm (2,60–5,38).

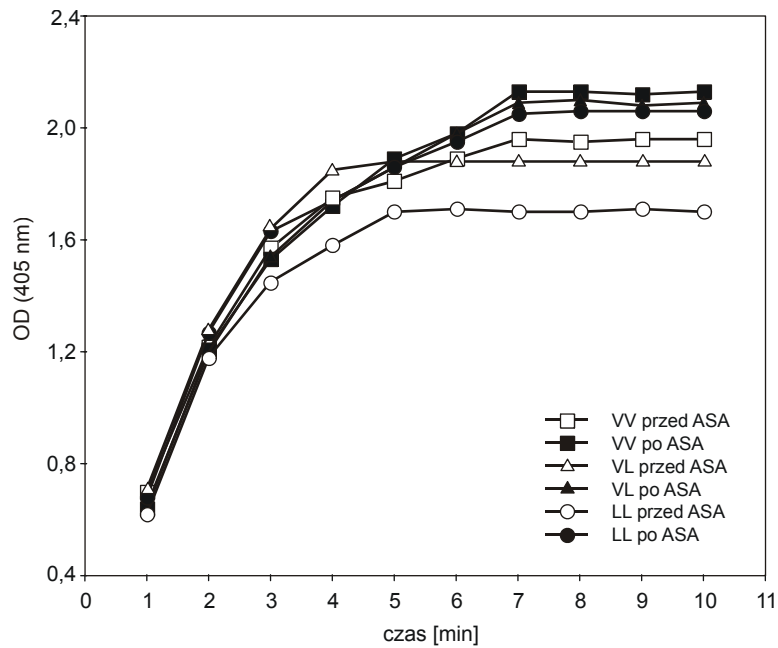
Rysunek 26. Krzywe polimeryzacji fibrynogenu/fibryny przed i po podaniu ASA w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A.

Punkty przedstawiają mediany poszczególnych pomiarów.

VV – homozygoty Val34Val

VL – heterozygoty

LL – homozygoty Leu34Leu



Polimorfizm Val34Leu cz. XIII A istotnie wpływał na zwiększenie stosunku masy do długości włókien fibryny po zastosowaniu ASA: zmiana stosunku masy do długości włókien była największa u homozygot Leu34Leu (51%), mniejsza u heterozygot (36%) i najmniejsza u homozygot Val34Val (23%) ($p = 0,0015$) (rys. 25). Takie same zależności zaobserwowaliśmy oceniając wpływ ASA i polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A na stosunek masy do długości włókien fibryny w żelu utworzonym w nadsączu otrzymanym po przerwaniu reakcji krzepnięcia po 1, 2 i 3 minutach ($p \leq 0,003$; dane niepokazane).

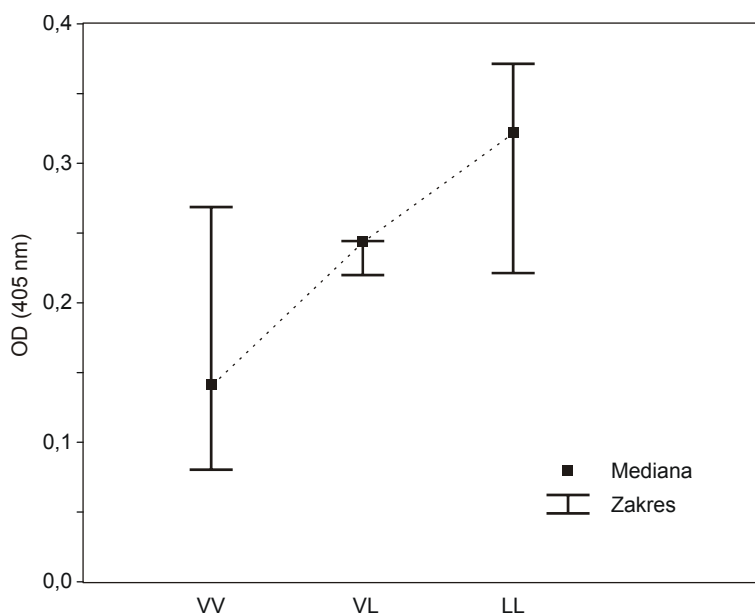
Wyjściowa przepuszczalność żelu fibrynowego była odwrotnie proporcjonalna do stężenia fibrynogenu w nadsączu (ρ Spearmana = $-0,43$; $p = 0,09$).

Turbidymetryczna ocena powstawania fibryny

Tworzenie fibryny i rozpraszanie światła przez fibrynogen/fibrynę ocenialiśmy turbidymetrycznie. Krzywe zależności gęstości optycznej od czasu przed i po podaniu ASA w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII A przedstawia rysunek 26.

Wyjściowo maksymalna szybkość narastania zmętnienia roztworu $V_{p_{max}}$ nie różniła się istotnie pomiędzy podgrupami wyodrębnionymi ze względu na polimorfizm Val34Leu cz. XIII A i wynosiła $0,69$ OD/min ($0,65-0,71$) u homozygot Val34Val, $0,73$ OD/min ($0,56-0,76$) u heterozygot i $0,74$ OD/min ($0,60-0,80$) u homozygot Leu34Leu. U wszystkich osób łącznie $V_{p_{max}}$ znacząco zmniejszyła się 4 h po podaniu ASA w porównaniu z wartością wyjściową ($0,64$ OD/min [$0,57-0,66$] vs $0,71$ OD/min [$0,65-0,74$]; $p = 0,015$). Nie wykazaliśmy istotnej zależności pomiędzy wpływem ASA na $V_{p_{max}}$ a polimorfizmem Val34Leu cz. XIII A.

Największa gęstość optyczna po osiągnięciu fazy plateau (OD_{max}) była wyjściowo mniejsza u homozygot Leu34Leu w porównaniu z heterozygotami i homozygotami Val34Val (odpowiednio: $1,72$ OD vs $1,90$ OD vs $1,96$ OD). U wszystkich osób łącznie OD_{max}



Rysunek 27. Zmiana maksymalnej gęstości optycznej podczas tworzenia żelu fibrynowego w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII.

VV – homozygoty Val34Val
 VL – heterozygoty
 LL – homozygoty Leu34Leu

znamiennie zwiększyła się 4 h po podaniu ASA w porównaniu z wartością wyjściową (2,12 OD [1,94–2,14] vs 1,90 OD [1,72–1,96]; $p = 0,008$). OD_{max} zwiększyła się najbardziej u homozygot Leu34Leu (0,32 OD), w porównaniu z heterozygotami (0,24 OD) i homozygotami Val34Val (0,14 OD) (rys. 27).

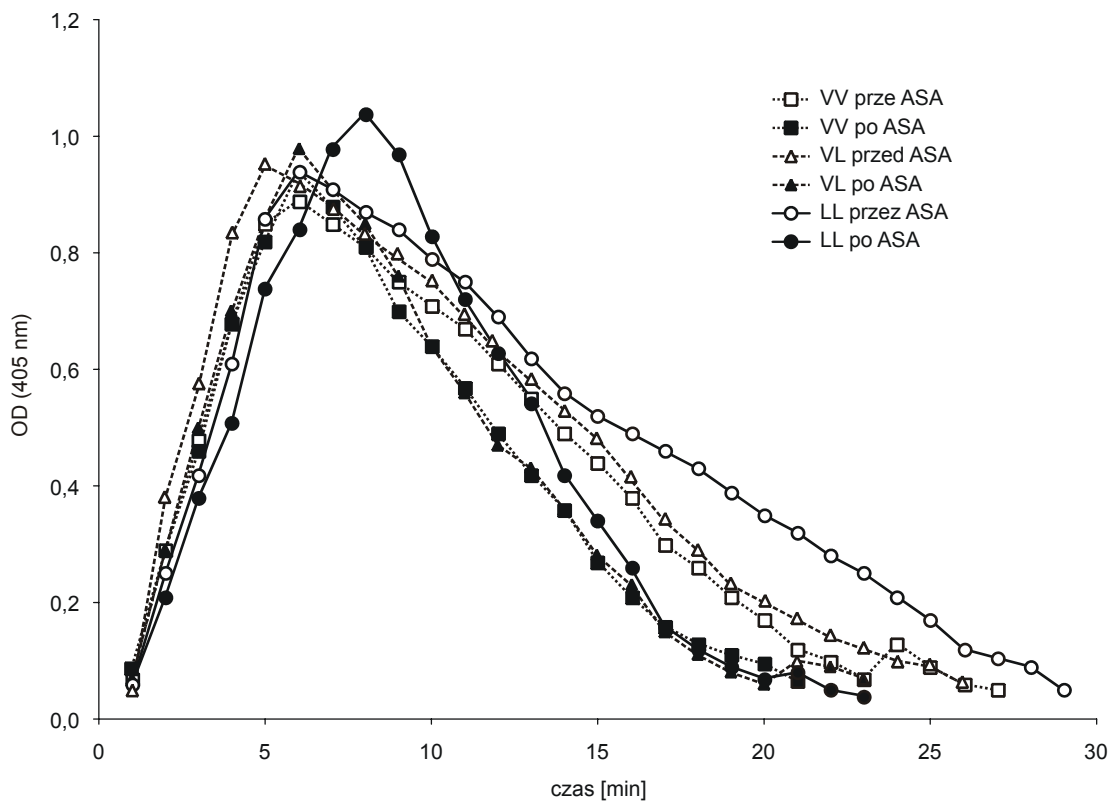
Podatność skrzepu na fibrylizę

Fibrylizę ocenialiśmy turbidymetrycznie, a krzywe zależności gęstości optycznej od czasu przed i po podaniu ASA w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII przedstawia rysunek 28.

W obecności ludzkiego tPA w stężeniu końcowym 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, u wszystkich osób łącznie przed podaniem ASA gęstość optyczna maksymalnie narastała z prędkością 0,26 OD/min (0,21–0,36) niezależnie od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII. Cztery godziny po podaniu ASA szybkość narastania gęstości optycznej nieznacznie, ale znamiennie zmniejszyła się do 0,21 OD/min (0,20–0,24) ($p = 0,008$). Nie obserwowaliśmy zależności pomiędzy wielkością efektu a polimorfizmem cz. XIII.

Maksymalna gęstość optyczna wyjściowo wynosiła 0,92 OD (0,90–0,94) i nie różniła się pomiędzy podgrupami wyodrębnionymi ze względu na polimorfizm Val34Leu cz. XIII. ASA miał niewielki wpływ na zmianę maksymalnej gęstości optycznej, która zmieniła się o 0,03 OD (od -0,01 do 0,07; $p = 0,09$). Zmiana maksymalnej gęstości optycznej nie zależała od polimorfizmu cz. XIII.

Maksymalne zmniejszenie gęstości optycznej, odpowiadające najszybszej fazie fibrylizy, u wszystkich osób łącznie wynosiło wyjściowo 0,07 OD/min (0,06–0,08) niezależnie od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII. Po podaniu ASA V_{max} zwiększyła się do 0,10 OD/min (0,09–0,12) ($p = 0,008$), przy czym zmiana była większa u homozygot Leu34Leu (83%), w porównaniu z heterozygotami (57%) i homozygotami Val34Val (29%) (rys. 29).

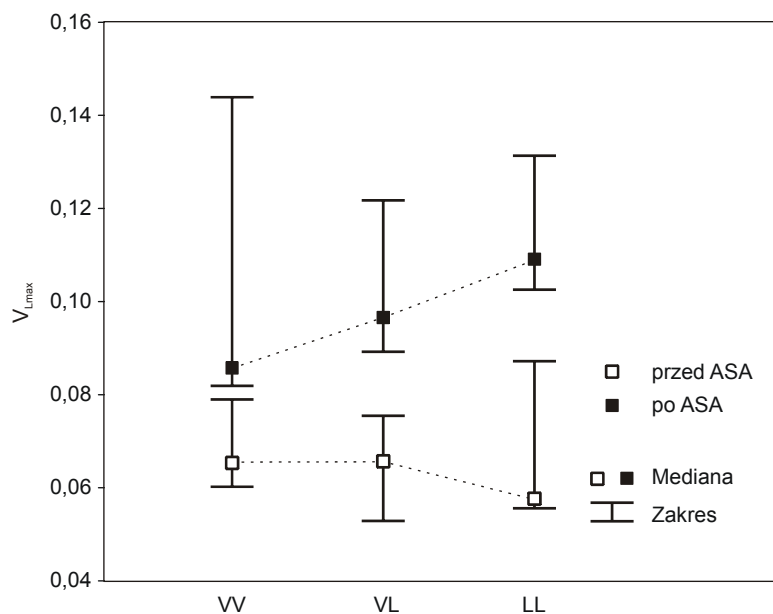


Rysunek 28. Krzywe turbidymetryczne tworzenia fibryny i fibrylizacji przed i po podaniu ASA w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIIIa.

Punkty przedstawiają mediany poszczególnych pomiarów; VV – homozygoty Val34Val; VL – heterozygoty; LL – homozygoty Leu34Leu.

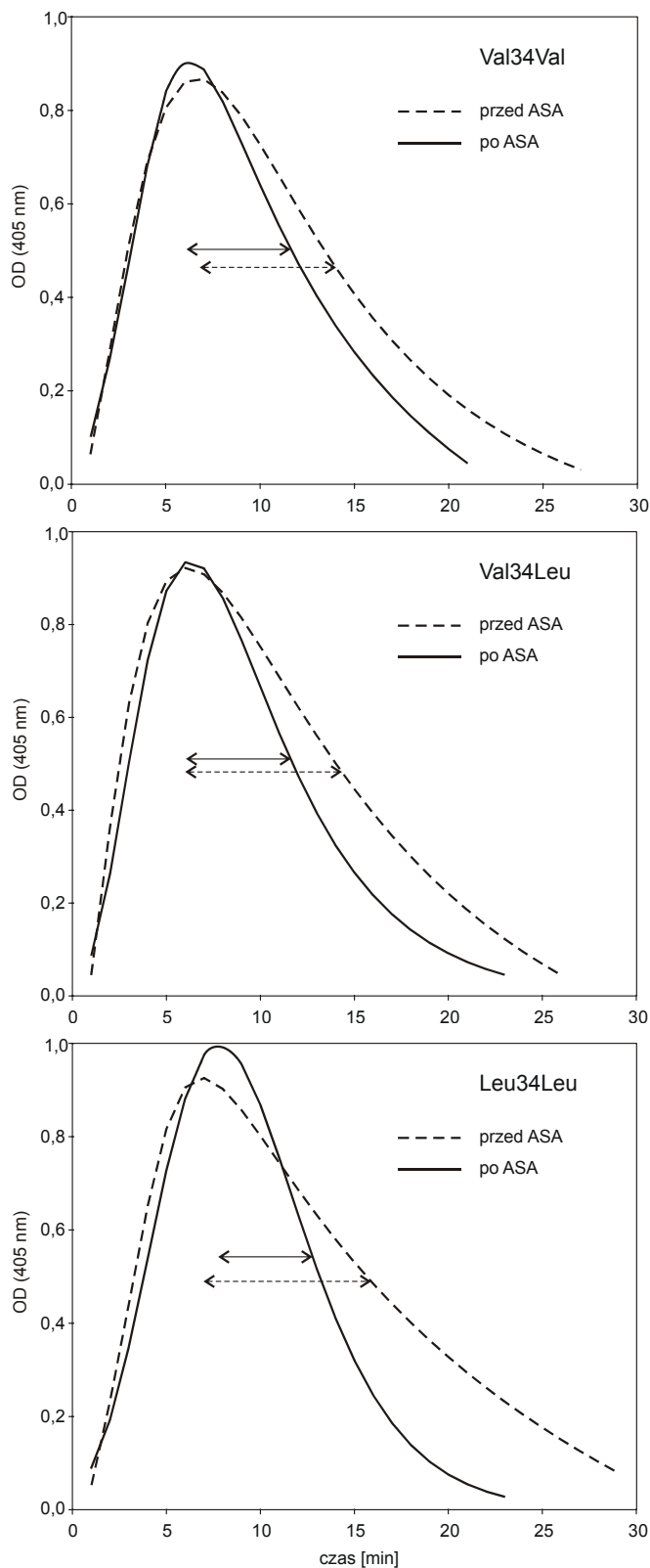
Rysunek 29. Maksymalne zmniejszenie gęstości optycznej podczas fibrylizacji przed i po podaniu ASA w zależności od polimorfizmu Val34Leu cz. XIIIa.

VV – homozygoty Val34Val
VL – heterozygoty
LL – homozygoty Leu34Leu



Czas lizy żelu fibrynowego ($t_{50\%}$) u wszystkich osób łącznie wynosił wyjściowo 8,8 min (8,4–10,5) i był krótszy o około 1 minutę u homozygot Val34Val (8,6 min [7,9–9,7]) w porównaniu z nosicielami allelu Leu (Val34Leu – 8,8 min [8,4–10,8]; Leu34Leu – 10,5 min [8,4–10,8]). W porównaniu z wartością wyjściową, u

wszystkich osób łącznie po podaniu ASA $t_{50\%}$ skrócił się o około 2 minuty do 6,4 min (5,7–6,6) ($p = 0,008$). Zmiana czasu fibrynolizy była większa u nosicieli allelu Leu34 w porównaniu z homozygotami Val34Val. W rezultacie, po ASA czas fibrynolizy był krótszy u homozygot Leu34Leu (5,7 min) w porównaniu z heterozygotami (6,5 min) i homozygotami Val34Val (6,9 min) (rys. 30).



Rysunek 30. Fibrynoliza oceniana turbidymetrycznie.

Rysunki przedstawiają krzywe turbidymetrii dopasowane do danych eksperymentalnych ($R^2 \geq 0,99$). Poziome strzałki obrazują czas fibrynolizy $t_{50\%}$ (objaśnienia w tekście).

Dyskusja

Przedstawione wyniki po raz pierwszy pokazują, że u ludzi zdrowych posiadających leucynę w pozycji 34 podjednostki katalitycznej cz. XIII, kwas acetylosalicylowy nie tylko zmienia tempo aktywacji cz. XIII, ale także zwiększa porowatość skrzepu fibrynowego i podatność na fibrylizację. Obserwacje te potwierdzają wcześniejsze doniesienia i rozszerzają je wykazując, że wariant Leu34 cz. XIII charakteryzujący się szybszą aktywacją przódziej katalizuje powstawanie wiązań krzyżowych między łańcuchami γ fibryny w obrębie tworzącego się skrzepu, a zażycie 300 mg ASA wyraźnie opóźnia tą reakcję. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykorzystano model krzepnięcia inicjowanego przez cz. tkankowy na pęcherzykach fosfolipidowych, w którym krew pobierana jest bez dodatku antykoagulantu (240), do oceny wpływu polimorfizmu cz. XIII na jego czynność. Uzyskane wyniki sugerują, że polimorfizm Val34Leu cz. XIII modyfikuje ostatnie etapy krzepnięcia krwi prowadzące do powstania stabilnego skrzepu, a jego wpływ zależy od obecności ASA. Te nowe, nieznane dotąd efekty działania ASA w zależności od obecności allelu Leu34 mogą stanowić przykład farmakogenetycznych oddziaływań w układzie krzepnięcia.

Uwagi dotyczące metodyki

Badana grupa liczyła 9 osób, po 3 z poszczególnym wariantem polimorficznym Val34Leu cz. XIII. Ograniczenia finansowe i organizacyjne, a także uciążliwy protokół eksperymentu uniemożliwiły zbadanie liczniejszej grupy osób, co mogłoby zwiększyć prawdopodobieństwo wykrycia istotnych statystycznie różnic zależnych od polimorfizmu Val34Leu cz. XIII. Warto jednak podkreślić, że również R. Ariëns i wsp. analizowali 3 homozygoty Leu34Leu porównując je z homozygotami Val34Val i opisali swe obserwacje w jednej z przewodnich prac dotyczących polimorfizmu Val34Leu cz. XIII opublikowanej w Blood w 2000 roku (145). Ta sama grupa oceniała przepuszczalność skrzepów fibrynowych uzyskanych z osocza cytrynianowego od około 100 osób o różnych genotypach cz. XIII (63). Pracochłonność i złożoność przeprowadzonych i opisanych tutaj kilku eksperymentów skłoniła nas do wzorowania się na protokole Ariënsa i wsp. i wzbogaceniu go o analizę fibrylizacji skrzepu, czego dotąd nie badano w odniesieniu do polimorfizmu Val34Leu cz. XIII.

Wybór 4 godzin od zażycia 300 mg ASA jako punktu ponownego pobrania krwi w celu oceny efektu leku w „ostrym” eksperymencie wynikał z analizy dostępnych danych na temat wpływu ASA na hemostazę. Wydłużenie czasu krwawienia, będącego tradycyjnie najprostszym, choć mało swoistym, wskaźnikiem działania ASA *in vivo*, zwykle obserwowano po 4 godzinach (274). Podobny protokół stosowano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CM UJ badając zależność między polimorfizmem PlA1/A2 integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ a czasem krwawienia (275).

Ze względu na stosunkowo dużą objętość krwi, którą pobieraliśmy bezpośrednio przed przyjęciem ASA i 4 godziny później, nie zdecydowaliśmy się na kolejne pobranie krwi w późniejszym czasie, co mogłoby lepiej opisać kinetykę oddziaływania pomiędzy zażyciem ASA a krzepnięciem krwi w zastosowanym modelu. Możliwe bowiem, że działanie ASA nasila się po kilku następnych godzinach od jego zażycia, zwłaszcza w przypadku białka o długim okresie półtrwania jakim jest fibrynogen. Z drugiej strony ASA zanika we krwi już po około 15 minutach i po podaniu podobnej dawki jego stężenie nie przekracza 35 $\mu\text{mol/l}$ (276). Oddzielona przez nieswoiste esterazy grupa acetylowa łączy się z wieloma białkami, przede wszystkim z albuminami, których stężenie w osoczu jest duże. Stwierdzone w tym badaniu oddziaływania ASA mogą sugerować, że mimo „nadmiaru” potencjalnych akceptorów grupy acetylowej fibrynogen zwykle w stężeniu 7–10 $\mu\text{mol/l}$ również może ulec takiej modyfikacji *in vivo*, podobnie jak ma to miejsce w przypadku przyłączenia do lizyn homocysteiny (277, 278).

Niebagatelne znaczenie dla ostatecznych wyników i ich interpretacji miał wybór modelu oceny krzepnięcia krwi, fibrynolizy skrzepów i metody oceny wybranych właściwości skrzepu. Każdy z modeli ma swoje zalety, ale też nie jest wolny od wad. Metoda oceny przepuszczalności żelu fibrynowego zastosowana w tej pracy została opracowana na Uniwersytecie w Leeds przez grupę kierowaną przez R. Ariënsa i P. Granta. W piśmiennictwie można znaleźć inne sposoby oceny przepuszczalności skrzepu przy zastosowaniu oczyszczonego chromatograficznie osocznego lub płytkowego cz. XIII i czystego fibrynogenu i trombiny (57, 65, 82, 85, 88, 254), co z oczywistych względów stanowi model odbiegający znacznie od warunków panujących w osoczu. Wiadomo, że liczne składniki osocza, np. albumina (80, 82) i fibronektyna (134), a być może także triglicerydy (70) lub niektóre białka ostrej fazy (np. orozomukoid (59)) modyfikują przepuszczalność żelu fibrynowego. W Instytucie Karola w Sztokholmie, grupa prowadzona przez M. Blombäck zwykle dializuje osocze przed przygotowaniem żelu oraz stosuje często stosunkowo małe stężenia trombiny (29, 55, 84) co, wydłużając formowanie się stabilnego skrzepu, ułatwia późniejszą nim manipulację. Przy takim podejściu większość zmiennych opisujących w przybliżeniu strukturę fibryny różni się od publikowanych przez Ariënsa i wsp., sugerując większą porowatość otrzymanych żeli fibrynowych. Inne możliwości oceny właściwości żelu fibrynowego obejmują tromboelastografię klasyczną bądź rotacyjną (279), a także metody obrazowe z szacowaniem wielkości por i grubości włókien fibryny za pomocą mikroskopu skaningowego (63, 145) lub konfokalnego (38, 64). Ze względu na procedurę przygotowywania próbek, wymagającą odwodnienia fibryny, obrazy z mikroskopu elektronowego pokazują jednak zniekształconą i zapadniętą sieć fibryny, a z kolei ocena struktury sieci za pomocą mikroskopu konfokalnego jest utrudniona ze względu na małą rozdzielczość. Warto także zaznaczyć, że w celu optymalizacji wyników stosowaliśmy typowe metody oceny jakości żeli, eliminując z dalszej analizy te, przez które bufor przesiałkał nierównomierne lub, w których makroskopowo stwierdziliśmy obecność pęcherzyków powietrza (tendencja ta wiąże się z dodawaniem do mieszaniny stosunkowo dużych stężeń trombiny). Uzyskane

wyniki współczynnika przepuszczalności, a nawet przepływy przy tych samych parametrach użytych buforów i rurczek były bardzo zbliżone do tych opublikowanych przez badaczy z uniwersytetu w Leeds (72, 77).

Zastosowana przez nas metoda oceny podatności skrzepu fibrynowego na lizę po dodaniu tPA jest jednym z kilku sposobów opisanych w artykułach publikowanych w ciągu ostatnich 15 lat. Modyfikacje poszczególnych metod polegają zwykle na innym składzie mieszaniny, np. na powierzchnię żelu fibrynowego na płytce dodaje się aktywną plazminę (278) albo tPA dodaje się do buforu przesączającego się przez wcześniej utworzony, stabilny żel (80). Absorbancję żelu najczęściej mierzy się przy długości fali 350 nm lub 405 nm jako funkcję czasu (29, 39, 47, 55, 57, 60, 77, 82, 85, 88, 134). Konceptyjnie innym podejściem jest oznaczanie stężenia dimeru D – markera fibrynolizy, w próbkach buforu przesiąkającego przez żel, aż dojdzie do całkowitego zniszczenia jego struktury podczas trawienia fibryny (80). Wybór zastosowanej tu metody wg A. Wolberg (47), przy nieco mniejszym stężeniu końcowym tPA, wynikał z chęci dokładnej ilościowej analizy procesu fibrynolizy żelu utworzonego w osoczu przy dobrej powtarzalności wyników i małej zmienności międzyosobniczej w grupie zdrowych ochotników. Efektywność fibrynolizy ocenialiśmy na podstawie analizy kilku zmiennych, których, o ile nam wiadomo na podstawie dostępnego piśmiennictwa, dotychczas nie analizowano w tym kontekście: szybkości narastania absorbancji w pierwszej fazie tworzenia się polimerów fibryny ($V_{p_{max}}$), maksymalnej absorbancji (OD_{max}) i tempa zmniejszania się absorbancji w fazie drugiej, kiedy przeważała fibrynoliza ($V_{l_{max}}$). Posłużyliśmy się także prostym i wygodnym parametrem, jakim jest czas spadku maksymalnej absorbancji o połowę – tzw. czas 50% lizy.

Analizując kluczowy dla naszego wnioskowania proces powstawania mierzalnych ilości dimerów γ w rozpuszczonych izolowanych skrzepach wykorzystaliśmy tu po raz pierwszy znakowanie monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko łańcuchom γ ludzkiego fibrynogenu połączonym wiązaniem krzyżowym, które jest znacznie bardziej czułe i swoiste w porównaniu z tradycyjnym barwieniem błękitem Coomassie. Jednoczesne użycie oczyszczonego standardu fibryny i pomoc doświadczanego zespołu prof. K. G. Manna umożliwiły przeprowadzenie ilościowej analizy stężenia dimerów γ przed i po podaniu ASA za pomocą techniki Western blot, czego dotychczas nie czyniono.

Wpływ ASA na krzepnięcie krwi

Analizując wszystkie 9 osób łącznie w modelu „minimalnie zmodyfikowanej pełnej krwi żyłnej” wg Randa (240), szczególnie wyraźnie widać wpływ 300 mg ASA na generację trombin, aktywację cz. XIIIa i tworzenie dimerów γ fibryny. W tym samym modelu, stosując większe stężenia cz. tkankowego, Butenas i wsp. nie obserwowali wpływu zażycia 650 mg ASA na stężenie kompleksów TAT u 3 zdrowych ochotników (280).

Przedstawione przez nas wyniki wskazują na osłabienie trombinogenezy w obecności małych stężeń cz. tkankowego, choć efekt ten jest stosunkowo niewielki. Przyczyn tej rozbieżności można upatrywać w małej liczbie grupy badanej przez

Butenasa i wsp. i bardzo małej mocy wykrycia jakiegokolwiek różnicy przy obserwowanej przez nich zmienności międzyosobniczej, czy też w kilkukrotnie wyższym stężeniu cz. tkankowego – inicjatora kaskady krzepnięcia, co prowadziło do przyspieszenia reakcji i skrócenia fazy inicjacji, utrudniając uchwycenie małych różnic polekowych. Dłuższa faza inicjacji w opisanej przez nas grupie (określona na podstawie zależności stężenia kompleksów TAT od czasu), w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez Butenasa i wsp. (280) oraz Brummel i wsp. (21, 241), świadczy o zmniejszonej aktywności kompleksu cz. tkankowego z cz. VIIa. Zaobserwowane dodatkowe znamienne wydłużenie fazy inicjacji po zażyciu ASA wskazuje, że lek ten zmniejszył aktywność kompleksu inicjującego zewnątrzpochodną drogę krzepnięcia, podobnie jak w modelu uszkodzenia mikronaczyń u osób przyjmujących 75 mg ASA przez 7 dni (234), chociaż natura tego zjawiska jest nieznaną.

Wpływ ASA na aktywację cz. XIII nie był dotąd badany w modelu Randa (240). Przedstawione tu wyniki sugerują, że powstawanie aktywnej formy podjednostki A oraz zanikanie jej zymogenu cz. XIII w nadsączu ulega spowolnieniu po zażyciu ASA, najpewniej, przynajmniej częściowo, z powodu upośledzenia trombinogenezy. Nie można wykluczyć, że tempo tej aktywacji zmniejsza się w wyniku modyfikacji fibryny przez ASA, ponieważ jak się uważa, prawidłowa fibryna 100–1000-krotnie przyspiesza kilkietapowy proces powstawania aktywnej transamidazy osoczowej (113), który zachodzi prawie wyłącznie na powierzchni tworzących się protofibryli. Opóźnienie tworzenia się aktywnej postaci cz. XIIIa w opisanym przez nas modelu jest zastanawiająco podobne do obserwowanego we krwi wypływającej z nacięć na skórze u zdrowych osób przyjmujących 75 mg ASA (281).

Łatwym do przewidzenia skutkiem upośledzenia aktywacji cz. XIII jest zwolnienie i opóźnienie powstawania dimerów γ w skrzepach tworzących się w kolejnych minutach. Aktywny cz. XIIIa jest bowiem jedyną transamidazą znajdującą się w osoczu i w płytkach. W zastosowanym modelu teoretyczna możliwość uwolnienia tkankowych przedstawicieli transamidaz z erytrocytów lub z tkanek jest bardzo mało prawdopodobna (282).

Obserwacja, że ASA może mieć wpływ na aktywację płytkowego cz. XIIIa w zależności od polimorfizmu Val34Leu jest zaskakująca. Homogenizacja płytek poddanych działaniu ASA *in vivo* nie wyklucza możliwości przyłączenia się reszty acetylowej, która do cz. XIII dołącza się z rezerwuaru jakim są fragmenty błony komórkowej płytek. Wydaje się mało prawdopodobne, aby płytkowy cz. XIIIa w ziarnistościach α mógł ulec acetylacji we krwi krążącej. Niewątpliwie wynik jednorazowego eksperymentu z płytkowym cz. XIIIa uzyskanym od homozygoty Val34Val i Leu34Leu wymaga potwierdzenia w kolejnych doświadczeniach.

Przedstawione wyniki są kolejnym dowodem wskazującym na istnienie dodatkowych działań przeciwzakrzepowych ASA, które najpewniej nie wiążą się ściśle z podstawową funkcją tego leku – zahamowaniem produkcji TXA₂. Jaki mechanizm odpowiada za słabe „antykoagulacyjne” działanie ASA pozostaje niejasne.

Być może dodatkowe efekty działania ASA przyczyniają się jednak, przynajmniej częściowo, do zastanawiająco dużej skuteczności tego prostego związku w prewencji incydentów sercowo-

naczyniowych, co trudno jest wytłumaczyć zahamowaniem powstawania tylko jednego z agonistów płytkowych.

Mechanizmy działania ASA na krzepnięcie krwi

Mechanizmy opisanych zmian są nieznane i prawdopodobnie złożone. W świetle dostępnego piśmiennictwa można zaproponować hipotezę, że acetylacja fibrynogenu, a w konsekwencji fibryny, zachodzi w ustroju w ciągu 4 godzin od przyjęcia ASA, co prowadzi do osłabienia roli fibryny w aktywacji cz. XIII i do zmiany właściwości skrzepu. Zmiana jednego aminokwasu w pozycji 34 łańcucha A cz. XIII wydaje się zatem nakładać na oddziaływania acetylowanej fibryny z procesami zachodzącymi na jej włóknach. Szczegóły tego zjawiska nie zostały dotychczas poznane. Być może, tak jak to się dzieje w przypadku COX-1, przyłączenie jednej grupy acetylowej do jednej lizyny modyfikuje wrażliwość fibryny na działanie cz. XIIIa, a następnie na tPA.

Zablokowanie niektórych lizyn poprzez ich acetylację jest prawdopodobnie odpowiedzialne za upośledzenie fibrynolizy obserwowane 4 godziny po przyjęciu ASA, ponieważ przyłączenie tPA, PAI-1 i plazminogenu do fibryny odbywa się właśnie za pośrednictwem lizyn. Wyjaśnienie, do których lizyn fibrynogenu lub fibryny może przyłączyć się grupa acetylowa ASA, wymaga dalszych badań. Obserwacje sugerujące acetylację lizyn fibryny, przynajmniej *in vitro*, pochodzą z kilku ośrodków (73, 76), ale dotychczas nie obejmowały analiz chromatograficznych różnych fragmentów fibryny ani spektrometrii mas, co umożliwiłoby zlokalizowanie lizyn poddawanych acetylacji.

Potencjalne implikacje praktyczne

W świetle przedstawionych wyników można przewidywać, że obecność allelu Leu34 może się wiązać z słabszą odpowiedzią na leczenie fibrynolityczne. Rzeczywiście w styczniu 2005 roku na łamach Journal of the American College of Cardiology opublikowano wyniki badania klinicznego wspierające tę koncepcję (283). W tym wieloośrodkowym badaniu kohortowym, w którym wzięło udział 293 chorych na świeży zawał serca, Marín i wsp. zaobserwowali, że obecność allelu Leu34 wiązała się z gorszym wynikiem leczenia fibrynolitycznego (ocenianego na podstawie obrazu klinicznego, seryjnych elektrokardiogramów i aktywności frakcji MB kinazy kreatynowej) i z około 2-krotnie większym ryzykiem zgonu, ponownego zawału serca lub potrzeby pilnej rewaskularyzacji łącznie w ciągu 24 h obserwacji. Nie można wykluczyć, że zróżnicowana wrażliwość na działanie leku fibrynolitycznego (w tym badaniu: TNK-tPA lub streptokinazy) w obecności ASA ma wpływ na kliniczną skuteczność leczenia trombolitycznego stosowanego również w innych schorzeniach m.in. w świeżym udarze niedokrwiennym mózgu lub zakrzepowych powikłaniach miażdżycy tętnic obwodowych. Kolejne badania kliniczne, uwzględniające jednocześnie polimorfizm Val34Leu cz. XIIIa i stosowanie ASA, są niezbędne, aby ocenić rzeczywisty wpływ obecności leucyny w pozycji 34 podjednostki A cz. XIII na częstość występowania istotnych incydentów zakrzepowych oraz efektu podawania leków

fibrynolitycznych, które mają różnego stopnia powinowactwo do fibryny.

Wnioski

1. U zdrowych ochotników jednorazowe zażycie 300 mg ASA opóźnia aktywację cz. XIIIa, a obecność allelu Leu34 wiąże się z tendencją do większego zwolnienia aktywacji cz. XIIIa pod wpływem ASA.
2. Po podaniu ASA struktura sieci fibryny jest bardziej przepuszczalna, jej włókna są grubsze, a stosunek masy do długości włókna – większy. Zmiany struktury sieci po podaniu ASA są wyrazistsze u nosicieli allelu Leu34 cz. XIIIa, będąc wprost proporcjonalne do liczby alleli Leu34.
3. Po podaniu ASA zmniejsza się stężenie dimerów γ w rozpuszczonych skrzepach fibrynowych. Efekt ten jest silniejszy u nosicieli allelu Leu34 cz. XIIIa w porównaniu z homozygotami Val34Val.
4. Po podaniu ASA zwiększa się podatność żelu fibrynowego na fibrynolizę, a obecność allelu Leu34 wiąże się z tendencją do szybszej lizy żelu pod wpływem ASA.

Streszczenie

Wprowadzenie

Wyniki badań klinicznych sugerują, że polimorfizm Val34Leu czynnika XIII wiąże się ze zmniejszeniem ryzyka zawału serca i żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej. Paradoksalnie, wykazano, że obecność allelu Leu34 zwiększa tempo aktywacji czynnika XIIIa, co sugeruje szybszą stabilizację skrzepu poprzez wytworzenie wiązań krzyżowych katalizowane przez aktywny czynnik XIIIa. Struktura takiego skrzepu wydaje się mniej podatna na fibrylizację. Niedawno stwierdzono, że kwas acetylosalicylowy silniej hamuje aktywację cz. XIIIa u nosicieli allelu Leu34, w porównaniu z homozygotami Val34Val. Wpływ kwasu acetylosalicylowego na właściwości skrzepu fibrynowego w zależności od polimorfizmu Val34Leu nie jest znany.

Cele

Wyjaśnienie wpływu kwasu acetylosalicylowego w zależności od polimorfizmu Val34Leu na aktywację czynnika XIIIa, powstawanie usieciowanej fibryny, przepuszczalność żelu fibrynowego i jego podatność na lizę.

Badani

9 zdrowych ochotników (4 kobiety i 5 mężczyzn) w wieku 30–45 lat: 3 osoby z genotypem Val34Val, 3 osoby z genotypem Val34Leu i 3 osoby z genotypem Leu34Leu czynnika XIIIa wybrane spośród 41 zdrowych osób. Wszyscy badani nie palili tytoniu, nie stosowali żadnych leków przez ≥ 4 tygodnie i mieli prawidłowe wyniki podstawowych badań laboratoryjnych krwi obwodowej.

Interwencja

Kwas acetylosalicylowy 300 mg jednorazowo

Pomiary

Wszystkie pomiary wykonywano wyjściowo i 4 h po podaniu kwasu acetylosalicylowego w modelu krzepnięcia zależnym od czynnika tkankowego (stężenie końcowe 2 pmol/l) opracowanym przez M. Randa i wsp. Aktywację protrombiny, czynnika XIII, stężenie dimerów γ w skrzepach utworzonych w osoczu i w obecności oczyszczonego płytkowego czynnika XIII oceniano za pomocą metody Western blot. Właściwości skrzepu fibrynowego, utworzonego w osoczu zmodyfikowaną metodą opracowaną przez B. Blombäck i M. Okadę, oceniano na podstawie jego przepuszczalności, wyrażonej współczynnikiem przepuszczalności Darcy'ego, i oszacowanego stosunku masy do długości włókien fibryny. Tworzenie się żelu i jego podatność na fibrylizację po dodaniu tkankowego aktywatora plazminogenu (1 $\mu\text{g/ml}$) oceniano spektrofotometrycznie przy długości fali 405 nm.

Wyniki

Aktywacja czynnika XIIIa przebiegała wolniej po podaniu kwasu acetylosalicylowego (2 *vs* 6 minut; $p = 0,008$), a efekt był większy u nosicieli allelu Leu34 w porównaniu z homozygotami Val34Val. Reakcje aktywacji protrombiny i konwersji fibrynogenu były typowe dla zastosowanego modelu i nie zależały od polimorfizmu czynnika XIII.

Stężenie dimerów γ w rozpuszczonych skrzepach utworzonych w osoczu zmniejszyło się znamienne po podaniu kwasu acetylosalicylowego (7,04 *vs* 2,39 mg/l; $p = 0,05$). Zmiana stężenia dimerów γ była większa u homozygot Leu34Leu, w porównaniu z heterozygotami i homozygotami Val34Val (odpowiednio, 85% *vs* 64% *vs* 25%; $p = 0,06$). Stężenie dimerów γ w skrzepach utworzonych w obecności oczyszczonego czynnika XIIIa wyizolowanego z płytek od homozygoty Val34Val i Leu34Leu było mniejsze po podaniu kwasu acetylosalicylowego, a efekt ten był większy u homozygoty Leu34Leu w porównaniu z homozygotą Val34Val.

Przepuszczalność żelu fibrynowego zwiększyła się znamienne po podaniu kwasu acetylosalicylowego ($p = 0,0002$). Zmiana współczynnika przepuszczalności była największa u homozygot Leu34Leu w porównaniu z heterozygotami i homozygotami Val34Val i wykazywała zależność od liczby alleli Leu34 (odpowiednio: 51% *vs* 34% *vs* 21%; $p = 0,001$). Średnica włókna fibryny i stosunek masy do długości włókna również zwiększyły się po podaniu kwasu acetylosalicylowego, a zależność od polimorfizmu Val34Leu czynnika XIIIa była taka sama jak w przypadku przepuszczalności żelu.

Żel fibrynowy utworzony po podaniu kwasu acetylosalicylowego był gęstszy optycznie w pomiarach turbidymetrycznych ($p = 0,008$). Zmiana pod wpływem kwasu acetylosalicylowego była większa u homozygot Leu34Leu, w porównaniu z heterozygotami i homozygotami Val34Val (0,32 OD *vs* 0,24 OD *vs* 0,14 OD).

Podatność żelu fibrynowego na lizę, wyrażona jako maksymalna szybkość zmniejszania się gęstości optycznej i czas, w którym gęstość optyczna zmniejszy się połowę wartości maksymalnej (tzw. czas 50% fibrylizy, $t_{50\%}$), zwiększyła się znamienne po podaniu kwasu acetylosalicylowego ($p = 0,008$). Przyspieszenie fibrylizy było największe u homozygot Leu34Leu w porównaniu z heterozygotami i homozygotami Val34Val; $t_{50\%}$ zmniejszył się odpowiednio o 4,16 min *vs* 2,74 min *vs* 2,36 min.

Wnioski

W modelu krzepnięcia zależnego od czynnika tkankowego, u zdrowych ochotników jednorazowe zażycie 300 mg kwasu acetylosalicylowego opóźniało aktywację czynnika XIIIa i zmieniało strukturę sieci fibryny, czyniąc ją bardziej przepuszczalną i podatną na fibrylizę. Efekty te zależały od polimorfizmu Val34Leu czynnika XIIIa i były najsilniejsze u homozygot Leu34Leu. Obserwacje te potwierdzają, że obecność allelu Leu34 czynnika XIIIa wpływa niekorzystnie na właściwości skrzepu fibrynowego, a stosowanie kwasu acetylosalicylowego wyraźnie osłabia ten efekt, co może mieć implikacje praktyczne.

English summary

Background

Recent clinical trials suggest that the the factor XIII Val34Leu polymorphism is associated with lower odds of myocardial infarction or venous thromboembolism. These results are accompanied by the paradoxical findings from basic research that show higher rate of factor XIIIa activation in Leu34 carriers, suggesting earlier fibrin network cross-linking catalyzed by activated factor XIIIa and increased resistance to fibrinolysis. It has recently been shown that the inhibition of the factor XIIIa activation by acetylsalicylic acid was stronger in Leu34 carriers compared to Val34Val homozygous individuals. The effect of acetylsalicylic acid on fibrin clot properties depending on the factor XIII Val34Leu polymorphism has not been defined yet.

Aims

To elucidate the effect of acetylsalicylic acid on the factor XIIIa activation, fibrin network formation, clot permeability, and susceptibility to fibrinolysis depending on the factor XIII Val34Leu polymorphism.

Patients

Nine healthy volunteers (4 females and 5 males) aged 30–45 years: 3 homozygous for the Val34, 3 with the Val34Leu genotype, and 3 homozygous for the Leu34 allele of factor XIIIa selected at random out of 41 healthy individuals. All the subjects were not current smokers, abstained from any drugs for more than 4 weeks, and had the results of basic laboratory tests within the normal range.

Intervention

Single 300 mg dose of acetylsalicylic acid

Methods

All measurements were taken at baseline and after 4 hours following acetylsalicylic acid administration. The tissue factor-dependent coagulation model according to Rand et al. was chosen (tissue factor final concentration 2 pmol/l). Activation of prothrombin and factor XIIIa, as well as the γ dimer concentration in the clots formed in plasma or from purified fibrinogen after addition of platelet-derived factor XIIIa were assessed by Western blot. Fibrin gel permeability was evaluated according to the modified method by Blombäck and Okada, and fiber mass/length ratio was calculated. Fibrin gel assembly and resistance to fibrinolysis after addition of 1 μ g/ml of the tissue plasminogen activator were estimated from the gel turbidity at 405 nm.

Results

Factor XIIIa activation was slower after acetylsalicylic acid ingestion (2 *vs* 6 minutes; $p = 0.008$) and the effect was larger in Leu34 carriers, compared to individuals homozygous for the Val34 allele. Prothrombin activation and fibrinogen conversion were characteristic for the chosen model and did not depend on factor XIIIa polymorphism.

Concentration of the γ dimers in solubilized clots formed in plasma was lower after ASA administration (7.04 *vs* 2.39 mg/l; $p = 0.05$). This change was greater in Leu34Leu, than in Val34Leu or Val34Val individuals (85% *vs* 64% *vs* 25% respectively; $p = 0.06$). Concentration of the γ dimers in solubilized clots formed from purified fibrinogen and platelet-derived factor XIIIa in Val34Val and Leu34Leu individuals was lower after acetylsalicylic acid administration and the effect was larger in Leu34Leu compared to Val34Val clot. Fibrin gel became more permeable after acetylsalicylic acid ingestion ($p = 0.0002$). This change was more pronounced in individuals homozygous for Leu34 allele, compared to Val34Leu or Val34Val homozygous individuals (51% *vs* 34% *vs* 21%, respectively; $p = 0.001$). Fiber diameter and mass/length ratio calculated from permeability were also increased following acetylsalicylic acid administration, and the relation to the Val34Leu polymorphism was analogous to that observed with the gel permeation. Fibrin gel turbidity increased after acetylsalicylic acid administration ($p = 0.008$) and the change was greater in Leu34Leu individuals, than in Val34Leu or Val34Val subjects (0.32 OD *vs* 0.24 OD *vs* 0.14 OD). Maximum fibrinolysis rate and 50% lysis time increased after acetylsalicylic acid administration ($p = 0.008$). Fibrinolysis proceeded faster in Leu34Leu subjects, compared to Val34Leu or Val34Val individuals, and 50% lysis time was shortened by 4.16 *vs* 2.74 *vs* 2.36 minutes, respectively.

Conclusions

In healthy individuals a single dose of 300 mg of acetylsalicylic acid delayed the activation of the factor XIIIa and modified fibrin gel structure making it more permeable and prone to lysis, as assessed in the tissue factor-dependent model of blood coagulation. The observed effects were dependent on the factor XIIIa Val34Leu polymorphism and were stronger in the patients homozygous for the Leu34 allele. These data confirm that the presence of Leu34 allele has unfavorable effect on the fibrin network structure and suggests that acetylsalicylic acid administration noticeably reduces this detrimental effect with possible clinical implications.

Podziękowania

Dziękuję Pani dr hab. Anecie Undas za stanowczość i anielską cierpliwość, Panu prof. Andrzejowi Szczeklikowi za długoletnią życzliwość, prof. Romanowi Jaeschke za katońską nieugiętość, dr Piotrowi Gajewskiemu za bezgraniczną wyrozumiałość, a mojej żonie i córkom za ciepłe pobłażanie.

Jestem bardzo wdzięczny wszystkim Koleżankom i Kolegom, którzy zgodzili się wziąć udział w tym badaniu lub pomogli mi w jego realizacji.

Badanie sfinansowano częściowo dzięki grantowi promotorskiemu Komitetu Badań Naukowych nr 2P05A 017 27.

Piśmiennictwo

1. **Clark R.A.** Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:355-367.
2. **Simpson-Haidaris P.J., Rybarczyk B.** Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:406-425.
3. **de Maat M.P.** Effects of diet, drugs, and genes on plasma fibrinogen levels. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:509-521.
4. **Redman C.M., Xia H.** Fibrinogen biosynthesis. Assembly, intracellular degradation, and association with lipid synthesis and secretion. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:480-495.
5. **Louache F., Debili N., Cramer E., Breton-Gorius J., Vainchenker W.** Fibrinogen is not synthesized by human megakaryocytes. *Blood*, 1991;77:311-316.
6. **Hoepflich P.D., Jr., Doolittle R.F.** Dimeric half-molecules of human fibrinogen are joined through disulfide bonds in an antiparallel orientation. *Biochemistry*, 1983;22:2049-2055.
7. **Doolittle R.F., Watt K.W., Cottrell B.A., Strong D.D., Riley M.** The amino acid sequence of the alpha-chain of human fibrinogen. *Nature*, 1979;280:464-468.
8. **Watt K.W., Takagi T., Doolittle R.F.** Amino acid sequence of the beta chain of human fibrinogen. *Biochemistry*, 1979;18:68-76.
9. **Fornace A.J., Jr., Cummings D.E., Comeau C.M., Kant J.A., Crabtree G.R.** Structure of the human gamma-fibrinogen gene. Alternate mRNA splicing near the 3' end of the gene produces gamma A and gamma B forms of gamma-fibrinogen. *J Biol Chem*, 1984;259:12826-12830.
10. **Wolfenstein-Todel C., Mosesson M.W.** Carboxy-terminal amino acid sequence of a human fibrinogen gamma-chain variant (gamma'). *Biochemistry*, 1981;20:6146-6149.
11. **Meh D.A., Siebenlist K.R., Mosesson M.W.** Identification and characterization of the thrombin binding sites on fibrin. *J Biol Chem*, 1996;271:23121-23125.
12. **Griening G.** Contribution of the alpha EC domain to the structure and function of fibrinogen-420. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:44-64.
13. **Bernocco S., Ferri F., Profumo A., Cuniberti C., Rocco M.** Polymerization of rod-like macromolecular monomers studied by stopped-flow, multiangle light scattering: set-up, data processing, and application to fibrin formation. *Biophys J*, 2000;79:561-583.
14. **Doolittle R.F., Yang Z., Mochalkin I.** Crystal structure studies on fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:31-43.
15. **Mosesson M.W., Siebenlist K.R., Meh D.A.** The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:11-30.
16. **Telford J.N., Nagy J.A., Hatcher P.A., Scheraga H.A.** Location of peptide fragments in the fibrinogen molecule by immunoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980;77:2372-2376.
17. **Mann K.G., Brummel K., Butenas S.** What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost*, 2003;1:1504-1514.
18. **Hantgan R.R., Francis C.W., Marder V.J.** Fibrinogen Structure and Physiology. In: Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J., Clowes A.W., George J.N., eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Fourth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000:203-232.
19. **Blombäck B., Hessel B., Hogg D., Therkildsen L.** A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature*, 1978;275:501-505.
20. **Everse S.J., Spraggon G., Veerapandian L., Riley M., Doolittle R.F.** Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry*, 1998;37:8637-8642.
21. **Brummel K.E., Butenas S., Mann K.G.** An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. *J Biol Chem*, 1999;274:22862-22870.

-
22. **Scheraga H.A., Laskowski M., Jr.** The fibrinogen-fibrin conversion. *Advances in Protein Chemistry*, 1957;12:1-131.
 23. **Blombäck B.** Fibrinogen and fibrin--proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res*, 1996;83:1-75.
 24. **Yang Z., Mochalkin I., Doolittle R.F.** A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000;97:14156-14161.
 25. **Medved L., Tsurupa G., Yakovlev S.** Conformational changes upon conversion of fibrinogen into fibrin. The mechanisms of exposure of cryptic sites. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:185-204.
 26. **Williams R.C.** Morphology of fibrinogen monomers and of fibrin protofibrils. *Ann N Y Acad Sci*, 1983;408:180-193.
 27. **Mosesson M.W., DiOrio J.P., Siebenlist K.R., Wall J.S., Hainfeld J.F.** Evidence for a second type of fibril branch point in fibrin polymer networks, the trimolecular junction. *Blood*, 1993;82:1517-1521.
 28. **Ferry J.D.** The mechanism of polymerization of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1952;38:566-569.
 29. **Blombäck 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.
 30. **Weisel J.W.** Fibrin assembly. Lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides. *Biophys J*, 1986;50:1079-1093.
 31. **Weisel J.W., Stauffacher C.V., Bullitt E., Cohen C.** A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science*, 1985;230:1388-1391.
 32. **Weisel J.W., Nagaswami C., Makowski L.** Twisting of fibrin fibers limits their radial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987;84:8991-8995.
 33. **Grøn B., Fillion-Myklebust C., Bennick A., Nieuwenhuizen W., Matsueda G.R., Brosstad F.** Early cross-linked fibrin in human plasma contains alpha-polymers with intact fibrinopeptide A. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1992;3:731-736.
 34. **Müller M.F., Ris H., Ferry J.D.** Electron microscopy of fine fibrin clots and fine and coarse fibrin films. Observations of fibers in cross-section and in deformed states. *J Mol Biol*, 1984;174:369-384.
 35. **Summaria L., Hsieh B., Robbins K.C.** The specific mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. *J Biol Chem*, 1967;242:4279-4283.
 36. **Hoylaerts M., Rijken D.C., Lijnen H.R., Collen D.** Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem*, 1982;257:2912-2919.
 37. **Mihalyi E., Weinberg R.M., Towne D.W., Friedman M.E.** Proteolytic fragmentation of fibrinogen. I. Comparison of the fragmentation of human and bovine fibrinogen by trypsin or plasmin. *Biochemistry*, 1976;15:5372-5381.
 38. **Collet J.P., Park D., Lesty C., Soria J., Soria C., Montalescot G., Weisel J.W.** 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.
 39. **Gabriel D.A., Muga K., Boothroyd E.M.** The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J Biol Chem*, 1992;267:24259-24263.
 40. **Rijken D.C., Hoylaerts M., Collen D.** Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1982;257:2920-2925.
 41. **Anand S., Diamond S.L.** Computer simulation of systemic circulation and clot lysis dynamics during thrombolytic therapy that accounts for inner clot transport and reaction. *Circulation*, 1996;94:763-774.
 42. **Blinic A., Kennedy S.D., Bryant R.G., Marder V.J., Francis C.W.** Flow through clots determines the rate and pattern of fibrinolysis. *Thromb Haemost*, 1994;71:230-235.
 43. **Diamond S.L.** Engineering design of optimal strategies for blood clot dissolution. *Annu Rev Biomed Eng*, 1999;1:427-462.

-
44. **Diamond S.L., Anand S.** Inner clot diffusion and permeation during fibrinolysis. *Biophys J*, 1993;65:2622-2643.
 45. **Carr M.E., Jr., Alving B.M.** Effect of fibrin structure on plasmin-mediated dissolution of plasma clots. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1995;6:567-573.
 46. **Suenson E., Lutzen O., Thorsen S.** Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *Eur J Biochem*, 1984;140:513-522.
 47. **Wolberg A.S., Gabriel D.A., Hoffman M.** Analyzing fibrin clot structure using a microplate reader. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2002;13:533-539.
 48. **Collet J.P., Soria J., Mirshahi M., Hirsch M., Dagonnet F.B., 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.
 49. **Williams S., Fatah K., Ivert T., Blombäck M.** The effect of acetylsalicylic acid on fibrin gel lysis by tissue plasminogen activator. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1995;6:718-725.
 50. **Yonekawa O., Voskuilen M., Nieuwenhuizen W.** Localization in the fibrinogen gamma-chain of a new site that is involved in the acceleration of the tissue-type plasminogen activator-catalysed activation of plasminogen. *Biochem J*, 1992;283 (Pt 1):187-191.
 51. **Carrell N., Gabriel D.A., Blatt P.M., Carr M.E., McDonagh J.** Hereditary dysfibrinogenemia in a patient with thrombotic disease. *Blood*, 1983;62:439-447.
 52. **Mullin J.L., Norfolk S.E., Weisel J.W., Lord S.T.** Clot lysis of variant recombinant fibrinogens confirms that fiber diameter is a major determinant of lysis rate. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:331-334.
 53. **Veklich Y., Francis C.W., White J., Weisel J.W.** Structural studies of fibrinolysis by electron microscopy. *Blood*, 1998;92:4721-4729.
 54. **Collet J.P., Lesty C., Montalescot G., Weisel J.W.** Dynamic changes of fibrin architecture during fibrin formation and intrinsic fibrinolysis of fibrin-rich clots. *J Biol Chem*, 2003;278:21331-21335.
 55. **Blombäck 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.
 56. **Marchi R., Loyau S., Angles-Cano E., Weisel J.W.** Structure and properties of clots from fibrinogen Bicetre II (gamma 308 Asn-->Lys). Increased permeability due to larger pores, thicker fibers, and decreased rigidity. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:125-128.
 57. **Nair C.H., Azhar A., Dhall D.P.** Studies on fibrin network structure in human plasma. Part One: Methods for clinical application. *Thromb Res*, 1991;64:455-476.
 58. **Park I.H., Johnson C.S., Gabriel D.A.** Probe diffusion in polyacrylamide gels as observed by means of holographic relaxation methods: search for a universal equation. *Macromolecules*, 1990;23:1548-1553.
 59. **Fatah K., Hamsten A., Blombäck B., Blombäck 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.
 60. **Carr M.E., Hermans J.** Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules*, 1978;11:46-50.
 61. **Scrutton M.C., Ross-Murphy S.B., Bennett G.M., Stirling Y., Meade T.W.** Changes in clot deformability--a possible explanation for the epidemiological association between plasma fibrinogen concentration and myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1994;5:719-723.
 62. **Okada M., Blombäck B.** Factors influencing fibrin gel structure studied by flow measurement. *Ann N Y Acad Sci*, 1983;408:233-253.
 63. **Lim B.C., Ariëns R.A., Carter A.M., Weisel J.W., Grant P.J.** Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet*, 2003;361:1424-1431.

-
64. **Antovic A.** Determinations of the overall haemostasis potential and fibrin gel permeability. Method development and application in research and in clinical materials. Karolinska Institutet; 2004.
 65. **Woodhead J.L., Nagaswami C., Matsuda M., Arocha-Pinango C.L., Weisel J.W.** The ultrastructure of fibrinogen Caracas II molecules, fibers, and clots. *J Biol Chem*, 1996;271:4946-4953.
 66. **Standeven K.F., Grant P.J., Carter A.M., Scheiner T., Weisel J.W., Ariëns R.A.** Functional analysis of the fibrinogen Aalpha Thr312Ala polymorphism: effects on fibrin structure and function. *Circulation*, 2003;107:2326-2330.
 67. **Maghzal G.J., Brennan S.O., George P.M.** Fibrinogen B beta polymorphisms do not directly contribute to an altered in vitro clot structure in humans. *Thromb Haemost*, 2003;90:1021-1028.
 68. **Jörneskog G., Egberg N., Fagrell B., Fatah K., Hessel B., Johnsson H., Brismar K., Blombäck M.** Altered properties of the fibrin gel structure in patients with IDDM. *Diabetologia*, 1996;39:1519-1523.
 69. **Nair C.H., Azhar A., Wilson J.D., Dhall D.P.** Studies on fibrin network structure in human plasma. Part II--Clinical application: diabetes and antidiabetic drugs. *Thromb Res*, 1991;64:477-485.
 70. **Fatah K., Silveira A., Tornvall P., Karpe F., Blombäck 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.
 71. **Greilich P.E., Carr M.E., Zekert S.L., Dent R.M.** Quantitative assessment of platelet function and clot structure in patients with severe coronary artery disease. *Am J Med Sci*, 1994;307:15-20.
 72. **Mills J.D., Ariëns R.A., Mansfield M.W., Grant P.J.** Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation*, 2002;106:1938-1942.
 73. **He S., Blombäck M., Yoo G., Sinha R., Henschen-Edman A.H.** Modified clotting properties of fibrinogen in the presence of acetylsalicylic acid in a purified system. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:531-535.
 74. **Williams S., Fatah K., Hjemdahl P., Blombäck M.** Better increase in fibrin gel porosity by low dose than intermediate dose acetylsalicylic acid. *Eur Heart J*, 1998;19:1666-1672.
 75. **Fatah K., Beving H., Albage A., Ivert T., Blombäck M.** Acetylsalicylic acid may protect the patient by increasing fibrin gel porosity. Is withdrawing of treatment harmful to the patient? *Eur Heart J*, 1996;17:1362-1366.
 76. **Björnsson T.D., Schneider D.E., Berger H., Jr.** Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis. Fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989;250:154-161.
 77. **Standeven K.F., Ariëns R.A., Whitaker P., Ashcroft A.E., Weisel J.W., Grant P.J.** The effect of dimethylbiguanide on thrombin activity, FXIII activation, fibrin polymerization, and fibrin clot formation. *Diabetes*, 2002;51:189-197.
 78. **Jörneskog G., Hansson L.O., Wallen N.H., Yngen M., Blombäck M.** Increased plasma fibrin gel porosity in patients with Type I diabetes during continuous subcutaneous insulin infusion. *J Thromb Haemost*, 2003;1:1195-1201.
 79. **Lauricella A.M., Quintana I.L., Kordich L.C.** Effects of homocysteine thiol group on fibrin networks: another possible mechanism of harm. *Thromb Res*, 2002;107:75-79.
 80. **Collet J.P., Mishal Z., Lesty C., Mirshahi M., Peyne J., Baumelou A., Bensman A., Soria J., Soria C.** Abnormal fibrin clot architecture in nephrotic patients is related to hypofibrinolysis: influence of plasma biochemical modifications: a possible mechanism for the high thrombotic tendency? *Thromb Haemost*, 1999;82:1482-1489.
 81. **Galanakis D.K., Lane B.P., Simon S.R.** Albumin modulates lateral assembly of fibrin polymers: evidence of enhanced fine fibril formation and of unique synergism with fibrinogen. *Biochemistry*, 1987;26:2389-2400.
 82. **Nair C.H., Dhall D.P.** Studies on fibrin network structure: the effect of some plasma proteins. *Thromb Res*, 1991;61:315-325.

-
83. **Carr M.E., Jr., Dent R.M., Carr S.L.** Abnormal fibrin structure and inhibition of fibrinolysis in patients with multiple myeloma. *J Lab Clin Med*, 1996;128:83-88.
 84. **Okada M., Blombäck B., Chang M.D., Horowitz B.** Fibronectin and fibrin gel structure. *J Biol Chem*, 1985;260:1811-1820.
 85. **Carr M.E.** Fibrin formed in plasma is composed of fibers more massive than those formed from purified fibrinogen. *Thromb Haemost*, 1988;59:535-539.
 86. **Okada M., Blombäck B.** Calcium and fibrin gel structure. *Thromb Res*, 1983;29:269-280.
 87. **Fatah K., Hessel B.** Effect of zinc ions on fibrin network structure. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1998;9:629-635.
 88. **Carr M.E., Jr., Shen L.L., Hermans J.** Mass-length ratio of fibrin fibers from gel permeation and light scattering. *Biopolymers*, 1977;16:1-15.
 89. **Schwartz M.L., Pizzo S.V., Hill R.L., McKee P.A.** 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.
 90. **Takahashi N., Takahashi Y., Putnam F.W.** Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinolytic, transglutaminase) from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986;83:8019-8023.
 91. **Ashcroft A.E., Grant P.J., Ariëns R.A.** A study of human coagulation factor XIII A-subunit by electrospray ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000;14:1607-1611.
 92. **Siebenlist K.R., Meh D.A., Mosesson M.W.** Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing gamma chains. *Biochemistry*, 1996;35:10448-10453.
 93. **Lorand L.** Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:291-311.
 94. **Muszbek L., Yee V.C., Hevessy Z.** Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res*, 1999;94:271-305.
 95. **Yorifuji H., Anderson K., Lynch G.W., Van de Water L., McDonagh J.** B protein of factor XIII: differentiation between free B and complexed B. *Blood*, 1988;72:1645-1650.
 96. **Kroll J.** The subunit composition of factor XIII proteins in normal and factor XIII deficient plasma and serum analysed by line immunoelectrophoresis. *Clin Chim Acta*, 1989;179:279-284.
 97. **Board P.G., Webb G.C., McKee J., Ichinose A.** Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24---p25. *Cytogenet Cell Genet*, 1988;48:25-27.
 98. **Carrell N.A., Erickson H.P., McDonagh J.** Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits. *J Biol Chem*, 1989;264:551-556.
 99. **Muszbek L., Adany R., Kawai M., Boda Z., Łopaciuk S.** Monocytes of patients congenitally deficient in plasma factor XIII lack factor XIII subunit a antigen and transglutaminase activity. *Thromb Haemost*, 1988;59:231-235.
 100. **Weisberg L.J., Shiu D.T., Conkling P.R., Shuman M.A.** Identification of normal human peripheral blood monocytes and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII a-chain. *Blood*, 1987;70:579-582.
 101. **Nagy J.A., Kradin R.L., McDonagh J.** Biosynthesis of factor XIII A and B subunits. *Adv Exp Med Biol*, 1988;231:29-49.
 102. **Webb G.C., Coggan M., Ichinose A., Board P.G.** Localization of the coagulation factor XIII B subunit gene (F13B) to chromosome bands 1q31-32.1 and restriction fragment length polymorphism at the locus. *Hum Genet*, 1989;81:157-160.
 103. **Ichinose A., Hendrickson L.E., Fujikawa K., Davie E.W.** Amino acid sequence of the a subunit of human factor XIII. *Biochemistry*, 1986;25:6900-6906.
 104. **Lorand L., Gray A.J., Brown K., Credo R.B., Curtis C.G., Domanik R.A., Stenberg P.** Dissociation of the subunit structure of fibrin stabilizing factor during activation of the zymogen. *Biochem Biophys Res Commun*, 1974;56:914-922.
 105. **Curtis C.G., Brown K.L., Credo R.B., Domanik R.A., Gray A., Stenberg P., Lorand L.** Calcium-dependent unmasking of active center cysteine during activation of fibrin stabilizing factor. *Biochemistry*, 1974;13:3774-3780.

-
106. **Kiesselbach T.H., Wagner R.H.** Demonstration of factor XIII in human megakaryocytes by a fluorescent antibody technique. *Ann N Y Acad Sci*, 1972;202:318-328.
 107. **Henriksson P., Becker S., Lynch G., McDonagh J.** Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *J Clin Invest*, 1985;76:528-534.
 108. **Muszbek L., Adany R., Szegedi G., Polgar J., Kawai M.** Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res*, 1985;37:401-410.
 109. **Łopaciuk S., Lovette K.M., McDonagh J., Chuang H.Y.** Subcellular distribution of fibrinogen and factor XIII in human blood platelets. *Thromb Res*, 1976;8:453-465.
 110. **Grundmann U., Amann E., Zettlmeissl G., Kupper H.A.** Characterization of cDNA coding for human factor XIIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986;83:8024-8028.
 111. **Lewis S.D., Janus T.J., Lorand L., Shafer J.A.** Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates. *Biochemistry*, 1985;24:6772-6777.
 112. **Hornyak T.J., Shafer J.A.** Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry*, 1992;31:423-429.
 113. **Greenberg C.S., Miraglia C.C.** The effect of fibrin polymers on thrombin-catalyzed plasma factor XIIIa formation. *Blood*, 1985;66:466-469.
 114. **Radek J.T., Jeong J.M., Wilson J., Lorand L.** Association of the A subunits of recombinant placental factor XIII with the native carrier B subunits from human plasma. *Biochemistry*, 1993;32:3527-3534.
 115. **Greenberg C.S., Dobson J.V., Miraglia C.C.** Regulation of plasma factor XIII binding to fibrin in vitro. *Blood*, 1985;66:1028-1034.
 116. **Credo R.B., Curtis C.G., Lorand L.** Alpha-chain domain of fibrinogen controls generation of fibrinoligase (coagulation factor XIIIa). Calcium ion regulatory aspects. *Biochemistry*, 1981;20:3770-3778.
 117. **Ariëns R.A., Lai T.S., Weisel J.W., Greenberg C.S., Grant P.J.** Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood*, 2002;100:743-754.
 118. **Chung S.I., Folk J.E.** Kinetic studies with transglutaminases. The human blood enzymes (activated coagulation factor 13 and the guinea pig hair follicle enzyme. *J Biol Chem*, 1972;247:2798-2807.
 119. **Lee K.N., Lee C.S., Tae W.C., Jackson K.W., Christiansen V.J., McKee P.A.** Crosslinking of alpha 2-antiplasmin to fibrin. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:335-339.
 120. **Procyk R., Adamson L., Block M., Blombäck B.** Factor XIII catalyzed formation of fibrinogen-fibronectin oligomers--a thiol enhanced process. *Thromb Res*, 1985;40:833-852.
 121. **Mosher D.F., Schad P.E., Vann J.M.** Cross-linking of collagen and fibronectin by factor XIIIa. Localization of participating glutaminy residues to a tryptic fragment of fibronectin. *J Biol Chem*, 1980;255:1181-1188.
 122. **Weisel J.W., Francis C.W., Nagaswami C., Marder V.J.** Determination of the topology of factor XIIIa-induced fibrin gamma-chain cross-links by electron microscopy of ligated fragments. *J Biol Chem*, 1993;268:26618-26624.
 123. **Spraggon G., Everse S.J., Doolittle R.F.** Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature*, 1997;389:455-462.
 124. **Mosesson M.W., Siebenlist K.R., Amrani D.L., DiOrio J.P.** Identification of covalently linked trimeric and tetrameric D domains in crosslinked fibrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989;86:1113-1117.
 125. **Siebenlist K.R., Meh D.A., Mosesson M.W.** Protransglutaminase (factor XIII) mediated crosslinking of fibrinogen and fibrin. *Thromb Haemost*, 2001;86:1221-1228.
 126. **Cottrell B.A., Strong D.D., Watt K.W., Doolittle R.F.** Amino acid sequence studies on the alpha chain of human fibrinogen. Exact location of cross-linking acceptor sites. *Biochemistry*, 1979;18:5405-5410.
 127. **Fretto L.J., Ferguson E.W., Steinman H.M., McKee P.A.** Localization of the alpha-chain cross-link acceptor sites of human fibrin. *J Biol Chem*, 1978;253:2184-2195.

-
128. **Sobel J.H., Gawinowicz M.A.** Identification of the alpha chain lysine donor sites involved in factor XIIIa fibrin cross-linking. *J Biol Chem*, 1996;271:19288-19297.
 129. **McDonagh R.P., Jr., McDonagh J., Duckert F.** The influence of fibrin crosslinking on the kinetics of urokinase-induced clot lysis. *Br J Haematol*, 1971;21:323-332.
 130. **Kanaide H., Shainoff J.R.** Cross-linking of fibrinogen and fibrin by fibrin-stablizing factor (factor XIIIa). *J Lab Clin Med*, 1975;85:574-597.
 131. **Blombäck B., Procyk R., Adamson L., Hessel B.** FXIII induced gelation of human fibrinogen--an alternative thiol enhanced, thrombin independent pathway. *Thromb Res*, 1985;37:613-627.
 132. **Mimuro J., Kimura S., Aoki N.** Release of alpha 2-plasmin inhibitor from plasma fibrin clots by activated coagulation factor XIII. Its effect on fibrinolysis. *J Clin Invest*, 1986;77:1006-1013.
 133. **Procyk R., Blombäck B.** Factor XIII-induced crosslinking in solutions of fibrinogen and fibronectin. *Biochim Biophys Acta*, 1988;967:304-313.
 134. **Carr M.E., Jr., Gabriel D.A., McDonagh J.** Influence of factor XIII and fibronectin on fiber size and density in thrombin-induced fibrin gels. *J Lab Clin Med*, 1987;110:747-752.
 135. **Barry E.L., Mosher D.F.** Factor XIIIa-mediated cross-linking of fibronectin in fibroblast cell layers. Cross-linking of cellular and plasma fibronectin and of amino-terminal fibronectin fragments. *J Biol Chem*, 1989;264:4179-4185.
 136. **Valnickova Z., Enghild J.J.** Human procarboxypeptidase U, or thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases. Evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibrin. *J Biol Chem*, 1998;273:27220-27224.
 137. **Ritchie H., Lawrie L.C., Mosesson M.W., Booth N.A.** Characterization of crosslinking sites in fibrinogen for plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2). *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:215-218.
 138. **Attié-Castro F.A., Zago M.A., Lavinha J., Elion J., Rodriguez-Delfin L., Guerreiro J.F., Franco R.F.** Ethnic heterogeneity of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Thromb Haemost*, 2000;84:601-603.
 139. **Kohler H.P., Stickland M.H., Ossei-Gerning N., Carter A., Mikkola H., Grant P.J.** Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 1998;79:8-13.
 140. **McCormack L.J., Kain K., Catto A.J., Kohler H.P., Stickland M.H., Grant P.J.** Prevalence of FXIII V34L in populations with different cardiovascular risk. *Thromb Haemost*, 1998;80:523-524.
 141. **Anwar R., Gallivan L., Edmonds S.D., Markham A.F.** Genotype/phenotype correlations for coagulation factor XIII: specific normal polymorphisms are associated with high or low factor XIII specific activity. *Blood*, 1999;93:897-905.
 142. **Reiner A.P., Schwartz S.M., Frank M.B., Longstreth W.T., Jr., Hindorff L.A., Teramura G., Rosendaal F.R., Gaur L.K., Psaty B.M., Siscovick D.S.** Polymorphisms of coagulation factor XIII subunit A and risk of nonfatal hemorrhagic stroke in young white women. *Stroke*, 2001;32:2580-2586.
 143. **Suzuki K., Iwata M., Ito S., Matsui K., Uchida A., Mizoi Y.** Molecular basis for subtypic differences of the "a" subunit of coagulation factor XIII with description of the genesis of the subtypes. *Hum Genet*, 1994;94:129-135.
 144. **Wartiovaara U., Mikkola H., Szôke G., Haramura G., Kárpáti L., Balogh I., Lassila R., Muszbek L., Palotie A.** Effect of Val34Leu polymorphism on the activation of the coagulation factor XIII-A. *Thromb Haemost*, 2000;84:595-600.
 145. **Ariëns R.A., Philippou H., Nagaswami C., Weisel J.W., Lane D.A., Grant P.J.** The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood*, 2000;96:988-995.
 146. **Balogh I., Szôke G., Kárpáti L., Wartiovaara U., Katona E., Komáromi 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.

147. **Trumbo T.A., Maurer M.C.** Examining thrombin hydrolysis of the factor XIII activation peptide segment leads to a proposal for explaining the cardioprotective effects observed with the factor XIII V34L mutation. *J Biol Chem*, 2000;275:20627-20631.
148. **Muszbek L.** Deficiency causing mutations and common polymorphisms in the factor XIII-A gene. *Thromb Haemost*, 2000;84:524-527.
149. **Sadasivan C., Yee V.C.** Interaction of the factor XIII activation peptide with alpha -thrombin. Crystal structure of its enzyme-substrate analog complex. *J Biol Chem*, 2000;275:36942-36948.
150. **Trumbo T.A., Maurer M.C.** Thrombin hydrolysis of V29F and V34L mutants of factor XIII (28-41) reveals roles of the P(9) and P(4) positions in factor XIII activation. *Biochemistry*, 2002;41:2859-2868.
151. **Weisel J.W., Veklich Y., Gorkun O.** The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots. *J Mol Biol*, 1993;232:285-297.
152. **Aleksic N., Ahn C., Wang Y.W., Juneja H., Folsom A.R., Boerwinkle E., Wu K.K.** Factor XIII Val34Leu polymorphism does not predict risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002;22:348-352.
153. **Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology Italian Study Group.** No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation*, 2003;107:1117-1122.
154. **Alhenc-Gelas M., Reny J.L., Aubry M.L., Aiach M., Emmerich J.** The FXIII Val 34 Leu mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost*, 2000;84:1117-1118.
155. **Butt C., Zheng H., Randell E., Robb D., Parfrey P., Xie Y.G.** Combined carrier status of prothrombin 20210A and factor XIII-A Leu34 alleles as a strong risk factor for myocardial infarction: evidence of a gene-gene interaction. *Blood*, 2003;101:3037-3041.
156. **Canavy I., Henry M., Morange P.E., Tired L., Poirier O., Ebagosti A., Bory M., Juhan-Vague I.** Genetic polymorphisms and coronary artery disease in the south of France. *Thromb Haemost*, 2000;83:212-216.
157. **Corral J., González-Conejero R., Iniesta J.A., Rivera J., Martínez C., Vicente V.** The FXIII Val34Leu polymorphism in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica*, 2000;85:293-297.
158. **Franco R.F., Pazin-Filho A., Tavella M.H., Simoes M.V., Marin-Neto J.A., Zago M.A.** Factor XIII val34leu and the risk of myocardial infarction. *Haematologica*, 2000;85:67-71.
159. **Gemmati D., Serino M.L., Ongaro A., Tognazzo S., Moratelli S., Resca R., Moretti M., Scapoli G.L.** A common mutation in the gene for coagulation factor XIII-A (VAL34Leu): a risk factor for primary intracerebral hemorrhage is protective against atherothrombotic diseases. *Am J Hematol*, 2001;67:183-188.
160. **Kakko S., Elo T., Tapanainen J.M., Huikuri H.V., Savolainen M.J.** Polymorphisms of genes affecting thrombosis and risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*, 2002;32:643-648.
161. **Reiner A.P., Frank M.B., Schwartz S.M., Linenberger M.L., Longstreth W.T., Teramura G., Rosendaal F.R., Psaty B.M., Siscovick D.S.** Coagulation factor XIII polymorphisms and the risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women. *Br J Haematol*, 2002;116:376-382.
162. **Reiner A.P., Heckbert S.R., Vos H.L., Ariëns R.A., Lemaitre R.N., Smith N.L., Lumley T., Rea T.D., Hindorff L.A., Schellenbaum G.D., Rosendaal F.R., Siscovick D.S., Psaty B.M.** Genetic variants of coagulation factor XIII, postmenopausal estrogen therapy, and risk of nonfatal myocardial infarction. *Blood*, 2003;102:25-30.

-
163. **Roldán V., Corral J., Marín F., Rivera J., Pineda J., González-Conejero R., Sogorb F., Vicente V.** Role of factor XIII Val34Leu polymorphism in patients <45 years of age with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2003;91:1242-1245.
 164. **Warner D., Mansfield M.W., Grant P.J.** Coagulation factor XIII and cardiovascular disease in UK Asian patients undergoing coronary angiography. *Thromb Haemost*, 2001;85:408-411.
 165. **Wartiovaara U., Perola M., Mikkola H., Totterman K., Savolainen V., Penttilä A., Grant P.J., Tikkanen M.J., Vartiainen E., Karhunen P.J., Peltonen L., Palotie A.** Association of FXIII Val34Leu with decreased risk of myocardial infarction in Finnish males. *Atherosclerosis*, 1999;142:295-300.
 166. **Catto A.J., Kohler H.P., Coore J., Mansfield M.W., Stickland M.H., Grant P.J.** Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood*, 1999;93:906-908.
 167. **Franco R.F., Reitsma P.H., Lourenço D., Maffei F.H., Morelli V., Tavella M.H., Araújo A.G., Piccinato C.E., Zago M.A.** Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost*, 1999;81:676-679.
 168. **Margaglione M., Bossone A., Brancaccio V., Ciampa A., Di Minno G.** Factor XIII Val34Leu polymorphism and risk of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*, 2000;84:1118-1119.
 169. **Rosendaal F.R., Grant P.J., Ariëns R.A.S., Poort S.R., Bertina R.M.** Factor XIII Val34Leu, factor XIII antigen and activity levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost*, 1999;82:508-509 (Suppl., abstract 1599).
 170. **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.
 171. **Weger M., Renner W., Stanger O., Schmut O., Deutschmann H., Wascher T.C., Haas A.** Role of factor XIII Val34Leu polymorphism in retinal artery occlusion. *Stroke*, 2001;32:2759-2761.
 172. **Catto A.J., Kohler H.P., Bannan S., Stickland M., Carter A., Grant P.J.** Factor XIII Val 34 Leu: a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 1998;29:813-816.
 173. **Corral J., Iniesta J.A., González-Conejero R., Villalón M., Vicente V.** Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. *Blood*, 2001;97:2979-2982.
 174. **Cho K.H., Kim B.C., Kim M.K., Shin B.A.** No association of factor XIII Val34Leu polymorphism with primary intracerebral hemorrhage and healthy controls in Korean population. *J Korean Med Sci*, 2002;17:249-253.
 175. **Cushman M., Kuller L.H., Prentice R., Rodabough R.J., Psaty B.M., Stafford R.S., Sidney S., Rosendaal F.R.** Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA*, 2004;292:1573-1580.
 176. **Undas A., Sydor W.J., Brummel K., Musiał J., Mann K.G., Szczeklik A.** Aspirin alters the cardioprotective effects of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Circulation*, 2003;107:17-20.
 177. **Roth G.J., Stanford N., Majerus P.W.** Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975;72:3073-3076.
 178. **Burch J.W., Stanford N., Majerus P.W.** Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. *J Clin Invest*, 1978;61:314-319.
 179. **Majerus P.W.** Arachidonate metabolism in vascular disorders. *J Clin Invest*, 1983;72:1521-1525.
 180. **Meade E.A., Smith W.L., DeWitt D.L.** Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, 1993;268:6610-6614.
 181. **Loll P.J., Picot D., Garavito R.M.** The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol*, 1995;2:637-643.

-
182. **Schrör K.** Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost*, 1997;23:349-356.
 183. **Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., Simmons D.L.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99:13926-13931.
 184. **Moncada S., Vane J.R.** Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev*, 1978;30:293-331.
 185. **McAdam B.F., Catella-Lawson F., Mardini I.A., Kapoor S., Lawson J.A., FitzGerald G.A.** Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999;96:272-277.
 186. **Clarke R.J., Mayo G., Price P., FitzGerald G.A.** Suppression of thromboxane A₂ but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N Engl J Med*, 1991;325:1137-1141.
 187. **Jaffe E.A., Weksler B.B.** Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin. *J Clin Invest*, 1979;63:532-535.
 188. **Rowland M., Riegelman S., Harris P.A., Sholkoff S.D.** Absorption kinetics of aspirin in man following oral administration of an aqueous solution. *J Pharm Sci*, 1972;61:379-385.
 189. **Smith J.B., Willis A.L.** Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol*, 1971;231:235-237.
 190. **Pedersen A.K., FitzGerald G.A.** Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med*, 1984;311:1206-1211.
 191. **Aarons L., Hopkins K., Rowland M., Brossel S., Thiercelin J.F.** Route of administration and sex differences in the pharmacokinetics of aspirin, administered as its lysine salt. *Pharm Res*, 1989;6:660-666.
 192. **van Pampus E.C., Huijgens P.C., Zevenbergen A., Twaalfhoven H., van Kamp G.J., Langenhuijsen M.M.** Influence of aspirin on human megakaryocyte prostaglandin synthesis. *Eur J Haematol*, 1993;50:264-268.
 193. **Demers L.M., Budin R.E., Shaikh B.S.** The effects of aspirin on megakaryocyte prostaglandin production. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1980;163:24-29.
 194. **Patrignani P., Filabozzi P., Patrono C.** Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest*, 1982;69:1366-1372.
 195. **Cerskus A.L., Ali M., Davies B.J., McDonald J.W.** Possible significance of small numbers of functional platelets in a population of aspirin-treated platelets in vitro and in vivo. *Thromb Res*, 1980;18:389-397.
 196. **Loew D., Vinazzer H.** Dose-dependent influence of acetylsalicylic acid on platelet functions and plasmatic coagulation factors. *Haemostasis*, 1976;5:239-249.
 197. **Kessels H., Beguin S., Andree H., Hemker H.C.** Measurement of thrombin generation in whole blood--the effect of heparin and aspirin. *Thromb Haemost*, 1994;72:78-83.
 198. **Szczeklik A., Krzanowski M., Góra P., Radwan J.** Antiplatelet drugs and generation of thrombin in clotting blood. *Blood*, 1992;80:2006-2011.
 199. **Szczeklik A., Musiał J., Undas A., Swadźba J., Góra P.F., Piwowarska W., Duplaga M.** Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996;16:948-954.
 200. **Undas A., Undas R., Musiał J., Szczeklik A.** A low dose of aspirin (75 mg/day) lowers thrombin generation to a similar extent as a high dose of aspirin (300 mg/day). *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2000;11:231-234.
 201. **Musiał J., Undas A., Undas R., Brożek J., Szczeklik A.** Treatment with simvastatin and low-dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline-high cholesterol levels. *Thromb Haemost*, 2001;85:221-225.

-
202. **López-Farré A., Caramelo C., Esteban A., Alberola M.L., Millas I., Monton M., Casado S.** Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation*, 1995;91:2080-2088.
 203. **Santos M.T., Valles J., Aznar J., Marcus A.J., Broekman M.J., Safier L.B.** Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. Reduction by aspirin. *Circulation*, 1997;95:63-68.
 204. **Valles J., Santos M.T., Aznar J., Osa A., Lago A., Cosin J., Sanchez E., Broekman M.J., Marcus A.J.** Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation*, 1998;97:350-355.
 205. **Podhaisky H.P., Abate A., Polte T., Oberle S., Schröder H.** Aspirin protects endothelial cells from oxidative stress--possible synergism with vitamin E. *FEBS Lett*, 1997;417:349-351.
 206. **Husain S., Andrews N.P., Mulcahy D., Panza J.A., Quyyumi A.A.** Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 1998;97:716-720.
 207. **He S., Cao H., Antovic A., Blombäck M.** Modifications of flow measurement to determine fibrin gel permeability and the preliminary use in research and clinical materials. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2005;16:61-67.
 208. **Pinckard R.N., Hawkins D., Farr R.S.** In vitro acetylation of plasma proteins, enzymes and DNA by aspirin. *Nature*, 1968;219:68-69.
 209. **Henschen-Edman A.H.** Fibrinogen non-inherited heterogeneity and its relationship to function in health and disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2001;936:580-593.
 210. **Villanueva G.B., Allen N.** Acetylation of antithrombin III by aspirin. *Semin Thromb Hemost*, 1986;12:213-215.
 211. **Hawkins D., Pinckard R.N., Farr R.S.** Acetylation of human serum albumin by acetylsalicylic acid. *Science*, 1968;160:780-781.
 212. **Hawkins D., Pinckard R.N., Crawford I.P., Farr R.S.** Structural changes in human serum albumin induced by ingestion of acetylsalicylic acid. *J Clin Invest*, 1969;48:536-542.
 213. **Watała C., Gwoździński K.** Effect of aspirin on conformation and dynamics of membrane proteins in platelets and erythrocytes. *Biochem Pharmacol*, 1993;45:1343-1349.
 214. **Winocour P.D., Watała C., Perry D.W., Kinlough-Rathbone R.L.** Decreased platelet membrane fluidity due to glycation or acetylation of membrane proteins. *Thromb Haemost*, 1992;68:577-582.
 215. **Hasan M., Jackson S.K., Sinclair A.J.** Aspirin-induced conformational changes in platelet membrane in subjects with stroke. *Gerontology*, 1995;41:212-219.
 216. **Hayden M., Pignone M., Phillips C., Mulrow C.** Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 2002;136:161-172.
 217. **Ridker P.M., Cook N.R., Lee I.M., Gordon D., Gaziano J.M., Manson J.E., Hennekens C.H., Buring J.E.** A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, 2005;352:1293-1304.
 218. **Antithrombotic Trialists' Collaboration.** Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*, 2002;324:71-86.
 219. **Harrington R.A., Becker R.C., Ezekowitz M., Meade T.W., O'Connor C.M., Vorchheimer D.A., Guyatt G.H.** Antithrombotic therapy for coronary artery disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 2004;126:513S-548S.
 220. **ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group.** Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet*, 1988;2:349-360.
 221. **Cairns J.A., Gent M., Singer J., Finnie K.J., Froggatt G.M., Holder D.A., Jablonsky G., Kostuk W.J., Melendez L.J., Myers M.G., et al.** Aspirin,

- sulfinpyrazone, or both in unstable angina. Results of a Canadian multicenter trial. *N Engl J Med*, 1985;313:1369-1375.
222. **Menon V., Harrington R.A., Hochman J.S., Cannon C.P., Goodman S.D., Wilcox R.G., Schünemann H.J., Ohman E.M.** Thrombolysis and adjunctive therapy in acute myocardial infarction: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 2004;126:549S-575S.
223. **Antman E.M., Anbe D.T., Armstrong P.W., Bates E.R., Green L.A., Hand M., Hochman J.S., Krumholz H.M., Kushner F.G., Lamas G.A., Mullany C.J., Ornato J.P., Pearle D.L., Sloan M.A., Smith S.C., Jr., Alpert J.S., Anderson J.L., Faxon D.P., Fuster V., Gibbons R.J., Gregoratos G., Halperin J.L., Hiratzka L.F., Hunt S.A., Jacobs A.K.** ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction--executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction). *Circulation*, 2004;110:588-636.
224. **International Stroke Trial Collaborative Group.** The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet*, 1997;349:1569-1581.
225. **CAST (Chinese Acute Stroke Trial) Collaborative Group.** CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20,000 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet*, 1997;349:1641-1649.
226. **Albers G.W., Amarenco P., Easton J.D., Sacco R.L., Teal P.** Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 2004;126:483S-512S.
227. **Pearson T.A., Blair S.N., Daniels S.R., Eckel R.H., Fair J.M., Fortmann S.P., Franklin B.A., Goldstein L.B., Greenland P., Grundy S.M., Hong Y., Miller N.H., Lauer R.M., Ockene I.S., Sacco R.L., Sallis J.F., Jr., Smith S.C., Jr., Stone N.J., Taubert K.A.** AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerotic Vascular Diseases. American Heart Association Science Advisory and Coordinating Committee. *Circulation*, 2002;106:388-391.
228. **Colwell J.A.** Aspirin therapy in diabetes. *Diabetes Care*, 2003;26 Suppl 1:S87-88.
229. **Patrono C.** Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost*, 2003;1:1710-1713.
230. **Rocca B., Secchiero P., Ciabattone G., Ranelletti F.O., Catani L., Guidotti L., Melloni E., Maggiano N., Zauli G., Patrono C.** Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99:7634-7639.
231. **Cipollone F., Ciabattone G., Patrignani P., Pasquale M., Di Gregorio D., Bucciarelli T., Davi G., Cuccurullo F., Patrono C.** Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation*, 2000;102:1007-1013.
232. **Catella-Lawson F., Reilly M.P., Kapoor S.C., Cucchiara A.J., DeMarco S., Tournier B., Vyas S.N., FitzGerald G.A.** Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med*, 2001;345:1809-1817.
233. **MacDonald T.M., Wei L.** Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin. *Lancet*, 2003;361:573-574.
234. **Undas A., Brummel K., Musiał J., Mann K.G., Szczeklik A.** P1A² polymorphism of β_3 integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury. *Circulation*, 2001;104:2666-2672.
235. **Chen W.H., Lee P.Y., Ng W., Tse H.F., Lau C.P.** Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol*, 2004;43:1122-1126.
236. **Eikelboom J.W., Hirsh J., Weitz J.I., Johnston M., Yi Q., Yusuf S.** Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or

- cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation*, 2002;105:1650-1655.
237. **Gum P.A., Kottke-Marchant K., Welsh P.A., White J., Topol E.J.** A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 2003;41:961-965.
238. **Hennekens C.H., Schrör K., Weisman S., FitzGerald G.A.** Terms and conditions: semantic complexity and aspirin resistance. *Circulation*, 2004;110:1706-1708.
239. **Sanderson S., Emery J., Baglin T., Kinmonth A.L.** Narrative review: aspirin resistance and its clinical implications. *Ann Intern Med*, 2005;142:370-380.
240. **Rand M.D., Lock J.B., van't Veer C., Gaffney D.P., Mann K.G.** Blood clotting in minimally altered whole blood. *Blood*, 1996;88:3432-3445.
241. **Brummel K.E., Paradis S.G., Butenas S., Mann K.G.** Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, 2002;100:148-152.
242. **Cawthorn K.M., van 't Veer C., Lock J.B., DiLorenzo M.E., Branda R.F., Mann K.G.** Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C. *Blood*, 1998;91:4581-4592.
243. **Mann K.G.** Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost*, 1999;82:165-174.
244. **Mann K.G., Butenas S., Brummel K.** The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003;23:17-25.
245. **Hockin M.F., Jones K.C., Everse S.J., Mann K.G.** A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J Biol Chem*, 2002;277:18322-18333.
246. **Mann K.G.** Thrombin formation. *Chest*, 2003;124:4S-10S.
247. **Szczeklik A., Musiał J., Undas A., Gajewski P., Góra P., Swadźba J., Jankowski M.** Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*, 1999;33:1286-1293.
248. **Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970;227:680-685.
249. **Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979;76:4350-4354.
250. **McDuffie F.C., Giffin C., Niedringhaus R., Mann K.G., Owen C.A., Jr., Bowie E.J., Peterson J., Clark G., Hunder G.G.** Prothrombin, thrombin and prothrombin fragments in plasma of normal individuals and of patients with laboratory evidence of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res*, 1979;16:759-773.
251. **Tamaki T., Aoki N.** Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Biochim Biophys Acta*, 1981;661:280-286.
252. **Chung S.I., Lewis M.S., Folk J.E.** 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.
253. **Blombäck B., Okada M.** Fibrin gel structure and clotting time. *Thromb Res*, 1982;25:51-70.
254. **Shah G.A., Nair C.H., Dhall D.P.** Comparison of fibrin networks in plasma and fibrinogen solution. *Thromb Res*, 1987;45:257-264.
255. **Darcy H.** *Les Fontaines Publiques de la Ville de Dijon*. Paris; 1856. (Dalmont V., ed. Libraire des corps imperiaux des ports et chaussees et des mines).
256. **White J.A., Deen W.M.** Agarose-dextran gels as synthetic analogs of glomerular basement membrane: water permeability. *Biophys J*, 2002;82:2081-2089.
257. **Greenhalgh E.S., Dunn M.W.** (National Textile Center. University Research Consortium). Modeling blood flow through vascular grafts. 1999.
258. **Carman P.C.** Fluid flow through granular beds. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers*, 1937;15:150-166.
259. **Carman P.C.** Some physical aspects of water flow in porous media. *Discussions of the Faraday Society*, 1948;3:72-77.
260. **Adams K.L., Miller B., Rebenfeld L.** Forced in-plane flow of an epoxy resin in fibrous networks. *Polymer Engineering and Science*, 1986;26:1434-1441.

-
261. **Lam R.C., Kardos J.L.** The permeability and compressibility of aligned and crossplied carbon fiber beds during processing of composites. *Polymer Engineering and Science*, 1991;31:1064.
 262. **Emersleben O.** Das Darcysche Filtergesetz. *Physikalische Zeitschrift*, 1925;26:601-610.
 263. **Sullivan R.R.** Further study of the flow of air through porous media. *Journal of Applied Physics*, 1941;12:503-508.
 264. **Signer R., Egli H.** Sedimentation von Makromolekülen und Durchströmung von Gelen. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 1949;69:45-58.
 265. **Wagh D.F.** Proteins and Their Interactions. *Reviews of Modern Physics*, 1959;31:84-93.
 266. **Larsson U., Rigler R., Blombäck B., Mortensen K., Bauer R.** Structure, dynamics and function of biomolecules. Vol. 1. Heidelberg: Springer Verlag; 1987:152-158.
 267. **Marguerie G., Stuhmann H.B.** A neutron small-angle scattering study of bovine fibrinogen. *Journal of Molecular Biology*, 1976;102:143-156.
 268. **Ferry J.D., Morrison P.R.** Preparation and properties of serum and plasma proteins. VIII. The conversion of human fibrinogen to fibrin under various conditions. *J Am Chem Soc*, 1947:388-400.
 269. **Weisel J.W., Nagaswami C.** Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J*, 1992;63:111-128.
 270. **Carr M.E., Jr., Krishnamurti C., Alving B.M.** Effect of plasminogen activator inhibitor-1 on tissue-type plasminogen activator-induced fibrinolysis. *Thromb Haemost*, 1992;67:106-110.
 271. **Bajzár L., Fredenburgh J.C., Nesheim M.** The activated protein C-mediated enhancement of tissue-type plasminogen activator-induced fibrinolysis in a cell-free system. *J Biol Chem*, 1990;265:16948-16954.
 272. **Motulsky H.J., Christopoulos A.** Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. San Diego, CA: GraphPad Software Inc., www.graphpad.com; 2003.
 273. **Butenas S., Bouchard B.A., Brummel-Ziedins K.E., Parhami-Seren B., Mann K.G.** Tissue factor activity in whole blood. *Blood*, 2005;105:2764-2770.
 274. **Fiore L.D., Brophy M.T., Lopez A., Janson P., Deykin D.** The bleeding time response to aspirin. Identifying the hyperresponder. *Am J Clin Pathol*, 1990;94:292-296.
 275. **Szczeklik A., Undas A., Sanak M., Frołow M., Węgrzyn W.** Relationship between bleeding time, aspirin and the PLA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa. *Br J Haematol*, 2000;110:965-967.
 276. **Dahlén B., Boréus L.O., Anderson P., Andersson R., Zetterström O.** Plasma acetylsalicylic acid and salicylic acid levels during aspirin provocation in aspirin-sensitive subjects. *Allergy*, 1994;49:43-49.
 277. **Jakubowski H.** Protein homocysteinylolation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J*, 1999;13:2277-2283.
 278. **Sauls D.L., Wolberg A.S., Hoffman M.** Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost*, 2003;1:300-306.
 279. **Schroeder V., Chatterjee T., Kohler H.P.** Influence of blood coagulation factor XIII and FXIII Val34Leu on plasma clot formation measured by thrombelastography. *Thromb Res*, 2001;104:467-474.
 280. **Butenas S., Cawthern K.M., van't Veer C., DiLorenzo M.E., Lock J.B., Mann K.G.** Antiplatelet agents in tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, 2001;97:2314-2322.
 281. **Undas A., Brummel K., Musiał J., Mann K.G., Szczeklik A.** Blood coagulation at the site of microvascular injury: effects of low-dose aspirin. *Blood*, 2001;98:2423-2431.
 282. **Greenberg C.S., Birckbichler P.J., Rice R.H.** Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J*, 1991;5:3071-3077.

-
283. **Marín F., González-Conejero R., Lee K.W., Corral J., Roldán V., López F., Sogorb F., Caturla J., Lip G.Y., Vicente V.** A pharmacogenetic effect of factor XIII valine 34 leucine polymorphism on fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2005;45:25-29.