

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Andrzej Machnik

DZIAŁANIE SIMWASTATYNY W MONOTERAPII I W SKOJARZENIU
Z EZETYMIBEM NA PARAMETRY HEMOSTAZY I STANU ZAPALNEGO
U CHORYCH PO ŚWIEŻYM ZAWALE SERCA

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Anetta Undas

Pracę wykonano w Centrum Interwencyjnego Leczenia Chorób Serca i Naczyń
Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II w Krakowie
Kierownik Prof. dr hab. med. Krzysztof Źmudka oraz
Zakładzie Kardiologii Anestezjologii i Kardiologii Doświadczalnej
Instytutu Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik Prof. dr hab. med. Anetta Undas.

Kraków, 2010

*Mojemu Promotorowi
Wielce Szanownej
Pani Prof. dr hab. med. Anettcie Undas
serdecznie dziękuję za cierpliwość, wyrozumiałość
oraz wsparcie na każdym etapie powstawania tej pracy.*

*Mojemu nauczycielowi
Wielce Szanownemu
Panu Prof. dr hab. med. Krzysztofowi Żmudce
dziękuję za nieustanną wiarę w ucznia
oraz doświadczaną życzliwość.*

... szukajcie, a znajdziecie, ...

(Mt 7:7)

SPIS TREŚCI

1.	Wprowadzenie.....	7
1.1	Epidemiologia choroby niedokrwiennej serca.....	7
1.2	Patogeneza miażdżycy.....	8
1.2.1	Niestabilna blaszka miażdżycowa.....	9
1.2.2	Zapalenie w ostrych zespołach wieńcowych – markery zapalenia...	10
1.2.3	Stres oksydacyjny i jego markery.....	13
1.3	Proces powstawania skrzepliny w ostrym zespole wieńcowym.....	17
1.3.1	Czynnik tkankowy	19
1.3.2	Osoczowy układ krzepnięcia.....	20
1.3.3	Kaskada krzepnięcia.....	21
1.3.4	Generacja trombiny.....	22
1.3.5	Płytki krwi.....	23
1.4	Endogenna fibrynoliza.....	27
1.5	Statyny.....	32
1.6.	Ezetymib.....	37
2.	Założenie i cele pracy.....	44
3.	Pacjenci i metody.....	46
3.1	Schemat badania.....	47
3.2	Protokół badania.....	47
3.3	Oznaczenia.....	50
3.4	Analiza statystyczna.....	54
4.	Wyniki.....	55
4.1	Charakterystyka badanych grup.....	55

4.2	Dane kliniczne i angiograficzne.....	58
4.3	Podstawowe badania laboratoryjne.....	63
4.4	Markery krzepnięcia.....	68
4.5	Markery zapalenia.....	69
4.6	Markery aktywacji płytek.....	70
4.7	Markery fibrynolizy.....	71
4.8	Markery stresu oksydacyjnego.....	73
5.	Omówienie.....	75
5.1	Parametry stanu zapalnego w zawale serca.....	76
5.2	Parametry hemostazy w zawale serca.....	78
5.3	Aktywność fibrynolityczna osocza w zawale serca	81
5.4	Ograniczenia badania.....	86
6.	Wnioski.....	88
7.	Streszczenie.....	89
8.	Summary.....	95
9.	Piśmiennictwo.....	100

Najczęściej używane skróty:

ADP = difosforan adenozyne

ALAT = aminotransferaza alaninowa

ASA = kwas acetylosalicylowy

β -TG = β -tromboglobulina

CK, CK/MB = kinaza kreatynowa, izoenzym kinazy kreatynowej

CLT = czas lizy skrzepu fibrynowego

COX = cyklooksygenaza

CRP = białko C reaktywne

F1+2 = fragment 1 i 2 protrombiny

HDL = lipoproteiny o dużej gęstości

IL = interleukina

LDL = lipoproteiny o małej gęstości

NSTEMI = zawał mięśnia sercowego bez uniesienia odcinka ST

STEMI = zawał mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST

TAT = kompleks trombina - antytrombina

TF = czynnik tkankowy

TG = triglicerydy

TX = tromboksan

OZW = ostry zespół wieńcowy

PAI-1 = inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1

ROS = reaktywne formy tlenu

8-iso-PGF_{2 α} = 8-izoprostaglandyna PGF_{2 α}

1.1 Epidemiologia choroby niedokrwiennej serca

Na przełomie XIX i XX wieku choroby układu sercowo-naczyniowego stały się dominującym problemem zdrowotnym i pozostają do dziś najczęstszą przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych. Na początku XXI wieku w Europie choroba wieńcowa przyczyniła się do ok. 50% zgonów zarówno u mężczyzn (38%), jak i u kobiet (54%). W Polsce choroba niedokrwienność serca odpowiada za 41% zgonów u mężczyzn i 52% zgonów u kobiet.

Ostre zespoły wieńcowe (OZW) obejmują zawał serca bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI) oraz zawał serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI). OZW często są pierwszą manifestacją choroby niedokrwiennej serca. NSTEMI występuje dwukrotnie częściej niż STEMI¹. W okresie od 1976 do 2009 roku liczba chorych hospitalizowanych w Polsce z powodu OZW zwiększyła się z 32 tysięcy do 98 tysięcy. U chorych z OZW w celu ustalenia optymalnego sposobu leczenia zalecane jest wykonanie diagnostyki inwazyjnej naczyń wieńcowych². W 2009 w Polsce wykonano łącznie 59251 zabiegów angioplastyki wieńcowej w OZW (*Tabela 1*). Śmiertelność wewnątrzszpitalna w przypadku NSTEMI wynosi 5%, natomiast w przypadku STEMI 7%². Śmiertelność 6-miesięczna dla obu stanów wynosi odpowiednio 12% i 13%². Śmiertelność po 4 latach od wypisu ze szpitala jest dwukrotnie wyższa w grupie chorych z NSTEMI².

Tabela 1. Liczba pierwotnie wykonanych zabiegów angioplastyki wieńcowej dla poszczególnych typów OZW w Polsce - dane z rejestru OZW za rok 2009

Rodzaj OZW	Liczba zabiegów pierwotnej angioplastyki wieńcowej	Liczba skutecznych zabiegów pierwotnej angioplastyki naczyń wieńcowych	Pilna operacja wszczepienia pomostów aortalno wieńcowych	Zgon w trakcie pobytu w szpitalu
STEMI	26389	23199	33	706
NSTEMI	32862	28797	272	243

1.2 Patogeneza miażdżycy

Niemal wszystkie OZW są spowodowane miażdżycą tętnic wieńcowych często powikłaną zakrzepicą rozwijającą się na jej podłożu. Miażdżycą jest złożonym procesem immunologiczno-zapalnym, w większości przypadków zapoczątkowanym przez hipercholesterolemię, prowadzącym do uszkodzenia komórek śródbłonna i powstania swoistych zmian w ścianie naczyń tętnicznych określanych mianem blaszki miażdżycowej³.

Miażdżycą naczyń wieńcowych może z jednej strony być niema klinicznie, a w innym przypadku, wskutek uszkodzenia blaszki miażdżycowej i następowej zakrzepicy, prowadzić do potencjalnie śmiertelnych powikłań, których najczęstszym przejawem są OZW⁴⁻⁵.

Blaszki miażdżycowe często są dzielone na 2 rodzaje, tj. stabilne oraz tzw. niestabilne, dużego ryzyka lub podatne na uraz⁶.

1.2.1 Niestabilna blaszka miażdżycowa

W tętnicy wieńcowej blaszka niestabilna lub dużego ryzyka cechuje się swoistą budową i łączy się z przebudową odśrodkową naczyń. Od światła tętnicy blaszkę miażdżycową oddziela warstwa łącznotkankowa nazywana pokrywą blaszki. Aktywne komórki stanu zapalnego wytwarzają cytokiny prozapalne, wolne rodniki oraz enzymy proteolityczne⁷⁻⁸. Substancje te mogą uszkodzić pokrywę łącznotkankową⁹⁻¹⁰. Kluczową rolę w destabilizacji blaszki i przerwaniu ciągłości jej pokrywy odgrywają metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP) oraz proteiny cysteinowe¹¹⁻¹². Osłabiona blaszka pęka pod wpływem obciążenia wywieranego przez zwiększone siły ścinające. Najczęstszym miejscem pęknięcia jest region znajdujący się w okolicy połączenia pokrywy blaszki ze ścianą tętnicy określany mianem regionu zawiasowego.

Blaszki miażdżycowe charakteryzujące się dużym ryzykiem pęknięcia określono mianem niestabilnej. Cechy takiej blaszki to: rdzeń lipidowy stanowiący powyżej 40% objętości blaszki ze zwiększoną ilością wolnego cholesterolu i jego estrów, cienka pokrywa ze zmniejszoną ilością włókien kolagenu i niewielką liczbą komórek mięśni gładkich, nacieki zapalne złożone głównie z monocytów / makrofagów i limfocytów T oraz nasilona neowaskulogeneza^{4,7,13}.

Blaszki podatne na uraz zazwyczaj nie powodują istotnego angiograficznie przewężenia światła tętnic wieńcowych¹⁴⁻¹⁵.

1.2.2 Zapalenie w ostrych zespołach wieńcowych – markery zapalenia

Przyczyną pęknięcia blaszki miażdżycowej jest zwykle stan zapalny. Proces ten wiąże się z destrukcyjnym działaniem metaloproteinaz, co prowadzi do rozpadu białek macierzy zawartych w pokrywie włóknistej. Markerami systemowej reakcji zapalnej przydatnymi w monitorowaniu procesu miażdżycy oraz ocenie prawdopodobieństwa wystąpienia OZW są: interleukina 6 (IL-6), białko C reaktywne (CRP), fibrynogen oraz IL-18.

IL-6 jest cytokiną prozapalną, zbudowaną z 184 aminokwasów, o wielokierunkowym działaniu. Ludzki gen IL-6 zlokalizowany jest na chromosomie 7. Syntetyzowana jest głównie przez monocyty, makrofagi, komórki śródbłonna naczyniowego, limfocyty B i T oraz miocyty stref brzeżnych martwicy mięśnia sercowego. Produkcja IL-6 wzmacniana jest dodatkowo poprzez aktywację ww. komórek na skutek stymulującego działania cytokin prozapalnych oraz utlenionego przez wolne rodniki cholesterolu frakcji LDL. Głównym czynnikiem stymulującym wydzielanie IL-6 jest IL-1, interferon (IFN), czynnik martwicy nowotworów (TNF). Działanie IL-6 odbywa się poprzez oddziaływanie z receptorem dla IL-6 (IL-6R). IL-6R znajduje się na hepatocytach, monocytach, neutrofilach, limfocytach T i B. IL-6 stymuluje wydzielanie czynników chemotaktycznych, metaloproteinaz macierzy, indukuje też proliferację komórek mięśni gładkich¹⁶. IL-6 zwiększa ekspresję czynnika tkankowego (TF) na powierzchni monocytów oraz hamuje produkcję syntetyzowanej w hepatocytach antytrombiny (AT)¹⁷⁻¹⁸. IL-6 poprzez adrenalinę, adnozynodwufosforan (ADP) oraz wpływ na metabolizm kwasu arachidonowego pobudza agregację płytek krwi¹⁹. IL-6 indukuje produkcję płytek krwi oraz zwiększa wrażliwość płytek na działanie trombiny²⁰. IL-6 zwiększa

w wątrobie syntezę CRP, fibrynogenu, inhibitora aktywatora plazminogenu – typu 1 (PAI-1)²¹. Wzrost sekrecji białek ostrej fazy pod wpływem IL-6 prowadzi do wzmocnienia tłęcej się lokalnie w śródbłonku naczyniowym reakcji zapalnej oraz zmniejszenia potencjału fibrynolitycznego, co prowadzi do destabilizacji blaszki miażdżycowej. Wykazano, że po pierwszych 12 godzinach od początku wystąpienia objawów OZW dochodzi do istotnego wzrostu poziomu IL-6²². Maksymalne stężenie IL-6 w krwi żyłnej u pacjentów z OZW występuje około 36 godzin od początku wystąpienia martwicy kardiomiocytów²³. Poziom IL-6 u pacjentów z ostrym zawałem serca ściany przedniej jest wyższy w porównaniu z chorymi na zawał serca ściany dolnej²⁴. Badanie FRICS II (*Fragmin and fast revascularisation during instability in coronary artery disease*) wykazało, że korzyści odnoszone z leczenia interwencyjnego były większe u chorych z poziomem IL-6 > 5 ng/l²⁵.

CRP jest białkiem ostrej fazy, którego poziom istotnie wzrasta w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek. Jest pentamerem składającym się z 5 niekowalencyjnie połączonych podjednostek o budowie pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Wytwarzane jest głównie w wątrobie w odpowiedzi na IL-6, IL-1 β , oraz TNF α . Duże ilości CRP zdeponowane są również w blaszkach miażdżycowych. Stężenie mRNA dla CRP w blaszkach miażdżycowych jest kilkakrotnie wyższe niż w wątrobie²⁶. Produkcja CRP w warunkach fizjologicznych odbywa się na względnie niskim poziomie (poziom CRP w krwi zwykle < 1 mg/dl). W reakcjach ostrej fazy poziom CRP może w krótkim czasie osiągać wartości 1000 krotnie wyższe od referencyjnych. Jako marker procesu miażdżycowego CRP prowadzi do nasilenia chemotaksji, zwiększenia ekspresji cytokin i TF w monocytach, ograniczenia biodostępności endotelialnej syntazy tlenku azotu (eNOS), a poprzez zwiększony wychwyty cholesterolu frakcji LDL przez monocyty prowadzi do powstania komórek

piankowatych²⁷. Dodatkowo CRP nasila migrację i proliferację mięśni gładkich, zwiększa produkcję wolnych rodników tlenowych oraz stymuluje syntezę PAI-1. CRP aktywuje układ dopełniacza. W przypadku infekcji CRP pobudza układ immunologiczny, czego konsekwencją jest tworzenie nacieków z monocytów koniecznych do prezentacji antygenów. Mechanizm wpływu CRP na progresję aterogenezy jest wielokierunkowy. Białko to jest jednocześnie biomarkerem oraz bezpośrednio wpływa na proces miażdżycy, choć siła i zakres tego oddziaływania *in vivo* wciąż budzą kontrowersje. Na podstawie przeprowadzonych do tej pory badań klinicznych wykazano, że podwyższony poziom CRP wiąże się z kilkukrotnym wzrostem wystąpienia OZW²⁸. Poziom CRP u pacjentów ze STEMI oznaczany do 12 godziny od chwili rozpoczęcia leczenia szpitalnego jest dobrym wskaźnikiem nawrotu incydentów wieńcowych oraz umieralności w kolejnych latach, szczególnie w przypadku gdy poziom CRP przekroczy 3 mg/l²⁹. Stężenia CRP oraz IL-6 korelują z rozległością niedokrwienia u chorych z OZW, ale także z nasileniem generacji trombiny i aktywacją płytek krwi^{20,30}.

Fibrynogen jest białkiem osocza krwi oraz czynnikiem krzepnięcia, syntetyzowanym w wątrobie. Fibrynogen zaliczany jest do białek ostrej fazy. Trzy geny odpowiedzialne za jego syntezę zlokalizowane są na chromosomie 4. Podwyższony poziom fibrynogenu powiązany jest z przyspieszonym postępem aterogenezy poprzez wnikanie w ścianę tętnicy i wiązanie w niej cząsteczek LDL, czynników krzepnięcia oraz proliferacją mięśniówki gładkiej naczyń³¹⁻³². Fibrynogen może na różne sposoby przyczynić się do wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych. Pod wpływem trombiny dochodzi do odszczepienia od fibrynogenu fibrynopeptydu A i B. Pozostały fragment, monomer fibryny, polimeryzuje i tworzy sieć fibrynową. FXIIIa poprzez wytworzenie wiązań

krzyżowych między sąsiadującymi monomerami fibryny prowadzi do stabilizacji i wytworzenia sieci fibrynowej.

IL-18 produkowana jest głównie przez monocyty i makrofagi. Gen IL-18 znajduje się na chromosomie 11. IL-18 stymuluje immunologiczną odpowiedź komórkową. W obecności interleukiny 4 (IL-4) zwiększa produkcję IL-6³³. W badaniach na modelu zwierzęcym wykazano, że IL-18 przyspiesza rozwój blaszki miażdżycowej poprzez nasilenie odpowiedzi zapalnej IFN- γ -zależnej³⁴. Natomiast zwiększona ekspresja białka wiążącego IL-18 (IL-18BP, *interleukin-18 binding protein*), endogennego inhibitora IL-18, doprowadzała u myszy apoE^{-/-} do zahamowania rozwoju blaszki miażdżycowej, zmniejszenia zawartości komórek zapalnych, a poprzez redukcję wielkości rdzenia lipidowego i wzrost ilości kolagenu w blaszce prowadziła do zmiany struktury blaszki w bardziej stabilną³⁴⁻³⁵. Stwierdzono, że wyeliminowanie działania IL-18 u myszy IL-18^{-/-} x apoE^{-/-} w porównaniu ze zwierzętami IL-18^{+/+} x apoE^{-/-} zmniejsza rozmiar zmian miażdżycowych o 35%³⁶. Wykazano, że poziom IL-18 znamienne wzrasta w przebiegu OZW i dodatkowo koreluje z wzrostem ryzyka zgonu sercowego u pacjentów z niestabilną dławicą piersiową³⁷.

1.2.3 Stres oksydacyjny i jego markery

Stan, w którym komórki organizmu są narażone na działanie tlenu cząsteczkowego w wysokich stężeniach lub chemicznych pochodnych tlenu, tzw. reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*), określane jest mianem stresu oksydacyjnego. Duże ilości ROS są wytwarzane w komórkach ścian naczyń krwionośnych głównie pod wpływem działania oksydazy NAD(P)H. Oksydaza

NAD(P)H związana jest z białkami komórek śródbłónka naczyniowego, mięśni gładkich i fibroblastów. Aktywacja oksydazy NAD(P)H zachodzi pod wpływem m. in. trombiny, stresu mechanicznego i angiotensyny II³⁸.

ROS wykazują działanie wielokierunkowe w naczyniach krwionośnych. Jest to działanie cytotoksyczne, sygnalizacyjne, związane z utlenianiem lipoprotein frakcji LDL. Newralgicznym punktem działania ROS jest błona komórkowa, w której dochodzi do peroksydacji lipidów. Jest to proces wieloetapowy – inicjacja, propagacja, terminacja – w którym w wyniku utleniania LDL powstają oksyLDL. Udowodniono, że oksyLDL jest bezpośrednio związany z hamowaniem zależnego od komórek śródbłónka uwalniania prostacykliny, silnego czynnika cytoprotekcyjnego. Produkty lipooksygenacji mogą również indukować ekspresję cyklooksygenazy-2 (COX-2) w makrofagach; istnieje zatem połączenie pomiędzy tlenową modyfikacją LDL, a aktywacją potencjału zapalnego makrofagów³⁹.

W organizmie ludzkim istnieje system usuwania wolnych rodników, w którego skład wchodzi dysmutazy nadtlenkowe (SOD) oraz nieenzymatyczne drobnocząsteczkowe antyoksydanty. W badaniach klinicznych udowodniono zmniejszony poziom SOD u chorych z nasilonym stresem oksydacyjnym indukowanym siłami ścinania⁴⁰. Szereg leków, w tym statyny i kwas acetylosalicylowy (ASA), wykazuje działania antyoksydacyjne⁴¹⁻⁴². Obniżenie poziomu O_2^- (anionorodnik ponadtlenkowy) i tym samym wzrost biodostępności NO uwalnianego z płytek krwi wywołuje efekt antyagregacyjny.

Stres oksydacyjny jest uważany za ważny czynnik sprzyjający rozwojowi miażdżycy.

Kwas arachidonowy zawarty w fosfolipidach błon plazmatycznych jest uwalniany przez fosfolipazę A_2 i następnie metabolizowany w szlakach

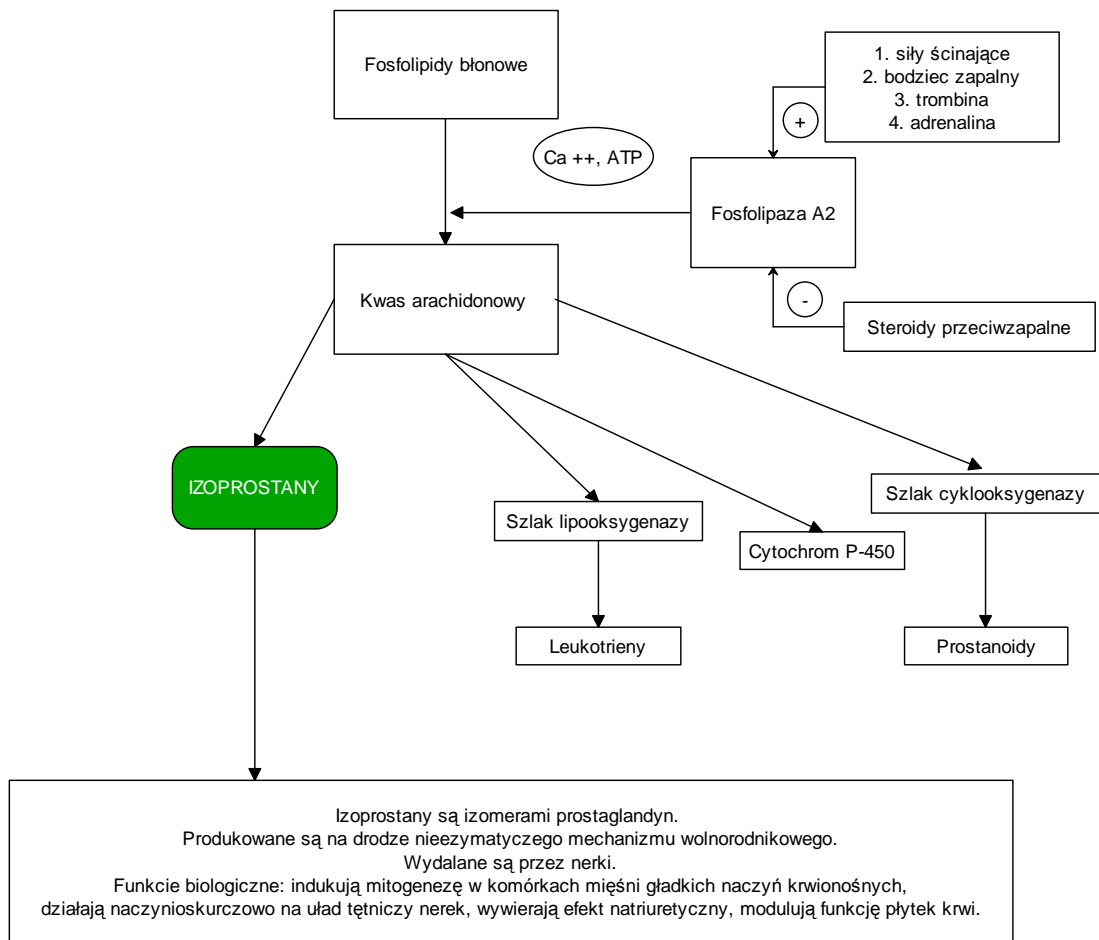
enzymatycznych, m.in. w szlakach katalizowanych przez COX-1 lub COX-2, na których powstają prostaglandyny, tromboksany i prostacykliny oraz szlaku nieenzymatycznym, w którym pod wpływem ROS dochodzi do autooksydacji błonowych kwasów tłuszczowych, co prowadzi do powstania izoprostanów (izoP)⁴³⁻⁴⁵ (*Rycina 1*). Syntezę związków podobnych do prostaglandyn, jako produktów peroksydacji kwasu arachidonowego *in vitro*, po raz pierwszy opisano w 1990 roku. Stężenie 8-iso-PGF_{2α} jest większe w moczu w porównaniu z osoczem krwi zdrowych dawców.

Każde zwierzę/ssak i człowiek syntetyzuje isoprostany.

W osoczu krwi szczurów poddanych działaniu związków chemicznych dla wywołania oksydacyjnych uszkodzeń zawartość izoprostanów wzrastała 200-krotnie w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt⁴⁵. 8-iso-PGF_{2α} tworzyły się w znacznie mniejszych ilościach u szczurów karmionych hepatotoksycznymi dawkami paracetamolu - substancji, która nie jest metabolizowana do form rodnikowych.

Wiedza o metabolizmie izoprostanów nadal pozostaje niepełna. W przeprowadzonych na szczurach badaniach, gdzie celem było określenie szybkości zanikania podawanego dożylnie 8-iso-PGF_{2α}, ustalono, że czas półtrwania tego związku we krwi wynosi ok. 16 minut. Wykorzystując znakowany izotopowo 8-iso-PGF_{2α}, udało się ustalić podstawowy metabolit tego związku u ludzi. Jest nim występujący w moczu 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-izo-PGF_{2α}. Metabolit ten reprezentuje 29% wszystkich możliwych do wyekstrahowania i odzyskiwanych z moczu promieniotwórczych związków.

Rycina 1. Szlak przemian fosfolipidów błonowych



Jednym z dobrze poznanych izoprostanów, odznaczającym się właściwościami naczynioskurczowymi w nerkowym i płucnym układzie krążenia a także indukowaniem syntezy DNA w komórkach mięśni gładkich, jest 8-izo-prostaglandyna $F_{2\alpha}$ (8-izo-PGF $_{2\alpha}$)⁴⁶. Wpływa ona ponadto na procesy wzrostu i podziału komórki oraz modyfikuje funkcję płytek krwi, ułatwiając agregację przy podprogowych stężeniach typowych agonistów płytek krwi, takich jak ADP i trombina. Działania te są możliwe dzięki interakcjom z receptorem tromboksanu A_2 (TXA $_2$) oraz jako rezultat blokowania farmakologicznych antagonistów receptorów TXA $_2$ ⁴⁷. Formowanie izoprostanów w monocytach może modyfikować niektóre aspekty ich funkcji, jak np. ekspresję TF.

Synteza izoprostanów w utlenionych lipoproteinach LDL może zakończyć się ich wychwytem przez makrofagi i utworzeniem komórek piankowatych. Izoprostany mogą także modyfikować funkcjonowanie komórek mięśni gładkich naczyń oraz gromadzić się w tych komórkach w pobliżu blaszek miażdżycowych⁴⁸.

Oksydowane lipidy stanowią nie tylko marker stresu oksydacyjnego, ale są również ważnymi mediatorami rozwoju miażdżycy oraz aktywują płytki krwi. 8-izo-PGF_{2α} jest izoprostanem o stabilnej cząsteczce oraz wiarygodnym markerem stresu oksydacyjnego *in vivo*. Stężenia 8-iso-PGF_{2α} są znamienne większe u chorych z OZW w porównaniu z osobami ze stabilną postacią dusznicy bolesnej i korelują z aktywacją płytek⁴⁹.

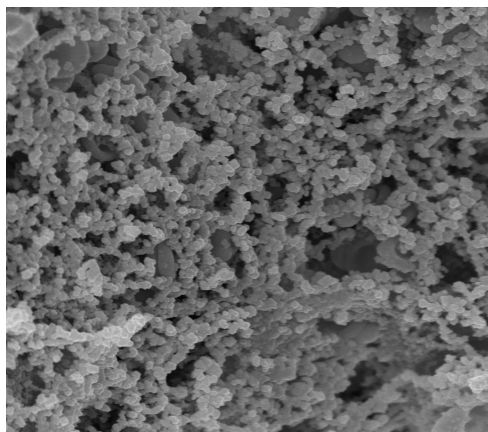
1.3 Proces powstawania skrzepliny w ostrym zespole wieńcowym

Miażdżyca prowadzi do powstania blaszek miażdżycowych, które w zależności od wielkości zmiany mogą, ale nie muszą, prowadzić do upośledzenia rezerwy wieńcowej w mięśniu sercowym. Konsekwencją pęknięcia pokrywy włóknistej blaszki miażdżycowej jest zakrzepica, która jest głównym procesem patogennym w OZW. Poprzez kontakt krwi z kolagenem macierzy wewnątrzkomórkowej i odłożonym w blaszce miażdżycowej TF związanym z makrofagami obciążonymi lipidami dochodzi do powstania skrzepliny⁵⁰⁻⁵¹ (*Rycina 2-4*).

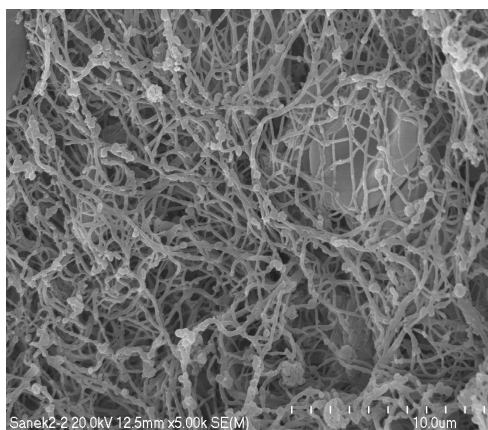
Rycina 2. Materiał zakrzepowy z prawej tętnicy wieńcowej uzyskany podczas trombektomii aspiracyjnej systemem DiverMax



Rycina 3. Formowania skrzepliny w tętnicy wieńcowej (obraz z elektronicznego mikroskopu skaningowego, powiększenie 5000x)



Rycina 4. Późny etap formowania skrzepliny w tętnicy wieńcowej (obraz z elektronicznego mikroskopu skaningowego, powiększenie 5000x)



1.3.1 Czynniki tkankowe

TF jest białkiem błonowym, którego gen znajduje się na chromosomie 1. TF jest *in vivo* podstawowym czynnikiem aktywującym kaskadę krzepnięcia. Jego rola nie ogranicza się jedynie do inicjowania procesu krzepnięcia – jest białkiem sygnałowym biorącym udział m.in. w angiogenezie⁵²⁻⁵³. Wewnątrzkomórkowe zdarzenia sygnałowe TF zachodzą za pośrednictwem receptorów aktywowanych przez proteazy serynowe (PAR)⁵⁴. TF, związany z głębszymi warstwami ściany naczyń głównie błonami komórkowymi mięśni gładkich i fibroblastów, w warunkach fizjologicznych oddzielony jest przez śródbłonek naczyniowy od krążącego we krwi FVII i jego aktywnej formy⁵⁵. W zdrowym naczyniu TF nie występuje na powierzchni komórek śródbłonka naczyniowego⁵⁵. TF znajduje się również w krążącej krwi, w znikomych ilościach, głównie na mikrocząstkach i ta pula może brać udział w procesach fizjologicznych i patologicznych⁵⁶.

Opisywano kilka typów TF, choć ich obecność we krwi krążącej i fizjologiczna rola wciąż budzi duże kontrowersje. Aktywny TF występuje w blaszce miażdżycowej na powierzchni komórek stanu zapalnego, szczególnie makrofagach⁵⁷. TF w połączeniu z aktywną postacią FVII (FVIIa) aktywuje FIX i FX, co z kolei prowadzi do inicjacji kaskady proteolitycznej prowadzącej do generacji trombiny i powstania fibryny. „Ukryty” (*encrypted*) TF związany jest z mikrocząstkami znajdującymi się w krążącej krwi^{56,58}. Tworzenie ukrytego TF polega na posttranslacyjnym zahamowaniu jego aktywności prozakrzepowej. Ukryty TF pozostaje na powierzchni błony komórkowej w postaci homodimerów i zachowuje zdolność wiązania FVII/FVIIa, jednak powstały kompleks charakteryzuje się znikomą zdolnością prozakrzepową⁵⁹. Ukrywanie polega

na zasłonięciu miejsc aktywnych TF. Alternatywnie składany TF (*asTF*, *alternatively spliced TF*) jest formą TF o łańcuchu pozbawionym domeny cytoplazmatycznej i zakończonym inną sekwencją aminokwasów niż pełna wersja TF⁶⁰.

Wyniki badań *in vitro* wskazują, że aktywność prozakrzepowa wolnego TF jest o kilka rzędów wielkości mniejsza od „właściwego” TF⁶¹. Zaobserwowano, że u pacjentów NSTEMI poziom TF był znacznie podwyższony, zwłaszcza w grupie chorych, którzy w skali Antmana, (*TIMI Risk Score for Unstable Angina/NON-ST Elevation Myocardial Infarct*) - siedmiostopniowa skala określająca ryzyko związane z niestabilną chorobą wieńcową lub NSTEMI, uzyskali ≥ 4 punkty⁶²⁻⁶³.

1.3.2 Osoczowy układ krzepnięcia

Odsłonięcie TF sygnalizuje uszkodzenie ściany naczynia i daje początek procesowi prowadzącemu do powstawania trombiny, a ostatecznie zakrzepu fibrynowego. Generacja trombiny jest procesem o dużej dynamice, w którym można wyróżnić 2 fazy – inicjacji i propagacji. W fazie inicjacji zostają uruchomione procesy krzepnięcia, natomiast w fazie propagacji wszystkie mechanizmy enzymatyczne osiągają maksymalną wydajność, produkując znaczne ilości trombiny. W generacji trombiny biorą udział 3 kompleksy enzymatyczne o zbliżonej strukturze, z których każdy składa się z proteazy serynowej zależnej od witaminy K (FVII, FIX, FX), kofaktora białkowego zwiększającego aktywność proteazy (TF, FV, FVIII) oraz wielkocząsteczkowego substratu białkowego (protrombina – FII).

1.3.3 Kaskada krzepnięcia

TF inicjuje kaskadę krzepnięcia poprzez wytworzenie niewielkiej ilości trombiny. Aktywny TF tworzy kompleks z FVIIa. Wytworzony kompleks TF + FVIIa aktywuje z kolei FIX i FX do FIXa i FXa. FIXa łączy się z FVIII i tak wytworzony kompleks w sposób mało wydajny prowadzi do powstania FXa z FX. Wytworzony w wyżej wymieniony sposób FXa łączy się na powierzchni błon komórkowych z FVa. Kompleks FXa z FVa prowadzi do przekształcenia protrombiny w trombinę. Wytworzona w ten sposób trombina prowadzi do przejścia FXI w FXIa. Powstała trombina aktywuje dalej FVIII i FV w FVIIIa i FVa, co w konsekwencji daje duże ilości trombiny. Synteza trombiny zależna od TF jest hamowana przez inhibitor szlaku czynnika tkankowego – TFPI. Dalsza synteza trombiny może zachodzić mimo działania TFPI, a podtrzymanie tego szlaku upatruje się w działaniu aktywowanego przez trombinę FXIa. FXI ulega aktywacji pod wpływem trombiny powstałej na drodze zależnej od TF i stanowi dodatkowe źródło FIXa, niezbędnego do propagacji zakrzepu w miejscach oddalonych od uszkodzonej ściany naczynia, gdzie TF nie jest dostępny w wystarczającej ilości.

Wyniki oznaczeń markerów generacji trombiny, tj. poziomu kompleksu trombina-antytrombina (TAT), fragmentów 1+2 protrombiny (F1+2) oraz fibrynopeptydu A (FPA), we krwi wskazują, że OZW charakteryzują się bardzo silną stymulacją osocznego układu krzepnięcia i wzmożoną produkcją trombiny, a cechy stanu prozakrzepowego u chorych po zawale serca obserwuje się zwykle przez wiele miesięcy od incydentu, a nawet po 2 latach⁶⁴⁻⁶⁵. Za główną przyczynę nasilonej trombinogenezy w OZW uważa się dużą zawartość TF wewnątrz uszkodzonej blaszki miażdżycowej i, w mniejszym stopniu, wychwytywanie przez zaktywowane

płytki krwi mikrocząsteczek krążących w krwi i zawierających na swej powierzchni TF⁶⁶. Tworzenie się trombiny i w konsekwencji konwersja fibrynogenu do fibryny zachodzą szybko, gdy dochodzi do kontaktu krążącej krwi z trombogennym wnętrzem niestabilnej blaszki miażdżycowej. Trombina, głównie poprzez aktywację receptorów PAR-1, prowadzi do aktywacji płytek krwi oraz uwalniania lub produkcji *de novo* przez nie szeregu aktywnych substancji m.in. TXA₂. TXA₂, główny produkt COX-1 w płytkach, aktywuje inne płytki, kurczy naczynia tętnicze oraz nasila agregację płytek.

1.3.4 Generacja trombiny

Od końca lat siedemdziesiątych XX wieku, wraz z wprowadzeniem do powszechnego użytku prostych metod oznaczania markerów trombinogenezy: TAT, F1+2 oraz wskaźników produkcji fibryny - FPA, wiadomo, że OZW wiąże się ze zwiększeniem generacji trombiny oznaczanej w krwi żyłnej. Udokumentowano także dalszy wzrost generacji trombiny w czasie leczenia fibrynolitycznego⁶⁷⁻⁶⁸.

Kompleks protrombinazy, w skład którego wchodzi: FXa, FVa i protrombina, powstający głównie na fosfolipidach błony komórkowej zaktywowanej płytki, rozszczepia łańcuch protrombiny przy Arg 320. Następnie w wyniku samostrawienia przy Arg 284 powstają 2 stabilne łańcuchy A i B aktywnej α -trombiny. Samoaktywacja trombiny prowadzi do odszczepienia fragmentu 1 i fragmentu 2 protrombiny (F1, F2). Aktywna trombina nie występuje w postaci wolnej lecz krąży w połączeniu z F1 oraz dimerem F1+2. Niewielka pozostała część trombiny ulega związaniu przez jej główny inhibitor – AT, tworząc TAT. Dzięki proteolitycznemu działaniu trombiny powstaje fibryna – główne białko zakrzepu.

Trombina oddziela fibrynopeptyd A (FPA) poprzez rozerwanie łańcucha A α przy Arg 16.

W ten sposób tworzy się fibryna I, od której trombina oddziela fibrynopeptyd B poprzez proteolizę łańcucha B β przy Arg 14. Tak powstała fibryna II samorzutnie polimeryzuje. Powstały zakrzep zyskuje na własnościach mechanicznych i oporności na lizę, dzięki powstaniu krzyżowych wiązań utworzonych przez FXIIIa aktywowany uprzednio przez trombinę.

1.3.5 Płytki krwi

Płytki krwi, krążące w ilości zwykle 150 do 350 tysięcy w mikrolitrze, zawierają trzy rodzaje ziarnistości płytkowych: ziarnistości alfa zawierające m.in. fibrynogen, β -tromboglobulinę (β -TG), ziarnistości gęste zawierające związki aktywujące płytki krwi – jony wapnia oraz ziarnistości lizosomalne z enzymami hydrolitycznymi. Płytki krwi w stanie nie pobudzonym nie posiadają zdolności przylegania do innych komórek krwi krążącej czy ściany naczyniowej. Oddziaływanie płytek krwi z uszkodzoną ścianą naczyń tętniczych powoduje lokalne zaburzenia hemostazy, prowadzące do powstania zakrzepu. Główną rolę w tych reakcjach odgrywają płytkowe receptory powierzchniowe. Najistotniejszymi aktywatorami płytek krwi, powodującymi zmianę ich kształtu, sekrecję oraz agregację, są kolagen, trombina, TXA₂ oraz ADP. Agonistą, który wpływa jedynie na zmianę kształtu płytek, jest 8-izo-PGF_{2 α} ⁴³.

Kolagen i TF stanowią odpowiednio pierwszą i drugą linię obrony zapobiegającą utracie integralności układu krążenia. Płytki krwi połączone z uszkodzoną blaszką miażdżycową ulegają szybkiemu pobudzeniu w obecności

kolagenu, ADP, adrenaliny i trombiny⁶⁹. W wyniku oddziaływania płytkowej glikoproteiny VI z kolagenem odsłoniętej ściany naczynia dochodzi do aktywacji płytek krwi. Aktywacja płytek zależna od kolagenu zachodzi poprzez białko Ras⁷⁰. Pobudzenie płytek prowadzi do zmiany ich struktury, uwolnienia ADP z ziarnistości oraz uruchomienia produkcji TXA₂ przez COX-1. Na powierzchni płytek uaktywnia się kompleks glikoproteiny IIb-IIIa, uzyskując zdolność wiązania fibrynogenu, co zwiększa siłę wiązania zakrzepu płytkowego⁷¹. Z kolei odsłonięty TF inicjuje zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, co prowadzi do generacji trombiny, która oprócz przekształcania fibrynogenu w fibrynę wzmacnia aktywację płytek. Jednym z najsilniejszych czynników pobudzających płytki jest trombina⁷². Trombina za pośrednictwem receptora PAR1 aktywuje płytki krwi, wywołując uwalnianie przez nie szeregu agonistów, m.in. TXA₂, ADP, potęgujących sygnał do mobilizacji kolejnych płytek krwi, której rezultatem jest m.in. ekspresja selektyny P⁷³. Poprzez wytworzenie połączenia pomiędzy selektyną P na aktywnych płytkach krwi z ligandem glikoproteinowym selektyny P typu 1 (PSGL-1), znajdującym się na powierzchni mikrocząsteczek, dochodzi do rekrutacji puli TF znajdującego się w krwi i w konsekwencji powstania skrzepliny^{58,74-75}. Aktywacja płytek jest znacznie ułatwiona w obecności dysfunkcyjnego śródbłonna, który produkuje zmniejszone ilości NO i prostacykliny.

Aktywację płytek możemy oceniać na podstawie markerów oznaczanych w surowicy takich jak: β -TG, TXA₂ i rozpuszczalnego ligandu CD40 (sCD40L).

β -TG jest białkiem wydzielanym podczas aktywacji płytek z ziarnistości alfa. Jest to jeden z najwcześniej odkrytych i stosowanych wskaźników aktywacji płytek. Nie jest znana funkcja tego białka ani jego potencjalny udział w mechanizmach krzepnięcia.

Konsekwencją aktywacji płytek jest sekrecja substancji biologicznie czynnych, takich jak: ADP i TXA₂. Te substancje przyczyniają się do agregacji płytek. TXA₂ jest syntetyzowany przede wszystkim w płytkach krwi. Jest silnym czynnikiem proagregacyjnym i naczynioskurczowym. Synteza TXA₂ rozpoczyna się od mobilizacji fosfolipazy A₂, co skutkuje rozpadem fosfatydylocholiny do kwasu arachidonowego, który przez COX-1 jest konwertowany do prostaglandyn PGG₂ i PGH₂. Następnie syntetaza tromboksanu przekształca te związki do TXA₂. TXA₂ oddziałuje poprzez swój receptor – tzw. receptor TP. Receptor ten zaliczany jest do rodziny serpentyn sprzężonych z heterotrimerycznymi białkami G⁷⁶. TXA₂ poprzez receptory płytkowe TP aktywuje płytki krwi, stymulując w ten sposób proces agregacji⁷⁷. TXA₂ ma bardzo krótki okres półtrwania i rozpada się do trwałego TXB₂.

Lekiem, który powoduje acetylację grupy hydroksylowej seryny w pozycji 529 łańcucha polipeptydowego COX-1 i przez to inaktywację ww. enzymu oraz zahamowanie konwersji kwasu arachidonowego do PGG₂, jest ASA. Wykazano, że COX-1 jest 50–100-krotnie wrażliwsza na działanie ASA niż COX-2. Ponieważ w płytkach występuje prawie wyłącznie COX-1, a w komórkach śródbłonna zarówno COX-1, jak i COX-2, toteż ASA specyficznie blokuje produkcję prostaglandyn w płytkach krwi⁷⁸⁻⁷⁹. W badaniach przeprowadzonych w grupie zdrowych ochotników wykazano, że w celu uzyskania efektu terapeutycznego wystarczy podać ASA w dawce 75 mg/dobę, która stosowana przez kilka dni powoduje niemal całkowite zablokowanie syntezy TXA₂ w płytkach⁸⁰. Skuteczność ASA w dawce nie mniejszej niż 75 mg/dobę potwierdzono w dużych badaniach klinicznych⁸¹.

Szlak sygnałowy CD40-sCD40L jest markerem aktywności płytek krwi. Szlak ten stanowi wspólny element mechanizmów aktywacji krzepnięcia i stanu

zapalnego. Źródłem większości rozpuszczalnego ligandu sCD40L oznaczanego w surowicy i osoczu są aktywowane płytki krwi⁸²⁻⁸⁴. Receptorem dla sCD40L jest CD40. CD40 występuje na powierzchni wielu typów komórek, między innymi monocytów, limfocytów, komórek śródbłonka i mięśni gładkich oraz na płytkach⁸⁵⁻⁸⁶. Trombina, aktywując płytki krwi w warunkach *in vitro*, prowadzi do ekspresji CD40L na powierzchni błony komórkowej, a w następnym etapie do złuszczenia i uwalniania jego rozpuszczalnej postaci sCD40L. sCD40L stanowi wiarygodny marker aktywacji płytek⁸². Na powierzchni aktywowanych płytek pojawia się CD40 oraz jego ligand CD40L. Połączenie CD40 i sCD40L, choć nasila aktywację płytek, nie jest niezbędne dla prawidłowej agregacji⁸². Konsekwencją pobudzenia płytek jest uwalnianie sCD40L. Połączenie sCD40L z CD40, prowadzi do stymulacji reakcji zapalnej w komórkach śródbłonka i ekspresji na ich powierzchni molekuł adhezyjnych i TF oraz uwalniania cytokin, między innymi IL-6⁸⁶⁻⁸⁸. sCD40L zwrótnie pobudza płytki do uwalniania mediatorów zapalnych i wolnych rodników⁸⁹. Aktywacja układu CD40-sCD40L prowadzi do ekspresji licznych cytokin, chemokin, czynników wzrostu i metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej oraz czynników krzepnięcia w licznych komórkach związanych z blaszką miażdżycową^{10, 90}. Z kolei zwiększona ekspresja CD40 na pobudzonych zapalnie komórkach śródbłonka i innych komórkach blaszki miażdżycowej uwrażliwia te komórki na prozapalne działanie sCD40L⁹¹. Stężenie sCD40L było znamienne większe u chorych z OZW w porównaniu z osobami z stabilną postacią choroby niedokrwiennej serca. Stężenie sCD40L jest silnym i niezależnym czynnikiem ryzyka pierwszego i kolejnego incydentu wieńcowego⁹²⁻⁹³. Udowodniono również, że stężenie sCD40L zmniejszało się znamienne w wyniku stosowania statyn^{92, 94-95}.

1.4 Endogenna fibrynoliza

Wzmoczona generacja trombiny prowadzi do powstawania dużych ilości fibryny *in loco* i ostatecznie do aktywacji endogennej fibrynolizy. Głównym enzymem układu fibrynolizy trawiącym włóknik jest, powstająca pod wpływem endogennych i egzogennych aktywatorów z nieczynnego proenzymu – plazminogenu, plazmina. Do powstania plazminy dochodzi głównie na drodze aktywacji plazminogenu przez tkankowy aktywator plazminogenu (tPA). Znaczne ilości tPA uwalniane są pod wpływem niedotlenienia, dużych sił ścinających, cytokin i czynników wzrostu. Z kolei sama plazmina może wpływać na aktywację tPA poprzez przekształcenie jej jednołańcuchowej postaci w bardziej aktywną postać dwułańcuchową. Zarówno plazmina jak i plazminogen wykazują powinowactwo do fibryny za pośrednictwem znajdujących się na łańcuchu ciężkim miejsc wiążących lizynę. Proces endogennej fibrynolizy zachodzi głównie na włóknach fibryny. Częściowe trawienie fibryny przyczynia się do odsłonięcia nowych miejsc wiążących tPA oraz plazminogen.

Działanie tPA może być nieodwracalnie znoszone przez PAI-1. W trakcie OZW obserwuje się zwiększone stężenia PAI-1, co sugeruje kompensacyjne uruchomienie mechanizmów ograniczających nasilenie fibrynolizy⁹⁶. Zakrzep powstały w miejscu uszkodzenia blaszki miażdżycowej u pacjenta z OZW jest zbudowany z gęstej sieci włókien fibryny oraz elementów morfotycznych krwi, których udział zmniejsza się wraz z każdą godziną od początku objawów⁹⁷. Gęsto upakowane włókna fibryny są bardziej odporne na fibrynolizę. Takie cechy skrzepu fibrynowego obserwowane u chorych badanych w ciągu pierwszych 12 godzin

od początku OZW wiążą się z podwyższonym poziomem CRP oraz markera stresu oksydacyjnego, takiego jak 8-iso-PGF_{2α}⁹⁸.

PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) jest jednołańcuchową glikoproteina o charakterze protezy serynowej i masie 47 kilodaltonów, z centrum aktywnym zlokalizowanym w C-końcowym obszarze zymogenu. Natomiast w obszarze N-końcowym PAI-1 znajdują się domeny EGF, *finger* oraz *kringles*, które odpowiedzialne są za interakcje z receptorami komórkowymi i fibryną⁹⁹. PAI-1 występuje w organizmie w formie aktywnej, utajonej, pośredniej oraz w postaci kompleksów tPA/PAI-1. Aktywna postać PAI-1 jest uwalniana do osocza m.in. z komórek śródbłonna oraz mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Około 10% osoczowej puli PAI-1 powstaje w płytkach krwi. Ekspresja genu PAI-1 w komórkach regulowana jest poprzez wpływ szeregu substancji m.in. IL-6. PAI-1 w formie aktywnej stabilizowany jest w osoczu przez witronektynę, a kompleks ten łatwo dysocjuje w obecności tPA¹⁰⁰. PAI-1 w połączeniu z witronektynę staje się inhibitorem trombiny. Z kolei trombina po związaniu z trombomoduliną prowadzi, poprzez aktywację białka C, do inaktywacji PAI-1. Jeżeli zsyntetyzowane cząsteczki PAI-1 po przedostaniu się do krwi nie zostaną związane przez tPA lub z innymi cząsteczkami m.in. plazminą szybko ulegają zwinięciu w formę utajoną. Przejście PAI-1 z formy utajonej do aktywnej zachodzi pod wpływem czynników denaturujących lub na powierzchni fosfolipidów¹⁰¹.

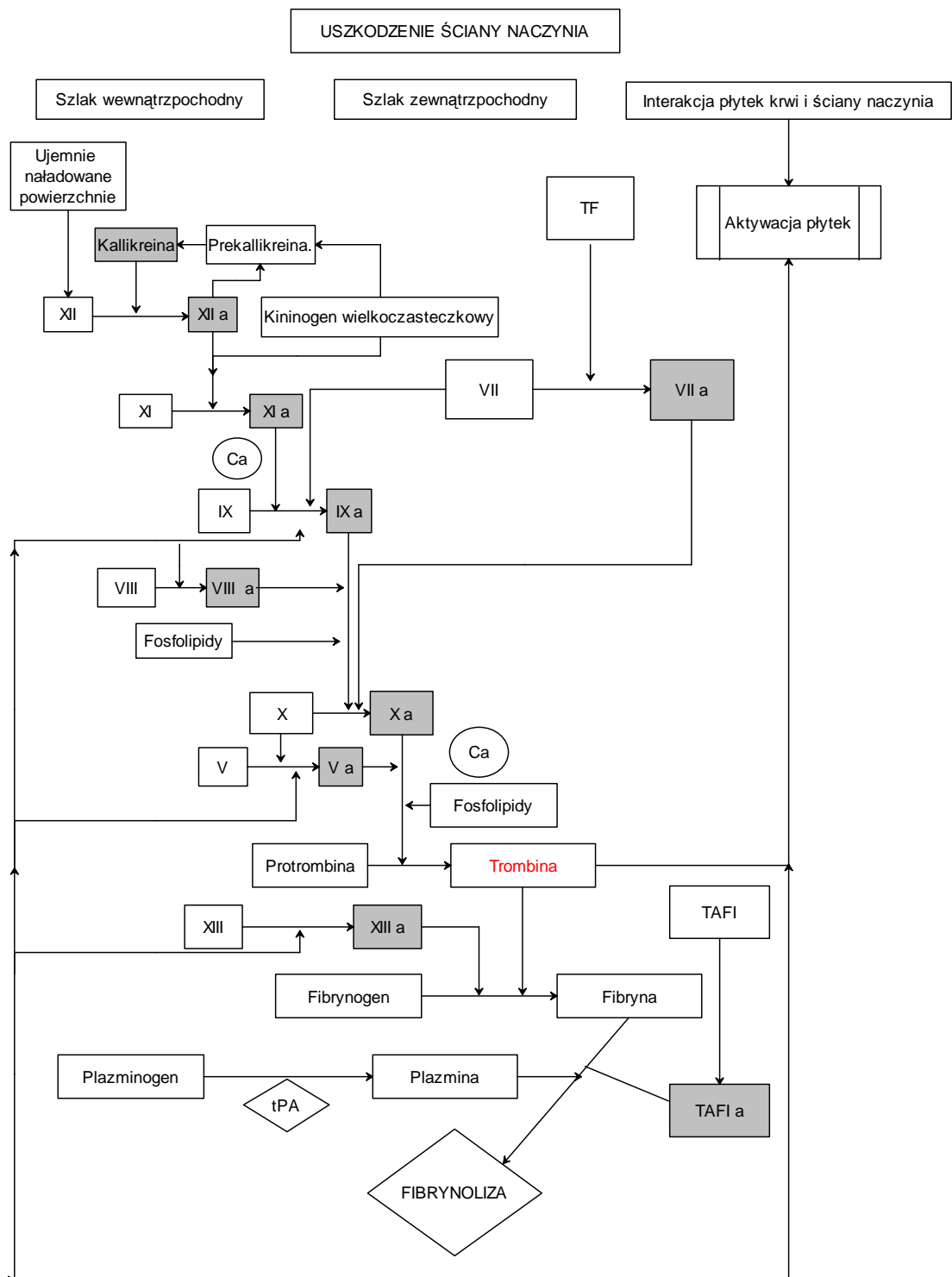
W warunkach fizjologicznych PAI-1 występuje w osoczu krwi głównie jako postać aktywna lub związana z t-PA. PAI-1 jest głównym inhibitorem aktywacji fibrynolizy, a jego rola polega na neutralizowaniu poprzez wytworzenie w stosunku 1 : 1 nieaktywnego kompleksu z tPA. Kompleks t-PA/PAI-1 jest następnie przy udziale białek receptorowych hepatocytów LRP (białko spokrewnione z receptorem

dla LDL) wychwytywany i usuwany z krążenia¹⁰². Innymi ważnymi funkcjami opisywanego wyżej peptydu jest hamowanie migracji komórek śródbłonna i mięśni gładkich oraz wytworzenie połączeń z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i receptorami dla LDL, co ostatecznie może wpływać na przebieg przebudowy naczyń¹⁰³. Udowodniono również, że wysoka aktywność PAI-1 ma związek ze składowymi zespołu metabolicznego¹⁰⁴. Stężenie PAI-1 w surowicy podlega rytmowi dobowemu. Obserwuje się wzrost jego stężenia w godzinach porannych oraz obniżenie w godzinach wieczornych, co ma niewątpliwie związek z obniżoną aktywnością fibrynolityczną i częstszym występowaniem OZW w godzinach porannych¹⁰⁵. Podwyższony poziom PAI-1 a przez to obniżona aktywność fibrynolityczna osocza jest charakterystyczna dla płci męskiej¹⁰⁶. Podobnie dzieje się u kobiet powyżej 60 roku życia, co tłumaczone jest kardioprotekcyjnym działaniem estrogenów w okresie przedmenopauzalnym¹⁰⁷. Powstawaniu skrzepliny w naczyniu wieńcowym sprzyjają zaburzenia układu fibrynolizy osoczowej, w którym zasadniczą rolę odgrywają t-PA i PAI-1¹⁰⁸⁻¹⁰⁹. Wysokie stężenie PAI-1 może być czynnikiem ryzyka wystąpienia zawału serca¹⁰⁷. U pacjentów z udokumentowaną, na podstawie koronarografii, miażdżycą naczyń wieńcowych zaobserwowano zwiększone ryzyko wystąpienia OZW w grupie chorych z wyższym stężeniem PAI-1¹¹⁰⁻¹¹¹.

Na podstawie wyników opublikowanych badań można stwierdzić, że podwyższony poziom PAI-1 pełni istotną rolę w patogenezie zawału serca. Uwolniony z uszkodzonego śródbłonna t-PA ulega bowiem w szybkim tempie inaktywacji przez PAI-1 do nieaktywnych kompleksów t-PA/PAI-1, zaś pozostała niezwiązana część bierze udział w aktywacji plazminogenu. Wielu autorów podaje, że wyjściowe istotne podwyższenie stężenia omawianego inhibitora u pacjentów

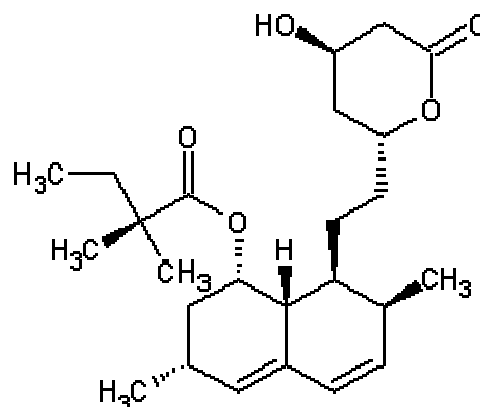
z OZW świadczy o niewydolności aktywności fibrynolitycznej osocza¹¹²⁻¹¹³. Liczne publikacje donoszą, że wysokie stężenie PAI-1 w osoczu krwi żyłnej u chorych z OZW poddanych leczeniu fibrynolitycznemu prowadzi do hamowania spontanicznie oraz farmakologicznie wywołanej fibrynolizy, co więcej, często predysponując do reokluzji naczynia dozawałowego¹¹⁴⁻¹¹⁵.

Rycina 5. Uproszczony schemat krzepnięcia i fibrynolizy



Inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA), zwane statynami, hamują reduktazę HMG-CoA na etapie syntezy mewalonianu i jednocześnie hamują powstawanie wszystkich izoprenoidów (pośrednie metabolity ww. szlaku), w tym farnezylopirofosforanu oraz geranylogeranylopirofosforanu (*Rycina 6-7*).

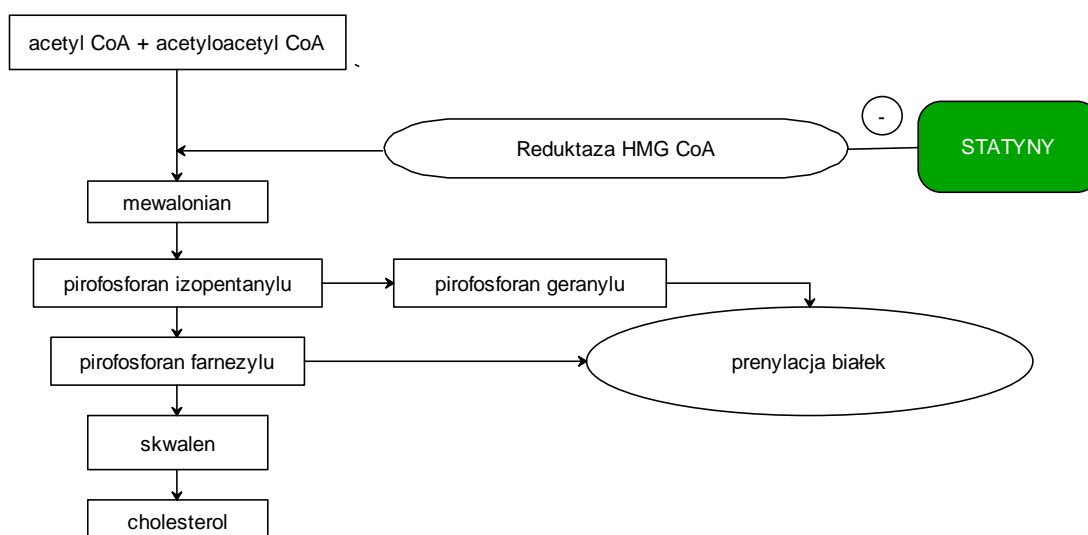
Rycina 6. Simwastatyna



Izoprenylacja, na skutek modyfikacji posttranslacyjnej, wpływa na aktywność białek sygnałowych należących do rodziny Rho, Ras i Rac wiążących trifosforan guanozyny (GTP)¹¹⁶. Białka te wpływają na efekторы aktywujące pewne elementy kaskady patogenetycznej różnych chorób. Szlak przekazywania wewnątrzkomórkowego z receptorów błonowych odbywa się za pośrednictwem białek Rho i Rac. Do pełnej aktywacji tych białek dochodzi na skutek geranylacji (Rho) oraz farnetylacji (Rac), gdzie donatorem cząsteczek jest synteza

mewalonianu. Sygnał podawany z receptorów błonowych i przekazywany następnie wewnątrzkomórkowo niejednokrotnie prowadzi, jak ma to miejsce w przypadku angiotensyny II, endoteliny czy czynników zapalnych, do postępującej destrukcji strukturalnej oraz upośledzenia czynności. Zahamowanie izoprenylacji białek przez statyny ogranicza w konsekwencji patologiczną przebudowę naczyń i serca. Kinazy Rho budzą zainteresowanie z uwagi na ich znaczenie w regulacji funkcji śródbłonna, natomiast Ras pełnią istotną rolę w onkogenezie. W kilku badaniach potwierdzono, że kinazy Rho regulują migrację komórek i przepuszczalność śródbłonna¹¹⁷⁻¹¹⁸. Ich aktywność realizuje się poprzez ułatwienie kontaktu z błoną cytoplazmatyczną, do czego niezbędna jest wcześniejsza prenylacja. Zahamowanie izoprenylacji zwiększa ilość nieaktywnych postaci kinaz w cytoplazmie. Inhibicja szlaku kinazy Rho wpływa na zwiększenie aktywności eNOS i wtórnie do tego zjawiska na rozkurcz naczyń, zmniejszenie aktywności wolnych rodników tlenowych oraz wzmożenie aktywności przeciwzapalnej¹¹⁶. Z kolei hamowanie białek sygnałowych Ras i Rac, poprzez wpływ na aktywność oksydazy NADPH, potęguje dalsze zmniejszenie aktywności wolnych rodników tlenowych¹¹⁶.

Rycina 7. Uproszczony schemat syntezy cholesterolu



Statyny przede wszystkim hamują syntezę endogennego cholesterolu, prowadząc do zmniejszenia stężenia cholesterolu całkowitego (TC), lipoprotein o małej gęstości (LDL-C) i niekiedy także triglicerydów (TG) oraz wzrostu cholesterolu lipoprotein o dużej gęstości (HDL-C). Zgodnie z obowiązującymi zaleceniami, wskaźnikiem służącym do oceny skuteczności leczenia hipolipemizującego jest LDL-C. W zależności od rodzaju i dawki zastosowanej statyny można uzyskać redukcję poziomu LDL-C o 20–60%¹¹⁹. U pacjentów po przebytych OZW zaleca się uzyskanie docelowo redukcji stężenia LDL-C < 70 mg/dl¹²⁰. Udowodniono bowiem, że efekty kliniczne u chorych obciążonych dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym są ściśle związane z obniżeniem poziomu LDL-C¹²¹. Wykazano, że zastosowanie we wczesnym okresie po wystąpieniu OZW atorwastatyny w dawce 20 mg prowadzi do zmniejszenia wielkości blaszki miażdżycowej, a zmiana ta koreluje z redukcją poziomu LDL-C¹²².

Obecnie wiele danych wskazuje, że zmniejszenie występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych w trakcie przyjmowania statyn wiąże się, przynajmniej częściowo, z efektami niezwiązanymi z obniżeniem stężenia LDL-C, m.in. ze stabilizacją blaszki miażdżycowej, działaniem przeciwzapalnym, przeciwzakrzepowym oraz profibrynolitycznym¹²³⁻¹²⁴.

Właściwości plejotropowe statyn są wynikiem przede wszystkim zahamowania przyłączenia przez te izoprenoidy cząsteczek lipidowych zwanych grupami prenylowymi (izoprenylacja), głównie geranogeranylacji, co wpływa na aktywność białek wewnątrzkomórkowych, które uczestniczą w wielu procesach wzrostu, apoptozy i różnicowania.

Zaburzenia metaboliczne, w tym nieprawidłowy profil lipidowy, mogą indukować miejscową i uogólnioną reakcję zapalną. Cholesterol może podsycać proces zapalny na skutek wzrostu aktywności czynnika transkrypcyjnego o działaniu prozapalnym - NF- κ B¹²⁵. Stwierdzono, że stosowanie statyn zmniejsza aktywność jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Przeciwwzapalne działanie statyn wyraża się często obserwowanym zmniejszeniem stężenia CRP i IL-6. W badaniu PROVE-IT TIMI-22 (*Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy: Thrombolysis in Myocardial Infarction 22*) podawanie atorwastatyny w dawce 80 mg/dobę u chorych po OZW prowadziło do znacznego zmniejszenia poziomu CRP. W przypadku rozuwastatyny stosowanej w badaniu JUPITER (*Justification for the Use of statins in Primary prevention: an International Trial Evaluating Rosuvastatin*) w dawce 20 mg/dobę obserwowano redukcję CRP aż o 37% u osób bez objawów chorób układu sercowo-naczyniowego¹²⁶. Pod wpływem terapii atorwastatyną w dawce 20 mg/dobę w porównaniu z placebo, prowadzonej przez 6 tygodni od wystąpienia OZW, zaobserwowano 28% różnicę w redukcji poziomu IL-6 na korzyść atorwastatyny¹²⁷. Atorwastatyna i simwastatyna, poprzez ograniczenie ekspresji receptora Toll like 4 (TL-4) uczestniczącego w aktywacji monocytów pod wpływem endotoksyn bakteryjnych, hamują proces postreceptorowej transmisji sygnału i ograniczają proces zapalny.

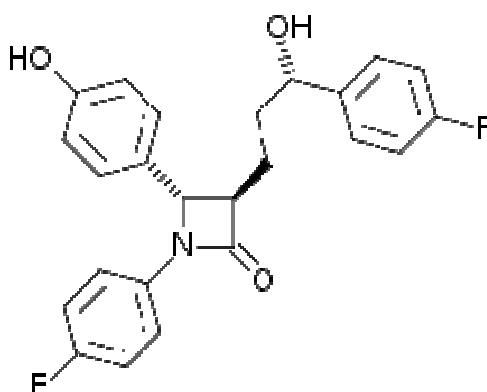
Statyny wywierają hamujący wpływ na układ krzepnięcia poprzez działanie na wielu etapach. Stwierdzono, że statyny takie jak simwastatyna i fluwastatyna w wyniku zahamowania aktywacji NF- κ B zmniejszają ekspresję RNA dla TF w hodowlach komórkowych¹²⁸. W innym badaniu *in vitro* zaobserwowano, że siła wpływu statyn na ekspresję TF była ściśle związana ze stopniem zahamowania

NF- κ B¹²⁹. Zmniejszenie ekspresji TF spowodowanego działaniem statyn jest związane z inhibicją aktywności szlaku białka Rho¹³⁰. Poprzez ograniczenie ekspresji TF na śródbłonku naczyniowym, monocytach, makrofagach, a także w obrębie blaszek miażdżycowych inhibitory HMG-CoA zmniejszają potencjał trombogenny krwi. Konsekwencją opisanego wyżej oddziaływania statyn jest zmniejszenie generacji trombiny, zahamowanie aktywacji FV i FXIII oraz zwolnienie konwersji fibrynogenu do fibryny¹³¹. Tego typu działanie obserwowano u stabilnych pacjentów z chorobą wieńcową już po 3 dniach stosowania simwastatyny w dawce 10-40 mg/dobę¹³²⁻¹³³. W badaniu JUPITER pokazano w przekonujący sposób na dużej populacji pacjentów z nieznacznie zwiększonym stężeniem LDL-C, że stosowanie rozuwastatyny w dawce 20 mg/dobę przez około 2 lata prowadzi do znacznego zmniejszenia ryzyka wystąpienia żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej¹³⁴. Ponadto udowodniono, że simwastatyna zmniejsza wytwarzanie TXB₂ oraz nasila fibrylizację poprzez hamowanie ekspresji PAI-1 oraz zwiększenie ekspresji tPA¹³⁵⁻¹³⁶. U osób obciążonych dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym wykazano, że simwastatyna stosowana przez 3 miesiące poprawia właściwości osocznego skrzepu fibrynowego poprzez wzrost jego przepuszczalności i przyspieszenie lizy¹³⁷.

Przeciwutleniające działanie statyn wiąże się ze zmniejszeniem stężenia 8-izoprostanów – markerów stresu oksydacyjnego, który może sprzyjać nadmiernej aktywacji krzepnięcia¹³⁸. Nie jest jednak jasne, czy statyny są wystarczająco silne, aby wpłynąć na przebieg reakcji krzepnięcia w OZW. Niedawno wykazano, że simwastatyna w dawce 40 mg/dobę włączona u pacjentów jeszcze przed wystąpieniem OZW wiąże się z mniejszą generacją trombiny w miejscu uszkodzenia naczyń obwodowych, ale nie w krwi żylny¹³⁹.

Ezetymib jest silnym selektywnym inhibitorem wchłaniania cholesterolu w jelitach (Rycina 8).

Rycina 8. Ezetymib



Całkowita pula cholesterolu w organizmie ludzkim dzieli się na cholesterol syntetyzowany *de novo* oraz cholesterol wchłaniany w przewodzie pokarmowym podczas trawienia. Na pulę cholesterolu egzogenego składa się w 30% cholesterol pokarmowy, którego źródłem są produkty pochodzenia zwierzęcego, w 50% cholesterol produkowany przez wątrobę i uwalniany do przewodu pokarmowego wraz z żółcią, w 20% cholesterol pochodzący ze złuszcających się komórek epitelialnych. W jelicie cienkim przy udziale kwasów żółciowych dochodzi do emulgacji cholesterolu, co prowadzi do powstania cholesterolu micelarnego. Zawarty w micelach cholesterol jest z kolei poprzez rąbek szczoteczkowy przekazywany do enterocytów. Znajdujący się w enterocycie cholesterol podlega za pośrednictwem transporterów kasetowych zawierających ATP (ABCG5/G8) zwrotnej eliminacji do światła jelita cienkiego lub ulega estryfikacji

przy udziale acylotransferazy cholesterolowej (ACAT). Na skutek tego ostatniego dochodzi do wytworzenia chylomikronów – struktur, powstałych przy współudziale białka MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), składających się z estrów cholesterolu połączonych z lipoproteinami zawierającymi białko apo B-48 i triglicerydy. Chylomikony poprzez naczynia chłonne i przewód piersiowy docierają do krwioobiegu. W naczyniach włosowatych tkanki tłuszczowej oraz mięśni ulegają pod wpływem lipaz hydrolizie do glicerolu oraz wolnych kwasów tłuszczowych (FFP).

Pierwotnie ezetymib został zaprojektowany jako lek blokujący ACAT. Jak obecnie dowiedziono, lek ten wiąże się z rąbkiem szczoteczkowym jelita cienkiego i wybiórczo hamuje wchłanianie cholesterolu. Ezetymib łączy się z białkiem Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) w nabłonku błony śluzowej jelita. Białko to odgrywa zasadniczą rolę we wchłanianiu cholesterolu do wnętrza komórki. Mechanizm działania ezetymibu polega na blokowaniu wchłaniania przez mikrokosmki enterocytów cholesterolu pochodzącego z pokarmu i żółci, dzięki blokadzie białka transportowego NPC1L1.

Gen NPC1L1 znajduje się na chromosomie 7. Białko to zlokalizowane jest jedynie w obrębie komórek nabłonka początkowego odcinka jelita cienkiego, w części komórki zorientowanej do światła jelita. Białko to zostało wykryte i opisane po raz pierwszy w roku 2004 przez zespół Altmanna¹⁴⁰. Myszy pozbawione właściwej ekspresji białka NPC1L1 wykazywały znaczne upośledzenie wchłaniania cholesterolu oraz były niewrażliwe na ezetymib¹⁴⁰.

Zasadnicze działanie ezetymibu polega na zmniejszeniu stężenia lipidów. Lek ten podany doustnie wpływa na ograniczenie puli cholesterolu transportowanego do wątroby.

Stosowanie ezetymibu zalecane jest w pierwotnej hipercholesterolemii w skojarzeniu ze statyną lub w monoterapii jako leczenie wspomagające dietę w grupie pacjentów, u których stosowanie inhibitorów reduktazy HMG-CoA jest przeciwwskazane lub ich skuteczność nie jest zadowalająca.

Ezetymib podany doustnie wchłania się szybko z przewodu pokarmowego. Sprzęgany jest głównie w postaci czynnego farmakologicznie glukuronianu ezetymibu. Ezetymib podlega szeregu przemianom w jelicie cienkim oraz wątrobie a następnie wydalany jest z żółcią. Główną frakcją, bo 80-90% występującego w osoczu, ezetymibu stanowi wspomniany wcześniej glukuronian ezetymibu, pozostała część, około 10%, to ezetymib. Glukuronian ezetymibu wiąże się z białkami osocza w około 90%, natomiast ezetymib w 99–100%. Wątrobowo jelitowe krążenie obu substancji jest znaczne – $t_{1/2}$ około 22 godzin. Wydalanie leku następuje w 78% z kałem, a w 11% z moczem. Zaobserwowano również, że na farmakokinetykę leku nie wpływa zarówno niewydolność nerek, jak i uszkodzenie czynności wątroby niewielkiego stopnia oraz zaawansowany wiek chorego.

Ezetymib w monoterapii zmniejsza wchłanianie cholesterolu o ok. 50%. Odzwierciedleniem tego działania jest obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego o 13%, cholesterolu frakcji LDL o 15–25% oraz TG o 10–15%. Ezetymib powoduje natomiast wzrost o 2-5% poziomu cholesterolu frakcji HDL.

Udowodniono, że ezetymib w dawce 10 mg/dobę podawany razem z atorwastatyną w dawce 10 do 40 mg/dobę działa nie tylko hipolipemizująco, zwiększając spadek cholesterolu LDL o około 20%, ale także nasila redukcję stężenia CRP związaną ze stosowaniem statyny¹⁴¹. Skojarzone leczenie ezetymibem jest atrakcyjną formą terapii służącą uzyskaniu zalecanego poziomu

LDL-C<70 mg/dl u pacjentów z dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym. Udowodniono, że leczenie simwastatyną 20 mg/dobę w połączeniu z ezetymibem 10 mg/dobę, w porównaniu z leczeniem rosuvastatyną 10 mg/dobę, prowadzi do bardziej efektywnej redukcji poziomu lipidów u chorych z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego¹⁴². Jednoczesne podawanie ezetymibu w dawce 10 mg/dobę z simwastatyną w dawce 40 mg/dobę, w porównaniu z simwastatyną w monoterapii, wiązało się ze zwiększeniem odsetka pacjentów z OZW, którzy uzyskali zalecany poziom LDL-C<70 mg/dl już w czwartej dobie leczenia¹⁴³.

Ezetymib może wywierać również pewne działania dodatkowe, podobne do tych opisanych dla statyn. W badaniu ENHANCE (*Ezetimibe and Simvastatin in Hypercholesterolemia Enhances Atherosclerosis Regression*) stosowanie simwastatyny w dawce 80 mg/dobę w monoterapii i w skojarzeniu z ezetymibem 10 mg/dobę prowadziło do redukcji poziomu CRP o 25,7% na korzyść podwójnej terapii. Z kolei sześciotygodniowa monoterapia ezetymibem w dawce 10 mg/dobę, w porównaniu z simwastatyną w dawce 20 mg/dobę u chorych z czynnym procesem zapalnym – reumatoidalne zapalenia stawów, prowadzi do istotnej redukcji poziomu CRP w obu grupach¹⁴⁴. Jednak skojarzona terapia ezetymibem i simwastatyną nie zmniejszała stężenia CRP u chorych z OZW¹⁴³.

Wpływ ezetymibu na procesy krzepnięcia i fibrynolizy jest mało znany. W badaniu eksperymentalnym porównującym terapię skojarzoną tj. simwastatyną w dawce dobowej 20 mg z ezetymibem w dawce 10 mg, w porównaniu z monoterapią simwastatyną w dawce 20 mg, stwierdzono, że ezetymib w dawce 10 mg/dobę nie wpływa na agregację płytek¹⁴⁵. Ezetymib może natomiast zmniejszać ekspresję PAI-1 w naczyniach i tkance tłuszczowej¹⁴⁵⁻¹⁴⁶. W modelu zwierzęcym, zastosowanym we wspomnianej wyżej pracy, wykazano, że podawanie myszom

przez 7 dni ezetymibu w najmniejszej maksymalnie blokującej wchłanianie cholesterolu dawce 5 mg/kg/dzień skutkuje obniżeniem o 60–70%, w porównaniu z grupą kontrolną, ekspresji mRNA PAI-1. Poziom antygenu PAI-1 nie uległ zmianie w trakcie badania, gdy ocenianym materiałem były wycinki aorty oraz tkanki tłuszczowej. Z kolei stosowanie w monoterapii ezetymibu w dawce 10 mg na dobę u chorych z zaburzonym profilem lipidowym istotnie wpływa na proces fibrylizy, co odzwierciedla redukcja stosunku PAI-1/tPA oraz poziomu tPA¹⁴⁷. Poziom PAI-1 podczas trzymiesięcznej obserwacji nie uległ znaczącej zmianie¹⁴⁷.

Ezetymib stosowany w monoterapii w dawce 10 mg/dobę oraz w skojarzeniu z simwastatyną w dawce 20 mg/dobę u pacjentów z zaburzeniami gospodarki lipidowej hamuje utlenianie¹⁴⁵. Stosowanie przez 12 tygodni ezetymibu w dawce 10 mg/dobę u pacjentów z hipercholesterolemią prowadzi do istotnego zmniejszenia poziomu markerów utleniania w tym 8-iso-PGF_{2α}¹⁴⁷. Lek ten dołączony do wcześniejszego leczenia statyną u pacjentów wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego prowadził do 11% redukcji poziomu markerów stresu oksydacyjnego w porównaniu z monoterapią statyną¹⁴⁸.

Warto zaznaczyć, że ezetymib może mieć także niekorzystne działanie. W badaniu SEAS (*Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis*) wykazano zwiększenie częstości wystąpienia nowotworów złośliwych u pacjentów przyjmujących ezetymib, jednak zarzut ten poddano w wątpliwość na podstawie wyników zbiorczej analizy dostępnych badań z tym lekiem¹⁴⁹⁻¹⁵⁰. Z kolei w badaniu ARBITER 6-HALTS (*Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol 6: HDL and LDL Treatment Strategies in Atherosclerosis*), w którym porównywano leczenie skojarzone statyną z kwasem nikotynowym

w dawce 2000 mg/dobę lub ezetymibem w dawce 10 mg/dobę, stwierdzono, że w grupie ezetymibu obniżenie stężenia LDL-C paradoksalnie wiązało się ze zwiększeniem grubości kompleksu intima-media tętnic szyjnych¹⁵¹.

Obecnie toczy się badanie IMPROVE-IT (*Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial*), w którym ocenia się skuteczność terapii ezetymibem w połączeniu z simwastatyną. Wyników badania należy spodziewać się w czerwcu 2013 roku¹⁵²⁻¹⁵³. IMPROVE-IT jest badaniem wieloośrodkowym, prospektywnym, randomizowanym, prowadzonym metodą podwójnie ślepej próby, zaprojektowanym w celu oceny korzyści i bezpieczeństwa zastosowanej u pacjentów z wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym terapii simwastatyną w dawce 40 mg/dobę skojarzonej z ezetymibem w dawce 10 mg/dobę, w porównaniu z monoterapią simwastatyną w dawce 40 mg/dobę. W trakcie badania wykonywane są oznaczenia poziomu LDL-C. Uzyskanie w trakcie badania stężenia lipidów frakcji LDL powyżej założonego poziomu skutkować będzie zwiększeniem dawki simwastatyny do 80 mg/dobę. Kryteria niezbędne do włączenia chorego do badania IMPROVE-IT to: wiek pacjenta powyżej 18 roku życia, przebyty w okresie ostatnich 10 dni OZW, poziom LDL-C < 125 mg/dl u chorych, którzy wcześniej byli poddani terapii statyną, poziom LDL-C < 100 mg/dl u chorych, którzy wcześniej nie byli poddani terapii statyną.

W badaniu zostanie ocenione bezpieczeństwo stosowania terapii skojarzonej u pacjentów wysokiego ryzyka sercowo naczyniowego, jego wpływ na ryzyko wystąpienia niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych oraz mechanizmów jego uzyskania.

Aktualnie badaniu IMPROVE-IT towarzyszy wiele kontrowersji dotyczących zarówno użytego do oceny badania modelu statystycznego, efektu terapii

ezetymibem jak też spodziewanej niewielkiej redukcji liczby niekorzystnych zdarzeń¹⁵⁴.

Dotąd nie opublikowano badań dotyczących potencjalnych dodatkowych efektów takiego skojarzonego leczenia hipolipemizującego, zwłaszcza parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy u pacjentów z OZW. Dane takie mogłyby pomóc wyjaśnić często niejednoznaczne wyniki badań klinicznych, w których podawano ezetymib wraz ze statyną, oraz ocenić rolę obserwacji z badań eksperymentalnych w terapii stosowanej u ludzi.

Statyny przynoszą, poza silnym działaniem hipolipemizującym, dodatkowe efekty kardioprotekcyjne, takie jak poprawa dysfunkcji śródbłonna, ograniczenie reakcji zapalnej, stabilizacja blaszki miażdżycowej oraz osłabienie aktywacji układu krzepnięcia. Dane potwierdzające istnienie tych efektów pochodzą z badań *in vitro* oraz badań klinicznych prowadzonych głównie u chorych ze stabilną postacią choroby wieńcowej.

Badania MIRACL (*Effects of Atorvastatin on Early Recurrent Ischemic Events in Acute Coronary Syndromes*) i PROVE IT wykazały, że intensywne leczenie hipolipemizujące za pomocą statyn przynosi istotne korzyści kliniczne u chorych po OZW. Narodowy Program Edukacji Cholesterolowej rekomenduje dążenie w owej grupie chorych bardzo dużego ryzyka do stężenia cholesterolu LDL < 70 mg/dl (1,8 mmol/l). Zmniejszenie liczby incydentów wieńcowych (głównie pochodzenia zakrzepowego) u osób przyjmujących statynę wydaje się sugerować, że leczenie hipolipemizujące może wywierać także działanie przeciwzapalne i przeciwzakrzepowe. Jednak OZW wiąże się z nasilonym stanem prozakrzepowym, w którym wzmożona produkcja trombiny może utrzymywać się przez wiele miesięcy. W dwóch dotychczas przeprowadzonych małych badaniach klinicznych nie udało się wykazać, aby u chorych po OZW atorwastatyna lub prawastatyna zmniejszały generację trombiny ocenianą we krwi obwodowej. Wnioski uzyskane z przeprowadzonych do tej pory badań sugerują, że wczesne wdrożenie do farmakoterapii chorych z OZW dużych dawek statyn może przynieść wymierne korzyści.

Praca zmierza do uzyskania odpowiedzi, czy stosowanie simwastatyny wpływa na aktywację układu krzepnięcia oraz proces zapalenia u chorych po OZW i czy ten przypuszczalny efekt może być wzmocniony przez dołączenie innego leku silnie obniżającego stężenie cholesterolu, tj. ezetymibu.

Ezetymib wykazuje, poza działaniem hipolipemizującym podobnym do statyn, pewne dodatkowe potencjalnie korzystne efekty wpływające na redukcję procesów oksydacji i ograniczenie procesu zapalnego. Dane te pochodzą z badań prowadzonych na zwierzętach oraz na chorych obciążonych zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym.

Cele pracy:

1. Analiza wpływu leczenia hipolipemizującego simwastatyną 40 mg/d lub simwastatyną 40 mg/d wraz z ezetymibem 10 mg/d na nasilenie procesu zapalnego, stresu oksydacyjnego, aktywację płytek krwi, generacji trombiny i aktywności fibrynolizy w pierwszych miesiącach po OZW.
2. Ocena zależności między wyżej wymienionymi zmiennymi a zmianami profilu lipidowego w czasie terapii hipolipemizującej.

Pacjenci przyjęci w trybie pilnym do Centrum Interwencyjnego Leczenia Chorób Serca i Naczyń w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II z powodu OZW w celu wykonania pilnej diagnostyki inwazyjnej choroby niedokrwiennej mięśnia sercowego i leczenia.

Kryteria włączenia:

Rozpoznanie OZW – niestabilna dławica piersiowa lub świeży zawał mięśnia sercowego bez lub z uniesieniem odcinka ST w ciągu 12 godzin od początku objawów. Zażycie przynajmniej 300 mg ASA co najmniej 1 godzinę przed przyjęciem do szpitala.

Kryteria wykluczenia:

1. ostry incydent sercowo-naczyniowy w ciągu ostatnich 3 miesięcy przed badaniem,
2. wstrząs kardiogeny,
3. skaza krwotoczna w wywiadzie,
4. ostra choroba infekcyjna,
5. nadczynność lub niedoczynność tarczycy,
6. cukrzyca wymagająca insulinoterapii,

7. leczenie antagonistami witaminy K lub innymi niż ASA niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, glukokortykosteroidami, oraz lekami hipolipemizującymi innymi niż statyny,
8. choroby mięśni,
9. choroby psychiczne,
10. ciężkie choroby współistniejące: rozpoznany aktywny nowotwór złośliwy, uszkodzenie wątroby (zwiększenie aktywności aminotransferazy alaninowej - (ALAT) $\geq 1,5$ razy powyżej górnej granicy normy), niewydolność nerek (stężenie kreatyniny $>140 \mu\text{mol/l}$),
11. brak zgody pacjenta na udział w badaniu.

3.1 Schemat badania

Badanie prospektywne z utajoną randomizacją prowadzone metodą podwójnej ślepej próby z użyciem placebo.

3.2 Protokół badania

U wszystkich chorych przy przyjęciu przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe. Wykonano EKG z 12 odprowadzeń. Oznaczono: stężenie glukozy, kreatyniny, fibrynogenu, troponiny I, aktywność kinazy kreatynowej (CK) wraz z izoenzymem MB (CK-MB) oraz lipidogram w surowicy krwi (*Rycina 9*).

U chorych została wykonana koronarografia i w razie wskazań rewaskularyzacja przezskórna. Zabiegi diagnostyczne wykonano z nakłucia prawej tętnicy udowej przy użyciu standardowych cewników diagnostycznych 6F.

U części pacjentów, natychmiast po koronarografii, została wykonana przezskórna pierwotna angioplastyka tętnic wieńcowych (PCI). Zabiegi terapeutyczne wykonywano po uprzednim podaniu heparyny niefrakcjonowanej w dawce 100j/kg i osiągnięciu aktywowanego czasu krzepnięcia (ACT) >240 s; w przypadku użycia blokera receptorów IIb/IIIa (abciksymb – ReoPro) ACT wynosiło ok. 200 s.

W trakcie zabiegów PCI używano:

- standardowych cewników prowadzących,
- przewodników wieńcowych: BMW, BHW, Whisper LS, MS i ES, Pilot 50,
- cewników balonowych: Sprinter, Maverick,
- trombektomów: Diver CE MAX,
- stentów metalowych (BMS): Liberte, Vision, Driver, Artos, Zeta, Volo, Skylor, Gazelle, Blazer,
- stentów uwalniających substancję antymitotyczną (DES): Endeavor .

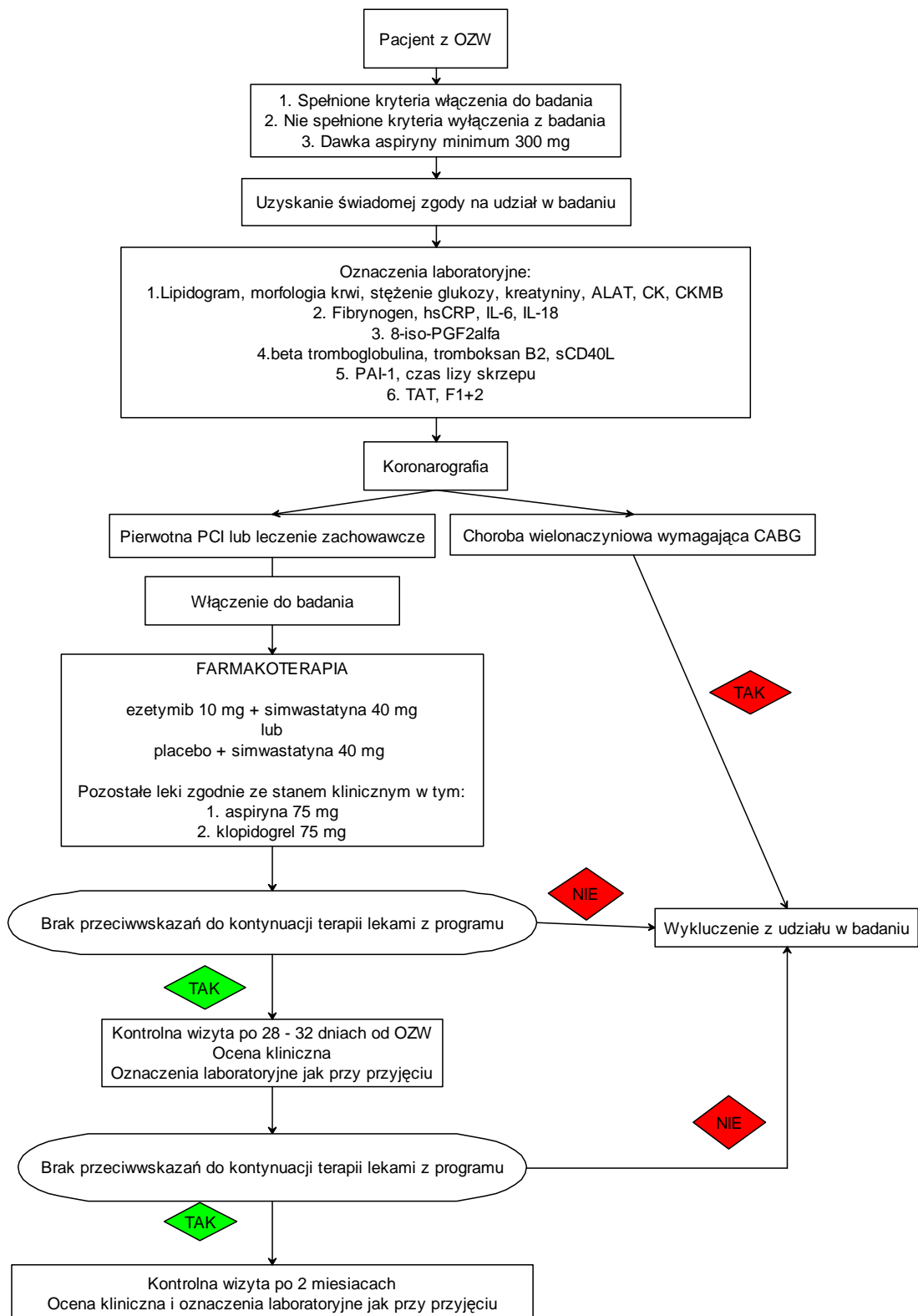
Po zabiegu pierwotnej angioplastyki kaniule naczyniowe służące do uzyskania dostępu „udowego” usuwano po normalizacji czasu częściowej trombolastyny po aktywacji (APTT - *Activated Partial Thromboplastin Time*).

Pacjenci włączeni do badania zostali losowo przydzieleni (bez względu na wyjściowe stężenie cholesterolu) do jednej z 2 grup:

1. leczonej simwastatyną w dawce 40 mg na dobę i placebo, lub
2. leczonej simwastatyną w dawce 40 mg dziennie i ezetymibem w dawce 10 mg na dobę.

Preparaty (simwastatyna, placebo, ezetymib) użyte w badaniu udostępnił producent, Merck Sharp and Dohme.

Rycina 9. Protokół badania



Zaplanowano włączenie co najmniej 25 chorych do każdej z 2 grup. Liczbę tę oszacowano na podstawie danych z badania Chenota i wsp. nad skutecznością takich schematów leczenia w OZW¹⁴³.

Czas monitorowanej terapii w obu grupach wyniósł 2 miesiące. W tym okresie pacjenci pozostawali pod nadzorem Poradni Kardiologicznej Instytutu Kardiologii i otrzymywali wszystkie inne leki zgodne z wytycznymi, w tym ASA i kłopidogrel.

Ocena kliniczna i oznaczenia laboratoryjne były wykonywane trzykrotnie:

1. 24 godziny po przyjęciu do szpitala,
2. po 28-32 dniach od przyjęcia pierwszej dawki simwastatyny lub simwastatyny z ezetymibem,
3. po upływie 2 miesięcy leczenia simwastatyną lub simwastatyną z ezetymibem.

Oznaczenia

Podczas każdej wizyty chorego oznaczono następujące parametry:

1. lipidogram, morfologia krwi obwodowej oraz stężenie glukozy, kreatyniny, ALAT, CK i CK-MB w surowicy krwi oznaczane metodami standardowymi w szpitalnym laboratorium (*Tabela 2*).

Tabela 2. Opis wykonywanych badań podstawowych

Parametr	Zakres referencyjny	Metoda	Zestaw (producent)
Cholesterol całkowity	3,1–5,2 mmol/l	Enzymatyczna z esterazą i oksydazą cholesterolową	Dimension RXL (Siemens)
LDL – cholesterol	do 2,84 mmol/l	Homogenna metoda bezpośrednia	Dimension RXL (Siemens)
HDL – cholesterol	1,04–1,55 mmol/l	Homogenna metoda bezpośrednia z syntetycznym polimerem i detergentem (met. SPD Daiichi)	Dimension RXL (Siemens).
Triglicerydy	do 1,7 mmol/l	Z oksydazą fosfoglicerolu (GPO) i oznaczeniem H ₂ O ₂ (z peroksydazą)	Dimension RXL (Siemens).
Płytki krwi	140–440 tys/ μ l	Krew pełna EDTA	Sysmex XT 2000i Sysmex KX 21
Glukoza	3,4–5,6 mmol/l	Heksokinazowa	Dimension RXL (Siemens)
Kreatynina	M: 71–115 μ mol/l K: 53–88 μ mol/l	Kinetyczna Jaffe z alkalicznym pikrynianem	Dimension RXL (Siemens)
ALAT	M: do 45 U/l K: do 34 U/l	Wg IFCC z NADH, z zastosowaniem 5–fosforanu pirydoksalu (P5P) i buforu TRIS.	Dimension RXL (Siemens)
CK	M: do 171 U/l K: do 145 U/l	Enzymatyczna z ADP i NADPH, 340 nm	Dimension RXL (Siemens)
CKMB	Do 24 U/l	Immunoinhibycyjna polegająca na wykrywaniu niezablokowanej podjednostki CKMB.	Dimension RXL (Siemens)

2. markery zapalenia – fibrynogen w osoczu cytrynianowym i CRP metodą o wysokiej czułości, IL-6 i IL-18 w surowicy (*Tabela 3*).

Tabela 3. Opis badań markerów zapalnych

Parametr	Zakres referencyjny	Metoda	Aparat (firma) / Zestaw (producent)
Hs-CRP	0–3 mg/l	Metoda turbidymetrycznego testu immunologicznego typu particie – enhanced (PETIA) (minimalna wykrywalna ilość = 0,5 mg/dl).	Dimension RXL (Siemens)
Fibrynogen	1,8–3,5 g/l	Modyfikowana metoda Claussa	BSC (Siemens).
IL-6	osocze EDTA: 0,428–8,87 pg/ml , osocze cytrynianowe: 0,435–9,57 pg/ml , surowica: 0,447–9,96 pg/ml; czułość: 0,016–0,111pg/ml	ELISA	R&D Systems, UK
IL-18	36,1-257,8 pg/ml czułość metody 12,5 pg/ml	ELISA	R&D Systems, UK

3. marker stresu oksydacyjnego – 8-iso-PGF_{2α} (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) w surowicy. Zakres referencyjny 35±6 pg/ml.

4. markery aktywacji płytek krwi – β -tromboglobulina (β -TG) w osoczu cytrynianowym (Diagnostica Stago, Asnieres, France), tromboksan B₂ (TXB₂) w surowicy (Cayman Chemicals), rozpuszczalny ligand CD40 (sCD40L) w osoczu wersenianowym (R&D Systems, UK) (Tabela 4).

Tabela 4. Opis badań markerów płytkowych

Parametr	Zakres referencyjny	Metoda	Zestaw (producent)
β -TG	<50, zakres pomiarowy metody: 5-250 UI/ml	ELISA	Diagnostica Stago Asnieres, France
TXB ₂	czułość: 176 pg/ml	ELISA	Cayman Chemicals
sCD40L	Na zdrowych ochotnikach - nieustalone	ELISA	R&D Systems, UK

5. markery fibrynolizy - PAI-1 (ELISA, American Diagnostica), czas lizy osoczowego skrzepu fibrynowego (CLT) metodą wg Lismana i wsp.¹⁵⁵.

Ocena czasu lizy skrzepu wg. Lismana polegała na dodaniu TF rozcieńczonego 10⁵ razy (Innovin, Siemens), rekombinowanego t-PA (Actylise) o stężeniu 56 ng/ml, CaCl₂ o stężeniu 17 mM, fosfolipidów błonowych o stężeniu 10 μ M do 75 μ l osocza cytrynianowego. Następnie całość uzupełniono do 150 μ l buforem HEPES (25 mM Hepes, 137 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 0,1% BSA, pH 7,4) a potem poddano badaniu 100 μ l tak utworzonej mieszaniny w spektrofotometrze (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA, USA), gdzie oceniono stopień zmętnienia przy fali długości 405 nm, w temperaturze 37°C¹⁵⁵.

6. markery generacji trombiny - TAT i F1+2 (Siemens, Marburg, Germany)

(Tabela 5).

Tabela 5. Opis badań markerów krzepnięcia

Parametr	Zakres referencyjny	Metoda	Zestaw (producent)
TAT	2,0–4,2 $\mu\text{g/l}$	ELISA	Siemens Enzygnost, Marburg, Germany
F1+2	69-229 pmol/l	ELISA	Siemens Enzygnost, Marburg, Germany

3.4 Analiza statystyczna

Obliczenia wykonano na komputerze typu PC (Windows, Microsoft) z zastosowaniem programów Statistica (Statsoft) i Excel (Microsoft). Wartości przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe (SD) lub błąd standardowy średniej (SEM), zaś w przypadku rozkładów nie spełniających kryteriów rozkładu normalnego jako medianę (IQR przedział międzykwartylowy). Zgodność z rozkładem normalnym sprawdzano z zastosowaniem testu Shapiro-Wilka. Dla porównania wyników w poszczególnych grupach w przypadku rozkładu normalnego stosowano test t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych, a w pozostałych sytuacjach test U Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych. Korelacje oceniano testem Spearmana lub Pearsona odpowiednio do rozkładu zmiennych. Za istotną statystycznie przyjęto wartość prawdopodobieństwa $p < 0,05$.

4.1 Charakterystyka badanych grup

Zgodę na udział w badaniu wyraziła grupa 63 pacjentów przyjętych do KSS im. Jana Pawła II z powodu OZW spełniających kryteria włączenia do badania. Pacjentów włączano i obserwowano od 15 czerwca 2008 do 7 lipca 2009. Ostatecznie 57 chorych z OZW zostało włączonych do badania i losowo przydzielonych do jednej z 2 grup: grupy leczonej simwastatyną w dawce 40 mg/dobę z ezetymibem w dawce 10 mg/dobę (n=28) lub do grupy otrzymującej w miejsce ezetymibu placebo (n=29). Jeden pacjent nie otrzymał leków, ponieważ ostatecznie rozpoznano u niego zatorowość płucną. Kolejnych dwóch po rewaskularyzacji przezskórnej zakwalifikowano do dalszego leczenia kardiochirurgicznego. Spośród 54 chorych, którzy otrzymywali badany lek, 46 pacjentów zostało uwzględnionych w końcowej analizie statystycznej (grupa ezetymibu [n=20] i grupa placebo [n=26]). Sześciu pacjentów z grupy ezetymibu i dwóch pacjentów z grupy placebo zostało wyłączonych z badania (p=0,2). Powodem wyłączenia były: nietolerancja leku (niestrawność i biegunka, grupa ezetymibu [n=1] grupa placebo [n=1]), konieczność podawania warfaryny z powodu migotania przedsionków (grupa ezetymibu [n=1]), brak współpracy chorych w trakcie badania [n=5]. Wszystkich chorych wykluczono w stanie stabilnym, klinicznie klasa CCS (*Canadian Cardiology Society*) 0 (n=7) lub klasa CCS 2 (n=1). Incydenty OZW nie były zgłaszane w ciągu pierwszych 6 i 12 miesięcy (kontakt telefoniczny po 6 i 12 miesiącach od włączenia do badania).

Obydwie grupy nie różniły się w odniesieniu do zmiennych demograficznych i klinicznych (*Tabela 6*).

Tabela 6. Charakterystyka badanych grup

	Ezetymib + Simwastatyna (n=20)	Placebo + Simwastatyna (n=26)	p
Wiek, lata	58,5 ± 1,9	56,2 ± 1,7	0,37
Mężczyźni, n (%)	14 (70,0)	21 (80,8)	0,49
BMI, wskaźnik masy ciała (kg/m ²)	26,9 [3,9]	27,5 [3,6]	0,89
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	13 (65,0)	12 (46,1)	0,24
Cukrzyca typu 2, n (%)	1 (5,0)	1 (3,8)	1,0
Przebyty zawał serca, n (%)	2 (10,0)	4 (15,4)	0,68
Hypercholesterolemia, n (%)	11 (55,0)	16 (61,5)	0,77
Palenie tytoniu, n (%)	10 (50,0)	10 (38,5)	0,55
Wcześniejsze stosowanie statyn, n (%)	5 (25,0)	7 (26,9)	1,0
Wcześniejszy epizod niedokrwienia centralnego systemu nerwowego (CSN), n (%)	1 (5,0)	1 (3,8)	1,0

Dane ilościowe zaprezentowane jako średnia ± SD odchylenia standardowego lub mediana [IQR - odstęp międzykwartyłowy] oraz porównane testem t-Studenta lub U-Manna Whitneya, w zależności od normalności rozkładu prawdopodobieństwa testowanego testem Shapiro Wilka. Dane jakościowe porównano testem Fishera.

Pacjenci otrzymali standardowe leczenie farmakologiczne. Przez cały okres obserwacji wszyscy chorzy stosowali leczenie przeciwplatekcyjne – kłopidogrel w dawce 75 mg/dobę oraz ASA w dawce 75 mg/dobę.

Wyjściowo obie grupy chorych różniły się istotnie statystycznie w zakresie przyjmowania inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEI) - odpowiednio w grupie ezetymibu [n=17], w grupie placebo [n=26] (p = 0,04) (*Tabela 7*).

Tabela 7. Farmakoterapia

	Ezetymib + Simwastatyna (n=20)	Placebo + Simwastatyna (n=26)	p
Wyjściowo			
ASA, n(%)	20 (100)	26 (100)	1,00
klopidogrel, n(%)	20 (100)	26 (100)	1,00
beta bloker, n(%)	20 (100)	25 (96,15)	0,37
inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI), n(%)	17 (85)	26 (100)	0,04
diuretyk, n(%)	1 (5)	2 (7,69)	0,71
inhibitory pompy protonowej, n(%)	11 (55)	12 (46,15)	0,55
inne, n(%)	2 (10)	5 (19,23)	0,39
Po 1 miesiącu			
ASA, n(%)	20 (100)	26 (100)	1,00
klopidogrel, n(%)	20 (100)	26 (100)	1,00
beta bloker, n(%)	20 (100)	25 (96,15)	0,37
ACEI, n(%)	19 (95)	26 (100)	0,25
diuretyk, n(%)	1 (5)	2 (7,69)	0,71
inhibitory pompy protonowej, n(%)	6 (30)	11 (42,31)	0,39
inne, n(%)	0 (0)	5 (19,23)	0,04
Po 2 miesiącach			
ASA, n(%)	20 (100)	26 (100)	1,00
klopidogrel, n(%)	20 (100)	26 (100)	1,00
beta bloker, n(%)	20 (100)	25 (96,15)	0,37
ACEI, n(%)	19 (95)	26 (100)	0,25
diuretyk, n(%)	1 (5)	2 (7,69)	0,71
inhibitory pompy protonowej, n(%)	7 (35)	9 (34,62)	0,98
inne, n(%)	0 (0)	5 (19,23)	0,04

Metodyka i oznaczenia jak w tabeli 6

4.2 Dane kliniczne i angiograficzne OZW

Czas, jaki upłynął od początku wystąpienia spoczynkowych dolegliwości bólowych w klatce piersiowej do rozpoczęcia hospitalizacji i leczenia w KSS im. Jana Pawła II w grupie pacjentów z NSTEMI, wyniósł średnio 10,5 godziny, a w grupie chorych z STEMI czas trwania dolegliwości wyniósł średnio 4,5 godziny. W grupie leczenia skojarzonego czas „door to balloon” uzyskano średnio na poziomie 6,5 godziny, natomiast w grupie monoterapii 4,5 godziny (*Tabela 8*). W grupie ezetymibu u 12 pacjentów rozpoznano STEMI, a u pozostałych chorych NSTEMI. W grupie placebo STEMI rozpoznano u 23 chorych, z kolei NSTEMI zdiagnozowano u 3 pacjentów ($p=0,03$, dokładny test Fischera) (*Tabela 8*). Naczyniami dozawałowymi najczęściej były gałąź międzykomorowa przednia lewej tętnicy wieńcowej (LAD, *left anterior descending*) i prawa tętnica wieńcowa (RCA, *right coronary artery*) - w grupie ezetymibu odpowiednio 4 i 11, a w grupie placebo 10 i 7 ($p=0,16$) (*Rycina 10-11*).

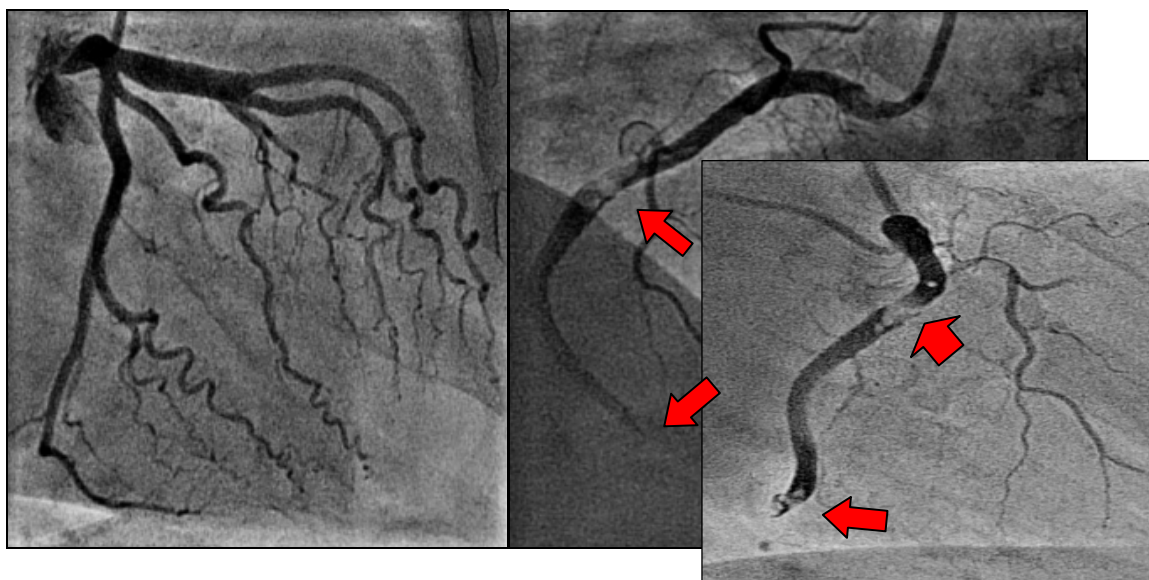
Wszyscy pacjenci otrzymali ASA przed lub w chwili przyjęcia do szpitala. Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do udziału w badaniu zostali poddani koronarografii. Nie stwierdzono znamienych różnic między porównywanymi grupami pod względem czasu trwania bólu zawałowego oraz początkowego stężenia troponiny I i CK-MB (*Tabela 8*).

Tabela 8. Podstawowe dane charakteryzujące ostre zespoły wieńcowe

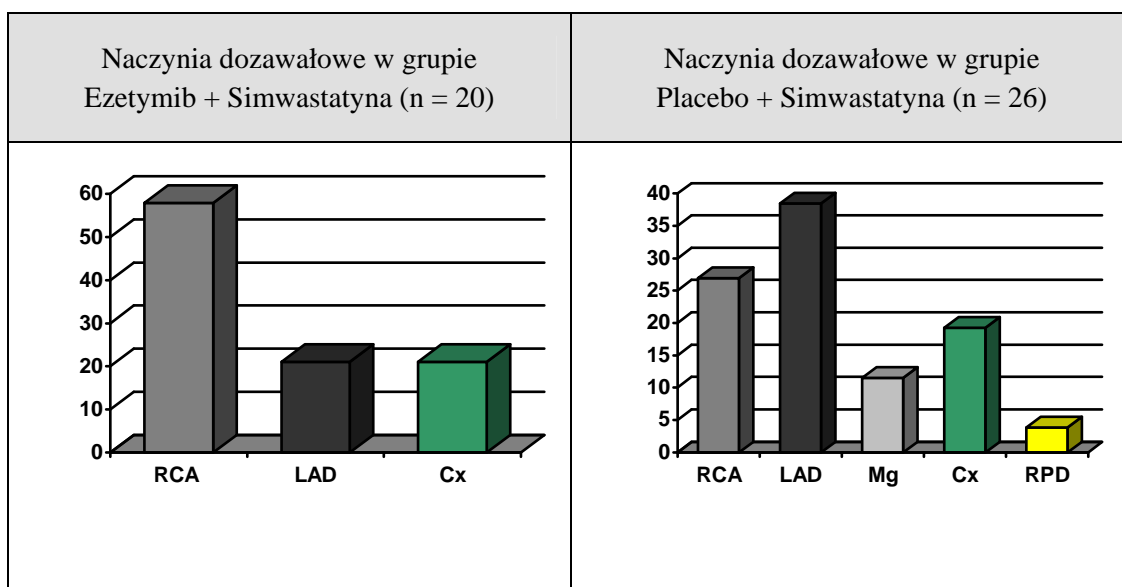
	Ezetymib + Simwastatyna (n=20)	Placebo + Simwastatyna (n=26)	p
Czas od początku wystąpienia OZW, (h)	6,5 (7,5)	4,5 (7,0)	0,26
NSTEMI, n(%)	8 (40,0)	3 (11,5)	0,03
Troponina I (ng/ml)	0,61 (3,43)	0,64 (6,73)	0,67
CK-MB (IU/l)	21,5 (18,0)	24,5 (73,0)	0,53
Implantacja stentu, n(%)	18 (90,0)	24 (92,3)	0,78
Ilość naczyń wieńcowych istotnie zwężonych angiograficznie, n	1,0 [1,0]	1,0 [0,0]	0,11
TIMI przed zabiegiem pierwotnej PCI	0,0 [2,0]	0,0 [2,0]	0,71
TIMI po zabiegu pierwotnej PCI	3,0 [0,0]	3,0 [0,0]	0,63
Trombektomia aspiracyjna, n(%)	1 (5,3%)	6 (23,1%)	0,10
Średnica implantowanego stentu, mm	3,5 [0,5]	3,5 [0,5]	0,12
Długość implantowanego stentu, mm	19,1 ± 5,42	19,5 ± 5,21	0,82
Maksymalne ciśnienie rozprężenia stentu, atm	15,0 [2,0]	16,0 [4,0]	0,76
Okołozabiegowo stosowanie blokera receptora płytkowego IIb/IIIa (ReoPro), n(%)	3 (15,8%)	6 (23,1%)	0,55
Dysekcje, n(%)	0 (0,0%)	3 (11,5%)	0,13
Powikłania, n(%)	0 (0,0%)	2 (7,7%)	0,22
Jednoczasowa angioplastyka kolejnego naczynia, n(%)	2 (10,5%)	2 (7,7%)	0,74
Implantacja więcej niż 1 stentu, n(%)	0 (0,0%)	4 (15,4%)	0,07

Metodyka i oznaczenia jak w tabeli 6

Rycina 10. Obraz lewej i prawej tętnicy wieńcowej z koronarografii z zakrzepem, wskazanym na rycinie przez strzałki, w prawej tętnicy wieńcowej



Rycina 11. Naczynia dozawałowe w grupie ezetymibu i placebo

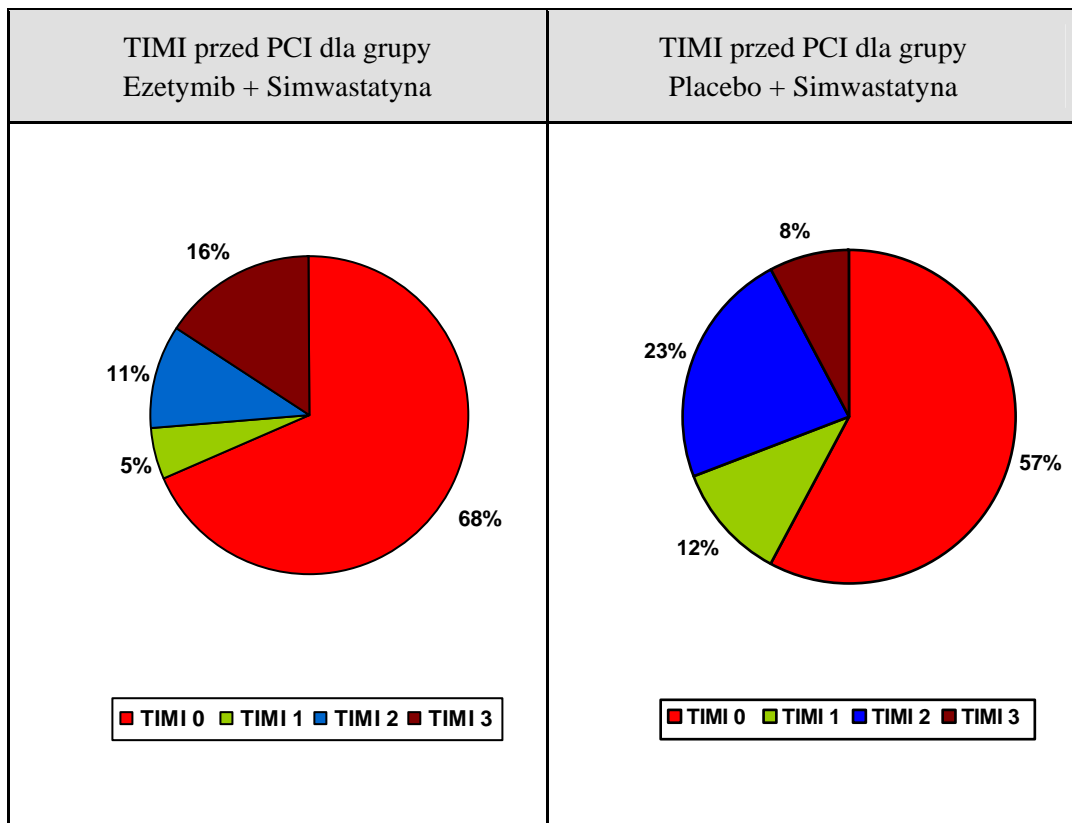


Według skali TIMI (*Thrombolysis In Myocardial Infarction*) służącej do wzrokowej oceny przepływu kontrastu w tętnicach wieńcowych, gdzie:

- TIMI 0 – niedrożność naczynia, brak przepływu (zakontrastowania) naczynia w trakcie koronarografii,
- TIMI 1 – przepływ znacznie upośledzony, częściowe zakontrastowanie naczynia dystalnie do miejsca zwężenia,
- TIMI 2 – naczynie kontrastuje się całkowicie, przepływ przez naczynie zwolniony,
- TIMI 3 – naczynie o prawidłowym przepływie,

brak przepływu w naczyniu dozawałowym (TIMI 0) stwierdzono u 13 (68,42%) chorych w grupie ezetymibu oraz u 15 (57,69%) chorych w grupie placebo (*Rycina 12*).

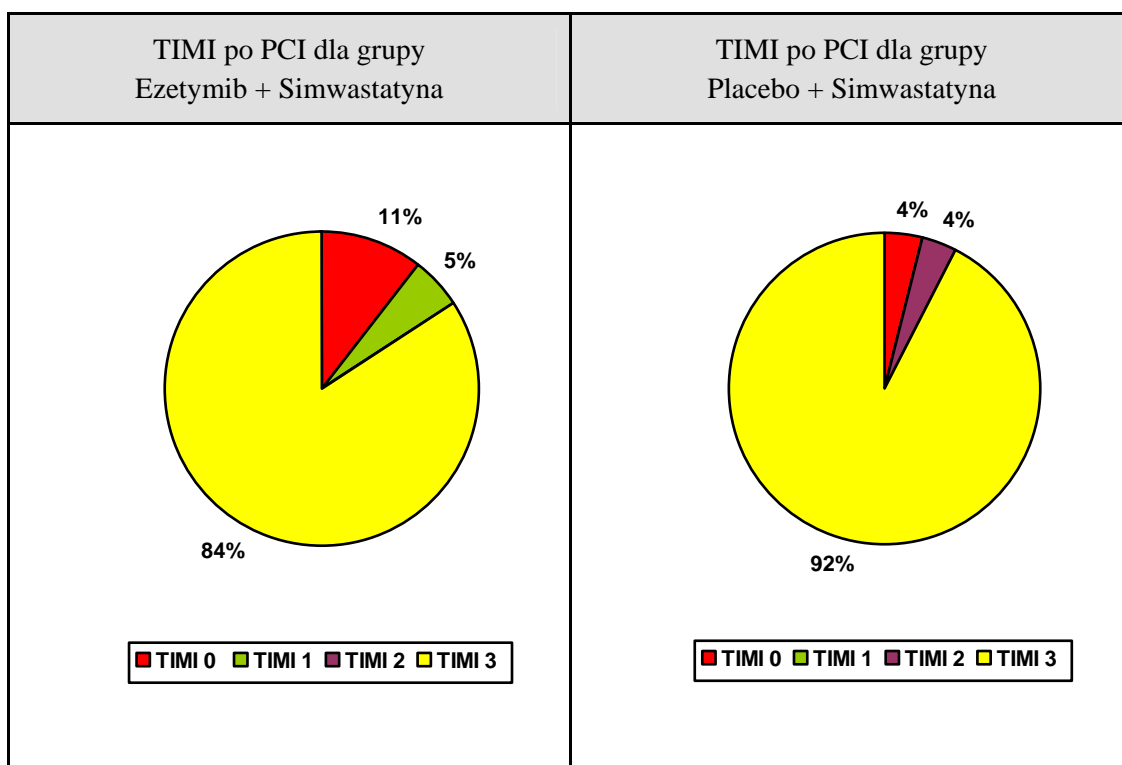
Rycina 12. Ocena przepływu kontrastu w naczyniu dozawałowym w skali TIMI uzyskana w trakcie koronarografii



Większość chorych, 18 z grupy ezetymibu (90%) i 24 z grupy placebo (92%), zostało poddanych leczeniu interwencyjnemu pierwotną angioplastyką z implantacją stentu. W przypadku jednego pacjenta z grupy ezetymibu podjęto decyzję o wszczęciu stentu uwalniającego substancję antymitotyczną – DES (*Drug Eluting Stent*). W pozostałych przypadkach implantowano stenty metalowe – BMS (*Bare Metal Stent*). Na podstawie wykonanej diagnostyki inwazyjnej do leczenia zachowawczego, z uwagi na niski wymiar referencyjny naczynia dozawałowego (średnica naczynia < 1 mm), zakwalifikowano 4 chorych, 2 z grupy ezetymibu (10%) i 2 z grupy placebo (7,7%). W przypadku pozostałych pacjentów wykonano angioplastykę balonową – POBA (*Percutaneous Old Balloon Angioplasty*). Ostatecznie TIMI 3 uzyskano u 17 (84,2%) chorych zakwalifikowanych do leczenia skojarzonego ezetymibem z simwastatyną oraz u 24 (92,3%) chorych poddanych monoterapii simwastatyną (*Rycina 13*).

Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic między porównywanymi grupami pod względem podjętej strategii leczenia interwencyjnego, okołozabiegowego podania blokera receptora płytkowego IIb/IIIa oraz TIMI określonego przed i na koniec leczenia zabiegowego (*Tabela 8*).

Rycina 13. Ocena przepływu kontrastu w naczyniu dozawałowym w skali TIMI po wykonaniu pierwotnej angioplastyki



4.3 Podstawowe badania laboratoryjne

Obie grupy nie różniły się w odniesieniu do większości rutynowych badań laboratoryjnych na początku badania (*Tabela 9*).

W trakcie badania zaobserwowano istotną redukcję stężenia cholesterolu całkowitego – w grupie ezetymibu o 42% ($p < 0,001$), a w grupie placebo o 24% ($p < 0,001$) w trakcie kolejnych dwóch miesięcy leczenia (*Rycina 14*).

Tabela 9. Wyniki podstawowych oznaczeń laboratoryjnych

	Ezetymib + Simwastatyna (n = 20)				Placebo + Simwastatyna (n = 26)			
	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡
Glukoza [mmol/l]	6,60 [2,00]	5,95 [1,10]*	6,00 [1,25]	0,035	6,65 [1,70]	5,55 [1,60]*	5,75 [1,60]	NS
Kreatynina [μmol/l]	82,7 ± 3,8	80,3 ± 3,7	81,9 ± 3,6	NS	82,8 ± 4,8	88,0 ± 3,3	86,8 ± 2,4	NS
CK [U/L]	184,5 [265,5]	79,0 [59,0]*	89,5 [73,0]*	0,008	150,0 [530,5]	92,0 [47,0]*	97,0 [47,0]*†	<0,001
ALAT [U/l]	29,0 [13,0]	31,0 [16,0]	36,5 [13,0]	NS	35,0 [22,5]	35,5 [17,5]	34,0 [19,0]	NS
Cholesterol całkowity [mmol/l]	5,57 [1,29]	3,25 [0,95]*	3,23 [1,31]*	<0,001	5,22 [1,19]	3,65 [1,34]*	3,93 [1,24]*†	<0,001
LDL-C [mmol/l]	3,25 [0,92]	1,73 [0,72]*	1,75 [1,15]*	<0,001	3,37 [0,85]	2,13 [0,70]*§	2,30 [0,85]*†	<0,001
HDL-C [mmol/l]	1,25 ± 0,07	1,09 ± 0,04*	1,16 ± 0,05	<0,001	1,16 ± 0,06	1,04 ± 0,05*	1,11 ± 0,04	0,037
Triglicerydy [mmol/l]	1,47 [1,78]	1,47 [0,81]	1,29 [0,76]	NS	1,38 [1,81]	1,63 [1,08]	1,73 [1,69]	NS
WBC [10 ³ /μl]	10,77 [5,09]	6,91 [1,64]*	6,27 [2,34]*	<0,001	11,6 [4,57]	6,34 [2,31]*	6,29 [2,74]*	<0,001

Wyniki zaprezentowane w zależności od rezultatu testu normalności rozkładu prawdopodobieństwa Shapiro – Wilka. Wyniki zaprezentowano jako średnia ± SD odchylenia standardowego lub mediana [IQR]

*P<0,05 kiedy porównywano dane z pomiarem początkowym w tej samej grupie badawczej z wykorzystaniem testu Wilcoxon lub post-hoc Tukey'a HSD,

†P<0,05 kiedy porównywano dane z pomiarem po jednym miesiącu w tej samej grupie badawczej z wykorzystaniem testu Wilcoxon lub post-hoc Tukey'a HSD,

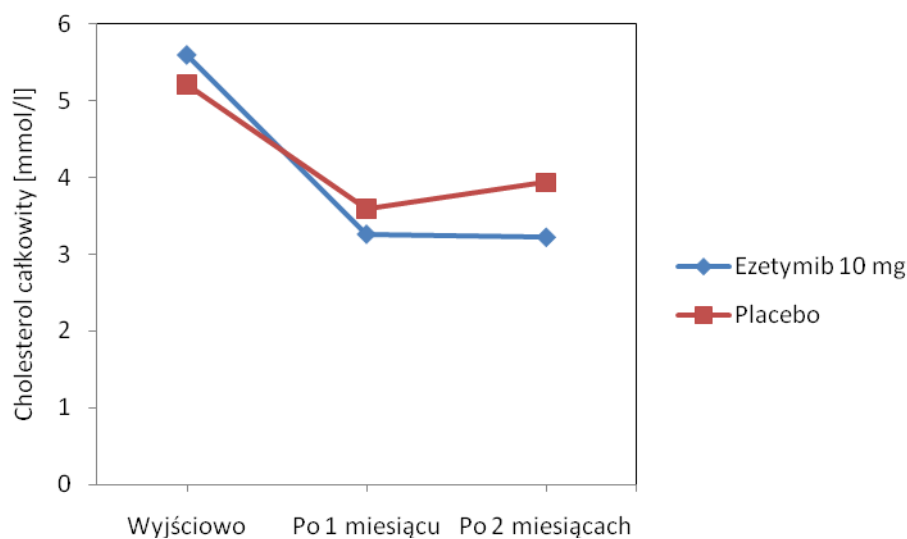
‡ P<0,05 porównania w tej samej badanej grupie (Friedman ANOVA),

§P<0,05 kiedy porównywano wartości w tym samym punkcie czasowym w grupie z ezetymibem (test U-Manna-Whitney'a lub test t -Studenta),

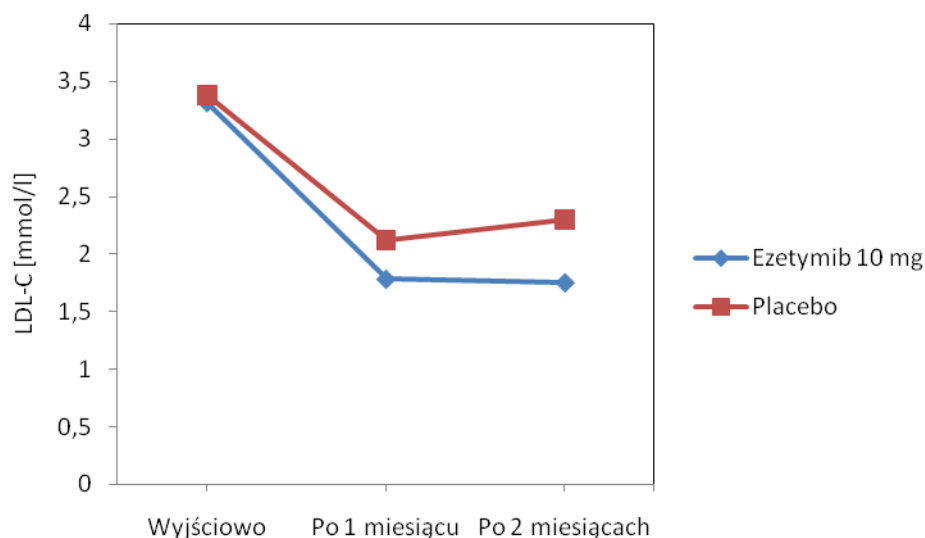
NS (no significant) – nieistotna statystycznie

Frakcja cholesterolu LDL w obu badanych grupach uległa redukcji zarówno po pierwszym, jak i po drugim miesiącu obserwacji (*Rycina 15*). Zastosowane postępowanie farmakologiczne skutkowało uzyskaniem poziomu LDL-C < 2,6 mmol/l u 90% chorych w grupie ezetymibu i u 76,9% w grupie placebo już po pierwszym miesiącu leczenia. Po miesiącu terapii skojarzonej w porównaniu z monoterapią obserwowano istotną statystycznie różnicę w redukcji poziomu cholesterolu frakcji LDL na korzyść grupy z ezetymibem (1,73 [0,72] vs 2,13 [0,70] mmol/l; $p = 0,037$). Po 2 miesiącach poziom cholesterolu frakcji LDL był również niższy w grupie terapii skojarzonej (1,75 [1,15] vs 2,30 [0,85] mmol/l; $p=0,085$) (*Tabela 9*).

Rycina 14. Poziom cholesterolu całkowitego w kolejnych punktach czasowych w grupie ezetymibu i placebo

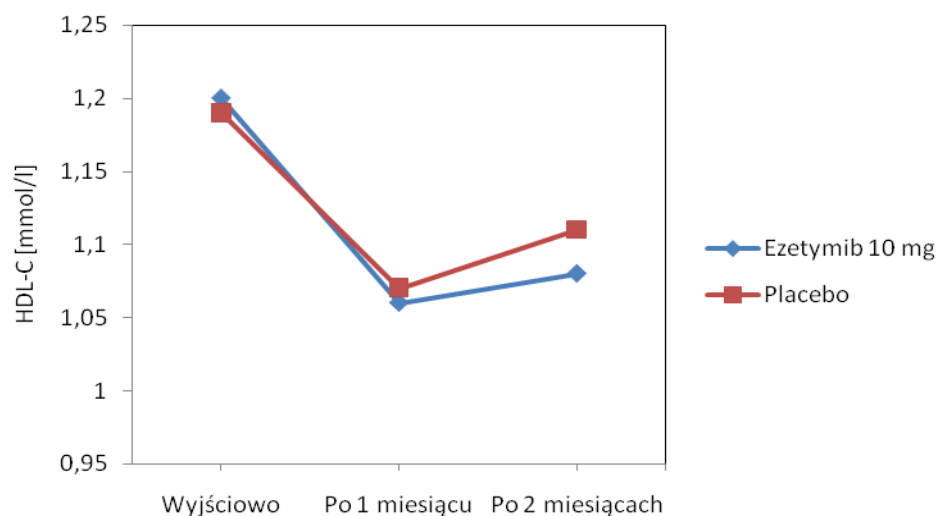


Rycina 15. Poziom cholesterolu frakcji LDL w kolejnych punktach czasowych w grupie ezetymibu i placebo



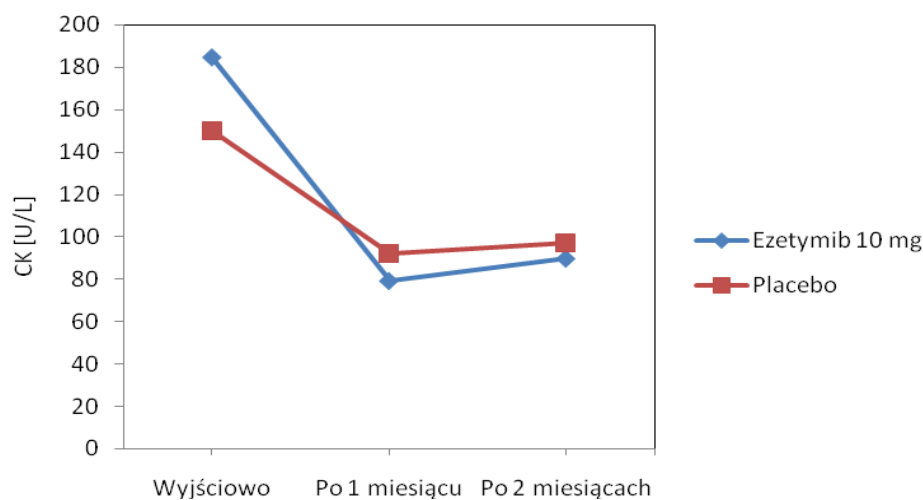
Po miesiącu terapii stężenia cholesterolu frakcji HDL również zmniejszyły się w obu grupach – w grupie ezetymibu: ($1,25 \pm [0,07]$ vs $1,09 \pm [0,04]$ mmol/l; $p < 0,001$), a w grupie placebo: ($1,16 \pm [0,06]$ vs $1,04 \pm [0,05]$ mmol/l; $p = 0,04$) (Rycina 18, Tabela 9). W drugim miesiącu obserwacji poziom cholesterolu frakcji HDL wykazywał w obu grupach tendencję wzrostową (Tabela 9, Rycina 16). Poziom triglicerydów pozostał niezmienny w trakcie badania (Tabela 9).

Rycina 16. Poziom cholesterolu frakcji HDL w kolejnych punktach czasowych w grupie ezetymibu i placebo



Bezpieczeństwo prowadzonej terapii oceniane było na podstawie poziomu ALAT (Tabela 9) oraz CK (Tabela 9, Rycina 17). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w trakcie kolejnych punktów czasowych zarówno w poziomie ALAT, jak i CK w obu badanych grupach.

Rycina 17. Poziom CK w kolejnych punktach czasowych w grupie ezetymibu i placebo



4.4 Markery krzepnięcia

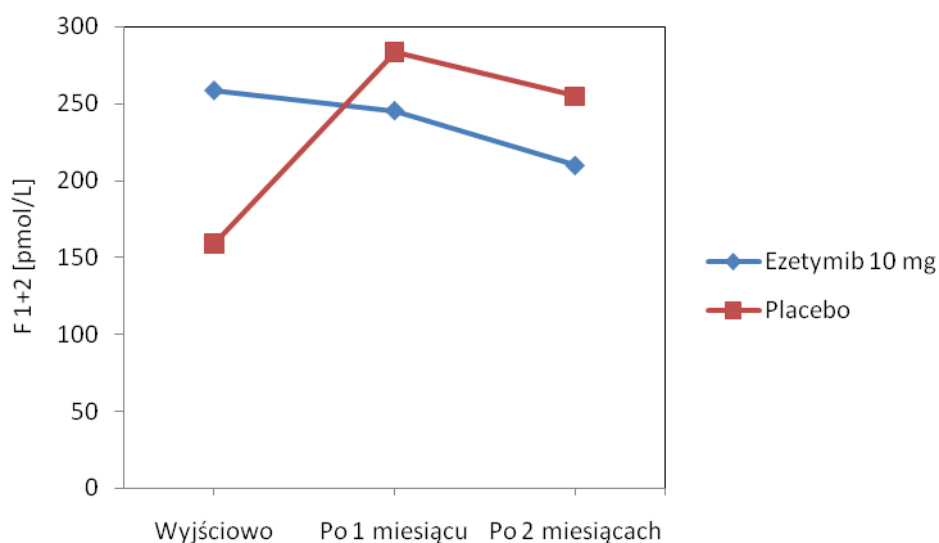
Poziom F1+2 w grupie ezetymibu uległ w trakcie badania redukcji o 19 % ($p=0,03$), ale nie w grupie placebo. W grupie ezetymibu sam poziom TAT zmniejszył się (o 30%) po 2 miesiącach leczenia w porównaniu do pozostałych dwóch punktów czasowych (*Tabela 10*). We wszystkich 3 punktach czasowych nie było różnic międzygrupowych w zakresie markerów generacji trombiny (TAT i F1+2) (*Tabela 10, Rycina 18*).

Tabela 10. Markery generacji trombiny oznaczane w trakcie badania

	Ezetymib + Simwastatyna (n=20)				Placebo + Simwastatyna (n=26)			
	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡
F1+2 [pmol/l]	258,5 [150,2]	245,4 [98,7]	209,6 [143,4]*	0,03	158,9 [199,6]	283,4 [207,6]	254,6 [115,2]	NS
TAT [µg/l]	3,50 [4,62]	3,36 [3,07]	2,48 [1,57]	NS	3,17 [4,53]	3,16 [1,88]	2,82 [2,32]	NS

Metodyka i oznaczenia jak w tabeli 9

Rycina 18. Poziom F1+2 w kolejnych punktach czasowych w grupie ezetymibu i placebo



W trakcie obserwacji nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności markerów krzepnięcia w stosunku do ocenianych w badaniu parametrów klinicznych i laboratoryjnych.

4.5 Markery zapalenia

W trakcie badania nie zanotowano istotnych statystycznie różnic w ocenie interleukin zaangażowanych w zapalenie naczyń (IL-6, IL-18) oraz markerów procesu zapalnego (CRP, Fibrynogen) (Tabela 12). Znaczne spadki zaobserwowano w obu grupach jedynie dla stężenia dla IL-6. W grupie ezetymibu o 48% i 16% odpowiednio po pierwszym i drugim miesiącu leczenia ($p=0,04$), a w grupie placebo o 33% po pierwszym i 4% po drugim miesiącu ($p=0,048$). Poziom IL-6 na początku badania był o 31,7% ($2,08 [1,93]$ vs $1,42 [2,01]$) większy w grupie ezetymibu w porównaniu z placebo. W żadnej z badanych grup nie stwierdzono korelacji między stężeniem IL-6 i CRP. Nie stwierdzono, podobnie jak w przypadku markerów

krzepnięcia, istotnych statystycznie korelacji w żadnym z analizowanych punktów czasowych pomiędzy ocenianymi w badaniu markerami zapalenia a ocenianymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi.

Tablica 12. Markery procesu zapalnego oceniane w trakcie badania

	Ezetymib + Simwastatyna (n=20)				Placebo + Simwastatyna (n=26)			
	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡
hsCRP [mg/l]	2,10 [5,20]	2,50 [3,20]	2,18 [2,77]	NS	2,40 [3,10]	2,39 [3,57]	2,16 [3,42]	NS
Fibrynogen [g/l]	4,45 ± 0,29	4,04 ± 0,27	3,92 ± 0,21	NS	4,38 ± 0,16	4,27 ± 0,18	4,04 ± 0,18	NS
IL-6 [pg/ml]	2,08 [1,93]	1,08 [0,71]*	0,90 [0,88]*	0,004	1,42 [2,01]	0,95 [1,24]	0,91 [0,81]*	0,048
IL-18 [pg/ml]	240,94 ±127,55	228,58 ±130,23	218,20 ±115,01	NS	250,92 ±101,97	252,95 ±117,65	244,78 ±102,08	NS

Metodyka i oznaczenia jak w tabeli 9

4.6 Markery aktywacji płytek

Badanie nie wykazało istotnych statystycznie różnic pomiędzy analizowanymi grupami w zakresie markerów aktywacji płytek (β -TG [tylko międzygrupowe różnice w drugim punkcie czasu] i TXB₂) (Tabela 13). Poziom β -TG został znacznie obniżony po 2 miesiącach terapii w obu grupach ($p < 0,05$), lecz bez różnic międzygrupowych. Obserwowane przez cały okres terapii niskie stężenie TXB₂ wskazuje na dobrą odpowiedź na ASA u wszystkich pacjentów w całym

badaniu (wszystkie < 1 ng/ml). W grupie placebo (p=0,002), ale nie w grupie ezetylibu (p=0,015), obserwowano znaczne obniżenie poziomu TXB₂.

Tabela 13. Markery aktywności płytek krwi oceniane w trakcie badania

	Ezetymib + Simwastatyna (n=20)				Placebo + Simwastatyna (n=26)			
	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡
β-TG [UI/ml]	161,6 [65,1]	143,2 [41,0]*	152,6 [74,4]*	0,007	173,9 [49,2]	170,9 [62,1]	135,4 [67,0]*	0,03
sCD40L [pg/ml]	172,7 [103,3]	173,4 [79,0]	122,3 [56,5]†	NS	244,2 [296,5]	135,3 [60,1]*	137,7 [59,7]*	<0,001
TXB ₂ [pg/ml]	83,2 [46,3]	78,7 [13,5]	66,7 [48,4]†	0,015	83,5 [74,1]	81,2 [17,3]	52,0 [27,0]*†	0,002

Metodyka i oznaczenia jak w tabeli 9

Z kolei poziom rozpuszczalnego liganda sCD40L uległ istotnej redukcji jedynie w grupie placebo + simwastatyna (o 43,6% w trakcie dwumiesięcznej obserwacji; p<0,001). Poziom sCD40L był o 41,4% większy w grupie placebo w porównaniu z grupą ezetylibu na początku badania.

W trakcie całego okresu obserwacji chorych nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy markerami aktywacji płytek w porównaniu do ocenianych parametrów kliniczno–laboratoryjnych.

4.7 Markery fibrylizy

Chociaż aktywacja fibrynogenu była podobna zarówno w grupie ezetylibu, jak i placebo we wszystkich 3 punktach czasowych, CLT stał się krótszy w obu grupach w trakcie badania (*Tabela 14, Rycina 19,20*). Co ważne, CLT był istotnie

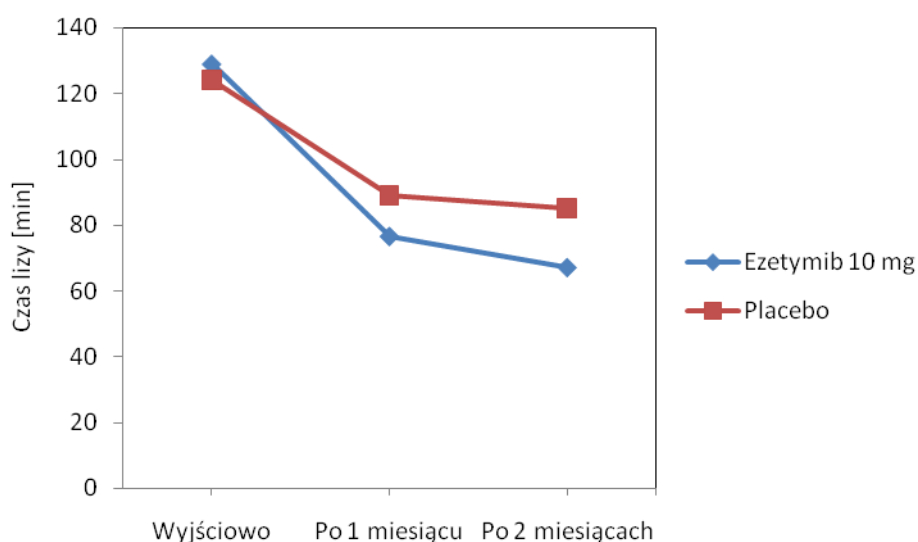
skrócony nie tylko po pierwszym miesiącu leczenia (odpowiednio w grupie ezetymibu o 38,1%, $p < 0,001$ i w grupie placebo o 29,4%, $p < 0,001$), ale, jak zaobserwowano, skracał się bardziej w kolejnych miesiącach obserwacji ($p < 0,001$ dla wszystkich porównań).

Tabela 14. Markery fibrylizy oznaczane w trakcie badania

	Ezetymib + Simwastatyna (n=20)				Placebo + Simwastatyna (n=26)			
	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p^{\ddagger}	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p^{\ddagger}
PAI-1 [ng/ml]	36,2 ± 1,9	12,4 ± 0,6*	10,5 ± 0,4*	<0,001	37,1 ± 1,5	19,2 ± 0,5*§	16,0 ± 0,6*†§	<0,001
CLT [min]	125,4 ± 3,4	77,6 ± 2,1*	66,8 ± 1,7*†	<0,001	125,7 ± 2,4	88,8 ± 1,7*§	84,2 ± 1,5*†§	<0,001

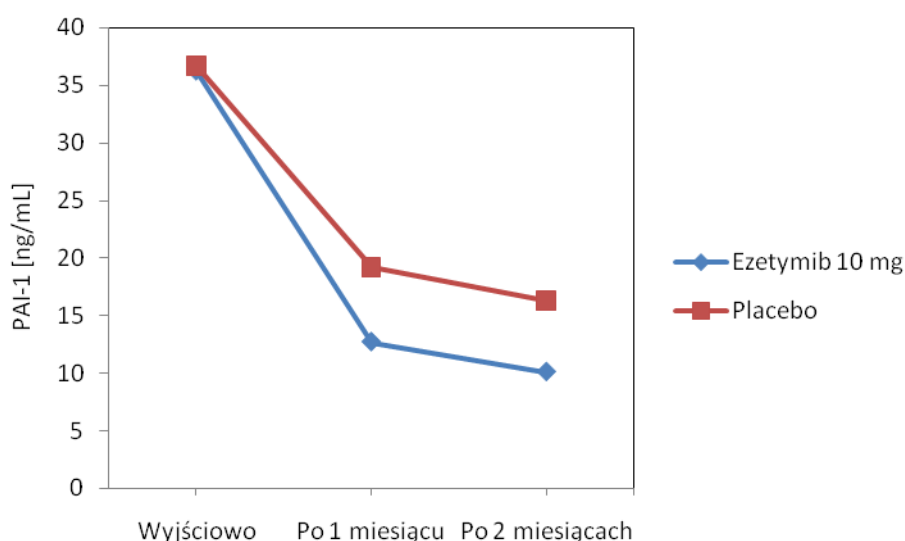
Metodyka i oznaczenia jak w tabeli 9

Rycina 19. Ocena czasu lizy skrzepu fibrynowego w grupie ezetymibu i placebo w kolejnych punktach czasowych



Z kolei poziom PAI-1 był niższy w grupie ezetymibu w porównaniu z grupą placebo o 39,5%, ($p < 0,0001$) po 1 miesiącu z dalszym obniżeniem w kolejnym miesiącu obserwacji - 11%, ($p < 0,001$) (Rycina 20).

Rycina 20. Ocena poziomu PAI-1 w grupie ezetymibu i placebo w kolejnych punktach czasowych



CLT w obu grupach był ściśle skorelowany z PAI-1 na początku badania (zarówno $r=0,9$, $p < 0,0001$), ale nie później. Względne skrócenie CLT i zmniejszenie PAI-1 było znacząco wyższe w grupie ezetymibu. Zarówno CLT jak i PAI-1 były znacznie niższe u pacjentów otrzymujących terapię skojarzoną po pierwszym miesiącu leczenia i różnica ta utrzymywała się także w trakcie dalszej, łącznie dwumiesięcznej, obserwacji.

4.8 Marker stresu oksydacyjnego

Poziom 8-iso-PGF_{2α} w grupie ezetymibu w porównaniu z grupą placebo był niższy o 17,4% ($p < 0,0001$) po 1 miesiącu. Również po 2 miesiącach zastosowanej

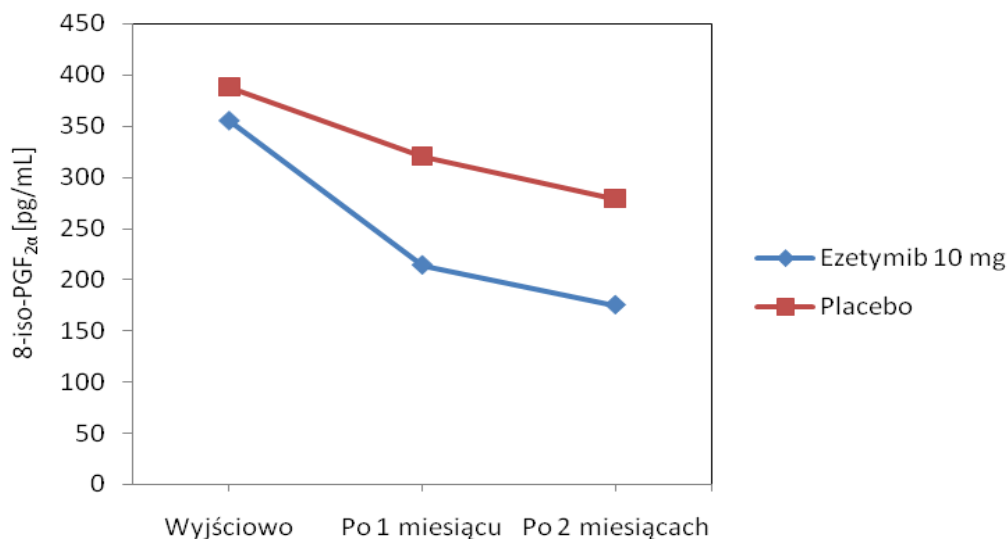
jak wyżej terapii obserwowano silniejszą o 11,3%, ($p < 0,001$) redukcję poziomu 8-iso-PGF_{2α} w grupie ezetymibu (*Tabela 15, Rycina 21*).

Tabela 15. Markery stersu oksydacyjnego oznaczane w trakcie badania

	Ezetymib + Simwastatyna (n=20)				Placebo + Simwastatyna (n=26)			
	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡	Wyjściowo	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	p‡
8-iso-PGF _{2α} [pg/ml]	355,5 [103,5]	214,0 [81,5]*	175,0 [77,0]*†	<0,001	388,0 [105,0]	320,5 [77,0]*§	279,0 [95,0]*†§	<0,001

Metodyka i oznaczenia jak w tabeli 9.

Rycina 21. Ocena poziomu 8-iso-PGF_{2α} w grupie ezetymibu i placebo w kolejnych punktach czasowych



Zmniejszenie poziomu 8-iso-PGF_{2α} było znacząco większe w grupie ezetymibu w porównaniu z grupą placebo już po pierwszym miesiącu leczenia i różnica ta utrzymywała się także po dwóch miesiącach.

Celem pracy było porównanie wpływu terapii simwastatyną oraz simwastatyną skojarzoną z ezetymibem na parametry hemostazy i stanu zapalnego u pacjentów z OZW. Przedstawione wyniki wskazują, że ezetymib w dawce 10 mg/dobę w leczeniu skojarzonym z simwastatyną w dawce 40 mg/dobę wykazuje nieco silniejsze działanie w porównaniu z simwastatyną w monoterapii na stężenie cholesterolu całkowitego i frakcji LDL. Interwencję farmakologiczną rozpoczęto w ciągu pierwszych 24 godzin od początku wystąpienia ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego. W trakcie dwumiesięcznej obserwacji monitorowano zmiany zachodzące w stanie zapalnym, układzie hemostazy oraz nasileniu stresu oksydacyjnego, które są typowe dla naturalnego przebiegu OZW i pierwszych tygodni po ostrym niedokrwieniu. Z przyczyn etycznych, wynikających z korzystnego wpływu statyn na leczenie choroby niedokrwiennej mięśnia sercowego, praca została zaprojektowana bez grupy pacjentów pozbawionych terapii statynami.

Zaprezentowane badanie wykazało, że podczas pierwszych 2 miesięcy obserwacji od początku wystąpienia OZW skutki działania simwastatyny skojarzonej z ezetymibem w porównaniu z monoterapią simwastatyną są podobne w odniesieniu do większości monitorowanych markerów hemostazy i zapalenia we krwi żyłnej.

Oryginalnym spostrzeżeniem jest obserwacja, że – nawet w przypadku niewielkiej grupy pacjentów – leczenie skojarzone simwastatyną z ezetymibem skutkuje bardziej nasiloną fibrynolizą oraz stłumieniem procesów utleniania.

5.1 Parametry stanu zapalnego w zawale serca

Wyniki badania potwierdzają, że OZW charakteryzuje się silną stymulacją mechanizmów prozapalnych, na co wskazywały liczne prace dotyczące zwiększenia stężenia markerów stanu zapalnego, tj. IL-6 i CRP, w przebiegu zawału serca¹⁵⁶. Obserwowany w trakcie badania niezmienny poziom fibrynogenu, CRP oraz IL-18 po pierwszym lub drugim miesiącu od wystąpienia OZW, niezależny od leczenia obniżającego poziom cholesterolu, jest dodatkowym dowodem na trwałą aktywację mechanizmów zapalnych zainicjowanych pęknięciem blaszki miażdżycowej i w konsekwencji niedokrwieniem mięśnia sercowego oraz jego martwicą. W trakcie badania stwierdzono jedynie w obu badanych grupach znaczne obniżenie poziomu IL-6, przy czym nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem IL-6 a CRP. Fakt ten może świadczyć o udziale niezależnych od IL-6 szlaków stymulacji produkcji CRP w wątrobie. IL-6 powstaje przede wszystkim lokalnie – w blaszce miażdżycowej, i zmiany jej stężenia mogą być ściśle powiązane z uszkodzeniem blaszki miażdżycowej¹⁵⁷. Z kolei CRP krążące w krwi jest syntetyzowane głównie w wątrobie w odpowiedzi na cytokiny prozapalne, a w szczególności IL-6¹⁵⁸. W dostępnych publikacjach potwierdzono hamujący wpływ statyn na stężenie markerów stanu zapalnego u zdrowych mężczyzn oraz pacjentów z dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym, jednak nie analizowano chorych z OZW^{133,159}.

Zastosowanie w prezentowanym badaniu simwastatyny w dawce 40 mg/dobę nie miało wpływu na markery stanu zapalnego w żadnej z badanych grup. Korzystne plejotropowe efekty działania statyn opisywane u osób z podwyższonym ryzykiem sercowo-naczyniowym, na przykład zmniejszenie CRP, nie są obserwowane u pacjentów z OZW, u których nasilenie stanu zapalnego jest znaczne

i słabo poddaje się regulacji za pomocą leków o stosunkowo słabym działaniu przeciwzapalnym⁹⁸.

Przeciwzapalne właściwości ezetymibu, wynikające ze zmniejszenia poziomu CRP w grupie chorych z wysokim ryzykiem wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych oraz cierpiących z powodu reumatoidalnego zapalenia stawów, obserwowano już wcześniej¹⁴⁴. Połączenie simwastatyny z ezetymibem wiązano z możliwością do uzyskania supresją stanu zapalnego u chorych z OZW. Dołączenie do simwastatyny ezetymibu nie przyniosło jednak redukcji poziomu markerów procesu zapalnego, co stanowi kolejny dowód na silną aktywację stanu zapalnego u pacjentów z OZW. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wynikami badania oceniającego wpływ skojarzonego leczenia ezetymibem i simwastatyną na poziom CRP u chorych z OZW¹⁴³.

Stwierdzono, że poziom IL-6 uwalnianej z monocytów za pośrednictwem receptorów aktywowanych przez proteazy (PAR) zachodzi pod wpływem trombiny¹⁶⁰. W prezentowanym badaniu nie zaobserwowano korelacji zachodzącej między stężeniami IL-6 i markerami generacji trombiny. Wyniki opublikowanych do tej pory badań dotyczących związku pomiędzy tymi markerami są rozbieżne. W grupie chorych z ostrym niedokrwieniem mózgu nie obserwowano związku między IL-6 a TAT, natomiast w grupie chorych z przewlekłą niewydolnością serca wykryto taką zależność¹⁶¹⁻¹⁶².

5.2 Parametry hemostazy w zawale serca

Uzyskane wyniki badania po raz kolejny potwierdzają, że OZW charakteryzuje się silną stymulacją mechanizmów prozakrzepowych^{64,163-164}. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że stężenia F1+2 u chorych z OZW są zwykle co najmniej dwukrotnie wyższe w porównaniu z wartościami obserwowanymi u chorych ze stabilną postacią dławicy piersiowej¹⁶⁵⁻¹⁶⁶. Podobny wzrost dotyczy stężeń TAT¹⁶⁵. Udowodniono również, że aktywacja układu krzepnięcia utrzymuje się nawet 6 miesięcy po zawale serca i wiąże się ze zwiększonym ryzykiem powikłań¹⁶⁶.

Wiele publikacji wskazuje na hamujący wpływ statyn na układ krzepnięcia. Najważniejszym efektem przeciwwakrzepowym statyn jest zmniejszenie ekspresji TF, co udowodniono w badaniach *in vitro*^{128,130}. Stwierdzono, że stosowanie simwastatyny nie tylko opóźnia generację łańcuchów, ciężkiego i lekkiego, czynnika Va o 30-60 sekund, ale także zmniejsza ich powstawanie odpowiednio o 30% i 19%. Działanie przeciwwakrzepowe simwastatyny było niezależne od jej wpływu na stężenie cholesterolu¹⁶⁷. Nieliczne publikowane dotychczas doniesienia naukowe dotyczące wpływu leczenia statynami na generację trombiny u chorych po przebyciu OZW przyniosły sprzeczne wyniki. Stosowanie u chorych po OZW przez okres 16 tygodni atorwastatyny w dużych dawkach nie skutkuje zmniejszeniem stężenia fragmentów F1+2 protrombiny w osoczu ani zahamowaniem tworzenia trombiny w powstających *in vitro* skrzepach¹⁶⁸. W innym badaniu z zastosowaniem prawastatyny w dawce 40 mg/dobę w porównaniu z placebo u chorych po OZW nie wykazano znamiennych różnic pod względem generacji trombiny¹⁶⁹. Z kolei w badaniu, w którym stosowano atorwastatynę zaobserwowano

bardzo szybko, bo uzyskaną już po 3 dniach leczenia, istotną redukcję stężenia F1+2 w krwi¹⁷⁰. Wnioski płynące z prac wielu badaczy nad wpływem statyn u chorych po OZW mogły wskazywać, że aktywacja układu krzepnięcia we wczesnym okresie zawału będzie zbyt nasiloną, aby udało się zaobserwować hamujący wpływ statyn. Aktualne badanie potwierdziło tę koncepcję. Brak międzygrupowych różnic w redukcji poziomu markerów generacji trombiny po 1 lub 2 miesiącach od OZW, niezależnych od leczenia obniżającego poziom cholesterolu, jest dodatkowym dowodem na przewlekłą aktywację mechanizmów prozakrzepowych zainicjowanych przez OZW.

Podobnie jak w przypadku markerów procesu zapalnego, efekty przeciwwakrzepowego działania statyn obserwowane u osób z podwyższonym ryzykiem sercowo-naczyniowym nie występują u pacjentów z OZW, gdzie aktywacja krzepnięcia krwi jest wzmożona i długotrwała. Informacje płynące z zakończonych badań nad wpływem ezetymibu na proces krzepnięcia są niejasne¹⁴⁵. Dołączenie do simwastatyny ezetymibu nie łączyło się w tym badaniu z istotnym zmniejszeniem poziomu markerów generacji trombiny w porównaniu z leczeniem simwastatyną w monoterapii.

Niezwykle istotnym elementem w patomechanizmie OZW jest aktywacja płytek krwi¹⁷¹⁻¹⁷². Pęknięcie blaszki miażdżycowej i odsłonięcie jej silnie trombogennego wnętrza nie tylko aktywuje osoczowy układ krzepnięcia poprzez ekspozycję TF, ale prowadzi również do aktywacji płytek. U chorych z OZW obserwuje się bardziej nasiloną aktywację płytek i znamienne zwiększenie stężeń wszystkich markerów aktywacji płytek oznaczanych w krwi żyłnej: β -tromboglobuliny oraz sCD40L^{84,173}. Niektóre doniesienia sugerowały hamujący wpływ statyn na aktywację płytek krwi, co mogłoby potwierdzać plejotropowy

charakter działania tej klasy leków^{170,174}. Przeciwpłytkowe działanie statyn jest zależne od ich działania hipolipemizującego, związanego z osłabieniem zależnego od ADP wiązania kolagenu z trombocytami, co udowodniono w badaniach oceniających wpływ zwiększonego stężenia cholesterolu na aktywność płytek¹⁷⁴. Dotąd nie opublikowano danych dotyczących wpływu stosowania statyn na aktywność płytek krwi u chorych z OZW. Wykazano, że stosowanie atorwastatyny w dawce 10 mg/dobę u chorych z zaburzeniami gospodarki lipidowej skutkuje szybkim, bo obserwowanym już po 3 dniach farmakoterapii, znamionnym zmniejszeniem stężenia sCD40L, przy czym efekt ten był niezależny od wpływu zastosowanej statyny na stężenie lipidów¹⁷⁰. Hamujący wpływ statyn na stężenie sCD40L u chorych z hiperlipidemią przedstawiono w innych doniesieniach^{173,175}. Nieliczne prace wykazały brak wpływu statyn na ekspresję CD40L na powierzchni płytek lub na stężenie sCD40L w krwi^{92,159}. W opublikowanych do tej pory badaniach zaobserwowano, że terapia skojarzona atorwastatyną z ezetymibem w takiej samej dawce, tj. 10 mg/dobę, w porównaniu z monoterapią atorwastatyną w dawce 40 mg/dobę nie wpływa na reaktywność płytek krwi u chorych z postacią stabilną dusznicy bolesnej, przy czym efekt porównywanej terapii na profil lipidowy był podobny¹⁷⁶. Całość dostępnych danych wyraźnie wskazuje, że ezetymib najpewniej nie wpływa na aktywację płytek.

W prezentowanym badaniu nie stwierdzono wpływu stosowania simwastatyny w dawce 40 mg w monoterapii oraz skojarzonej z 10 mg ezetymibu na markery aktywacji płytek krwi obecnych w krwi żyłnej. U pacjentów z OZW otrzymujących zgodnie z aktualnymi wytycznymi ASA i kłopidogrel, tłumienie aktywacji płytek za pomocą simwastatyny lub simwastatyny z ezetymibem przebiegało podobnie w obu grupach, bez istotnych statystycznie różnic.

Co ważne, poziom sCD40L był znacząco wyższy w grupie placebo na początku badania. Stężenie sCD40L > 5,0 µg/l, jak obserwowano w badaniu OPUS-TIMI 16 (*Orbofiban in Patients with Unstable Coronary Syndromes*) i CAPTURE (*Chimeric 7E3 Antiplatelet Therapy in Unstable Angina Refractory to Standard Treatment*), wskazuje na grupę pacjentów najbardziej zagrożonych zgonem oraz ponownym zawałem serca niezakończonym zgonem we wczesnym okresie po OZW, co w przypadku prezentowanego badania wskazuje na chorych z przewagą OZW typu STEMI^{93,177}.

5.3 Aktywność fibrynolityczna osocza w zawale serca

W prezentowanym badaniu udowodniono, że, nawet w przypadku niewielkiej grupy pacjentów, leczenie skojarzone simwastatyną z ezetymibem skutkuje bardziej nasilonym przebiegiem fibrynolizy, co odzwierciedla niższy poziom PAI-1, oraz stłumieniem procesów utleniania potwierdzonym redukcją poziomu 8-iso-PGF_{2α}. Antyoksydacyjnie działanie simwastatyny i ezetymibu, oceniane w grupie chorych z dużym ryzykiem sercowo–naczyniowym opisywane było już wcześniej i prowadziło do istotnego zmniejszenia poziomu markerów stresu oksydacyjnego, w tym 8-iso-PGF_{2α}¹⁴⁷. Stosowanie przez 3 miesiące ezetymibu w dawce 10 mg/dobę skutkowało u pacjentów z hiperlipidemią istotnym zmniejszeniem poziomu 8-iso-PGF_{2α}¹⁴⁷. Połączenie obu leków, tj. simwastatyny z ezetymibem, dawało wzmocnienie efektu przeciwutleniającego, co wiązało się z dalszą redukcją poziomu markerów utleniania w porównaniu z monoterapią simwastatyną¹⁴⁸. Ezetymib, w dawce 10 mg/dobę, dodany do terapii simwastatyną,

u pacjentów z dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym dawał w okresie 22 tygodni leczenia redukcję markerów stresu oksydacyjnego o 11%¹⁴⁸.

Klinicznym objawem powstania zakrzepu w tętnicy wieńcowej i w konsekwencji OZW jest zaburzenie równowagi pomiędzy kaskadą krzepnięcia krwi prowadzącą do powstania skrzepu a fibryinolizą odpowiedzialną za jego rozpuszczenie. Powstaniu skrzepliny w tętnicy wieńcowej sprzyjają zaburzenia układu fibrynolizy, której głównymi markerami są tPA oraz PAI-1. Rozpuszczenie skrzepu fibrynowego odbywa się za pośrednictwem interakcji pomiędzy tPA, protezą serynową uwalnianą z komórek śródbłonna naczyniowego oraz plazminogenem. Uwalnianie tPA jest stymulowane przez szereg czynników, głównie trombinę, oraz duże siły ścinania. Obecność fibryny przyspiesza o co najmniej dwa rzędy wielkość generacji plazminy katalizowanej przez tPA¹⁷⁸. U chorych z chorobą niedokrwienną serca dochodzi do zmniejszenia uwalniania tPA ze ścian tętnic wieńcowych¹⁷⁹. Plazmina, centralny enzym w lizie fibryny, rozszczepia wiązanie Lys-Arg zarówno w cząsteczce fibryny, jak również w macierzy pozakomórkowej¹⁷⁸. Rodzina inhibitorów proteaz serynowych hamuje fibryinolizę poprzez wytworzenie nieodwracalnych kompleksów z miejscem aktywnym plazminy. PAI-1 oraz w mniejszym stopniu PAI-2, nekryna oraz inhibitor C1 – esterazy hamują tPA. Najważniejszy fizjologiczny inhibitor tPA, PAI-1, jest uwalniany m.in. z płytek krwi, w znacznej ilości pod wpływem cytokin prozapalnych, trombiny oraz lipoprotein¹⁷⁸. Wysokie stężenie PAI-1 u chorych z OZW było opisywane już wcześniej¹¹². Wzrost stężenia PAI-1 jest odpowiedzialny za zmniejszenie efektywności fibrynolizy i może odgrywać istotną rolę w patogenezie zakrzepu w tętnicy wieńcowej¹¹³. Stosowanie statyn, w tym simwastatyny, w grupie pacjentów z wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym wiąże się z hamowaniem PAI-1 oraz zwiększeniem

aktywności tPA¹³⁶. Ezetymib, podobnie jak simwastatyna, wpływa na nasilenie potencjału fibrynolitycznego osocza¹⁴⁵⁻¹⁴⁶. Dane te pochodzą głównie z badań hodowli komórkowych, na modelach zwierzętach oraz w grupie chorych z podwyższonym ryzykiem sercowo-naczyniowym. Skojarzona terapia simwastatyną w dawce 40 mg i ezetymibem w dawce 10 mg, w porównaniu do leczenia simwastatyną w monoterapii, prowadzi do zwiększenia efektywności fibrynolizy u pacjentów z OZW. Istotną redukcję poziomu PAI-1 obserwowano w grupie leczenia skojarzonego już po pierwszym miesiącu leczenia.

Niezwykle ciekawe jest spostrzeżenie wskazujące, że dodanie ezetymibu do simwastatyny w porównaniu z monoterapią simwastatyną skraca CLT. W większości testów lizy skrzepu rekombinowany tPA, rozpoczynając od stężeń używanych podczas fibrynolizy w warunkach *in vivo* aż do 10-krotnie wyższych, podawany jest łącznie z trombiną. Innym testem zmierzającym do uruchomienia reakcji krzepnięcia, bez dodawania egzogennej trombiny, jest zainicjowanie kaskady krzepnięcia przez dodanie TF w obecności fosfolipidów błonowych i osocza, co wydłuża czas lizy zazwyczaj do 50 – 100 minut¹⁵⁵. Poprzez uwzględnienie modyfikującego potencjału białek kaskady krzepnięcia na degradację fibryny, ten system oceny efektywności fibrynolizy jest bliższy sytuacji obserwowanej *in vivo*. CLT jest uważany za wiarygodny wskaźnik lizy stosowany w różnych sytuacjach klinicznych. Wykazano m.in., że pacjenci poniżej 50-tego roku życia po przebytych OZW mają wydłużony CLT, który koreluje z BMI, ciśnieniem tętniczym krwi oraz CRP¹⁸⁰. Po uwzględnieniu czynników ryzyka sercowo-naczyniowego zagrożenie OZW było 1,8 krotnie wyższe w przypadku pacjentów z najdłuższym CLT. Nie było związku pomiędzy CLT a ryzykiem OZW u pacjentów w wieku 50 lat i więcej¹⁸⁰. Niski potencjał fibrynolityczny osocza, oceniany za pomocą CLT, wiąże się z ponad

dwukrotnie wyższym prawdopodobieństwem wystąpienia zakrzepicy tętniczej¹⁸⁰⁻¹⁸¹. Osłabienie aktywności fibrynolitycznej osocza stanowi czynnik ryzyka wystąpienia zakrzepicy żyłnej¹⁸². Z kolei dwukrotne zwiększenie ryzyka wystąpienia zakrzepicy żył głębokich wiąże się z wydłużonym, powyżej 90 percentyla, CLT oznaczanego w zdrowej grupie kontrolnej¹⁸². Związek między CLT a stężeniem PAI-1, stwierdzony w prezentowanej pracy, odnotowywano również w wielu badaniach prowadzonych w innych populacjach, w tym u krewnych 1-go stopnia chorych na chorobę wieńcową oraz u chorych w świeżym zawale serca z hiperglikemią¹⁸³⁻¹⁸⁴.

Obserwacja o nasilonej fibrynolizie w czasie skojarzonej terapii hipolipemizującej po OZW pozwala wysunąć przypuszczenie, że terapia fibrynolityczna może być skuteczniej prowadzona u pacjentów otrzymujących w leczeniu ezetymib. Przeprowadzone badanie potwierdza obserwacje wskazujące na profibrynolityczne i antyoksydacyjne działanie wywołane przez ezetymib nie tylko w hodowlach komórkowych i modelach zwierzęcych, ale również u chorych należących do grupy wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego^{145-146,185}. Wszystkie te różnice nie korelowały z redukcją poziomu cholesterolu, co oznacza, że dodatkowe zmiany związane z działaniem ezetymibu są niezależne od jego stężenia.

Mechanizm będący podstawą skrócenia CLT podczas skojarzonego leczenia pociągał za sobą zmiany w poziomie PAI-1 oraz 8-isoprostanów. Podwyższone poziomy zarówno PAI-1 jak i 8-iso-PGF_{2α} były już wcześniej obserwowane w ostrym niedokrwieniu mięśnia serca^{98,186-187}. Redukcja poziomu 8-isoprostanu może, jak zostało to potwierdzone w przeprowadzonych wcześniej badaniach, przyczynić się do szybszego rozpadu skrzepu fibrynowego⁹⁸. Dane doświadczalne wskazują, że zmodyfikowany pod wpływem procesu utleniania fibrynogen prowadzi

do powstawaniu skrzepu fibrynowego o zmienionych właściwościach, osłabiając przy tym zależną od tPA aktywność plazminogenu¹⁸⁸. Dane na temat wpływu oksydacji na właściwości fibryny, pochodzące głównie z badań *in vitro*, są jednak niejednoznaczne. Fibrynogen jest szczególnie podatny na utlenianie (dwudziestokrotnie wrażliwszy na działanie wolnych rodników tlenowych w porównaniu z albuminą), przez co może chronić inne krążące białka przed zapoczątkowanym w procesie utleniania uszkodzeniem i dysfunkcją¹⁸⁹⁻¹⁹⁰. W większości badań *in vitro* wykazano, że utleniony fibrynogen zmniejsza tempo powstawania skrzepu fibrynowego¹⁸⁹. W innych badaniach stwierdzono, że zmniejszenie efektywności fibrynolizy może być konsekwencją nieprawidłowości w strukturze fibryny / fibrynogenu¹⁹¹. Zmodyfikowany fibrynogen po wykrzepieniu daje bardziej zwarte oraz oporniejsze na fibrynolizę włókna fibryny. Niemniej jednak, jak podają niektórzy badacze, utlenienie fibrynogenu sprzyja konwersji fibrynogenu do fibryny, co w konsekwencji zwiększa również agregację płytek oraz zmniejsza stymulowanie zależnej od tPA aktywacji plazminogenu¹⁹²⁻¹⁹³.

Przeprowadzona w pracy obserwacja sugeruje, że osłabione utlenianie fibrynogenu / fibryny może przyczynić się do szybszej lizy skrzepu w przypadku zastosowania w leczeniu ezetymibu w połączeniu z simwastatyną. Statyny są w stanie poprawić właściwości skrzepu przez tworzenie mniej zwartych zakrzepów, które są bardziej podatne na rozpad^{98-99,131}. Właściwości statyn umożliwiające łatwiejszą lizę skrzepu wynikają z zahamowania izoprenylacji białek sygnałowych, co jest związane z wpływem na kaskadę krzepnięcia (zmniejszenie ekspresji TF prowadzi do ograniczenia generacji trombiny, zwiększenie ekspresji trombomoduliny na komórkach śródbłonna naczyniowego prowadzi do zależnej od kompleksu trombomodulina - trombina aktywacji białka C, które w formie

aktywnej wpływa na FV i FVIII), hamującym wpływem na zapalenie (zmniejszenie CRP) oraz stres oksydacyjny (redukcja poziomu 8-iso-PGF_{2α})^{98,131}. Simwastatyna hamuje aktywność PAI-1 oraz zwiększa aktywność tPA¹³⁶. Można zatem uznać, że podawanie simwastatyny przyczynia się do efektywniej przebiegającej fibrynolizy w obu grupach pacjentów.

Zastosowanie ezetymibu u pacjentów z OZW i w konsekwencji zwiększenie potencjału profibrynolitycznego osocza poszerza naszą wiedzę na temat skutków tak prowadzonego leczenia.

5.4 Ograniczenia badania

Najistotniejszym ograniczeniem prezentowanego badania była mała liczebność analizowanych grup w skutek trudności z rekrutacją chorych. Zwiększenie liczby włączonych do ostatecznej analizy pacjentów pozwoliłoby uzyskać większą różnicę między grupami oraz odnaleźć potencjalne korelacje analizowanych parametrów. Analiza korelacji przy takiej liczebności jest obciążona dużym błędem typu II. Pomimo tego liczebność badanych grup była wystarczająca, aby stwierdzić wyraźną różnicę między grupami w zakresie markerów stresu oksydacyjnego oraz fibrynolizy, co potwierdza, że różnice między grupami w parametrach lizy i stresu oksydacyjnego są niewątpliwie bardzo duże. Pacjentów obserwowano przez 12 miesięcy, przy czym wyżej wymienione markery oznaczane były jedynie w trzech punktach czasowych. Wydłużenie obserwacji i analiza badanych parametrów laboratoryjnych w dodatkowych punktach czasowych mogłyby przynieść interesujące wnioski dotyczące zależności między nasileniem aktywacji układu krzepnięcia w pierwszych godzinach OZW, a dalszym przebiegiem

klinicznym i odległym rokowaniem. Niestety, możliwość zaobserwowania odpowiedniej liczby incydentów klinicznych przy małej liczebności badanych grup jest znikoma. Jedynie duża grupa pozwoli ocenić wpływ badanych parametrów na istotne punkty końcowe w OZW, tak jak to oceniano w prowadzonym na szeroką skalę badaniu IMPROVE-IT.

1. Rozpoczęcie w ciągu pierwszych 24 godzin od wystąpienia OZW skojarzonej terapii simwastatyną w dawce 40 mg/dobę z ezetymibem w dawce 10 mg/dobę w porównaniu z monoterapią simwastatyną w dawce 40 mg/dobę jest metodą bezpieczną oraz bardziej skuteczną w uzyskaniu zalecanych poziomów cholesterolu frakcji LDL w trakcie dwumiesięcznej obserwacji.
2. W porównaniu z monoterapią simwastatyną, leczenie skojarzone simwastatyną z ezetymibem u pacjentów po zawale serca jest związane z głębszą redukcją stresu oksydacyjnego oraz przyśpieszeniem fibrynolizy związanym z większą redukcją stężenia PAI-1.
3. Obserwowane zmiany w wartościach 8-iso-PGF_{2α}, PAI-1 oraz CLT nie były związane ze zmianami w profilu lipidowym.
4. Zastosowanie simwastatyny w dawce 40 mg/dobę w monoterapii, jak i skojarzonej z ezetymibem w dawce 10 mg/dobę, nie wpływa na poziomy markerów zapalenia, generacji trombiny oraz aktywacji płytek krwi u chorych w pierwszych 2 miesiącach po OZW.

Niestabilna blaszka miażdżycowa w tętnicy wieńcowej i w konsekwencji powstanie na jej powierzchni zakrzepu jest najczęstszą przyczyną ostrych zespołów wieńcowych (OZW). Nasilenie ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, procesów utleniania oraz zaburzona hemostaza zachodzą w czasie ostrego niedokrwienia serca.

Inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A – statyny wykazują, poza obniżeniem stężenia cholesterolu, inne działania, takie jak: hamowanie aktywacji krzepnięcia, ograniczenie procesu zapalnego, poprawę funkcji śródbłonna naczyniowego oraz hamowanie procesów utleniania.

Ezetymib, selektywny inhibitor wychwytu cholesterolu, zmniejsza poziom cholesterolu frakcji LDL o około 6–20% u chorych z wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym, po dodaniu do statyny. Dane eksperymentalne sugerują, że ezetymib może hamować reakcje zapalne, utlenianie oraz ekspresję inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1).

Ponieważ nie wiadomo, czy podanie statyny i/lub ezetymibu u pacjentów z OZW może wpłynąć na zapalenie i procesy hemostazy, celem pracy było porównanie wpływu leczenia simwastatyną 40 mg/dobę lub simwastatyną 40 mg/dobę wraz z ezetymibem 10 mg/dobę na parametry hemostazy i stanu zapalnego u chorych w pierwszych miesiącach po OZW .

Badanie objęło 63 chorych z OZW przyjętych do szpitala w pierwszych 12 godzinach od początku bólu wieńcowego. Badanie prowadzono z randomizacją metodą podwójnie ślepej próby z użyciem placebo. Pacjenci włączeni do badania zostali losowo przydzieleni (bez względu na wyjściowe stężenie cholesterolu)

do jednej z 2 grup: leczonej simwastatyną w dawce 40 mg/dobę i placebo, lub leczonej simwastatyną w dawce 40 mg/dobę i ezetymibem w dawce 10 mg/dobę.

Głównymi kryteriami wykluczającymi z udziału w badaniu były: ostry incydent sercowo-naczyniowy w ciągu ostatnich 3 miesięcy przed badaniem, choroba wielonaczyniowa wymagająca pilnej rewaskularyzacji kardiochirurgicznej, niewydolność krążenia (NYHA III-IV), leczenie antagonistami witaminy K, ciężka choroba współistniejąca, cukrzyca wymagająca insulinoaterapii oraz ostra choroba infekcyjna.

U wszystkich chorych przy przyjęciu oraz po 1 i 2 miesiącach od wystąpienia OZW oznaczano: stężenie glukozy, kreatyniny, fibrynogenu, troponiny I (TnI), aktywność kinazy kreatynowej (CK) wraz z jej izoenzymem MB (CK-MB) oraz lipidogram.

Markery procesu zapalnego (białko C reaktywne oznaczane metodą wysokiej czułości [hsCRP], interleukina 6 [IL-6] i 18 [IL-18], fibrynogen), procesu utleniania (8-izo-prostaglandyna-PGF_{2α} [8-iso-PGF_{2α}]), aktywacji płytek krwi (β-tromboglobulina [β-TG], tromboksan A₂ [TXA₂], rozpuszczalny ligand CD40L [sCD40L]), fibrylizy (PAI-1, czas lizy skrzepu fibrynowego [CLT]) oraz generacji trombiny (kompleks trombina – antytrombina [TAT], fragmenty 1+2 protrombiny [F1+2]) oznaczano w czasie pierwszych 12 godzin od wystąpienia objawów OZW oraz po pierwszym i drugim miesiącu leczenia. Pomiar CLT zmodyfikowaną metodą Lismana i wsp. polega na ocenie efektywności lizy pod wpływem tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) po dodaniu do osocza czynnika tkankowego i fosfolipidów. U wszystkich chorych wykonano koronarografię i w razie wskazań rewaskularyzację przezskórną. Zastosowano leczenie zgodne z zaleceniami, w tym kłopidogrel 75 mg/dobę.

Ostatecznie 57 chorych z OZW włączono do dwóch grup: grupy leczonej simwastatyną w dawce 40 mg z ezetymibem w dawce 10 mg (n=28) lub do grupy otrzymującej simwastatynę w dawce 40 mg i placebo (n=29). Spośród 54 chorych, którzy otrzymywali wyżej wymienione leki, ostateczna analiza objęła 46 pacjentów (35 mężczyzn) w wieku od 42 do 74 lat (grupa ezetymibu [n=20] i grupa placebo [n=26]). Sześciu pacjentów z grupy ezetymibu i dwóch pacjentów z grupy placebo wyłączono z analizy (p=0,2). Powodem wyłączenia były: nietolerancja leku (niestrawność i biegunka, grupa ezetymibu [n=1] grupa placebo [n=1]), konieczność podawania warfaryny z powodu migotania przedsionków (grupa ezetymibu [n=1]), brak współpracy chorych w trakcie badania [n=5]). Pacjentów obserwowano przez okres 12 miesięcy, nie odnotowując ostrego incydentu sercowo-naczyniowego ani zgonu.

Czas, jaki upłynął od początku wystąpienia bólu w klatce piersiowej do rozpoczęcia hospitalizacji i leczenia w grupie ezetymibu, wyniósł średnio 6,5 godziny, a w grupie placebo wyniósł średnio 4,5 godziny.

Obydwie grupy nie różniły się w odniesieniu do większości zmiennych demograficznych i klinicznych (w grupie ezetymibu w porównaniu z grupą placebo odnotowano większą liczbę pacjentów z NSTEMI [8 v 3; p=0,03]). Obie grupy nie różniły się wynikami rutynowych badań laboratoryjnych na początku badania.

Cholesterol LDL był istotnie mniejszy po miesiącu terapii w grupie z ezetymibem i simwastatyną w porównaniu do leczenia simwastatyną w monoterapii (1,73 [0,72] vs 2,13 [0,70] mmol/l; p=0,037). Po 2 miesiącach poziom cholesterolu LDL wykazywał tendencje do dalszego spadku w grupie terapii skojarzonej (1,75 [1,15] vs 2,30 [0,85] mmol/l; p=0,085).

We wszystkich 3 punktach czasowych nie było różnic między grupami w zakresie markerów generacji trombiny (TAT i F1+2), markerów zapalenia (CRP, IL-6, IL-18, fibrynogenu) oraz markerów aktywacji płytek (β -TG, sCD40 i TXB₂). Ten ostatni parametr wskazywał na dobrą odpowiedź na kwas acetylosalicylowy (ASA) u wszystkich pacjentów w całym badaniu (wszystkie < 1 ng/ml).

PAI-1 uległ redukcji w obu grupach zarówno po pierwszym jak i po drugim miesiącu leczenia. W grupie ezetymibu i simwastatyny poziom PAI-1 zmniejszył się o 65,5% ($p < 0,001$) po miesiącu oraz o 5,5% ($p < 0,001$) w drugim miesiącu. Z kolei redukcja poziomu PAI-1 w grupie placebo i simwastatyny w pierwszym miesiącu nastąpiła o 48% ($p < 0,001$), a w drugim miesiącu o 9% ($p < 0,001$). W grupie ezetymibu, w porównaniu z grupą placebo, obserwowano jedynie po pierwszym miesiącu terapii istotną statystycznie redukcję poziomu PAI-1 ($12,4 \pm 0,6$ vs $19,2 \pm 0,5$ ng/ml; $p < 0,001$).

CLT uległ skróceniu po miesiącu obserwacji o 38,1%, ($p < 0,001$) w grupie ezetymibu oraz o 29,4%, ($p < 0,001$) w grupie placebo. W drugim miesiącu leczenia nastąpiło dalsze skrócenie CLT odpowiednio o 8,4% w przypadku leczenia skojarzonego i 3,6% w przypadku monoterapii (dla obu grup $p < 0,001$). CLT był istotnie krótszy w grupie ezetymibu i simwastatyny w porównaniu z grupą placebo ($77,6 \pm 2,1$ vs $88,8 \pm 1,7$ min; $p < 0,0002$) po miesiącu leczenia z dalszym skróceniem w trakcie drugiego miesiąca obserwacji ($66,8 \pm 1,7$ vs $84,2 \pm 1,5$ min; $p < 0,0001$). CLT zarówno w grupie ezetymibu, jak i placebo ściśle korelował z poziomem PAI-1 przy przyjęciu (w obu grupach $r = 0,9$; $p < 0,0001$), ale nie w pozostałych punktach czasowych.

Co ważne, relatywne skrócenie CLT oraz zmniejszenie poziomu PAI-1 było istotnie większe w grupie ezetymibu i simwastatyny w porównaniu z grupą placebo

i simwastatyny ($p < 0,001$). Skrócenie CLT oraz redukcja poziomu PAI-1 była istotnie większa w grupie leczenia skojarzonego zarówno po pierwszym jak i drugim miesiącu stosowanej terapii ($p < 0,001$).

Poziom 8-iso-PGF_{2α} był niższy zarówno w grupie ezetymibu, jak i placebo po pierwszym miesiącu odpowiednio o 39,5% ($p < 0,0001$) w grupie leczenia skojarzonego i o 17,4% ($p < 0,0001$) w grupie monoterapii simwastatyną. Również w trakcie drugiego miesiąca obserwacji stwierdzono dalszą redukcję poziomu 8-iso-PGF_{2α} o 11% ($p < 0,0001$) w grupie ezetymibu oraz 11,3% ($p < 0,001$) w grupie placebo. W grupie pacjentów otrzymujących ezetymib z simwastatyną poziom 8-iso-PGF_{2α} po pierwszym miesiącu terapii uległ silniejszej redukcji w porównaniu z grupą placebo (214,0 [81,5] vs 320,5 [77,0] pg/ml; $p = 0,00001$). Po drugim miesiącu terapii zaobserwowano w grupie leczenia skojarzonego w porównaniu z monoterapią simwastatyną dalszą istotną redukcję poziomu 8-iso-PGF_{2α} (175,0 [77,0] vs 279,0 [95,0] pg/ml; $p = 0,000004$). Względne obniżenie poziomu 8-iso-PGF_{2α} było istotnie większe w grupie ezetymibu i simwastatyny w obu punktach czasowych.

Zaobserwowano, że względne zmniejszenie CLT, poziomu PAI-1 i 8-izoprostanów było istotnie większe w grupie ezetymibu w porównaniu z grupą placebo. Wszystkie 3 parametry były znacznie niższe u pacjentów otrzymujących simwastatynę i ezetymib już po pierwszym miesiącu leczenia i różnica ta utrzymywała się także w trakcie dalszej obserwacji. Nie stwierdzono zależności wyżej wymienionych zmian ze zmianami w profilu lipidowym w czasie leczenia.

Prezentowane badanie wskazuje, że terapia skojarzona ezetymibem i simwastatyną w porównaniu z monoterapią simwastatyną wiąże się z większym zahamowaniem stresu oksydacyjnego oraz wzmocnieniem aktywności układu

fibrynolitycznego u chorych z OZW już po miesiącu leczenia. Badanie sugeruje, że ezetymib w połączeniu ze statyną może wywierać dodatkowe przeciwzakrzepowe efekty niezależne od działania hipolipemizującego.

The presence of an unstable atherosclerotic plaque in the coronary artery and subsequent thrombus formation on its surface is the most common cause of acute coronary syndrome (ACS). Acute cardiac ischemia is accompanied by systemic inflammatory response, oxidation processes and activation of the blood coagulation.

3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, statins, in addition to decreasing cholesterol levels, exert other effects, such as clotting activation inhibition, suppression of inflammatory state, improved endothelial function and inhibition of oxidation.

Ezetimibe, a selective cholesterol uptake inhibitor, decreases LDL cholesterol levels by 6-20% when added to statins in high cardiovascular risk patients. Experimental data suggest that ezetimibe may suppress inflammation, oxidation and expression of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1).

The potential effect of statin and/or ezetimibe administration in ACS patients on inflammation and hemostasis is unknown, therefore this study aimed to compare the effect of simvastatin 40 mg daily or simvastatin 40 mg plus ezetimibe 10 mg daily on hemostasis and inflammation parameters in patients within the first months after ACS.

The study included 63 patients with ACS, admitted to hospital within 12 hours from chest pain onset. The study was randomized, double-blinded and placebo-controlled. Enrolled patients were randomized (irrespective of a baseline cholesterol level) into one of 2 groups: receiving simvastatin 40 mg per day plus placebo and receiving simvastatin 40 mg per day plus ezetimibe 10 mg per day for 2 months.

The main exclusion criteria were: acute cardiovascular event within 3 months prior to enrolment, multivessel disease that required urgent surgical coronary revascularization, heart failure (NYHA III/IV), vitamin K antagonist therapy, severe comorbidity, diabetes treated with insulin and acute infectious disease.

Blood glucose, creatinine, fibrinogen, troponin I (TnI), creatine kinase activity (CK) with MB isoenzyme (CK-MB) and lipid profile were determined on admission and after 1 and 2 months in all patients. Markers of inflammation (high-sensitivity C-reactive protein [hsCRP], interleukin 6 [IL-6] and 18 [IL-18]), oxidation (8-iso-prostaglandin-PGF_{2α} [8-iso-PGF_{2α}]), platelet activation (β-thromboglobulin [β-TG], thromboxane B₂ [TXB₂], soluble CD40 ligand [sCD40L]), fibrinolysis (PAI-1, fibrin clot lysis time [CLT]) and thrombin generation (thrombin-antithrombin complex [TAT]), prothrombin 1+2 fragments [F1+2]) were determined within 12 hours from ACS onset and after 1 and 2 months of therapy. Measurement of CLT with the modified method by Lisman et al. is based on the assessment of lysis efficiency mediated by tissue plasminogen activator (t-PA) after addition of tissue factor (TF) and phospholipids to plasma. All patients underwent coronary angiography and angioplasty, if indicated. The therapy was administered according to the guidelines, including clopidogrel 75 mg per day.

Eventually, 57 patients were included in the study; 28 patients were enrolled to the simvastatin plus ezetimibe group and 29 patients to the simvastatin plus placebo group. From the 54 patients, who received the study medication, 46 subjects were included in the final analysis (35 males), aged from 42 to 74 years (20 in the ezetimibe group and 26 in the placebo group). Six patients from the ezetimibe group and two patients from the placebo group were excluded from the analysis (p=0.2) due to drug intolerance (diarrhea, 1 patient in the ezetimibe

group and 1 patient in the placebo group), need for warfarin therapy for atrial fibrillation (1 patient in the ezetimibe group), patient non-compliance during follow-up (5 patients). Within 12 months of follow-up, no acute cardiovascular event and no deaths were observed among the randomized patients.

A mean time from chest pain onset to study inclusion was 6.5 hours in the ezetimibe group and 4.5 hours in the placebo group ($p>0.1$). The groups did not differ significantly in demographic and clinical variables, there were more NSTEMI patients in the ezetimibe group compared to the placebo group (8 vs 3, $p=0.03$). Results of routine laboratory tests at baseline were similar in both groups.

After one month of therapy, LDL cholesterol was significantly lower in the ezetimibe plus simvastatin group compared to simvastatin alone (1.73 [0.72] vs 2.13 [0.70]) mmol/L; $p=0.037$). After two months, the trend towards LDL decrease in the combination therapy group was maintained (1.75 [1.15] vs 2.30 [0.85] mmol/L; $p=0.085$).

There were no differences between the groups in all time points in respect to thrombin generation, inflammatory, and platelet activation markers. Low TXB₂ levels reflected good response to acetylsalicylic acid (ASA) in all patients (all results < 1 ng/mL).

PAI-1 decreased in both groups after 1 and 2 months of therapy. In the ezetimibe plus simvastatin group, PAI-1 level decreased by 65.5% ($p<0.001$) after 1 month and by additional 5.5% ($p<0.001$) after 2 months. In comparison, there was a PAI-1 reduction of 48% ($p<0.001$) after 1 month and 9% ($p<0.001$) after another month in the placebo plus simvastatin group. Statistically significant

reduction of PAI-1 levels (12.4 ± 0.6 vs 19.2 ± 0.5 ng/mL; $p < 0.001$) in the ezetimibe group compared to the placebo group was observed only after 1 month of therapy.

CLT decreased by 38.1% ($p < 0.001$) in the ezetimibe group and 29.4% ($p < 0.001$) in the placebo group after 1 month. After 2 months, CLT decreased even more, by 8.4% and 3.6% in the combination therapy and the monotherapy groups, respectively (both $p < 0.001$). CLT was significantly shorter in the ezetimibe plus simvastatin group compared to the placebo group (77.6 ± 2.1 vs 88.8 ± 1.7 min; $p < 0.0002$) and continued to decrease during 2nd month of follow-up (66.8 ± 1.7 vs 84.2 ± 1.5 min; $p < 0.0001$). In both ezetimibe and placebo groups, there was a strong correlation between CLT and PAI-1 level at baseline (in both groups $r = 0.9$; $p < 0.0001$), but not at other time points.

Relative shortening of CLT and decrease of PAI-1 levels was significantly greater in the ezetimibe plus placebo group compared to the placebo plus simvastatin group ($p < 0.001$). A decrease of CLT and PAI-1 levels was more pronounced in the combination therapy group, after 1 and 2 months of therapy alike ($p < 0.001$).

8-iso-PGF_{2α} was lower after 1 month by 39.5% ($p < 0.0001$) in the combination therapy group and 17.4% ($p < 0.0001$) in the simvastatin monotherapy group. After 2 months of therapy, further reduction of 8-iso-PGF_{2α} was observed by 11% ($p < 0.0001$) and 11.3% ($p < 0.001$) in the ezetimibe and placebo groups, respectively. The reduction of 8-iso-PGF_{2α} was greater in patients receiving ezetimibe plus simvastatin than in the placebo group ($214.0 [81.5]$ vs $320.5 [77.0]$ pg/mL; $p = 0.00001$). Additional significant reduction in 8-iso-PGF_{2α} levels was observed in the combination therapy group compared to the simvastatin monotherapy group after 2 months of therapy ($175.0 [77.0]$ vs $279.0 [95.0]$ pg/mL; $p = 0.000004$).

A relative decrease in 8-iso-PFG_{2α} levels was significantly greater in the ezetimibe plus simvastatin group at both time points.

A relative drop in CLT, PAI-1 and 8-izoprostanes was significantly greater in the ezetimibe group compared to the placebo group. All these parameters were much lower in patients on simvastatin plus ezetimibe as soon as at the first month of therapy, and this difference persisted during follow-up. There was no relationship between these changes and lipid profile during therapy.

The current study demonstrates that combination therapy with ezetimibe and simvastatin is associated with more profound inhibition of oxidation stress and enhanced activation of the fibrinolytic system in ACS patients as early as following 1 month of therapy, compared to simvastatin monotherapy. The study suggests that ezetimibe combined with statin may have additional anti-thrombotic effects on top of its cholesterol-lowering action.

1. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, et al. Heart disease and stroke statistics 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009;119:480-6.
2. Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007;28:1598-660.
3. Jawien J. New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn* 2008;118:127-31.
4. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:937-54.
5. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
6. Muller JE, Abela GS, Nesto RW, Tofler GH. Triggers, acute risk factors and vulnerable plaques: the lexicon of a new frontier. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:809-13.
7. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-8.
8. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36-44.
9. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1223-30.

10. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997;96:396-9.
11. Shah PK, Galis ZS. Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain. *Circulation* 2001;104:1878-80.
12. Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1359-66.
13. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993;69:377-81.
14. Ambrose JA, Tannenbaum MA, Alexopoulos D, et al. Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:56-62.
15. Rioufol G, Finet G, Ginon I, et al. Multiple atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome: a three-vessel intravascular ultrasound study. *Circulation* 2002;106:804-8.
16. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
17. Neumann FJ, Ott I, Marx N, et al. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3399-405.
18. Niessen RW, Lamping RJ, Jansen PM, et al. Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on HepG2 cells and in baboons. *Thromb Haemost* 1997;78:1088-92.
19. Oleksowicz L, Mrowiec Z, Zuckerman D, Isaacs R, Dutcher J, Puszkun E. Platelet activation induced by interleukin-6: evidence for a mechanism involving arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemost* 1994;72:302-8.
20. Kerr R, Stirling D, Ludlam CA. Interleukin 6 and haemostasis. *Br J Haematol* 2001;115:3-12.

21. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Yannakoulia M, Chrysohoou C, Stefanadis C. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study. *Atherosclerosis* 2005;183:308-15.
22. Bossowska A, Kiersnowska-Rogowska B, Bossowski A, Galar B, Sowinski P. Cytokines in patients with ischaemic heart disease or myocardial infarction. *Kardiol Pol* 2003;59:105-14.
23. Ikeda U, Ohkawa F, Seino Y, et al. Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:579-84.
24. Halawa B, Salomon P, Jolda-Mydlowska B, Zysko D. Levels of tumor necrosis factor (TNF-alpha) and interleukin 6 (IL-6) in serum of patients with acute myocardial infarction. *Pol Arch Med Wewn* 1999;101:197-203.
25. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA* 2001;286:2107-13.
26. Ridker PM. Role of inflammatory biomarkers in prediction of coronary heart disease. *Lancet* 2001;358:946-8.
27. Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001;103:2531-4.
28. Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment. *Am J Med* 2004;116 Suppl 6A:9S-16S.
29. Ortolani P, Marzocchi A, Marrozzini C, et al. Predictive value of high sensitivity C-reactive protein in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2008;29:1241-9.
30. Shu J, Ren N, Du JB, Zhang M, Cong HL, Huang TG. Increased levels of interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 are of cardiac origin in acute coronary syndrome. *Scand Cardiovasc J* 2007;41:149-54.
31. Rothwell PM, Howard SC, Power DA, et al. Fibrinogen concentration and risk of ischemic stroke and acute coronary events in 5113 patients with transient ischemic attack and minor ischemic stroke. *Stroke* 2004;35:2300-5.

32. Haverkate F. Levels of haemostatic factors, arteriosclerosis and cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 2002;39:109-12.
33. Netea MG, Kullberg BJ, Verschueren I, Van Der Meer JW. Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *Eur J Immunol* 2000;30:3057-60.
34. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma. *Circ Res* 2002;90:E34-8.
35. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res* 2001;89:E41-5.
36. Elhage R, Jawien J, Rudling M, et al. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res* 2003;59:234-40.
37. Rosso R, Roth A, Herz I, Miller H, Keren G, George J. Serum levels of interleukin-18 in patients with stable and unstable angina pectoris. *Int J Cardiol* 2005;98:45-8.
38. Hishikawa K, Luscher TF. Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997;96:3610-6.
39. Kumagai T, Matsukawa N, Kaneko Y, Kusumi Y, Mitsumata M, Uchida K. A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator: identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem* 2004;279:48389-96.
40. Jun T, Ke-yan F, Catalano M. Increased superoxide anion production in humans: a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. *J Hum Hypertens* 1996;10:305-9.
41. Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2002;105:387-92.

42. Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension* 2002;40:142-7.
43. Maclouf J, Folco G, Patrono C. Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost* 1998;79:691-705.
44. Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. The isoprostanes: a perspective. *Prostaglandins* 1997;54:823-51.
45. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 1999;26:202-26.
46. Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, et al. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest* 1992;90:136-41.
47. Fukunaga M, Makita N, Roberts LJ, 2nd, Morrow JD, Takahashi K, Badr KF. Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993;264:C1619-24.
48. Ferro D, Basili S, Pratico D, Iuliano L, FitzGerald GA, Violi F. Vitamin E reduces monocyte tissue factor expression in cirrhotic patients. *Blood* 1999;93:2945-50.
49. Szuldrzynski K, Zalewski J, Machnik A, Zmudka K. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in acute coronary syndromes are associated with systemic and local platelet activation. *Pol Arch Med Wewn* 2010;120:19-24.
50. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-71.
51. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996;94:2013-20.
52. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* 2004;10:502-9.

53. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996;383:73-5.
54. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, et al. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:13932-7.
55. Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost* 2007;5:1097-105.
56. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2311-5.
57. Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, et al. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996;94:3090-7.
58. Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003;197:1585-98.
59. Le DT, Rapaport SI, Rao LV. Relations between factor VIIa binding and expression of factor VIIa/tissue factor catalytic activity on cell surfaces. *J Biol Chem* 1992;267:15447-54.
60. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003;9:458-62.
61. Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 2005;105:2764-70.
62. Antman EM, Cohen M, Bernink PJ, et al. The TIMI risk score for unstable angina/non-ST elevation MI: A method for prognostication and therapeutic decision making. *JAMA* 2000;284:835-42.
63. Lee KW, Blann AD, Lip GY. Plasma markers of endothelial damage/dysfunction, inflammation and thrombogenesis in relation to TIMI risk stratification in acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2005;94:1077-83.

64. Undas A, Szuldrzynski K, Brummel-Ziedins KE, Tracz W, Zmudka K, Mann KG. Systemic blood coagulation activation in acute coronary syndromes. *Blood* 2009;113:2070-8.
65. Merlini PA, Ardissino D, Oltrona L, Broccolino M, Coppola R, Mannucci PM. Heightened thrombin formation but normal plasma levels of activated factor VII in patients with acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1675-9.
66. Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1989-96.
67. Gulba DC, Barthels M, Westhoff-Bleck M, et al. Increased thrombin levels during thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. Relevance for the success of therapy. *Circulation* 1991;83:937-44.
68. Vila V, Martinez-Sales V, Reganon E, et al. Effects of unfractionated and low molecular weight heparins on plasma levels of hemostatic factors in patients with acute coronary syndromes. *Haematologica* 2001;86:729-34.
69. Kamath S, Blann AD, Lip GY. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J* 2001;22:1561-71.
70. Soulet C, Gendreau S, Missy K, Benard V, Plantavid M, Payrastre B. Characterisation of Rac activation in thrombin- and collagen-stimulated human blood platelets. *FEBS Lett* 2001;507:253-8.
71. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol* 2001;8:270-6.
72. Eidt JF, Allison P, Noble S, et al. Thrombin is an important mediator of platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries with endothelial injury. *J Clin Invest* 1989;84:18-27.
73. Gross PL, Furie BC, Merrill-Skoloff G, Chou J, Furie B. Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development. *J Leukoc Biol* 2005;78:1318-26.

74. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991;64:1057-68.
75. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004;104:3190-7.
76. Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest* 1996;97:949-56.
77. Vezza R, Mezzasoma AM, Venditti G, Gresele P. Prostaglandin endoperoxides and thromboxane A2 activate the same receptor isoforms in human platelets. *Thromb Haemost* 2002;87:114-21.
78. Smith JB, Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol* 1971;231:235-7.
79. Clarke RJ, Mayo G, Price P, FitzGerald GA. Suppression of thromboxane A2 but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N Engl J Med* 1991;325:1137-41.
80. Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ. Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke* 2006;37:2153-8.
81. 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.
82. Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001;98:1047-54.
83. Lee Y, Lee WH, Lee SC, et al. CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome. *Cardiology* 1999;92:11-6.
84. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:896-9.

85. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:4-43.
86. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-4.
87. Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczeck RA, Muller-Berghaus G. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost* 1998;80:1008-14.
88. Zhou L, Stordeur P, de Lavarelle A, et al. CD40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent procoagulant activity. *Thromb Haemost* 1998;79:1025-8.
89. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2428-34.
90. Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, Peters MJ, Callard RE. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology* 2000;100:441-8.
91. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4342-6.
92. Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, et al. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation* 2002;106:399-402.
93. Varo N, de Lemos JA, Libby P, et al. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;108:1049-52.
94. Lim HS, Blann AD, Lip GY. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin, interleukin-6, and tissue factor in diabetes mellitus: relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *Circulation* 2004;109:2524-8.

95. Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1668-73.
96. Sinkovic A, Pogacar V. Risk stratification in patients with unstable angina and/or non-ST-elevation myocardial infarction by Troponin T and plasminogen-activator-inhibitor-1 (PAI-1). *Thromb Res* 2004;114:251-7.
97. Beygui F, Collet JP, Nagaswami C, Weisel JW, Montalescot G. Images in cardiovascular medicine. Architecture of intracoronary thrombi in ST-elevation acute myocardial infarction: time makes the difference. *Circulation* 2006;113:e21-3.
98. Undas A, Szuldrzynski K, Stepien E, et al. Reduced clot permeability and susceptibility to lysis in patients with acute coronary syndrome: effects of inflammation and oxidative stress. *Atherosclerosis* 2008;196:551-7.
99. Huber K. Plasminogen activator inhibitor type-1 (part one): basic mechanisms, regulation, and role for thromboembolic disease. *J Thromb Thrombolysis* 2001;11:183-93.
100. Deng G, Royle G, Seiffert D, Loskutoff DJ. The PAI-1/vitronectin interaction: two cats in a bag? *Thromb Haemost* 1995;74:66-70.
101. Wiman B, Hamsten A. The fibrinolytic enzyme system and its role in the etiology of thromboembolic disease. *Semin Thromb Hemost* 1990;16:207-16.
102. Levin EG, Santell L. Conversion of the active to latent plasminogen activator inhibitor from human endothelial cells. *Blood* 1987;70:1090-8.
103. Stefansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 1996;383:441-3.
104. Imperatore G, Riccardi G, Iovine C, Rivellese AA, Vaccaro O. Plasma fibrinogen: a new factor of the metabolic syndrome. A population-based study. *Diabetes Care* 1998;21:649-54.
105. Angleton P, Chandler WL, Schmer G. Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1). *Circulation* 1989;79:101-6.

106. Urano T, Sumiyoshi K, Nakamura M, Mori T, Takada Y, Takada A. Fluctuation of tPA and PAI-1 antigen levels in plasma: difference of their fluctuation patterns between male and female. *Thromb Res* 1990;60:133-9.
107. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998;98:2241-7.
108. DeWood MA, Spores J, Notske R, et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med* 1980;303:897-902.
109. Prins MH, Hirsh J. A critical review of the relationship between impaired fibrinolysis and myocardial infarction. *Am Heart J* 1991;122:545-51.
110. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Circulation* 1996;94:2057-63.
111. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995;332:635-41.
112. Almer LO, Ohlin H. Elevated levels of the rapid inhibitor of plasminogen activator (t-PAI) in acute myocardial infarction. *Thromb Res* 1987;47:335-9.
113. Ferlito S, Gallina M, Mangiameli S, Chiaranda G. Thrombotic markers during myocardial infarction. *Panminerva Med* 1995;37:133-6.
114. Paganelli F, Alessi MC, Morange P, Maixent JM, Levy S, Vague IJ. Relationship of plasminogen activator inhibitor-1 levels following thrombolytic therapy with rt-PA as compared to streptokinase and patency of infarct related coronary artery. *Thromb Haemost* 1999;82:104-8.
115. Sinkovic A. Pretreatment plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels and the outcome of thrombolysis with streptokinase in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1998;136:406-11.

- 116.Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89-118.
- 117.Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 1999;144:1235-44.
- 118.Ridley AJ. Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:24-30.
- 119.Jones PH, Davidson MH, Stein EA, et al. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR* Trial). *Am J Cardiol* 2003;92:152-60.
- 120.Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e149-61.
- 121.Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2004;350:1495-504.
- 122.Okazaki S, Yokoyama T, Miyauchi K, et al. Early statin treatment in patients with acute coronary syndrome: demonstration of the beneficial effect on atherosclerotic lesions by serial volumetric intravascular ultrasound analysis during half a year after coronary event: the ESTABLISH Study. *Circulation* 2004;110:1061-8.
- 123.Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Kaczor M, Musial J. New nonlipid effects of statins and their clinical relevance in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 2004;91:1065-77.
- 124.Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004;109:III39-43.
- 125.Kleemann R, Kooistra T. HMG-CoA reductase inhibitors: effects on chronic subacute inflammation and onset of atherosclerosis induced by dietary cholesterol. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005;5:441-53.

126. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008;359:2195-207.
127. Lewandowski M, Kornacewicz-Jach Z, Millo B, et al. The influence of low dose atorvastatin on inflammatory marker levels in patients with acute coronary syndrome and its potential clinical value. *Cardiol J* 2008;15:357-64.
128. Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:265-72.
129. Hilgendorff A, Muth H, Parviz B, et al. Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003;41:397-401.
130. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002;105:1756-9.
131. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Statins and blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:287-94.
132. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Brummel-Ziedins KE, Brozek J, Szczeklik A, Mann KG. Simvastatin given for 3 days can inhibit thrombin generation and activation of factor V and enhance factor Va inactivation in hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1524-5.
133. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Domagala TB, et al. Early antithrombotic and anti-inflammatory effects of simvastatin versus fenofibrate in patients with hypercholesterolemia. *Thromb Haemost* 2005;94:193-9.
134. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, et al. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2009;360:1851-61.
135. Zucker ML, Trowbridge C, Krehbiel P, Jackson B, Chernoff SB, Dujovne CA. Platelet function in hypercholesterolemics before and after hypolipidemic drug therapy. *Haemostasis* 1986;16:57-64.

136. Wiesbauer F, Kaun C, Zorn G, Maurer G, Huber K, Wojta J. HMG CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins. *Br J Pharmacol* 2002;135:284-92.
137. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Lowenhoff T, Szczeklik A. Statins, fenofibrate, and quinapril increase clot permeability and enhance fibrinolysis in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 2006;4:1029-36.
138. Patrono C, Falco A, Davi G. Isoprostane formation and inhibition in atherothrombosis. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:198-203.
139. Pastuszczak M, Kotlarz A, Mostowik M, Zalewski J, Zmudka K, Undas A. Prior simvastatin treatment is associated with reduced thrombin generation and platelet activation in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Thromb Res* 2010;125:382-6.
140. Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303:1201-4.
141. Ballantyne CM, Hourii J, Notarbartolo A, et al. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation* 2003;107:2409-15.
142. Vaverkova H, Farnier M, Averna M, et al. Lipid-Altering Efficacy of Ezetimibe/Simvastatin 10/20 mg Compared to Rosuvastatin 10 mg in High-Risk Patients with and without Type 2 Diabetes Mellitus Inadequately Controlled Despite Prior Statin Monotherapy. *Cardiovasc Ther* 2010.
143. Chenot F, Montant PF, Marcovitch O, Blaimont M, de Meester A, Descamps OS. Co-administration of ezetimibe and simvastatin in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2007;37:357-63.
144. Maki-Petaja KM, Booth AD, Hall FC, et al. Ezetimibe and simvastatin reduce inflammation, disease activity, and aortic stiffness and improve endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:852-8.
145. Hussein O, Minasian L, Itzkovich Y, Shestatski K, Solomon L, Zidan J. Ezetimibe's effect on platelet aggregation and LDL tendency to peroxidation

- in hypercholesterolaemia as monotherapy or in addition to simvastatin. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65:637-45.
146. Yamamoto K, Shibayama S, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J. A novel cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases adipose-derived and vascular PAI-1 expression in vivo. *Thromb Res* 2009;124:644-5.
147. Turfaner N, Uzun H, Balci H, et al. Ezetimibe therapy and its influence on oxidative stress and fibrinolytic activity. *South Med J* 2010;103:428-33.
148. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Kosugi R, et al. Effects of ezetimibe add-on therapy for high-risk patients with dyslipidemia. *Lipids Health Dis* 2009;8:41.
149. Rossebo AB, Pedersen TR, Boman K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med* 2008;359:1343-56.
150. Peto R, Emberson J, Landray M, et al. Analyses of cancer data from three ezetimibe trials. *N Engl J Med* 2008;359:1357-66.
151. Taylor AJ, Villines TC, Stanek EJ, et al. Extended-release niacin or ezetimibe and carotid intima-media thickness. *N Engl J Med* 2009;361:2113-22.
152. Cannon CP, Giugliano RP, Blazing MA, et al. Rationale and design of IMPROVE-IT (IMProved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial): comparison of ezetimibe/simvastatin versus simvastatin monotherapy on cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2008;156:826-32.
153. Califf RM, Lokhnygina Y, Cannon CP, et al. An update on the IMPROVED reduction of outcomes: Vytorin Efficacy International Trial (IMPROVE-IT) design. *Am Heart J* 2010;159:705-9.
154. Kastelein JJ, Bots ML. Statin therapy with ezetimibe or niacin in high-risk patients. *N Engl J Med* 2009;361:2180-3.
155. Lisman T, Leebeek FW, Mosnier LO, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis. *Gastroenterology* 2001;121:131-9.

156. Gabriel AS, Ahnve S, Wretling B, Martinsson A. IL-6 and IL-1 receptor antagonist in stable angina pectoris and relation of IL-6 to clinical findings in acute myocardial infarction. *J Intern Med* 2000;248:61-6.
157. Maier W, Altwegg LA, Corti R, et al. Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein. *Circulation* 2005;111:1355-61.
158. De Servi S, Mariani M, Mariani G, Mazzone A. C-reactive protein increase in unstable coronary disease cause or effect?
J Am Coll Cardiol 2005;46:1496-502.
159. Steiner S, Speidl WS, Pleiner J, et al. Simvastatin blunts endotoxin-induced tissue factor in vivo. *Circulation* 2005;111:1841-6.
160. Li T, Wang H, He S. Induction of interleukin-6 release from monocytes by serine proteinases and its potential mechanisms. *Scand J Immunol* 2006;64:10-6.
161. Song JW, Song KS, Choi JR, Kim SY, Rhee JH. Plasma level of IL-6 and its relationship to procoagulant and fibrinolytic markers in acute ischemic stroke. *Yonsei Med J* 2006;47:201-6.
162. Marcucci R, Gori AM, Giannotti F, et al. Markers of hypercoagulability and inflammation predict mortality in patients with heart failure. *J Thromb Haemost* 2006;4:1017-22.
163. Merlini PA, Ardissino D, Bauer KA, et al. Persistent thrombin generation during heparin therapy in patients with acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1325-30.
164. Martinez-Sales V, Vila V, Reganon E, et al. Elevated thrombotic activity after myocardial infarction: A 2-year follow-up study. *Haemostasis* 1998;28:301-6.
165. Hoffmeister HM, Ehlers R, Buttcher E, et al. Relationship between minor myocardial damage and inflammatory acute-phase reaction in acute coronary syndromes. *J Thromb Thrombolysis* 2003;15:33-9.

166. Merlini PA, Bauer KA, Oltrona L, et al. Persistent activation of coagulation mechanism in unstable angina and myocardial infarction. *Circulation* 1994;90:61-8.
167. Undas A, Brummel KE, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor V, and factor XIII and by enhancing factor Va inactivation. *Circulation* 2001;103:2248-53.
168. Olivotti L, Ghigliotti G, Spallarossa P, et al. High doses of atorvastatin do not affect activity of prothrombinase in patients with acute coronary syndromes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:315-22.
169. Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. *Circulation* 1999;99:3227-33.
170. Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, et al. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 2005;111:412-9.
171. Fuchs I, Frossard M, Spiel A, Riedmuller E, Laggner AN, Jilma B. Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS. *J Thromb Haemost* 2006;4:2547-52.
172. Van de Werf F, Ardissino D, Betriu A, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2003;24:28-66.
173. Garlich CD, John S, Schmeisser A, et al. Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation* 2001;104:2395-400.
174. Ferroni P, Basili S, Santilli F, Davi G. Low-density lipoprotein-lowering medication and platelet function. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:346-54.

- 175.Semb AG, van Wissen S, Ueland T, et al. Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:275-9.
- 176.Piorkowski M, Fischer S, Stellbaum C, et al. Treatment with ezetimibe plus low-dose atorvastatin compared with higher-dose atorvastatin alone: is sufficient cholesterol-lowering enough to inhibit platelets? *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1035-42.
- 177.Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003;348:1104-11.
- 178.Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005;129:307-21.
- 179.Newby DE, McLeod AL, Uren NG, et al. Impaired coronary tissue plasminogen activator release is associated with coronary atherosclerosis and cigarette smoking: direct link between endothelial dysfunction and atherothrombosis. *Circulation* 2001;103:1936-41.
- 180.Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Rosendaal FR, Lisman T. Plasma levels of fibrinolytic proteins and the risk of myocardial infarction in men. *Blood* 2010;116:529-36.
- 181.Guimaraes AH, de Bruijne EL, Lisman T, et al. Hypofibrinolysis is a risk factor for arterial thrombosis at young age. *Br J Haematol* 2009;145:115-20.
- 182.Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2005;105:1102-5.
- 183.Mills JD, Ariens RA, Mansfield MW, Grant PJ. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 2002;106:1938-42.
- 184.Undas A, Wiek I, Stepien E, Zmudka K, Tracz W. Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation, and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome. *Diabetes Care* 2008;31:1590-5.

185. Nakagami H, Osako MK, Takami Y, et al. Vascular protective effects of ezetimibe in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2009;203:51-8.
186. van der Putten RF, Glatz JF, Hermens WT. Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta* 2006;371:37-54.
187. Elesber AA, Best PJ, Lennon RJ, et al. Plasma 8-iso-prostaglandin F2alpha, a marker of oxidative stress, is increased in patients with acute myocardial infarction. *Free Radic Res* 2006;40:385-91.
188. Hoffman M. Alterations of fibrinogen structure in human disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6:206-11.
189. Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med* 1994;17:429-37.
190. Olinescu RM, Kummerow FA. Fibrinogen is an efficient antioxidant. *J Nutr Biochem* 2001;12:162-9.
191. Marchi R, Mirshahi SS, Soria C, et al. Thrombotic dysfibrinogenemia. Fibrinogen "Caracas V" relation between very tight fibrin network and defective clot degradability. *Thromb Res* 2000;99:187-93.
192. Feng YH, Hart G. In vitro oxidative damage to tissue-type plasminogen activator: a selective modification of the biological functions. *Cardiovasc Res* 1995;30:255-61.
193. Upchurch Jr GR, Ramdev N, Walsh MT, Loscalzo J. Prothrombotic Consequences of the Oxidation of Fibrinogen and their Inhibition by Aspirin. *J Thromb Thrombolysis* 1998;5:9-14.