

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Marek Żółciński

Mechanizmy przeciwwzkrzepowego działania atorwastatyny u osób
zdrowych i pacjentów po przebytych epizodzie żylnych chorób
zakrzepowo-zatorowych

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Anetta Undas

Pracę wykonano w Instytucie Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. med. Jerzy Sadowski

Kraków, 2011

mojej Žonie Sabinie

SPIS TREŚCI

1. Wprowadzenie.....	6
1.1. Rola układu hemostazy.....	6
1.2. Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa i jej powikłania.....	6
1.2.1. Czynniki ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej.....	9
1.2.2. Powstawanie zakrzepu w łożysku żylnym.....	12
1.2.3. Proces generacji trombiny i jej działanie.....	13
1.2.4. Układ białka C.....	14
1.2.5. Powstanie zakrzepu fibrynowego.....	14
1.3. Metody badania skrzepu fibrynowego.....	19
1.4. Czynniki modulujące strukturę skrzepu fibrynowego.....	21
1.4.1. Czynniki genetyczne.....	21
1.4.2. Czynniki nabyte.....	21
1.5. Właściwości skrzepu fibrynowego w żyłnej chorobie zakrzepowo-zatorowej.....	27
1.6. Właściwości skrzepu fibrynowego w innych jednostkach chorobowych.....	28
2. Działanie statyn.....	29
2.1. Dodatkowe, tzw. plejotropowe działanie statyn.....	29
2.2. Wpływ statyn na układ krzepnięcia	31
2.2.1. Statyny a aktywność kompleksu TF – FVIIa.....	31
2.2.2. Statyny a generacja trombiny.....	32
2.2.3. Statyny a trombomodulina i układ białka C.....	33
2.2.4. Statyny a struktura i funkcja skrzepu fibrynowego.....	33
2.2.5. Statyny a płytki krwi.....	34
2.3. Statyny a żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa – dane z badań klinicznych.....	34
3. Założenia i cele pracy.....	36
4. Badani.....	37
4.1. Pacjenci z żyłną chorobą zakrzepowo-zatorową.....	37
4.1.1. Kryteria kwalifikacji.....	37
4.1.2. Kryteria wykluczające.....	37
4.2. Grupa kontrolna.....	38
4.2.1. Kryteria kwalifikacji.....	38
4.2.2. Kryteria wykluczające.....	38

5. Metody.....	40
5.1. Protokół.....	40
5.2. Wykonane oznaczenia.....	40
5.2.1. Podstawowe oznaczenia.....	41
5.2.2. Markery stanu zapalnego.....	41
5.2.3. Parametry układu krzepnięcia.....	41
5.2.4. Ocena w kierunku trombofilii.....	42
5.2.5. Ocena struktury i funkcji fibryny.....	44
5.2.6. Analiza statystyczna.....	49
6. Wyniki.....	50
6.1. Charakterystyka badanych grup.....	50
6.2. Działanie atorwastatyny.....	55
6.2.1. Efekty atorwastatyny w grupie kontrolnej.....	55
6.2.2. Efekty atorwastatyny u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową.....	59
6.2.3. Zmiany parametrów fibrynowych w podgrupach pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową.....	64
6.2.4. Wyniki analizy statystycznej – moc testu.....	66
7. Dyskusja.....	68
7.1. Wyjściowe właściwości skrzepów fibrynowych w żylniej chorobie zakrzepowo-zatorowej.....	68
7.2. Efekty atorwastatyny u osób bez żylniej choroby zakrzepowo-zatorowej.....	69
7.3. Efekty atorwastatyny u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową.....	70
7.4. Ograniczenia badania.....	74
7.5. Podsumowanie.....	75
8. Wnioski.....	76
9. Streszczenie.....	77
10. Summary.....	80
11. Piśmiennictwo.....	83

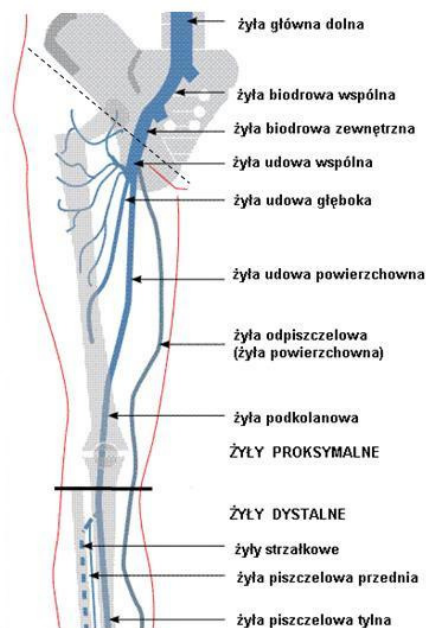
1. Wprowadzenie

1.1. Rola układu hemostazy

Układ hemostazy jest odpowiedzialny za utrzymanie integralności układu krążenia, a proces krzepnięcia krwi jest odpowiedzią na uszkodzenie naczynia. Sprawne funkcjonowanie układu hemostazy możliwe jest dzięki współdziałaniu czynników humoralnych i komórkowych. W przypadku uszkodzenia ściany naczynia, poprzez odsłonięcie czynnika tkankowego (TF) i kolagenu, dochodzi do natychmiastowej aktywacji swoistych białek osocza i płytek krwi, prowadzących do wytworzenia zakrzepu, który zapobiega dalszej utracie krwi. W układzie krążenia w warunkach fizjologicznych istnieje stała równowaga pomiędzy krzepnięciem krwi a procesem fibrynolizy, czyli dezintegracji zakrzepu.

1.2. Żylna choroba zakrzepowo – zatorowa i jej powikłania

Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ), czyli zakrzepica żył głębokich i jej częste powikłanie – zatorowość płucna występuje u około 1-2/1000 osób rocznie, a liczba zachorowań wzrasta w wieku [1,2]. W początkowym stadium zakrzepica żył głębokich często zajmuje żyły łyżki (żyły piszczelowe, żyły strzałkowe) i/lub zatoki żyłne mięśnia łyżki (Rys.1). Na tym etapie nazywana jest zakrzepicą dystalną, najczęściej jest bezobjawowa i w większości przypadków ustępuje samoistnie [3]. Rozpuszczanie zakrzepu zachodzi dzięki własnej aktywności fibrynolitycznej, silniejszej niż aktywność czynników prozakrzepowych. Zakrzepica dystalna stanowi 10-20% przypadków objawowej zakrzepicy żył głębokich i rzadko (w 20-30% przypadków) wiąże się z zatorowością płucną. W 25% przypadków nieleczona zakrzepica łyżki ulega progresji i w ciągu około 7 dni obejmuje żyły proksymalne tj. żyłę podkolanową, żyłę udową powierzchowną i wspólną, żyły biodrowe, a nawet żyłę główną dolną [4]. Zakrzepica proksymalna jest zwykle objawowa i stwarza duże (ok. 50%) ryzyko zatorowości płucnej. Wśród pacjentów z objawami zakrzepicy żył głębokich kończyn dolnych (obrzęk podudzia lub całej kończyny, bolesność uciskowa, ocieplenie kończyny, poszerzenie żył powierzchownych), aż u 80% występuje zakrzepica proksymalna.



Rysunek 1. Anatomia układu żylnego kończyny dolnej. Linia przerywaną oznaczono więzadło pachwinowe. Na podstawie: Ho WK, Deep vein thrombosis - risks and diagnosis. *Aust Fam Physician*. 2010,39:468-74, zmodyfikowane.

Najgroźniejszym powikłaniem ŻChZZ jest zatorowość płucna, czyli zamknięcie lub zwężenie tętnicy płucnej lub jej odgałęzienia przez materiał zatorowy (najczęściej zakrzep). Wobec braku swoistych objawów rozpoznanie zatorowości płucnej ustala się na podstawie klinicznego prawdopodobieństwa oraz wykonaniu badań obrazowych. Śmiertelność w przypadku nieleczonej (nierozpoznanej) zatorowości płucnej wynosi 30% [5]. Zator tętnicy płucnej jako powikłanie zakrzepicy żył głębokich występuje zwykle po 3-7 dniach, a w 10% przypadków kończy się zgonem w ciągu 1 godziny. Aktualna klasyfikacja zatorowości płucnej opiera się na indywidualnie oszacowanym ryzyku wczesnego zgonu (śmiertelność 30-dniowa), które zależy od występowania wstrząsu lub hipotensji, cech dysfunkcji prawej komory i wskaźników uszkodzenia mięśnia sercowego. Na tej podstawie wyróżnia się

zatorowość płucną wysokiego (śmiertelność >15%) oraz niewysokiego (śmiertelność ≤15%) ryzyka zgonu, co determinuje dalsze postępowanie terapeutyczne [5].

Podstawowe znaczenie w leczeniu ŻChZZ ma niezwłoczne wdrożenie antykoagulacji za pomocą heparyny niefrakcjonowanej, drobnocząsteczkowej lub fondapariny, z wczesnym podaniem doustnych antagonistów witaminy K (VKA) w celu uzyskania terapeutycznej wartości (zakres 2,0 – 3,0) międzynarodowego współczynnika znormalizowanego (INR). W przypadku braku przeciwwskazań leczenie trombolityczne zaleca się w zatorowości płucnej wysokiego ryzyka zgonu oraz u wybranych pacjentów z rozległą świeżą zakrzepicą proksymalnych żył głębokich kończyn dolnych (np. żył biodrowo-udowych) i objawami od <14 dni [6]. Inne metody lecznicze to embolektomia płucna, umieszczenie filtru w żyłę główną dolną i trombektomia żylna. Embolektomię płucną lub trombektomię żylną wykonuje się w przypadku potwierdzonej zatorowości płucnej wysokiego ryzyka przy współistnieniu przeciwwskazań lub niepowodzeniu leczenia fibrynolitycznego, filtry w żyłę główną dolną umieszcza się natomiast w razie przeciwwskazań do leczenia przeciwzakrzepowego i dużego ryzyka nawrotu zatorowości płucnej.

Chorzy z zakrzepicą żył głębokich (zarówno proksymalną jak i dystalną) lub z zatorowością płucną wymagają długotrwałej wtórnej profilaktyki z użyciem leków przeciwkrzepliwych (najczęściej VKA), z uwagi na duże ryzyko powiększenia się zakrzepu, nawrotu zakrzepicy lub ponownego zatoru. Według zaleceń *American College of Chest Physicians* z 2008 roku i opartych na nich polskich zaleceniach z 2009 roku [6] zaleca się podawanie VKA przez min. 3 miesiące po pierwszym epizodzie ŻChZZ, a nawet bezterminowo u chorych z samoistną zakrzepicą proksymalną i/lub zatorowością płucną. U pacjentów z ≥2 epizodami ŻChZZ wskazane jest przewlekłe stosowanie VKA. Po zakończeniu antykoagulacji ryzyko nawrotu ŻChZZ po pierwszym epizodzie samoistnej zakrzepicy żył głębokich wynosi w ciągu 2, 5 i 8 lat obserwacji odpowiednio 18%, 25% i 30%, jednak w obecności nowotworu złośliwego lub niektórych postaci trombofilii ryzyko nawrotu ŻChZZ jest znacznie większe. Jeżeli przyczyną zakrzepicy żył głębokich był przejściowy czynnik ryzyka (np. ciąża, unieruchomienie) ryzyko nawrotu ŻChZZ w ciągu 1 i 2 roku po wstrzymaniu antykoagulacji jest mniejsze i wynosi odpowiednio 3,3% i 6,6% [7]. Obecność rezydualnej skrzepliny w żyłach głębokich kończyn dolnych i zwiększone stężenie dimeru D w osoczu po przerwaniu antykoagulacji wiążą się ze zwiększonym ryzykiem nawrotu ŻChZZ [6].

Odległe powikłania ŻChZZ to zespół pozakrzepowy i zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne. Zespół pozakrzepowy powstaje jako konsekwencja uszkodzenia ściany naczyń żylnych kończyn dolnych i ich zastawek przez zakrzepicę co powoduje nieprawidłowe

cofanie się krwi żyłnej oraz nadciśnienie żyłne w kończynach dolnych. Zastój krwi żyłnej i miejscowa aktywacja odpowiedzi zapalnej odpowiedzialne są za wystąpienie najczęstszych objawów tj. obrzęk, uczucie bólu i ciężkości kończyn dolnych, zmiany skórne (wyprysk, przebarwienia, *lipodermatosclerosis*, owrzodzenia). Szacuje się, że w ciągu 5 lat od epizodu objawowej zakrzepicy żył głębokich kończyn dolnych zespół pozakrzepowy rozwija się u 28% osób [8].

Zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne to rzadkie powikłanie ostrej zatorowości płucnej, obserwowane w ok. 4% przypadków, kiedy to pomimo właściwego leczenia przeciwzakrzepowego skrzepliny w łożysku płucnym nie rozpuszczają się, a ulegają powolnej organizacji i włóknieniu. Od epizodu zatorowości płucnej do czasu rozwinięcia się objawów nadciśnienia płucnego upływa od kilku do kilkunastu lat. Stopniowa progresja choroby zależy od kolejnych epizodów nawracającej zatorowości płucnej lub miejscowego wykrzepiania. Dodatkowo w naczyniach, które pozostały drożne i przyjmują zwiększoną objętość krwi pod zwiększonym ciśnieniem dochodzi do dysfunkcji wydzielniczej śródbłonna naczyniowego (zmniejszenie wydzielania prostacykliny i tlenu azotu przy nadmiernej produkcji endoteliny) prowadzącej do proliferacji wszystkich warstw ściany drobnych tętniczek płucnych i wytworzenia tzw. zmian splotowatych [9].

Wystąpienie powikłań ŻChZZ wiąże się z dużą chorobowością i kosztami opieki medycznej. Prawidłowa profilaktyka ŻChZZ jest uznawana za najważniejszą interwencję zwiększającą bezpieczeństwo chorych, pozwalającą nie tylko uniknąć niekorzystnych stanów zdrowotnych, ale i zmniejszyć ogólny koszt opieki [6].

1.2.1. Czynniki ryzyka ŻChZZ

Klasycznie przyczyn zakrzepicy upatruje się w zakłóceniu równowagi między 3 składnikami - tzw. triada Virchowa - zwolnienie przepływu krwi, przewaga czynników prozakrzepowych, uszkodzenie ściany naczynia. Znane czynniki ryzyka zakrzepicy wpływają zwykle na ≥ 2 ww. elementy. Ocenia się, że blisko 60% przypadków ŻChZZ indukowanych jest przemijającymi czynnikami ryzyka (unieruchomienie, uraz, operacja, ciąża i połóg, stosowanie doustnych środków hormonalnych) (Tabela 1).

Tabela 1. Kliniczne czynniki ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej [10]

Czynniki silne (iloraz szans >10)	<ul style="list-style-type: none"> • złamania miednicy, bliższego odcinka kości udowej i innych kości długich kończyn dolnych • aloplastyka stawu biodrowego/kolanowego • zabieg chirurgiczny u chorego na nowotwór złośliwy • uraz wielonarządowy • ostre uszkodzenie rdzenia kręgowego
Czynniki umiarkowane (iloraz szans 2-9)	<ul style="list-style-type: none"> • artroskopia • doustne środki hormonalne • ciąża i połóg • udar mózgu • przebyta ŻChZZ
Czynniki słabe (iloraz szans <2)	<ul style="list-style-type: none"> • unieruchomienie • otyłość • zaawansowany wiek

ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

ŻChZZ niezwiązaną z przemijającymi czynnikami ryzyka określa się mianem samoistnej lub idiopatycznej. U ok. 25% pacjentów z samoistną ŻChZZ stwierdza się genetyczne predyspozycje do tworzenia zakrzepu, czyli tzw. trombofilię wrodzoną [11-13]. Najczęstszą przyczyną trombofilii wrodzonej u osób rasy białej jest czynnik V Leiden (Tabela 2). U osób obciążonych najczęstszymi typami trombofilii wrodzonych zakrzepica żylna rozwija się zwykle przy jednoczesnej obecności nabytego czynnika (np. ciąża, uraz, nowotwór złośliwy). Ryzyko zakrzepicy związanej z trombofilią wrodzoną znacznie rośnie z wiekiem.

Tabela 2. Najczęstsze trombofilie wrodzone

Rodzaj trombofilii	Częstość występowania (%)		Wzrost ryzyka rozwoju zakrzepicy żyłnej u heterozygot
	populacja ogólna	chorzy z ŻChZZ	
czynnik V Leiden	5	20	4-8x
wariant 20210A genu protrombiny	3	7	2-5x
heterozygotyczny niedobór białka C	0,3	4	6-8x
heterozygotyczny niedobór białka S	0,1-0,2	2	5-10x
heterozygotyczny niedobór AT	0,02-0,1	2	10-20x
zwiększona aktywność cz. VIII *	11	20	5

ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa, AT – antytrombina

* - zwiększona aktywność cz.VIII zależy także od czynników nabytych (np. stanu zapalnego)

1.2.2. Powstawanie zakrzepu w łożysku żylnym

Patogeneza ŻChZZ nie jest dokładnie poznana. Początku zakrzepicy żyłnej upatruje się w zatokach żylnych, gdzie w warunkach zwolnionego przepływu krwi dochodzi do zmniejszenia pH i odsłonięcia TF inicjującego kaskadę krzepnięcia, w przebiegu której generowana jest trombina, a następnie tworzony jest zakrzep fibrynowy [14]. W powstawaniu zakrzepu biorą także udział komórki śródbłonna i aktywowane płytki krwi, jednak w łożysku żylnym, czyli w środowisku zwolnionego przepływu krwi i działania małych sił ścinających, decydujące znaczenie ma generacja trombiny na drodze zależnej od TF.

W warunkach fizjologicznych TF (glikoproteina o masie cząsteczkowej 47 kDa) nie występuje na powierzchni śródbłonna, ale znajduje się w głębszych warstwach ściany naczyń takich jak komórki mięśni gładkich, pericyty i fibroblasty [15].

W ostatnich latach wykazano obecność TF o tzw. ukrytej (ang. *encrypted*) aktywności na powierzchni błony komórkowej monocytów [16] prezentujących antygen CD14 [17] oraz krążących mikrocząstek [18,19]. Ukrywanie aktywności prozakrzepowej TF polega na jego posttranslacyjnej modyfikacji, której efektem jest prezentowanie TF w postaci homodimerów zachowujących zdolność wiązania czynnika (f) VII/VIIa, jednak powstały kompleks wykazuje znikomą aktywność prozakrzepową [20]. Odkrywanie aktywności TF związane jest z wytworzeniem wiązania dwusiarczkowego między resztami tiolowymi cysteiny w pozycji 186 i 209 w domenie pozakomórkowej TF [21], które jest katalizowane przez izomerazę dwusiarczkową uwalnianą przez aktywowane komórki śródbłonna i płytki krwi [22]. Oddziaływanie między przestrzennie oddalonymi aminokwasami w cząsteczce białka nazywane jest oddziaływaniem allosterycznym i prowadzi do zmian konformacyjnych struktury TF. Powstały w ten sposób TF o tzw. odsłoniętej (ang.: *decrypted*) aktywności, tworząc kompleks z fVIIa, nabywa zdolności do wiązania i aktywacji fX [21,22].

Proces odkrywania i ukrywania TF jest dodatkowo regulowany stężeniem jonów wapnia w cytoplazmie oraz składem fosfolipidów budujących zewnętrzną warstwę błony komórkowej. Pobudzenie komórki i napływ jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej do cytoplazmy powoduje zwiększenie stężenia fosfatydyloseryny w błonie komórkowej, co wspomaga proces odsłonięcia aktywności prozakrzepowej TF [16].

1.2.3. Proces generacji trombiny i jej działanie

Generacja trombiny jest procesem dynamicznym, w którym można wyróżnić fazę inicjacji, propagacji i wygaszenia [23]. W fazie inicjacji TF, jako kofaktor przyspiesza autoaktywację fVII do fVIIa [24], a powstały w ten sposób kompleks tenazy zewnątrzpochodnej (TF-fVIIa) aktywuje niewielkie ilości czynnika IX i X [25,26]. Czynniki Xa po połączeniu z fVa i protrombiną tworzy kompleks protrombinazy inicjujący powstawanie trombiny. Niewielka ilość wyprodukowanej początkowo trombiny jest niezbędna do aktywacji fVIII do fVIIIa [27] i ostatecznie kompleks fVIIIa/fIXa (tenaza wewnątrzpochodna) staje się źródłem istotnych ilości fIXa. W fazie propagacji krzepnięcia tenaza wewnątrzpochodna staje się znacznie bardziej wydajna niż tenaza zewnątrzpochodna [28] i odpowiada za >90% generowanej trombiny. W fazie wygaszenia ilość generowanej trombiny osiąga *plateau*.

Generacja trombiny może zostać zainicjowana na drodze wewnątrzpochodnej, w której fXII, ulega aktywacji w wyniku kontaktu z ujemnie naładowanymi powierzchniami tj. kolagenem, kwasem rybonukleinowym, polifosforanami pochodzenia płytkowego, prekallikreina, fIXa i fXIa. Rola szlaku wewnątrzpochodnego w procesie krzepnięcia krwi *in vivo* jest znikoma [29].

Kompleks protrombinazy składający się z fIXa, fVa oraz protrombiny spoczywających 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. W krwi wykrywa się także meizotrombinę powstającą z protrombiny po hydrolizie przy Arg 320. Autoaktywacja 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 – antytrombinę (AT) - tworząc kompleks trombina-antytrombina (TAT). Dzięki proteolitycznemu działaniu trombiny na fibrynogen powstaje fibryna – główne białko zakrzepu. Trombina aktywuje także fXI, kluczowe kofaktory krzepnięcia (fV i fVIII) oraz - w kompleksie z trombomoduliną – białko C.

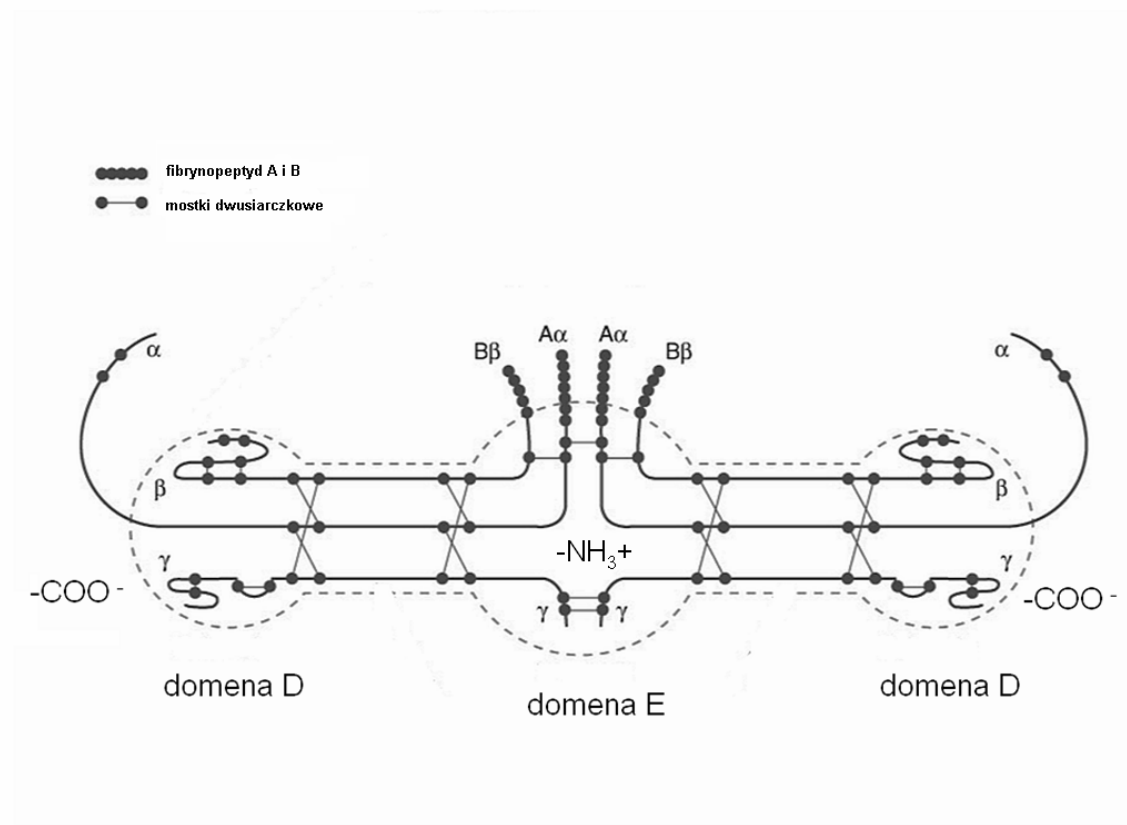
1.2.4. Układ białka C

W warunkach fizjologicznych układ białka C jest naturalnym inhibitorem proteaz, który hamuje powstawanie i aktywność α trombiny. W jego skład wchodzi: białko C, S trombomodulina (TM) oraz śródbłonkowy receptor białka C (EPCR, *endothelial cell protein C receptor*) [30]. Białko C po konwersji przez α trombinę do tzw. aktywowanego białka C (APC) inaktywuje fVa i fVIIIa. Białko S jest kofaktorem APC, eliminuje także ochronne działanie fXa wobec fVa oraz - na drodze niezależnej do APC - hamuje protrombinazę i tenazę wewnątrzpochodną [31]. TM jest konstytutywnym białkiem komórek śródbłonka ułatwiającym aktywację białka C przez α trombinę. Aktywacja białka C przez układ α trombina - trombomodulina zachodzi szczególnie wydajnie, gdy jest ono połączone z receptorem błony komórkowej śródbłonka EPCR. Powstały kompleks APC – EPCR ma zdolność do proteolizy receptora typu 1 aktywowanego proteazą (PAR-1, *protease-activated receptor-1*), co zapobiega pobudzeniu komórek śródbłonka przez generowaną trombinę. Kompleks APC – EPCR poprzez wpływ na PAR-1 wykazuje działanie przeciwzapalne wobec komórek śródbłonka poprzez pobudzenie syntazy tlenku azotu (NO) oraz hamowanie ekspresji prozapalnego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i molekuł adhezyjnych [32-34].

1.2.5. Powstanie zakrzepu fibrynowego

Wytworzenie zakrzepu fibrynowego względnie odpornego na działanie czynników mechanicznych i enzymatycznych z fibrynogeny stanowi finalny produkt procesu krzepnięcia krwi. Fibrynogen produkowany jest w wątrobie jako rozpuszczalna glikoproteina o masie cząsteczkowej 340 kDa i wydzielany do układu krążenia tak, iż jego stężenie w osoczu utrzymywane jest zwykle w przedziale 2-4 g/l. Pod wpływem stanu zapalnego osoczowe stężenie fibrynogeny ulega zwiększeniu [35]. Fibrynogen jest symetrycznym dimerem zbudowanym z 3 par polipeptydowych łańcuchów: A α , B β , γ , połączonych 29 mostkami dwusiarczkowymi (Rys.2). Badania metodą krystalografii rentgenowskiej wykazały, że dwa C-końcowe regiony (tzw. domeny D) zbudowane z łańcuchów B β , γ są oddalone od siebie, przez co cząsteczka fibrynogeny ma wydłużony i symetryczny kształt. Część centralną (tzw.

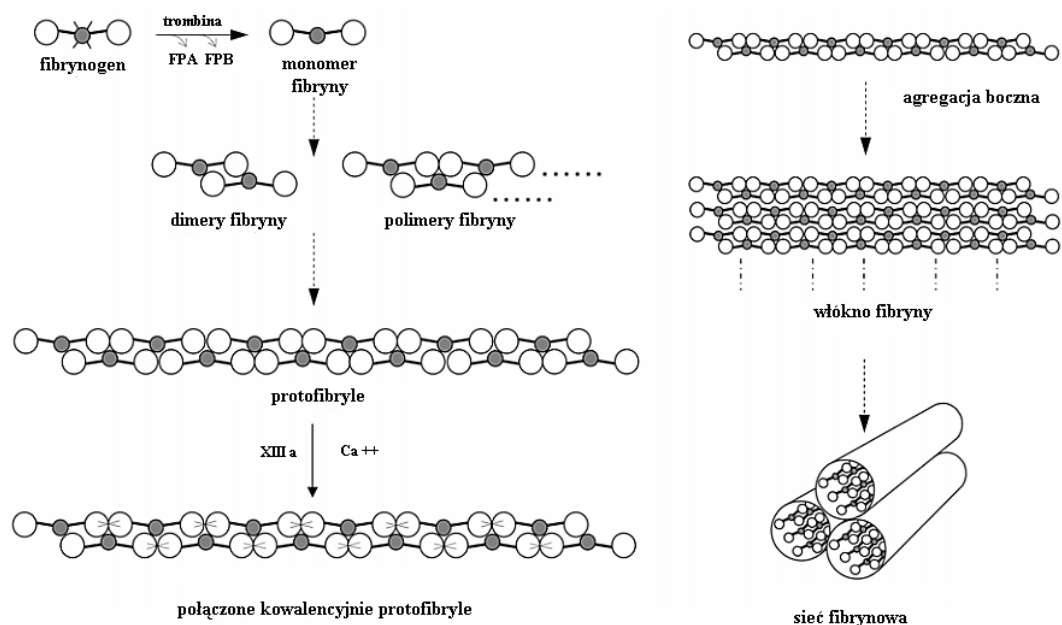
domenę E) budują natomiast dodatnio naładowane aminowe końce wszystkich sześciu łańcuchów wraz z fibrynopeptydami A (FPA) i B (FPB) [36].



Rysunek 2. Schematyczna budowa fibrynogenu.. Na podstawie: katalogu firmy Haematologic Technologies Inc. http://www.haemtech.com/Platelet_Proteins/Fibrinogen.htm, zmodyfikowane.

Wytworzenie zakrzepu fibrynowego z fibrynogenu jest wieloetapowym procesem enzymatycznym inicjowanym proteolityczną aktywnością trombiny [37]. Trombina oddziela od N-końcowych fragmentów fibrynogenu 4 krótkie peptydy FPA i FPB, co prowadzi do powstania monomeru fibryny o budowie $(\alpha, \beta, \gamma)_2$. Odłączenie FPA i FPB odsłania miejsca aktywne w domenie E (zwane odpowiednio „E_A” i „E_B”), które wykazują zdolność to przyciągania elektrostatycznego, a następnie tworzenia kowalencyjnych wiązań ze specyficznymi rejonami w domenie D (odpowiednio „D_A” i „D_B”) sąsiadujących monomerów fibryny [38,39]. W ten sposób powstają protofibryle [37,40] zbudowane z dachówkowato nachodzących na siebie monomerów fibryny, które przyjmują formę dwuniciową (Rys.3). Badania krystalograficzne potwierdziły, że oddzielenie FPA warunkujące wystąpienie oddziaływań typu „E_A” i „D_A” jest kluczowe dla spontanicznej polimeryzacji i przyrostu

protofibrili na długość [41,42]. Drugim ważnym etapem jest zjawisko bocznej agregacji, które decyduje o grubości tworzącego się włókna fibryny. Oddzielenie FPB i powstanie oddziaływań typu „E_B” i „D_B” sprzyja procesowi bocznej agregacji protofibrili [43,44], choć prawdopodobnie nie jest dla niego niezbędne [45]. Duże znaczenie dla wystąpienia bocznej agregacji mają interakcje C-końcowych rejonów łańcuchów α domen D, które determinują nie tylko strukturę fibryny i jej właściwości fizykochemiczne, ale także podatność na lizę [46,47]. W przypadku zaburzenia procesu bocznej agregacji powstają skrzepy zbudowane z cienkich, rozgałęzionych włókien [43,44].



Rysunek 3. Proces polimeryzacji fibryny. Etapy konwersji fibrynogenu do monomerów fibryny i protofibrili (po stronie lewej) oraz proces bocznej agregacji protofibrili z wytworzeniem włókna i sieci fibryny (po stronie prawej). FPA - fibrynopeptyd A, FPB - fibrynopeptyd B. Na podstawie: Sjøland JA, *Inflammation and Fibrin Structure in Patients with End-Stage Renal Disease*, rozprawa doktorska 2007, zmodyfikowane.

Powstały zakrzep zyskuje na oporności na lizę dzięki powstaniu kowalencyjnych wiązań krzyżowych tworzonych przy udziale fXIIIa o aktywności transglutaminazy [48]. fXIIIa w obecności jonów Ca^{2+} katalizuje tworzenie się krzyżowych wiązań amidowych między grupami glutamyłowymi i lizynowymi (Glu398/399-Lys406), znajdującymi się w sąsiadujących C-końcowych fragmentach łańcuchów γ fibryny. Wolniej powstają wiązania krzyżowe między łańcuchami α , które sprzyjają dalszej polimeryzacji fibryny oraz utrudniają dostęp plazminie do rejonów między domeną D i E. fXIIIa katalizuje także powstawanie wiązań krzyżowych między fibryną a niektórymi białkami osocza o właściwościach antyfibrynolitycznych tj. α_2 -antyplazmina czy inhibitor fibrylizy aktywowany przez trombinę (TAFI) [49].

Procesem wiodącym do rozpuszczenia zakrzepu fibrynowego i zachowania drożności naczyń jest fibrynoliza. Fibrynoliza zachodzi jednocześnie z procesem tworzenia fibryny, a ostateczny rozmiar tworzącego się zakrzepu jest wypadkową tych dwóch antagonistycznych procesów. Podstawowy mechanizm fibrynolizy polega na stopniowej proteolizie fibryny za pośrednictwem plazminy powstającej z plazminogenu dzięki aktywności tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), a w mniejszym stopniu urokinazy (u-PA). Plazminogen produkowany jest w wątrobie jako nieaktywny zymogen i krąży w osoczu w postaci Glu-plazminogenu, który na powierzchni komórek śródbłonna może przekształcić się w postać bardziej reaktywną – tzw. Liz-plazminogen. t-PA produkowany jest przez komórki śródbłonna i po uwolnieniu do krwiobiegu natychmiast neutralizowany jest przez inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1). Część t-PA przyłącza się za pośrednictwem swoistych receptorów do powierzchni komórek śródbłonna i leukocytów, przez co unika inaktywacji przez PAI-1. Plazminogen łączy się za pośrednictwem miejsc wiążących lizynę z fibryną, gdzie - w obecności t-PA – jego konwersja do plazminy zwiększa się 200-400 – krotnie [50]. Plazmina jest kluczowym enzymem fibrynolizy, który hydrolizuje wiązania Lys-Arg fibryny, w wyniku czego powstają produkty degradacji fibryny o różnej wielkości, w tym najmniejsze dimery D zbudowane z dwóch połączonych wiązaniem krzyżowym domen D.

Głównym osoczym inhibicielem plazminy jest α_2 -antyplazmina, jednak dzięki połączeniu z fibryną plazmina unika szybkiej inaktywacji przez krążącą w osoczu α_2 -antyplazminę. Wyniki ostatnich badań wskazują, że część osoczowej α_2 -antyplazminy jest wbudowywana przy udziale fXIIIa do tworzonej fibryny, co zmniejsza podatność skrzepu na lizę [51].

Podstawowym inhibitorem t-PA jest PAI-1 uwalniany pod wpływem cytokin prozapalnych, trombiny i endotoksyn z komórek śródbłonna, hepatocytów, megakariocytów i leukocytów [50], a jego zwiększona synteza przechyla równowagę hemostazy w stronę zakrzepicy. W miarę narastania zakrzepu znacznie zwiększa się wbudowywanie wytwarzanego w nadmiarze PAI-1 do jego struktury, co prowadzi do inhibicji t-PA, a w konsekwencji do zahamowania endogennej lizy. PAI-2 jest inhibitorem t-PA produkowanym w głównie łożysku i jego znaczenie rośnie w czasie ciąży. Ogniwem łączącym krzepnięcie i fibrylizację jest TAFI. TAFI hamuje fibrylizację poprzez odszczepienie od fibryny C-końcowych reszt lizyny i argininy, co upośledza wiązanie się plazminogenu i t-PA z fibryną i stabilizuje zakrzep [50].

Struktura przestrzenna fibryny również reguluje tempo fibrylizacji. Na podstawie doświadczeń u pacjentów z wrodzoną dysfibrynogenemią (fibrynogen Dusart) donoszono, że cienkie włókna fibryny decydują o oporności na lizę [52]. Aktualnie przeważa pogląd, iż dominujące znaczenie ma budowa przestrzenna skrzepu, jego gęstość i rozmiar porów. Wykazano, że skrzepy o luźnej strukturze, większej liczbie porów oraz grubych włóknach są bardziej podatne na lizę, ponieważ są łatwiej penetrowane przez t-PA i plazminogen [44]. W warunkach *in vivo* fibrylizacja jest procesem heterogennym, toteż w obrębie zakrzepu można wyróżnić zarówno obszary podlegające szybkiej lizie jak i względnie odporne na lizę. Czynniki wpływające na to zjawisko są mało poznane, choć pewne znaczenie może mieć heterogenna budowa sieci fibrynowej w zależności od odległości od powierzchni komórek uczestniczących w jej tworzeniu. Skrzepy o najbardziej zbitej strukturze powstają tuż przy powierzchni komórek [53]. Struktura fibryny wpływa wreszcie na tempo aktywacji plazminogenu. Najnowsze badania *in vitro* wskazują, że fibryna uzyskana w obecności dużych stężeń trombiny zbudowana jest z cienkich włókien układających się w sieć o drobnych porach, na powierzchni której proteoliza plazminogenu do plazminy katalizowana przez t-PA zachodzi szybciej niż w obecności fibryny uzyskanej przy mniejszych stężeniach trombiny, grubszych włóknach i większych porach. Sam proces fibrylizacji jest jednak mniej sprawny w przypadku fibryny o cienkich włóknach i małej średnicy porów [54].

1.3. Metody badania skrzepu fibrynowego

Właściwości skrzepu można badać w roztworach oczyszczonego lub rekombinowanego fibrynogenu albo w osoczu cytrynianowym po dodaniu trombiny i/lub jonów wapnia. Wydaje się, że analizy oparte na osoczu lepiej oddają zjawiska zachodzące *in vivo*, bowiem wykorzystywany jest fibrynogen poddawany posttranslacyjnej modyfikacji oraz uwzględnia się wpływ przyłączających się do niego białek i innych cząstek. Wykazano, że włókna fibryny skrzepu uzyskanego z osocza cytrynianowego są grubsze, niż włókna skrzepu utworzonego z oczyszczonego fibrynogenu [55].

Strukturę i funkcję skrzepu fibrynowego uzyskanego *in vitro* można oceniać za pomocą: (1) wskaźnika przepuszczalności (K_s), tzw. stałej Darcy'ego (określającej wielkość porów) obliczanej na podstawie objętości buforu przesiąkającego przez żel fibrynowy w jednostce czasu; (2) tzw. *lag phase*, czyli czasu przed rozpoczęciem bocznej agregacji protofibryli; (3) maksymalnej absorbancji skrzepu odzwierciedlającej średnią wielkość włókna fibrynowego oraz ilość protofibryli przypadających na jedno włókno fibryny [56,57]. *Lag phase* oraz maksymalną absorbancję wyznacza się na podstawie przebiegu krzywej turbidimetrycznej. Zmniejszenie grubości włókna fibryny wiedzie zwykle do zmniejszenia finalnego zmętnienia skrzepu, choć zmętnienie zależy nie tylko od grubości włókna fibryny, ale także od gęstości ułożenia, ilości rozgałęzień czy wreszcie homogenności rozkładu włókien fibryny [58]. W celu oceny struktury skrzepu fibrynowego stosowana jest elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM)/ transmisyjna lub konfokalna, która pozwala na pomiar średnicy włókna, wielkości porów i kątów rozgałęzień włókien. Istotną zaletą tych technik jest bezpośrednie obrazowanie uzyskanych skrzepów, dzięki czemu możliwe jest różnicowanie sieci fibrynowych o gęstym utkaniu lub luźniej strukturze. Ograniczeniem tej metody jest analizowanie znacznie przetworzonych skrzepów (odwodnionych i utrwalonych), jednak wyniki SEM korelują z wynikami uzyskiwanymi z badań przepuszczalności skrzepów nieprzetworzonych. Dane uzyskane z SEM i badań przepuszczalności dowodzą, że średnica porów koreluje z grubością włókna fibrynowego, a skrzepy o cienkich włóknach tworzą bardziej zwarte struktury i o mniejszej średnicy porów w porównaniu do skrzepów o grubszych włóknach [47].

Istnieje zależność między grubością włókna fibrynowego i strukturą skrzepu a efektywnością fibrylizacji: ściśle upakowane włókna, o małej ilości porów i licznych rozgałęzieniach są

bardziej odporne na lizę [59]. Do testów lizy skrzepów wykorzystywany jest rekombinowany t-PA (rt-PA) w zakresie stężeń od wartości bliskich stężeniom uzyskiwanym w czasie terapii fibrynolitycznej, do stężeń 10 – krotnie większych. rt-PA dodawany jest jednocześnie z trombiną, a jego działanie określa się na podstawie zmian absorbancji żelu fibrynowego w funkcji czasu. Inną metodykę reprezentują testy, w których nie dodaje się egzogennej trombiny, a reakcje krzepnięcia osocza inicjowane są przez TF umieszczony na pęcherzykach fosfolipidowych, co wydłuża czas lizy zależnej do rt-PA (zwykle z 50 do 100 minut) [60]. Obrazy uzyskane metodą dynamicznej mikroskopii konfokalnej potwierdziły wolniejszą lizę skrzepów utkanych z gęsto upakowanych włókien w porównaniu ze skrzepami zbudowanymi włókien grubszych i luźno ułożonych, mimo że liza pojedynczego grubego włókna fibryny jest wolniejsza niż liza włókna cienkiego [44,59]. Wyniki różnych testów fibrynolizy skrzepów słabo ze sobą korelują, co świadczy o dużej zmienności lizy zależnej od danych warunków doświadczalnych.

Ostateczna budowa i funkcja skrzepu fibrynowego jest wypadkową wpływu komórek prezentujących TF, składu osocza i nasilenia generacji trombiny. Komórki obficie prezentujące TF (fibroblasty, miocyty lub stymulowane cytokinami zapalnymi komórki śródbłonna) indukują powstanie skrzepów o zbitej strukturze i opornych na lizę. Podobny wpływ na budowę i funkcję skrzepu fibrynowego wykazują czynniki osoczowe zmienione w przypadku niektórych trombofilii wrodzonych (fibrynogen Dusart) lub, co zdarza się znacznie częściej, pod wpływem czynników środowiskowych [61]. Badania prowadzone u zdrowych bliźniaków wykazały, że nabyte czynniki środowiskowe mocniej niż czynniki wrodzone determinują zmienność parametrów fibrynowych, przykładowo wpływ czynników środowiskowych na współczynnik przepuszczalności wynosił 61%, a czynników genetycznych 39% [62]. Osoczowe stężenie fibrynogenu, będące wypadkową czynników środowiskowych i wrodzonych, było najważniejszym modyfikatorem struktury skrzepu fibrynowego, choć zmienność stężenia fibrynogenu odpowiada jedynie w 18% za zmienność przepuszczalności skrzepu [62].

Wyniki badania EUROCLOT przeprowadzonego w dużej populacji pacjentów również potwierdzają większy udział czynników środowiskowych, niż genetycznych w modulowaniu parametrów skrzepów fibrynowych i lizy zależnej od rt-PA [63].

1.4. Czynniki modulujące strukturę skrzepu fibrynowego

Wśród czynników modulujących strukturę skrzepu fibrynowego wyróżnia się czynniki uwarunkowane genetycznie / wrodzone oraz czynniki nabyte.

1.4.1. Czynniki genetyczne

Czynniki genetyczne umiarkowanie wpływają na zmienność mierzalnych parametrów struktury skrzepu [63]. Na podstawie badań bliźniaków, rodzin lub pojedynczych osób oszacowano zależność zmienności struktury skrzepu od czynników genetycznych na <50%. W większości przypadków zależność ta wynosi ok. 10-40% [64], największy wpływ czynników wrodzonych (ok. 46%) zanotowano na wartość maksymalnej absorbancji skrzepu [65]. Wśród czynników genetycznych wpływających na strukturę skrzepu zidentyfikowano m. in. niektóre przypadki dysfibrynogenemii (fibrynogen Dusart [52], fibrynogen Znojmo [66], fibrynogen Krakow [67]), wariant fibrynogenu z domeną γ' [68,69], polimorfizm genu fXIII (Val34Leu) [49,70] oraz wariant 20210A genu protrombiny [71]. Dane na temat wpływu najczęstszego polimorfizmu genu łańcucha β fibrynogenu na strukturę skrzepu są sprzeczne [72,73].

1.4.2. Czynniki nabyte

Zespół metaboliczny - elementy wchodzące w skład tej jednostki chorobowej (współwystępowanie obwodu talii ≥ 80 cm u kobiet lub ≥ 94 cm u mężczyzn oraz przynajmniej 2 z następujących czynników: zwiększone stężenie triglicerydów $\geq 1,7$ mmol/l, zmniejszone stężenie cholesterolu HDL $< 1,0$ mmol/l u mężczyzn lub $< 1,3$ mmol/l u kobiet, ciśnienie tętnicze $> 130/85$ mmHg, glikemia na czczo $\geq 5,6$ mmol/l lub leczenie hiperglikemii) niekorzystnie zmieniają strukturę i funkcję skrzepu. Gęstość skrzepu fibrynowego oraz oporność na lizę rośnie wraz z ilością składowych zespołu metabolicznego [63].

Cukrzyca - w cukrzycy typu 1 lub 2 często stwierdza się hiperfibrynogenię, a skrzepy uzyskane u pacjentów z cukrzycą charakteryzują się mniejszą ilością porów, bardziej zbitą strukturą i większą liczbą rozgałęzień włókien fibryny [74,75]. Wykazano ujemną korelację między stężeniem hemoglobiny glikowanej a wielkością porów w skrzepie fibrynowym oraz dodatnią korelację z ilością rozgałęzień włókien fibryny [75]. Zmieniona struktura skrzepu w cukrzycy wynika z procesu glikacji i oksydacji fibrynogenu [68,76], które wpływają na polimeryzację fibryny oraz tworzenie wiązań krzyżowych katalizowane przez fXIIIa [76]. W badaniu z użyciem skrzepów uzyskanych z oczyszczonego osocza nie stwierdzono jednak istotnych różnic w przepuszczalności między pacjentami z cukrzycą typu 2 a osobami zdrowymi, pomimo zwiększonego stężenia glikowanego fibrynogenu u osób chorych [77]. Wdrożenie insulinoterapii powoduje zwiększenie przepuszczalności skrzepów nawet przy braku poprawy kontroli glikemii [78]. Dane na temat związku hiperglikemii z osłabieniem lizy są bardziej spójne - stwierdzono zależność niewyrównanej cukrzycy z upośledzeniem fibrynolizy [69,74], co może wynikać z upośledzenia zdolności przyłączania się plazminogenu do fibryny i zmniejszenia tempa powstawania plazminy [69]. Istnieje dodatnia korelacja między stopniem glikacji białek a opornością na lizę [40], co może predysponować do powikłań zakrzepowych w układzie krążenia u pacjentów z niewyrównaną cukrzycą.

Palenie tytoniu - zwiększa ryzyko incydentów zakrzepowych m.in. poprzez zwiększenie stężenia fibrynogenu w osoczu. Wykazano, że wypalenie dwóch papierosów powoduje (w porównaniu do osób niepalących) niekorzystne zmiany struktury skrzepów fibrynowych, które stają się bardziej zbite i utkane z cienkich włókien fibrynowych [79], a także odporne na lizę [80]. Potwierdzono, że wśród osób dotychczas zdrowych, palenie tytoniu ≥ 5 lat związane jest z mniejszą o 22,2% przepuszczalnością i dłuższym o 35,4% czasem lizy skrzepów fibrynowych [81]. Ilość wypalanych papierosów dziennie i ilość paczkołat wykazywały podobne korelacje ze zmienionymi właściwościami skrzepów fibrynowych [81], które wydają się zależeć głównie od wzrostu stężenia fibrynogenu i stresu oksydacyjnego [81]. Opublikowane niedawno badanie Cayla i wsp. dowodzi, że po 4 miesiącach od wdrożenia ustawowego zakazu palenia tytoniu w miejscach publicznych, u osób dotychczas zawodowo narażonych na bierne palenie, występuje 40-procentowe zmniejszenie sztywności skrzepów fibrynowych, 20-procentowe zmniejszenie ich gęstości oraz 20-procentowa poprawa efektywności lizy. Korzystnym zmianom parametrów fibrynowych nie towarzyszyły zmiany funkcji płytek krwi ani zmniejszenie markerów stanu zapalnego [82].

Homocysteina (Hcy) - aminokwas będący produktem metabolizmu metioniny, jest związana ze zwiększonym ryzykiem choroby wieńcowej oraz zakrzepicy. Doświadczenia na zwierzętach wykazały, że hiperhomocysteinemia koreluje z tworzeniem skrzepów fibrynowych zbudowanych z cienkich, gęsto upakowanych włókien, co warunkuje ich oporność na lizę [83]. Duże ilości Hcy dodawane *in vitro* do osocza sprzyjają powstawaniu skrzepów fibrynowych o grubych, krótkich włóknach i zbitej strukturze [84]. ϵ – aminowe grupy lizyn fibrynogenu mogą podlegać kowalencyjnej modyfikacji przez wysoce reaktywny tioester – tiolakton homocysteiny – obecny w małych ilościach w osoczu [85]. Homocysteinyłowane lizyny fibrynogenu wpływają na formowanie gęsto upakowanych włókien fibryny, które są odporne na lizę pod wpływem plazminy oraz zaburzają zależną od t-PA aktywację plazminogenu [86]. Badania struktury i właściwości skrzepów fibrynowych u osób zdrowych i z chorobą wieńcową potwierdziły zmniejszoną porowatość i większą oporność na lizę w przypadku zwiększonego stężenia homocysteiny [87], jednak ostra hiperhomocysteinemia (po obciążeniu metioniną) nie ma wpływu na parametry skrzepów. Wykazano natomiast zależną od podania folianów redukcję stężenia homocysteiny i poprawę przepuszczalności i podatności na lizę skrzepów fibrynowych [87].

Lipoproteina (a) Lp(a) - zawiera apolipoproteinę (a), apo (a), której domeny białkowe (zwane kringlami) są homologiczne z domenami IV i V plazminogenu. Lp(a) konkuruje z plazminogenem o miejsca wiążące w fibrynie czy na powierzchni komórek, co prowadzi do upośledzenia fibrynolizy. Wykazano także, że Lp(a) bezpośrednio osłabia zdolności katalityczne kompleksu plazminogen – t-PA – fibryna poprzez hamowanie konwersji mało aktywnego Glu-plazminogenu do aktywnej postaci Lys-plazminogenu [88]. Zwiększone osoczowe stężenie Lp(a) koreluje ze zmniejszoną przepuszczalnością skrzepów fibrynowych zbudowanych z cienkich włókien i ich opornością na lizę [89]. Podłoże molekularne oddziaływania Lp(a) na właściwości skrzepu są słabo poznane. Karboksylowe końce łańcuchów α fibrynogenu/fibryny, wykorzystywane przez fXIIIa do tworzenia wiązań kowalencyjnych, zawierają miejsca o wysokim powinowactwie do apo(a). Wydaje się, że Lp(a) nie oddziałuje na fibrynogen krążący w osoczu, ale wykazuje silne powinowactwo do fibryny zdeponowanej na uszkodzonej ścianie naczynia lub blaszce miażdżycowej [90].

Trombina - jej aktywność w osoczu zależy m.in. od wyjściowego nieaktywnego zymogenu (protrombiny) oraz innych osoczowych czynników krzepnięcia. Potwierdzeniem istotnego znaczenia wpływu prawidłowej aktywności czynników krzepnięcia na powstawanie skrzepu fibrynowego są wyniki doświadczeń prowadzonych u pacjentów z hemofilią. Osocze pacjentów z hemofilią A lub B charakteryzuje się zmniejszoną generacją trombiny oraz

opóźnionym i spowolnionym tempem tworzenia fibryny. W efekcie powstające skrzepy mają zaburzoną strukturę i dużą przepuszczalność, są zbudowane z grubych włókien fibrynowych i są bardziej podatne na lizę niż u osób zdrowych [39]. U pacjentów z hemofilią i obecnością inhibitorów czynników krzepnięcia zastosowanie rekombinowanego fVIIa zwiększa generację trombiny, normalizuje strukturę skrzepu i zwiększa jego stabilność pomimo braku fVIII czy fIX [91].

W doświadczeniach *in vitro* stwierdzono, że w przypadku zwiększenia poziomu protrombiny przekraczającego wartości prawidłowe, zwiększa się generacja trombiny, która sprzyja zmniejszeniu stosunku masy do długości powstających włókien fibryny [71]. Skrzepy fibrynowe uzyskane po zastosowaniu dużych stężeń trombiny w modelu z oczyszczonym fibrynogenem, charakteryzują się cienkimi włóknami oraz małą liczbą porów [56,57]. Generacja trombiny w warunkach *in vivo* jest procesem bardziej złożonym i determinowanym m.in. przez komórki o aktywności prozakrzepowej. W eksperymentach z użyciem fibroblastów inkubowanych w roztworze zespołu protrombinazy i fibrynogenu lub osocza powstający skrzep ma budowę heterogenną – im bliżej powierzchni komórek, tym sieć fibrynowa staje się bardziej gęsta i oporna na lizę [92]. Skrzepy o zwartej strukturze i odporne na lizę powstają także na powierzchni śródbłonna aktywowanego cytokinami prozapalnymi, podczas gdy śródbłonek nieaktywowany sprzyja tworzeniu skrzepów o luźnej strukturze i większej podatności na lizę [53]. Zjawisko to wskazuje na kluczową rolę miejscowej ekspresji TF w powstawaniu i degradacji skrzepu fibrynowego.

Stres oksydacyjny - moduluje strukturę skrzepu fibrynowego, bowiem fibrynogen jest białkiem szczególnie podatnym na utlenianie i pełni rolę naturalnego antyoksydanta [93]. Większość wyników doświadczeń *in vitro* z fibrynogenem eksponowanym na działanie wolnych rodników tlenowych wskazuje na zmniejszenie tempa produkcji skrzepu fibrynowego [40,93], choć wpływ Fe^{+3} jest przeciwny [94]. Związek między wskaźnikami stresu oksydacyjnego a właściwościami skrzepu *in vivo* jest mało znany. Wyniki badań *in vitro* sugerują, że cząsteczki utlenionego fibrynogenu mają zdolność do osłabiania aktywacji plazminogenu do plazminy pod wpływem t-PA [94], jednak znaczenie kliniczne takiej obserwacji jest niepewne, ponieważ *in vivo* aktywacja plazminogenu do plazminy zależna od t-PA odbywa się przy udziale fibryny a nie fibrynogenu. Izoprostany F_2 (produkowane podczas nieenzymatycznej peroksydacji kwasu arachidonowego) używane jako stabilny wskaźnik stresu oksydacyjnego w surowicy lub osoczu korelują ujemnie z przepuszczalnością skrzepu oraz fibrynolizą [95]. Modyfikacje w kinetyce powstawania i strukturze skrzepu

fibrynowego zachodzące *in vivo* pod wpływem stresu oksydacyjnego wydają się sprzyjać powikłaniom zakrzepowym.

Aktywowane płytki krwi i komórki śródbłónka – poprzez swoiste molekuly adhezyjne tj. VE-kadheryny, ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*) i integryny α M β 2, α 5 β 1, α IIb β 3 i α v β 3 – mogą łączyć się z fibrynogenem i fibryną modulując strukturę i funkcję skrzepu. Szczególną rolę w niekorzystnych modyfikacjach skrzepu fibrynowego pełnią integryny α IIb β 3 płytek krwi i α v β 3 komórek śródbłónka naczyniowego [96,97]. Badania Colleta i wsp. wykazały, że interakcje fibryny z płytkową integryną α IIb β 3 sprzyjają tworzeniu w sąsiedztwie agregatów płytkowych gęstych sieci fibrynowych, które są wysoce odporne na lizę. Podanie abcyksymabu – fragmentu chimerowego przeciwciała blokującego β 3 - zmniejsza gęstość sieci fibrynowej i zwiększa jej podatność na lizę. Dodanie abcyksymabu korzystnie oddziałuje na strukturę skrzepu tylko w czasie pierwszych 10 minut jego tworzenia, co sugeruje, że w późniejszym okresie silne interakcje zaktywowanych płytek i fibryny czynią skrzep mało przepuszczalnym [96]. Obserwacje te mogą wyjaśniać brak powodzenia opóźnionej terapii fibrynolitycznej u pacjentów z zawałem serca czy udarem niedokrwiennym mózgu.

Płytki krwi - poprzez uwolnienie pewnych białek i substancji nieorganicznych – niekorzystnie zmieniają strukturę skrzepu zwłaszcza w miejscu swojej agregacji [44]. Płytkowy czynnik 4 (uwalniany z ziarnistości α) oraz nieorganiczne polifosforany (pochodzące z ziarnistości gęstych) sprzyjają powstawaniu skrzepów o zbitej strukturze, polifosforany ponadto upośredzają lizę fibryny zależną od plazminy [98-101]. Polifosforany w sposób zależny od jonów wapnia, a niezależny od FXIIIa, blisko 3-krotnie zwiększają zmętnienie żelu fibrynowego oraz powodują powstanie skrzepów o grubych włóknach [99]. Obrazy uzyskane metodą elektronowej mikroskopii skaningowej ujawniły, że takie skrzepy zbudowane są z ciasno upakowanych agregatów fibryny poprzedzielanych dużymi porami, co różni je od prawidłowych skrzepów o homogennej strukturze [100]. Upośredzenie fibrynolizy pod wpływem polifosforanów wynika z osłabienia przyłączania się plazminogenu i t-PA do powierzchni skrzepu fibrynowego [100]. Prozakrzepowe właściwości polifosforanów są zależne od długości polimeru fosforanowego - największe zmętnienie żelu fibrynowego obserwuje się pod wpływem polifosforanów zawierających min. 250 reszt kwasu ortofosforowego [101].

Wpływ komórek śródbłónka na powstający skrzep fibrynowy zależy od obecności cytokin prozapalnych tj. lipopolisacharyd, interleukina 1 β , czynnik martwicy guza α (TNF α), które osłabiają śródbłódkową ekspresję trombomoduliny, a pobudzają ekspresję TF. Dysfunkcja

śródbłonka uzyskana doświadczalnie pod wpływem TNF α sprzyjała tworzeniu gęstych i stabilnych skrzepów, a zablokowanie TF na powierzchni pobudzonych komórek śródbłonka zmniejszało gęstość i stabilność sieci fibrynowej [53].

Kwas acetylosalicylowy (aspiryna) - stosowany w dawce 75-300 mg dziennie w prewencji wtórnej choroby wieńcowej, prócz działania przeciwplatekcyjnego, zwiększa także przepuszczalność skrzepu i stosunek masy do długości włókna fibryny [102]. U osób zdrowych nawet małe dawki kwasu acetylosalicylowego (37,5 mg/d) znacząco zwiększają przepuszczalność skrzepu i grubość włókna fibrynowego [103]. Przepuszczalność skrzepu fibrynowego wraca do wartości wyjściowych w 7 dni po odstawieniu aspiryny [104]. Kwas acetylosalicylowy stosowany u pacjentów z chorobą wieńcową zwiększa wielkość porów w strukturze skrzepu i jego podatność na lizę, co jest najpewniej skutkiem formowania grubszych włókien fibryny [105]. Nie wykazano jednak zwiększenia podatności na lizę skrzepów u osób zdrowych przyjmujących 75-320 mg aspiryny dziennie [102].

Modyfikacja fibrynogenu przez aspirynę polega na acetylacji reszt lizynowych fibrynogenu, co upośledza proces polimeryzacji fibryny, zmniejsza stabilność tworzonego skrzepu, zwiększa jego porowatość oraz podatność na lizę [106]. W eksperymentach *in vitro* aspiryna hamuje utlenienie fibrynogenu, w ten sposób stabilizuje jego funkcje biologiczne i zapobiega ich utracie pod wpływem oksydacji [94]. Aspiryna prawdopodobnie także hamuje aktywację fXIII poprzez zmniejszenie generacji trombiny [107]. W doświadczeniach z użyciem modelu uszkodzenia mikrokrążenia obwodowego wykazano, że zależne od aspiryny osłabienie aktywacji fXIII jest bardziej nasilone u nosicieli allele Leu34 niż homozygot Val34 [108], co może po części wyjaśniać niektóre aspekty zjawiska oporności na aspirynę [109].

Statyny (inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A), poza zmniejszeniem stężenia cholesterolu, działają także przeciwzakrzepowo oraz korzystnie zmieniają strukturę skrzepu [110]. Inne leki modulujące strukturę skrzepu to inhibitory konwertazy angiotensyny [111] oraz metformina [112] jednak dane na temat ich działania są skąpe.

1.5. Właściwości skrzepu fibrynowego w ŻChZZ

U pacjentów z ŻChZZ, epizodem zakrzepicy w łożysku tętnicznym, chorobami z autoagresji lub powikłaniami położniczymi obserwuje się swoistą nadkrzepliwość związaną ze wzmożoną produkcją fibryny i osłabieniem fibrynolizy [113]. Badania z użyciem rt-PA potwierdziły zmniejszenie efektywności lizy skrzepu fibrynowego u pacjentów po przebytych pierwszym epizodzie ŻChZZ, a także 2-krotne zwiększenie ryzyka wystąpienia ŻChZZ u zdrowych ochotników z najdłuższymi (>90 percentyla) czasami lizy [114]. 77% zmienności czasu lizy u pacjentów z ŻChZZ zależy od PAI-1, TAFI, protrombiny i α_2 -antyplazminy; udział fibrynogenu jest minimalny [115]. Analiza pacjentów z ŻChZZ uczestniczących w badaniu kliniczno-kontrolnym *Multiple Environmental and Genetic Assessment* ujawniła, że trzy tradycyjne czynniki ryzyka ŻChZZ – doustne środki antykoncepcyjne, unieruchomienie, obecność czynnika V Leiden – potęgują dodatkowo ryzyko zakrzepicy wynikające z wydłużenia czasu lizy o odpowiednio 20-, 10,3- i 8,1-razy [116]. Niedawno stwierdzono, że szczególnie długi czas lizy (>95 percentyla) związany jest z 3,4-razy większym ryzykiem wystąpienia zespołu Budda i Chiariego i częściowo koreluje ze zwiększoną aktywnością PAI-1, ale nie TAFI [117].

Badania Undas i wsp. wykazały, że po wykluczeniu znanych trombofilii, obecności nowotworu, urazu, operacji czy ciąży, u pacjentów z samoistną ŻChZZ i ich zdrowych krewnych pierwszego stopnia występują: mniejsza przepuszczalność i upakowanie skrzepów fibrynowych, większa maksymalna absorbancja i wydłużony czas lizy w porównaniu do zdrowych niespokrewnionych kontroli [118]. Wyniki te wskazują na genetyczne podłoże samoistnej ŻChZZ. Niekorzystne zmiany strukturalne i czynnościowe skrzepów fibrynowych były silniej wyrażone u pacjentów z ŻChZZ niż u ich zdrowych krewnych, co sugeruje udział dodatkowych czynników i/lub przebytego epizodu zakrzepicy *per se* w niekorzystnych modyfikacjach fibryny. Można założyć, że genetycznie uwarunkowane niekorzystne modyfikacje struktury i funkcji fibryny stanowią nowy czynnik ryzyka wystąpienia samoistnej ŻChZZ [118]. Stwierdzono ponadto, że skrzepy fibrynowe uzyskane od pacjentów z przebytą zatorowością płucną cechują się większą przepuszczalnością, mniejszym upakowaniem i większą podatnością na lizę w porównaniu do skrzepów pacjentów z samą tylko zakrzepicą żył głębokich kończyn dolnych [118].

Nie jest jasne czy u pacjentów z ŻChZZ związaną z przejściowymi czynnikami ryzyka występują niekorzystne zmiany struktury i funkcji fibryny w porównaniu z osobami zdrowymi. Wstępne obserwacje nie potwierdzają istnienia zmian w przepuszczalności czy

podatności na lizę skrzepów fibrynowych uzyskanych od pacjentów z zakrzepicą żył głębokich kończyn dolnych wikłającą uraz lub zabieg operacyjny.

1.6. Właściwości skrzepu fibrynowego w innych jednostkach chorobowych

W 1992 roku stwierdzono związek między strukturą skrzepu a zaawansowaną chorobą wieńcową [119]. U mężczyzn z zawałem serca przebyłym <45 r.ż skrzepy zbudowane są z gęstej sieci fibrynowej i mają zmniejszoną przepuszczalność [120]. Wykazano także, że w podobnej grupie pacjentów (choroba wieńcowa rozpoznana <45 r.ż.) skrzepy fibrynowe cechują się zwiększoną sztywnością i ilością krótkich włókien, co wiąże się z mniejszą podatnością na lizę [121]. Istnieją dowody na podłoże genetyczne modyfikacji struktury i funkcji fibryny obserwowanych u takich pacjentów i ich zdrowych krewnych pierwszego stopnia [122].

Niekorzystne zmiany struktury i/lub funkcji skrzepów fibrynowych obserwowano także u pacjentów z udarem mózgu [123], zastoinową niewydolnością serca [124], miażdżycą zarostową tętnic kończyn dolnych [125], schyłkową niewydolnością nerek [126,127], przewlekłą obturacyjną chorobą płuc [128] oraz reumatoidalnym zapaleniem stawów [129].

2. Działanie statyn

Statyny są stosowane od 1987 roku w celu zmniejszenia stężenia lipidów w surowicy krwi. Ich korzystne działanie zaobserwowano w profilaktyce pierwotnej i wtórnej chorób układu sercowo–naczyniowego na podłożu miażdżycy. Atorwastatyna jest syntetyczną i lipofilną statyną, która w sposób kompetycyjny i odwracalny hamuje wątrobową biosyntezę cholesterolu na etapie przemiany 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA) do mewalonianu, katalizowanej przez reduktazę HMG-CoA. Bezpośrednim skutkiem hamowania reduktazy HMG-CoA jest nasilenie transkrypcji genu kodującego receptor dla cholesterolu LDL na powierzchni hepatocytów, a w konsekwencji zwiększony wychwyt z krwi lipoprotein o małej gęstości (LDL). W rezultacie dochodzi do redukcji stężenia cholesterolu całkowitego (TC), frakcji cholesterolu LDL (o 18-60%) i triglicerydów (TG) (o 10-30%). Stężenie cholesterolu zawartego w lipoproteinach o dużej gęstości (HDL-C) nie ulega zmianie.

2.1. Dodatkowe, tzw. plejotropowe działanie statyn

Statyny wywierają również działanie niezależne od zmniejszenia stężenia cholesterolu. Dane z badań klinicznych i doświadczalnych z wykorzystaniem statyn wskazują na wiele dodatkowych korzyści wykraczających poza efekt zmniejszenia stężenia cholesterolu, co określa się mianem działania plejotropowego. Stwierdzono, że statyny oddziałują na układ krążenia poprzez: 1) poprawę funkcji śródbłonna, 2) stabilizację blaszek miażdżycowych, 3) hamowanie układu krzepnięcia i stymulację endogennej fibrynolizy, 4) hamowanie reakcji zapalnej oraz immunomodulację.

Jednym ze szlaków przyczyniających się do wystąpienia efektów plejotropowych statyn jest zahamowanie reduktazy HMG-CoA, od której zależy nie tylko synteza cholesterolu, ale także synteza niesteroidowych grup lipidowych czyli izoprenoidów. W komórkach śródbłonna naczyniowego, komórkach mięśni gładkich, fibroblastach oraz komórkach uczestniczących w reakcjach zapalnych izoprenoidy (związki farnesyly i geranyly) służą do posttranslacyjnej modyfikacji wielu białek regulatorowych. Izoprenylacja małych białek sygnałowych o aktywności GTPazy ułatwia ich połączenie z błoną komórkową i oddziaływanie na kolejne

białka regulacyjne [130]. Izoprenylacja dotyczy w szczególności GTPazy sygnałowych należących do nadrodziny białek Ras. Należą tu m.in. białka Rho (izoformy A,B,C), Rac (izoformy 1,2,3), Rab, Cdc42 oraz Ras, których efektorami są odpowiednie kinazy białkowe regulujące kluczowe dla danej komórki procesy rearanżacji cytoszkieletu, proliferacji, ekspresji molekuł adhezyjnych, uwalniania cytokin i ekspresji genów [131]. Zahamowanie izoprenylacji białek o aktywności GTPazy zwiększa ich pulę swobodnie krążącą w cytoplazmie, która traci możliwość łączenia się z błoną komórkową i pobudzania kinaz.

Szczególne zainteresowanie budzi białko Rho i jego efektorowe kinazy ROCK (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*) z uwagi na ich znaczenie w regulacji cytoszkieletu, migracji i przepuszczalności komórek śródbłonka [132,133]. Zahamowanie izoprenylacji białek Rho i zmniejszenie aktywności szlaku Rho/ROCK prowadzi do zwiększenia ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) [134,135] oraz pobudzenia szlaku kinaz PI3K/Akt, które również nasilają aktywność eNOS [136]. Statyny mogą także pobudzać szlak PI3K/Akt na drodze niezależnej od Rho/ROCK [137]. Zwiększenie aktywności eNOS obserwowane jest dodatkowo w przypadku braku białka błonowego – tzw. kaweoliny-1 - która ogranicza funkcję eNOS poprzez zamykanie tego enzymu w pęcherzykach (kaweolach). Wykazano, że atorwastatyna zmniejsza ilość kaweoliny-1, co zapobiega usuwaniu eNOS z powierzchni komórki [138].

Innym ciekawym białkiem sygnalizacyjnym jest Rac. Hamowanie izoprenylacji białka Rac upośledza zależną od NADPH produkcję wolnych rodników tlenowych. Wykazano, że w obecności statyny, wskutek zahamowania aktywności Rac1 i zmniejszonego powstawania wolnych rodników, zmniejsza się także uszkodzenie komórek indukowane angiotensyną II [139,140], co może chronić przed przerostem mięśnia sercowego [141]. Istnieją dane z badań klinicznych na temat istotnej roli hamowania białek Rac1 podczas stosowania statyn [142].

Inhibitory reduktazy HMG-CoA oddziałują również na receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów (PPAR), które znajdują się na terenie jądra komórkowego i po połączeniu w heterodimery z receptorem retinoidowym X sterują ekspresją wielu genów [143]. PPAR odpowiedzialne są przede wszystkim za utrzymanie homeostazy energetycznej komórki, a także regulują odpowiedzią komórki na stan zapalny [144,145]. W ostatnich latach na podstawie doświadczeń prowadzonych na hodowlach komórkowych stwierdzono, że pod wpływem statyn dochodzi do pobudzenia PPAR- γ w makrofagach i monocytach, czego efektem jest zmniejszenie produkcji przez te komórki TNF α oraz czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [146,147]. W modelach zwierzęcych potwierdzono szybkie przeciwzapalne działanie

statyn za pośrednictwem receptorów PPAR- α , które polegało na zahamowaniu ekspresji prozapalnych genów [148].

Istnieją wreszcie dowody na przeciwwzpalne działanie statyn niezależne PPAR. Statyny mogą wiązać się bezpośrednio z integryną LFA (*lymphocyte function-associated antigen*) na powierzchni limfocytów T, która służy do rozpoznawania molekuł adhezyjnych ICAM-1. Skutkiem takiego działania jest osłabienie reaktywności limfocytów T i zmniejszenie odczynu zapalnego [149].

2.2. Wpływ statyn na układ krzepnięcia

Wiele danych wskazuje, że statyny mogą wywierać hamujący wpływ na układ krzepnięcia poprzez działanie na kilku etapach – od osłabienia interakcji TF-fVIIa, poprzez zmniejszanie generacji trombiny, wpływ na układ trombomodulina – białko C, modulowanie struktury i funkcji skrzepu fibrynowego, zwiększenie endogennej fibrynolizy czy wreszcie oddziaływanie na płytki krwi.

2.2.1. Statyny a aktywność kompleksu TF – fVIIa

Stwierdzono, że simwastatyna, fluwastatyna, ceriwastatyna i prawastatyna zmniejszają ekspresję RNA dla TF w hodowlach komórkowych i monocytach ludzkich aktywowanych lipopolisacharydem [150,151], co było rezultatem zahamowania jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że siła wpływu statyn na ekspresję TF była ściśle zależna od stopnia zahamowania NF- κ B [152] i szlaku kinaz RhoA//ROCK [153]. W doświadczeniach z ludzkimi komórkami śródbłonna aorty czy komórkami mięśni gładkich wykazano, że simwanstatyna istotnie osłabia indukowaną działaniem trombiny ekspresję TF w sposób zależny od czasu podania i zastosowanej dawki. Zahamowanie ekspresji TF w tych komórkach było również zależne od inhibicji szlaku kinaz Rho/ROCK, a podanie mewanolianu znosiło ochronny efekt simwastatyny [153,154]. Szczególną uwagę zwracają wyniki badania ATROCAP (*The Atorvastatin and Thrombogenicity of the Carotid Atherosclerotic Plaque*), w którym zaobserwowano, że stosowanie przez 4-6 miesięcy atorwastatyny powodowało znamienne zmniejszenie zarówno ilości antygeny TF jak i jego aktywności w blaszkach miażdżycowych usuniętych z tętnic

szyjnych [155]. Podobne wyniki uzyskano badając zmniejszenie ekspresji TF w blaszkach miażdżycowych usuwanych z tętnic wieńcowych pacjentów leczonych inhibitorami reduktazy HMG-CoA [156]. Istnieją wreszcie dowody, że atorwastatyna może zmniejszać ilość TF w mikrocząstkach uwalnianych z aktywowanych płytek krwi [157].

Dane na temat wpływu statyn na fVII są niejednoznaczne. W kilku badaniach stwierdzono, że stosowanie atorwastatyny zmniejszało aktywność prozakrzepową fVII w sposób niezależny od działania hipolipemizującego [158,159], jednak inne zespoły badając inne statyny nie potwierdziły tych obserwacji [160].

2.2.2. Statyny a generacja trombiny

Badania Undas i wsp. [161] oraz innych zespołów [162,163] wykazały hamujący wpływ stosowania statyn na generację trombiny. Stwierdzono także osłabienie aktywacji fV i fXIII, zmniejszenie proteolizy fibrynogenu i zwolnienie jego konwersji do fibryny, a także zwiększenie inaktywacji czynnika fVa i ekspresji trombomoduliny [110]. Zmniejszenie generacji trombiny wykazano w modelu uszkodzenia naczyń po podaniu 3 dawek simwastatyny 40 mg dziennie [164], po miesiącu [165] i po 3 miesiącach simwastatyny 20-40 mg dziennie [166] u osób z hipercholesterolemią lub osób obciążonych dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym. W grupie pacjentów przyjmujących simwastatynę przez 3 dni obserwowano w miejscu uszkodzenia naczyń istotne zmniejszenie stężenia produktów konwersji protrombiny do trombiny (fragmentów F 1+2, pretrombiny-2 i łańcucha B), łańcuchów ciężkich i lekkich fVa, a także zwolnienie szybkości generacji trombiny (o ok. 30%) i aktywacji fV (o ok. 20%). Ponadto stwierdzono przyśpieszoną inaktywację fVa zależną od aktywnego białka C, którego aktywność znamienne zwiększyła się [164]. W modelu mikrouszkodzenia krążenia obwodowego wykazano zmniejszenie konwersji fibrynogenu do fibryny (wyrażane jako zmniejszone powstawanie FPA i FPB) po 3 miesiącach stosowania statyny, które było niezależne od efektu hipolipemizującego i także odzwierciedlało zmniejszenie generacji trombiny [166]. Osłabienie generacji trombiny (wyrażonej jako potencjał endogennej trombiny) pod wpływem stosowanej atorwastatyny potwierdzono także w testach *in vitro* z wykorzystaniem automatycznego trombogramu [157].

2.2.3. Statyny a trombomodulina i układ białka C

W szeregu badań stwierdzono, że statyny zwiększają transkrypcję genu TM w komórkach śródbłonna [166-169], w sposób zależny od zahamowania szlaku sygnałowego Rho. Znaczne zwiększenie transkryptu genu TM (mRNA) obserwowano już po upływie 24 godzin od zastosowania atorwastatyny [170]. Innym niezależnym szlakiem wiodącym do zwiększenia ekspresji TM w komórkach śródbłonna pod wpływem statyn jest szlak zależny od NO [171]. Badania Undas i wsp. dostarczyły dowodów na zależne od simwastatyny zwiększenie wydajności proteolitycznej APC. Analiza metodą Western blotu produktów degradacji fVa w krwi uzyskanej metodą mikrouszkodzenia naczyń obwodowych wykazała istotne zwiększenie aktywności białka C po 3 dniach lub 3 miesiącach stosowania simwastatyny [164,166]. Badania oparte na analizie osocza krwi żyłnej nie potwierdziły zwiększenia stężenia białka C w toku leczenia atorwastatyną [172], co sugeruje, że zależna od statyn poprawa sprawności enzymatycznej kompleksu TM-APC jest szczególnie silnie wyrażona w kapilarach, gdzie stosunek aktywności układu TM-APC do objętości krwi jest znaczny.

2.2.4. Statyny a struktura i funkcja skrzepu fibrynowego

Inhibitory reduktazy HMG-CoA nie zmieniają stężenia fibrynogenu w osoczu, ale korzystnie wpływają na parametry skrzepów fibrynowych [110]. Pierwszych danych na temat potencjalnego wpływu tych leków na endogenną fibrynolizę dostarczyły badania doświadczalne na hodowlach komórkowych, w których – po podaniu statyn – obserwowano zmniejszenie produkcji PAI-1 [173,174] oraz zwiększanie wydzielania t-PA [175], jednak wyniki badań *in vivo* nie były niejednoznaczne [176].

U pacjentów z chorobą wieńcową 4-tygodniowe leczenie simwastatyną lub atorwastatyną 40 mg dziennie skutkowało zwiększeniem przepuszczalności żelu fibrynowego (o 20%) i skróceniem czasu lizy (o 22%) pomimo braku zmian stężenia PAI-1 czy t-PA. Parametry skrzepów korelowały ze zmniejszeniem generacji trombiny, które najpewniej było skutkiem zależnego od statyny zmniejszenia ekspresji TF, nie wykazano natomiast związku zmian stężenia lipidów z poprawą struktury/funkcji fibryny po leczeniu tymi lekami [111]. W grupie pacjentów z zaawansowaną miażdżycą tętnic wieńcowych, u osób uprzednio leczonych

inhibitorami reduktazy HMG-CoA, obserwowano poprawę przepuszczalności i skrócenie czasu lizy skrzepów fibrynowych [177]. Niedawno wykazano, że simwastatyna podawana przez 3 miesiące w dawce 40 mg dziennie osobom o małym ryzyku sercowo-naczyniowym i bez hipercholesterolemii daje podobne efekty – tj. zwiększenie przepuszczalności skrzepu i skrócenie czasu jego lizy – które są niezależne od zmian w lipidogramie, ale korelują ze zmniejszeniem stężenia CRP [178].

2.2.5. Statyny a płytki krwi

Badania płytek krwi u osób leczonych statynami dały sprzeczne wyniki [179,180]. Istnieją doniesienia o zależnym od statyn zmniejszeniu stężenia selektyny P [181] oraz metabolitów tromboksanu A₂ [182,183], jednak znacznie kliniczne tych obserwacji pozostaje niejasne.

2.3. Statyny a ŻChZZ – dane z badań klinicznych

W ostatnich latach zwrócono uwagę na potencjalne związki między ŻChZZ a zakrzepicą na blaszce miażdżycowej w układzie tętniczym. W wielu badaniach obserwacyjnych (kohortowych i kliniczno-kontrolnych) stwierdzano, że u pacjentów leczonych statynami w celu redukcji ryzyka sercowo-naczyniowego niespodziewanie rzadziej występuje ŻChZZ. Zmniejszenie ryzyka wystąpienia ŻChZZ u osób stosujących statyny szacowano na 40-50% [184-190], jednak metodologia tych badań (głównie badania retrospektywne) obniża wiarygodność wyników. Jako pierwsi Ray i wsp. w badaniu kohortowym retrospektywnym (n=125 862) wykazali, że u osób stosujących jakąkolwiek statynę ryzyko wystąpienia ŻChZZ jest o ok. 22% mniejsze niż u osób nieprzyjmujących tych leków; HR 0,78 (0,69-0,87) [184]. Analiza Yang'a i wsp. (badanie kohortowe, retrospektywne) nie wykazała istotnych korzyści ze stosowania statyn w prewencji ŻChZZ prawdopodobnie z uwagi na mniejszą populację [185]. W kolejnych latach publikowano wyniki badań obserwacyjno-kontrolnych u pacjentów z przebyłą ŻChZZ i zdrowych ochotników [189,190] stwierdzając, że stosowanie statyny wiązało się z 45% zmniejszeniem ilorazu szans wystąpienia zakrzepicy żyłnej; OR 0,55 (0,46-0,67), a leki hipolipemizujące inne niż statyny nie miały tak korzystnego działania. Wpływ statyn na redukcję ryzyka wystąpienia ŻChZZ widoczny był niezależnie od

stosowanego preparatu (efekt klasy), bez względu na wiek czy obecność miażdżycy w układzie tętniczym [190].

W roku 2008 opublikowano wyniki pierwszego randomizowanego badania prospektywnego JUPITER (*Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin*) [191], w którym lek z grupy statyn (rozuwastatynę) stosowano u osób zdrowych (n=17 802), bez hiperlipidemii, z nieznacznie zwiększonym stężeniem CRP w surowicy (>2mg/l). Badanie to zostało przedwcześnie zakończone z uwagi na zmniejszenie ryzyka wystąpienia głównego punktu końcowego (zawał serca, udar mózgu, procedura rewaskularyzacji z powodu niestabilnej choroby wieńcowej, zgon z powodu incydentu sercowo-naczyniowego) w grupie leczonych rozuwastatyną, w porównaniu do osób przyjmujących placebo. W grupie leczonej rozuwastatyną w ciągu średnio 1,9 lat obserwacji stwierdzono m.in. zmniejszenie stężenia CRP o ok. 37% co dało blisko pięćdziesięcioprocentowe zmniejszenie ryzyka wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego w układzie tętniczym; HR 0,56 (0,46 – 0,69).

Jako wtórny punkt końcowy analizowano następnie częstość występowania ŻChZZ [192]. W grupie leczonej rozuwastatyną ryzyko wystąpienia ŻChZZ było o 43% mniejsze niż u osób otrzymujących placebo; HR 0,57 (0,37-0,86). Rozuwastatyna silniej redukowała ryzyko wystąpienia zakrzepicy żyłnej bez zatorowości (o 55%) niż zatorowości płucnej (o 23%), redukcja ryzyka samoistnej ŻChZZ lub związanej z obecnością przejściowych czynników ryzyka była podobna (39% vs. 48%). Co oczywiste nie było różnic w częstości krwawień między grupą przyjmującą statynę czy placebo.

Wyniki badania JUPITER są niezbitym dowodem na przeciwwzakrzepowe działanie statyn w łożysku tętniczym i żylnym o istotnym znaczeniu klinicznym. Wspierają również koncepcję istnienia wspólnego podłoża patogenetycznego (prezentowanie TF) zakrzepicy tętniczej i żyłnej.

3. Założenia i cele pracy

Dotychczasowe badania mechanizmów przeciwwzkrzepowego działania statyn prowadzano u pacjentów z hipercholesterolemią z wykorzystaniem modelu uszkodzenia naczyń. Badano także wpływ statyn na strukturę i funkcje skrzepu osób zdrowych.

Aktualnie nie ma danych na temat potencjalnego wpływu inhibitorów reduktazy HMG-CoA na strukturę i funkcję skrzepu fibrynowego u pacjentów z ŻChZZ, choć wiadomo, że parametry skrzepu fibrynowego w ŻChZZ są niekorzystnie zmienione. Nie jest jasne czy statyny potrafią korzystnie zmienić strukturę i funkcję skrzepu u pacjentów po przebytych epizodzie ŻChZZ i jakie czynniki determinują siłę takiego działania.

Na podstawie dostępnych badań, można założyć, iż przeciwwzkrzepowe działanie zastosowanej statyny (atorwastatyna 40 mg dziennie) wystąpi już po trzech dniach stosowania. Wykazano, że u pacjentów z hipercholesterolemią wczesne efekty przeciwwzkrzepowe statyn utrzymują się podczas terapii i są podobne do tych obserwowanych po 3 dniach oraz 1 i 3 miesiącach leczenia [164-166]. Jest prawdopodobne, że podobne zjawiska wystąpią u pacjentów po przebytej ŻChZZ, a wyniki planowanych badań przyczynią się do lepszego zrozumienia wpływu statyn na układ krzepnięcia.

4. Badani

Do udziału w badaniu zakwalifikowano 53 osób, w wieku 23 – 65 lat (średni wiek 43,2 lata), w tym 28 mężczyzn i 25 kobiet. Do badania włączono 28 pacjentów po przebytych epizodach ŻChZZ rekrutowanych z Poradni Nadkrzepliwości Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II oraz Wojewódzkiej Poradni Chorób Naczyń Szpitala Zakonu Bonifratrów Św. Jana Grandego w Krakowie.

Grupę kontrolną stanowiło 25 ochotników o małym ryzyku sercowo-naczyniowym. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego na prowadzenie badań (KBET/55/B/2009), a uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na udział.

4.1. Pacjenci z ŻChZZ

4.1.1. Kryteria kwalifikacji

Kryteriami włączenia do grupy chorych z ŻChZZ były:

- przebyta zakrzepica żył głębokich kończyn dolnych i/lub zatorowość płucna potwierdzona w badaniach obrazowych (USG żył głębokich, spiralna tomografia komputerowa tętnic płucnych) w ciągu ostatnich 30 miesięcy
- niestosowanie leczenia przeciwkrzepliwego co najmniej od 1 miesiąca

4.1.2. Kryteria wykluczające

Kryteria wyłączenia z udziału w badaniu były następujące:

- ostra zakrzepica
- dławica piersiowa
- skaza krwotoczna
- choroby autoimmunologiczne
- stężenie CRP >10 mg/l
- nadczynność lub niedoczynność tarczycy
- cukrzyca

- aktualne leczenie tienopirydynami, doustnymi antykoagulantami, heparyną niefrakcjonowaną lub drobnocząsteczkową, aspiryną i innymi niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, kortykosteroidami podawanymi doustnie oraz lekami hipolipemizującymi
- choroby współistniejące: nowotwór złośliwy, uszkodzenie wątroby (zwiększenie aktywności aminotransferazy alaninowej $\geq 1,5$ razy górnej granicy normy), niewydolność nerek (stężenie kreatyniny $>140 \mu\text{mol/l}$), choroby mięśni, choroby psychiatryczne
- brak zgody pacjenta na udział w badaniu

4.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowili dobrani pod względem płci i wieku ochotnicy, u których nie wystąpiły incydenty zakrzepicy żyłnej ani tętniczej. Dozwolone było występowanie nadciśnienia tętniczego łagodnego tak, aby jego częstość była podobna jak w grupie chorych po ŻChZZ.

4.2.1. Kryteria kwalifikacji

Kryteriami włączenia do grupy kontrolnej były:

- małe ryzyko sercowo-naczyniowe oceniane jako $<5\%$ wg SCORE
- niestosowanie żadnych leków, prócz ewentualnie leków hipotensyjnych, w ciągu ostatnich 4 tygodni

4.2.2. Kryteria wykluczające

Kryteriami wykluczenia z grupy kontrolnej były:

- przebyty jakiegokolwiek epizod zakrzepicy żyłnej lub tętniczej
- dławica piersiowa
- ostra zakrzepica

- skaza krwotoczna
- choroby autoimmunologiczne
- stężenie CRP >10mg/l
- nadczynność lub niedoczynność tarczycy
- cukrzyca
- aktualne leczenie tienopirydynami, doustnymi antykoagulantami, heparyną niefrakcjonowaną lub drobnocząsteczkową, aspiryną i innymi niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, kortykosteroidami podawanymi doustnie oraz lekami hipolipemizującymi
- choroby współistniejące: nowotwór złośliwy, uszkodzenie wątroby (zwiększenie aktywności aminotransferazy alaninowej $\geq 1,5$ razy górnej granicy normy), niewydolność nerek (stężenie kreatyniny >140 $\mu\text{mol/l}$), choroby mięśni, choroby psychiatryczne
- brak zgody pacjenta na udział w badaniu

5. Metody

5.1. Protokół

Badanie było badaniem interwencyjnym prowadzonym metodą próby otwartej. U wszystkich uczestników zostało przeprowadzone badanie podmiotowe i przedmiotowe oraz oszacowany współczynnik masy ciała (BMI) i ryzyko sercowo-naczyniowe. Osoby zakwalifikowane do badania otrzymywały atorwastatynę (Sortis, Pfizer) przez 3 kolejne dni w dawce 40 mg dziennie. U pacjentów z przebytą ŻChZZ odnotowywano lokalizację zakrzepicy oraz wykonywano kontrolne badanie USG aparatem firmy GE Vivid 7 (USA). Oceniano badaniem uciskowym oraz metodą kolorowego doplera przepływ krwi w żyłach głębokich goleni, pniu piszczelowo-strzałkowym, żyłe podkolanowej, żyłe udowej powierzchownej i wspólnej oraz w żyłe biodrowej zewnętrznej w celu wykrycia ewentualnego istnienia rezydualnej skrzepliny definiowanej jako >20% zwężenie światła żyły.

5.2. Wykonane oznaczenia

Krew żylną pobierano dwukrotnie – wyjściowo i po 3 dniach stosowania atorwastatyny 40 mg dziennie. Krew pobierano rano na czczo za pomocą zestawów próbek próżniowych firmy Sarstedt z użyciem minimalnej stazy. Oznaczenia morfologii krwi oraz podstawowych parametrów krzepnięcia: fibrynogen, dimery D, INR i czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) wykonywano bezpośrednio po pobraniu. W surowicy oznaczano lipidogram, stężenie kreatyniny, glukozy, CRP metodą wysokiej czułości oraz aktywność aminotransferazy alaninowej. W przypadku pacjentów z hipercholesterolemią oznaczano także stężenie hormonu tyreotropowego w celu wykluczenia niedoczynności tarczycy. Pozostałą objętość krwi, po odwirowaniu rozdzielano na osocze lub surowicę, a następnie zamrażano w temperaturze -80°C. Zamrożone próbki rozmrażano jednokrotnie celem wykonania zaplanowanych oznaczeń.

5.2.1. Podstawowe oznaczenia

Morfologię krwi oraz liczbę płytek oznaczano standardowymi metodami w laboratorium szpitalnym za pomocą analizatora firmy Sysmex (Japonia). Stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji HDL, LDL oraz triglicerydów oznaczano metodami enzymatycznymi w laboratorium szpitalnym za pomocą analizatora Cobas 6000 firmy Roche (Szwajcaria). Stężenie cholesterolu LDL w surowicy oznaczano metodą bezpośrednią.

5.2.2. Markery stanu zapalnego

CRP

Stężenie białka C-reaktywnego w surowicy krwi oznaczano metodą o wysokiej czułości testem immunoturbidymetrycznym ze wzmocnieniem cząstkami lateksu za pomocą analizatora Cobas 6000 firmy Roche (Szwajcaria). Zakres wartości prawidłowych: 0,0 – 3,0 mg/l.

5.2.3. Parametry układu krzepnięcia

Fibrynogen

Stężenie fibrynogenu w osoczu oznaczano metodą Clausa odczynnikiem Fibrinogen-C XL firmy Instrumentation Laboratory (USA). Zakres wartości prawidłowych: 1,8 – 3,5 g/l.

Markery generacji trombiny

Fragmety F1+2 protrombiny w osoczu (F1.2) oznaczano metodą ELISA firmy Siemens, Marburg (Niemcy).

t-PA

Stężenie tkankowego aktywatora plazminogenu w osoczu oznaczano metodą ELISA firmy Hyphen Biomed, Neuville-Sur-Oise (Francja).

PAI-1

Stężenie inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 w osoczu oznaczano metodą ELISA Hyphen Biomed, Neuville-Sur-Oise (Francja).

Lp(a)

Stężenie lipoproteiny Lp(a) w osoczu oznaczano metodą ELISA firmy (DRG Diagnostics, Marburg (Niemcy)).

5.2.4. Ocena w kierunku trombofilii

Czynnik V Leiden

Polimorfizm fV Leiden (A1691G) badano metodą Real-Time PCR z użyciem odczynników TaqMan Genotyping Assays w aparacie 7900 Fast Real Time PCR System firmy Applied Biosystems (USA).

Polimorfizm genu protrombiny G20210A

Polimorfizm genu protrombiny G20210A badano metodą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) z użyciem restryktazy HindIII firmy Fermentas (USA).

Przeciwciała antykardiolipinowe

Przeciwciała antykardiolipinowe (w klasie IgG i IgM) oznaczano metodą ELISA firmy INOVA Diagnostics (USA). Zakres wartości prawidłowych: dla klasy IgG 0-13,1 GPL, dla klasy IgM 0-17,3 MPL.

Przeciwciała przeciw β_2 -glikoproteinie I

Przeciwciała przeciw β_2 -glikoproteinie I (w klasie IgG i IgM) oznaczano metodą ELISA firmy INOVA Diagnostics (USA). Zakres wartości prawidłowych: dla klasy IgG 0-15,7 SGU, dla klasy IgM 0-14 SMU.

Antykoagulant toczenia

Oznaczano w osoczu metodą koagulometryczną w aparacie ACL TOP 500 firmy Instrumentation Laboratory (USA). Wartość prawidłowa – wynik ujemny.

Antytrombina

Aktywność antytrombiny oznaczano w osoczu metodą chromogenną w aparacie ACL TOP 500 firmy Instrumentation Laboratory (USA). Zakres wartości prawidłowych: 75-125%.

Wolne białko S

Wolne białko S badano metodą immunoturbidymetrii w aparacie Instrumentation Laboratory (USA). Zakres wartości prawidłowych: mężczyźni 75-130%, kobiety 59-118%.

Białko C

Białko C oznaczano metodą chromogenną zestawem Protein C – 0020300500 firmy Instrumentation Laboratory (USA). Zakres wartości prawidłowych: 70-140%.

Czynnik VIII

Aktywność fVIII w osoczu oznaczano metodą koagulometryczną z wykorzystaniem osocza testowego pozbawionego fVIII w aparacie firmy Instrumentation Laboratory (USA). Zakres wartości prawidłowych: 70-130%.

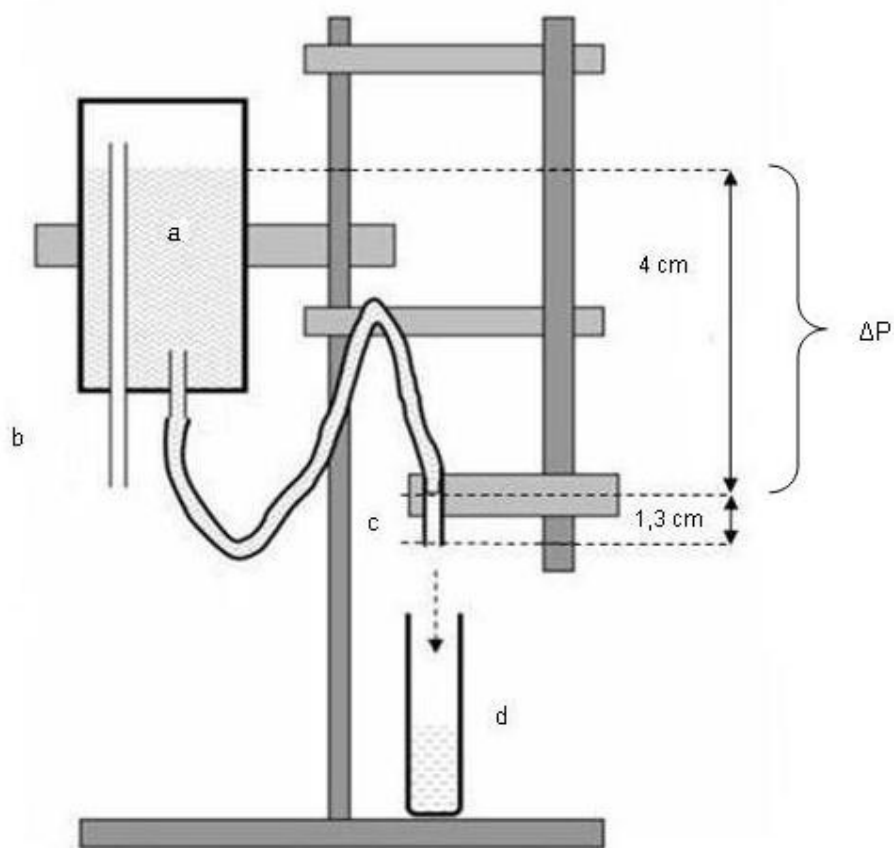
Homocysteina

Stężenie całkowitej homocysteiny oznaczano w osoczu EDTA metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) w aparacie Hewlett Packard 1100 firmy Bio-Rad (USA) wg Głowackiego R. i wsp [193]. Zakres wartości prawidłowych: 5-15 μ mol/l.

5.2.5. Ocena struktury i funkcji fibryny

Właściwości osoczowego skrzepu fibrynowego

Oznaczono wskaźnik przepuszczalności, tzw. stałą Darcy'ego (K_s), metodą Millsa i wsp.[122] w zestawie przedstawionym na rysunku 4.



Rysunek 4. Schematyczna budowa aparatu do badania przepuszczalności skrzepów fibrynowych. Oznaczenia: a – zbiornik z buforem, b – rurka odpowietrzająca, c – rurka z badanym skrzepem, d – próbówka zbiorcza, ΔP – ciśnienie buforu na poziomie przesiąkania. Na podstawie: Sjøland JA, *Inflammation and Fibrin Structure in Patients with End-Stage Renal Disease*, rozprawa doktorska 2007, zmodyfikowane.

Polistyrenowa rurkę (c) o długości 20 mm i średnicy 2,8 mm przepłukiwano fibrynogenem o stężeniu 2 g/l w buforze TBS (Tris HCl 50 mmol/l i NaCl 0,15 mol/l pH 7,4) z dodatkiem trombiny ludzkiej (Sigma) i pozostawiano w 25 °C przez 60 min, następnie płukano samym buforem. Wewnętrzna powierzchnia rurki zostawała w ten sposób pokrywana cienką warstwą fibryny, aby zwiększyć przyleganie do ścian formowanej w niej później żelu fibrynowego i zapobiec zapadaniu się żelu oraz przepływowi buforu między ścianą rurki a żelem [56], ponieważ żel fibrynowy utworzony w osoczu jest delikatny i łatwo się zapada w plastikowych rurkach [194]. Utworzona cienka warstwa fibryny nie wpływa na pomiar przesączania przez uformowany następnie żel fibrynowy [56]. Tak przygotowaną rurkę z jednym końcem zaklejonym Parafilmem[®] wypełniano 20 µl osocza cytrynianowego zmieszany z 80 µl TBS, do którego dodawano chlorek wapnia i ludzką trombinę (Sigma) w stężeniach końcowych odpowiednio 15 mmol/l i 1 U/ml. Rurkę umieszczano w wilgotnej komorze w temperaturze 25⁰C na 2 godziny. Po usunięciu Parafilmu[®] rurkę z żelem fibrynowym przepłukiwano TBS. Górny otwór rurki łączono polistyrenowym przewodem ze zbiornikiem buforu (a), który przesączał się pod ciśnieniem 4 cm H₂O. Przesączony w ciągu 1 godziny bufor zbierano, ważono i mierzono objętość. Następnie - po zakończeniu eksperymentów - dodawano błękit bromofenolu do buforu, aby wykryć uszkodzone żełe i odrzucić uzyskane z nich wyniki.

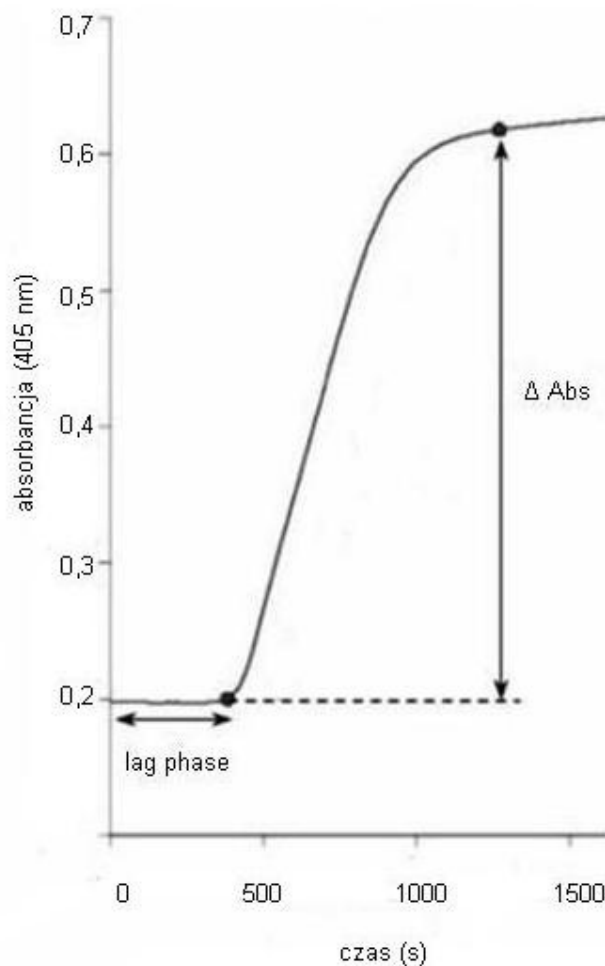
Współczynnik K_s jest miarą powierzchni żelu umożliwiającej przepływ buforu i jest obliczany na podstawie równania:

$$K_S = \frac{L \cdot \eta \cdot Q}{t \cdot A \cdot \Delta P}$$

gdzie Q to przepływ w czasie t, L – długość żelu (13 mm), η - lepkość płynu (1/100 puaz), A - pole przekroju żelu (0,049 cm²), Δp - ciśnienie działające na żel (w dynach/cm²).

Turbidymetria

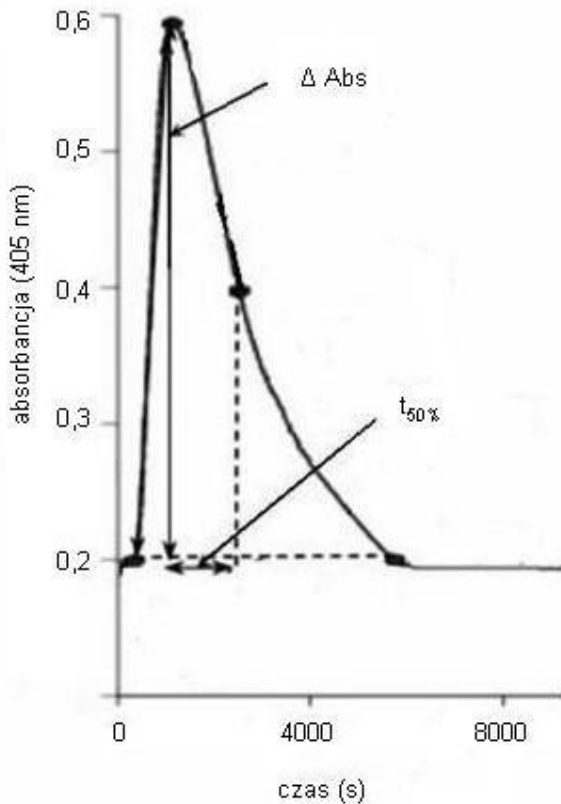
Jest metodą opartą na zjawisku rozpraszania wiązki światła przechodzącego przez roztwór fibrynogenu/fibryny. Rozpraszanie wiązki światła nasila się podczas polimeryzacji żelu fibrynowego, a zmniejsza się podczas fibrynolizy. Osocze cytrynianowe rozcieńczano w stosunku 2:3 za pomocą 0,05 mol/l Tris-HCl, 0,15 mol/l NaCl, pH 7,4. Po dodaniu 1 U/ml ludzkiej trombiny (Sigma) i 15 mmol/l chlorku wapnia do osocza (stężenia końcowe), mierzono absorbancję przy długości fali 405 nm przez 8 min na spektrofotometrze Perkin-Elmer Lambda 4B. W ten sposób wyznaczano przebieg krzywej turbidymetrycznej tworzenia się żelu fibrynowego (rysunek 5), na podstawie której oceniano tzw. *lag phase* oraz maksymalną absorbancję (Δ Abs) w fazie *plateau* (zwykle po 6 - 8 min). Czas określany jako *lag phase* odzwierciedla czas potrzebny do utworzenia protofibryli, a Δ Abs zależy od ilości protofibryli tworzących włókno fibryny w wyniku bocznej agregacji [57,127,195].



Rysunek 5. Przebieg krzywej turbidymetrycznej tworzenia się żelu fibrynowego. Oznaczenia: *lag phase* – czas przed początkiem polimeryzacji, Δ Abs - maksymalna absorbancja. Na podstawie: Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ; EuroCLOT Investigators. *Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2783-9, zmodyfikowane.

Sprawność mechanizmów fibrynolitycznych

Wykonano ocenę kinetyki lizy po dodaniu egzogennej rt-PA (Boehringer Ingelheim) metodą Williamsa i wsp. [105]. 100 μ l osocza cytrynianowego mieszano z 1 U/ml ludzkiej trombiny i 1 μ mol/l rt-PA. Kinetyka powstawania fibryny i jej lizy oceniane są na podstawie absorbancji przy długości fali 405 nm przez 30 min. Czas lizy ($t_{50\%}$) oceniany zmodyfikowaną metodą Williamsa i wsp. zdefiniowany jest jako czas, w którym absorbancja zmniejsza się o 50% wartości szczytowej (rysunek 6) [57].



Rysunek 6. Przebieg krzywej turbidymetrycznej tworzenia się żelu fibrynowego oraz lizy. Oznaczenia: $t_{50\%}$ – czas w którym absorbancja zmniejsza się o 50% wartości szczytowej, ΔAbs - maksymalna absorbancja. Na podstawie: Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ; EuroCLOT Investigators. *Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007,27:2783-9, zmodyfikowane.

Kinetykę lizy skrzepu badano również bez dodawania egzogennej trombiny, metodą Lismana i wsp. [60]. 75 μl osocza cytrynianowego mieszano z 15 mmol/l chlorkiem wapnia, 10000-krotnie rozcieńczonym TF (Innovin, Dade Behring), 12 $\mu\text{mol/l}$ pęcherzykami fosfolipidowymi i 60 ng/ml rt-PA (Boehringer Ingelheim, Germany) [196]. Kinetyka powstawania fibryny i jej lizy tzw. czas lizy skrzepu (CLT) oceniane są na podstawie absorbancji przy długości fali 405 nm w temperaturze 37°C.

Oceniono także maksymalne stężenie ($D-D_{\text{max}}$) i tempo ($D-D_{\text{rate}}$) uwalniania dimerów D ze skrzepu podanego działaniu rt-PA w stężeniu końcowym 0,2 $\mu\text{mol/l}$ zgodnie z procedurą

opracowaną przez Colleta i wsp.[197]. Tempo lizy szacowano w oparciu o stężenia dimerów D (American Diagnostica) w płynie przesiąkającym przez żel fibrynowy przygotowany wg wcześniej omówionej metody. Próbki pobierano co 20 min.

Ocenę struktury i funkcji fibryny wykonano we współpracy z laboratorium K.G. Manna (Departament of Biochemistry, Burlington, VT, USA).

5.2.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano w programie STATISTICA 9 PL w środowisku Windows PC. Dane przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe bądź jako medianę (zakres międzykwartylowy) dla zmiennych odbiegających od rozkładu normalnego. Dane w skali nominalnej przedstawiono w postaci liczebności i wartości procentowych. Test Shapiro-Wilka wykorzystano do oceny normalności rozkładu zmiennych. Powiązane bądź niepowiązane testy t-Studenta oraz testy nieparametryczne Wilcoxon lub Kruskalla-Wallisa wykorzystano do oceny istotności różnic w zależności od charakterystyki badanych zmiennych i ich rozkładu. Dane w skali nominalnej analizowano testem Chi-kwadrat. Korelację pomiędzy zmiennymi oceniano za pomocą metody rangowej Spearmana. Analiza kowariancji (ANCOVA) została wykorzystana do obliczenia skorygowanych średnich oraz oceny istotności różnic pomiędzy badanymi grupami. Wartości p mniejsze niż 0,05 zostały uznane za istotne. Moc testu w zależności od liczebności grup oszacowano dla oznaczeń K_s , $t_{50\%}$ oraz CLT przy pomocy programu GPower 3.1.2 w środowisku Windows PC [198].

6. Wyniki

6.1. Charakterystyka badanych grup

Grupa kontrolna oraz osoby po przebytych epizodach ŻChZZ nie różniły się pod względem wieku, płci, częstości palenia tytoniu, obciążającego wywiadu rodzinnego w kierunku chorób układu krążenia, występowania nadciśnienia tętniczego czy stosowania inhibitorów konwertazy angiotensyny. Pacjenci z ŻChZZ mieli częściej niż osoby z grupy kontrolnej dodatni wywiad rodzinny w kierunku ŻChZZ, ale obserwacja ta osiągnęła graniczną wartość istotności statystycznej ($p=0,053$). Pacjenci z ŻChZZ mieli większy BMI niż osoby z grupy kontrolnej (tabela 6.1). Nie było różnic w wynikach podstawowych badań laboratoryjnych w obu grupach, poza nieznacznie większym stężeniem CRP [1,66 (0,74-2,22) mg/l vs 0,84 (0,54-1,12) mg/l; $p=0,03$], glukozy [5,66 \pm 0,36 mmol/l vs 5,44 \pm 0,36 mmol/l; $p=0,03$] oraz t-PA [14,05 (11,05 -17,35) ng/ml vs 10,8 (10,10-13,70) ng/ml; $p=0,015$] u pacjentów z ŻChZZ.

Tabela 6.1.

Podstawowa charakterystyka osób z grupy kontrolnej i pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową

	Grupa kontrolna n=25	ŻChZZ n=28	p
Wiek (lata)	42,4 ±10,5	43,9 ±11,1	0,60
Płeć męska, n (%)	14 (56%)	14 (50%)	0,67
BMI (kg/m ²)	24,4 (23,0-27,8)	28,3 (24,8-30,5)	0,04
Palenie tytoniu, n (%)	6 (24%)	9 (32%)	0,52
Obciążający wywiad rodzinny ch.u.k., n (%)	5 (20%)	6 (21%)	0,91
ŻChZZ w rodzinie, n (%)	0 (0%)	4 (14%)	0,05
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	4 (16%)	6 (21%)	0,62
Stosowanie ACE-I, n (%)	3 (12%)	3 (11%)	0,89

Wartości podane jako średnia ±SD, mediana (przedział międzykwartyłowy) lub procent

BMI - wskaźnik masy ciała, ch.u.k. - choroby układu krążenia, ŻChZZ - żylna choroba zakrzepowo-zatorowa, ACE-I - inhibitory konwertazy angiotensyny

W grupie osób z ŻChZZ odnotowano 10 pacjentów z zakrzepicą samoistną (36% grupy ŻChZZ), resztę (n=18, 64%) stanowili pacjenci z zakrzepicą związaną z przejściowymi czynnikami ryzyka: unieruchomienie (n=10), zabieg operacyjny (n=4), doustne środki hormonalne (n=3), połów (n=1). Zakrzepica proksymalna żył kończyn dolnych występowała u 17 pacjentów, natomiast zakrzepica dystalna u 11. Zatorowość płucna została rozpoznana w przeszłości u 4 osób (14% grupy ŻChZZ), a aktualnie wykonywane badanie ultrasonograficzne żył kończyn dolnych ujawniło obecność skrzepliny rezydualnej u 9 pacjentów (32% grupy ŻChZZ). Średni czas od epizodu ŻChZZ do dnia włączenia do badania wynosił 15 miesięcy (10,5-25), średni czas leczenia antykoagulacyjnego 7 miesięcy (5-12), a czas od zakończenia antykoagulacji 8 miesięcy (3,5-15). Obecność trombofilii stwierdzono ogółem u 14 pacjentów (50%) z ŻChZZ. 6 osób posiadało heterozygotyczną postać fV Leiden, 3 osoby zwiększoną aktywność fVIII (>150%), 1 osoba wariant 20210A genu protrombiny (heterozygota), 1 osoba niedobór AT, 1 osoba hiperhomocysteinemię, u 1 osoby

współwystępowały heterozygotyczna postać fV Leiden z hiperhomocysteinemią oraz u 1 osoby współwystępował wariant 20210A genu protrombiny (heterozygota) z hiperhomocysteinemią.

Wyniki oznaczeń parametrów fibrynowych wyjściowo istotnie różniły się w grupie kontrolnej i u pacjentów z ŻChZZ, co przedstawiono w tabeli 6.2. U pacjentów z ŻChZZ stwierdzono szybsze powstawanie protofibryli (*lag phase* krótszy o 9%, $p < 0,0001$), tworzenie grubszych włókien fibrynowych (Δ Abs większa o 14,2%, $p < 0,0001$), a skrzepy były o 27,4% mniej przepuszczalne ($p < 0,0001$) i o 25% mniej podane na lizę ($p < 0,0001$), występowało też większe $D-D_{max}$ o 20,6% ($p = 0,0008$), choć wolniejsze w czasie (o 8,1%, $p = 0,0002$) uwalnianie dimerów D pod wpływem rt-PA.

Tabela 6.2. Wyjściowe parametry fibrynowe w grupie kontrolnej i u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową

Zmienna	Grupa kontrolna n=25	ŻChZZ n=28	p
K_s (10^{-9} cm ²)	9,5 ±1,3	6,9 ±0,9	<0,0001
<i>Lag phase</i> (s)	47,7 ±3,7	43,4 ±3,6	<0,0001
Δ Abs (405nm)	0,77 ±0,05	0,88 ±0,05	<0,0001
t _{50%} (min)	7,7 ±1,2	9,7 ±1,1	<0,0001
CLT (min)	71,7 ±8,8	89,5 ±12,0	<0,0001
D-D _{max} (mg/l)	3,4 (3,3-4,1)	4,1 (3,9-4,4)	0,0008
D-D _{rate} (mg/l/min)	0,074 ±0,007	0,068 ±0,005	0,0002

Wartości podane jako średnia ±SD lub mediana (przedział międzykwartyłowy)

ŻChZZ - żylna choroba zakrzepowo-zatorowa, K_s - współczynnik przepuszczalności, *Lag phase* - czas przed rozpoczęciem bocznej agregacji protofibryli, Δ Abs (405nm) - maksymalna absorbancja żelu fibrynowego w turbidymetrii przy długości fali 405 nm, t_{50%} - czas lizy oceniany zmodyfikowaną metodą Williama i wsp., CLT - czas lizy oceniany zmodyfikowaną metodą Lismana i wsp., D-D_{max} - maksymalne stężenie dimerów D, D-D_{rate} - maksymalne tempo przyrostu dimerów D

Wykonano także analizę wyjściowych parametrów fibrynowych w podgrupach pacjentów z ŻChZZ. U pacjentów z samoistną ŻChZZ (n=10) w porównaniu do zakrzepicy związanej z przejściowymi czynnikami ryzyka (n=18) występowała większa przepuszczalność skrzepów (K_s 7,6 ±1,4*10⁻⁹ cm² vs 6,3 ±1,1*10⁻⁹ cm², p= 0,01), większa podatność na lizę (t_{50%} 8,7 ±1,6 min vs 10,2 ±1,1 min, p= 0,01) i wolniejsze tempo uwalniania dimerów D (D-D_{rate} 0,065 ± 0,005 mg/l/min vs 0,069 ±0,004 mg/l/min, p= 0,01). U pacjentów z obecną rezydualną skrzepliną w żyłach głębokich kończyn dolnych stwierdzono w porównaniu do pacjentów bez

skrzepliny rezydualnej większą absorbancję maksymalną (ΔAbs $0,9 \pm 0,04$ vs $0,8 \pm 0,06$, $p=0,005$) i mniejszą przepuszczalność skrzepów fibrynowych (K_s $6,0 \pm 0,9 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2$ vs $7,2 \pm 1,4 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2$; $p=0,03$), krótszą fazę tworzenia protofibrili (*lag phase* $41,2 \pm 2,5$ s vs $44,5 \pm 2,8$ s, $p=0,005$) oraz dłuższy czas lizy ($t_{50\%}$ $10,6 [9,5 - 11,3]$ min vs $9,9 [7,5 - 10,3]$ min, $p=0,03$). Nie stwierdzono istotnych różnic w strukturze/funkcji fibryny u pacjentów z zakrzepicą proksymalną vs dystalną ani u pacjentów z obecną vs nieobecną trombofilią.

W tabeli 6.5 przedstawiono współczynniki korelacji parametrów fibrynowych i innych zmiennych przed zastosowaniem atorwastatyny w grupie kontrolnej. Przed włączeniem atorwastatyny w tej grupie wiek korelował ujemnie z *lag phase* ($r= -0,55$, $p=0,004$), a dodatnio z maksymalną absorbancją ($r=0,4$, $p=0,04$). Stężenie fibrynogenu korelowało ujemnie z K_s ($r= -0,57$, $p=0,003$), *lag phase* ($r= -0,77$, $p<0,0001$) oraz tempem uwalniania dimerów D ($r= -0,66$, $p=0,0003$), a dodatnio z maksymalną absorbancją ($r=0,83$, $p<0,0001$), czasem lizy $t_{50\%}$ ($r=0,62$, $p=0,001$) i CLT ($r=0,84$, $p<0,0001$) oraz maksymalnym stężeniem dimerów D ($r=0,69$, $p=0,0001$). Dodatkowo większość parametrów fibrynowych (prócz K_s i $t_{50\%}$) korelowała ze stężeniem PAI-1 (ujemne korelacje dla *lag phase* i D-D_{rate}, dodatnie dla maksymalnej absorbancji, CLT i D-D_{max}). Nie zaobserwowano istotnych korelacji między parametrami fibrynowymi a CRP, poza słabą ujemną korelacją dla K_s ($r= -0,47$, $p=0,017$).

Analiza współczynników korelacji między parametrami fibrynowymi a innymi zmiennymi u pacjentów z ŻChZZ (tabela 6.8) przed stosowaniem atorwastatyny wykazała ujemną korelację stężenia fibrynogenu z K_s ($r= -0,44$, $p=0,019$) oraz korelacje dodatnie z maksymalną absorbancją ($r=0,57$, $p=0,001$), czasami lizy $t_{50\%}$ ($r=0,64$, $p=0,0002$) i CLT ($r=0,8$, $p<0,0001$) i maksymalnym stężeniem uwalnianych dimerów D ($r=0,38$, $p=0,04$). Nie stwierdzono istotnych korelacji między stężeniem fibrynogenu a *lag phase* czy tempem uwalniania dimerów D. Przed zastosowaniem atorwastatyny stężenie CRP korelowało dodatnio z maksymalną absorbancją ($r=0,52$, $p=0,004$) i czasami lizy ($r=0,44$, $p=0,02$), a F1.2 dodatnio z maksymalną absorbancją ($r=0,46$, $p=0,01$). Nie było istotnych korelacji między stężeniem PAI-1 czy Lp(a) a parametrami fibrynowymi. Nie stwierdzono także istotnych korelacji między parametrami fibrynowymi a czasem od epizodu ŻChZZ, czasem od zakończenia leczenia antykoagulacyjnego ani długością antykoagulacji.

6.2. Działanie atorwastatyny

6.2.1. Efekty atorwastatyny w grupie kontrolnej

Po 3 dniach stosowania atorwastatyny 40 mg dziennie stwierdzono istotne zmniejszenie stężenia cholesterolu całkowitego (o ok. 19%), cholesterolu LDL (o ok. 23%), triglicerydów (o ok. 7%) oraz t-PA (o ok. 8%). Wyniki pozostałych oznaczeń nie zmieniły się (tabela 6.3).

Tabela 6.3. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie kontrolnej (n=25) wyjściowo i po 3 dniach atorwastatyny (40 mg dziennie)

Zmienna	Wyjściowo	Po atorwastatynie	p
Hb (g/dl)	14,5 ±0,98	-	-
WBC (x10 ³ /μl)	5,9 (5,2-6,3)	-	-
PLT (x10 ³ /μl)	237 (210-264)	-	-
AlAT (U/l)	28 (19-34)	25 (19-42)	0,45
Glukoza (mmol/l)	5,44 ±0,36	5,47 ±0,39	0,73
Kreatynina (μmol/l)	79 (68-84)	77 (69-88)	0,26
TC (mmol/l)	5,87 ±1,03	4,76 ±1,02	<0,0001
LDL-C (mmol/l)	3,33 ±0,61	2,59 ±0,62	<0,0001
HDL-C (mmol/l)	1,29 (1,08-1,62)	1,21 (1,08-1,60)	0,33
TG (mmol/l)	0,95 (0,66-1,6)	0,89 (0,61-1,33)	0,01
CRP (mg/l)	0,84 (0,54-1,12)	0,57 (0,39-1,20)	0,37
D-dimery >300 (μg/L), n (%)	6 (24%)	5 (20%)	0,73
Fibrynogen (g/l)	3,08 ±0,73	3,18 ±0,76	0,14
tHcy (μmol/l)	5,70 (4,50-8,70)	6,70 (5,20-8,60)	0,33
t-PA (ng/ml)	10,80 (10,10-13,70)	10,00 (9,40-10,40)	0,001
PAI-1 (ng/ml)	20,07 ±7,36	17,85 ±7,00	0,24
F1.2 (pmol/l)	105 (85-121)	104 (89-114)	0,95
Lp(a) (mg/dl)	5,73 (3,35-11,63)	5,43 (3,29-11,79)	0,86

Wartości podane jako średnia ±SD, mediana (przedział międzykwartyłowy) lub procent

Hb – hemoglobina, WBC – leukocyty, PLT - płytki krwi, AlAT - aminotransferaza alaninowa, TC - cholesterol całkowity, LDL-C - cholesterol LDL, HDL-C - cholesterol HDL, TG – triglicerydy, CRP - białko C reaktywne, tHcy - homocysteina całkowita, t-PA - tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 - inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1, F1.2 - fragment protrombiny 1.2, Lp(a) - lipoproteina Lp(a)

Tabela 6.4. Parametry fibrynowe w grupie kontrolnej (n=25) wyjściowo i po 3 dniach atorwastatyny (40 mg dziennie)

Zmienna	Wyjściowo	Po atorwastatynie	p
K_s (10^{-9} cm ²)	9,5 ±1,3	8,7 ±1,3	0,06
<i>Lag phase</i> (s)	47,7 ±3,7	48,0 ±3,8	0,84
Δ Abs (405nm)	0,77 ±0,05	0,78 ±0,05	0,27
t _{50%} (min)	7,7 ±1,2	8,0 ±1,2	0,36
CLT (min)	71,7 ±8,8	63,8 ±8,8	0,003
D-D _{max} (mg/l)	3,4 (3,3-4,1)	3,4 (3,3-4,0)	0,91
D-D _{rate} (mg/l/min)	0,07 ±0,007	0,07 ±0,007	0,92

Wartości podane jako średnia ±SD lub mediana (przedział międzykwartyłowy)

skrótów jak w tabeli 6.2

Parametry fibrynowe w grupie kontrolnej wyjściowo i po 3 dniach stosowania atorwastatyny przedstawiono w tabeli 6.4; poza skróceniem - o 11% - czasu lizy (CLT) nie zaobserwowano istotnych zmian.

Analizy korelacji parametrów fibrynowych i innych zmiennych po 3 dniach atorwastatyny zobrazowano w tabeli 6.5. Stężenie fibrynogenu korelowało dodatnio z absorbancją ($r= 0,76$, $p< 0,0001$), CLT ($r= 0,48$, $p= 0,01$) oraz maksymalnym stężeniem uwalnianych dimerów D ($r= 0,43$, $p= 0,03$). Stężenie CRP korelowało ujemnie z K_s ($r= -0,41$, $p= 0,04$), a dodatnio maksymalną absorbancją ($r= 0,45$, $p= 0,02$) i stężeniem dimerów D ($r= 0,43$, $p= 0,03$). Dodatkowo zaobserwowano ujemne korelacje między PAI-1 a tempem uwalniania dimerów D ($r= -0,52$, $p= 0,007$) oraz między Lp(a) a *lag phase* ($r= -0,46$, $p= 0,02$).

Tabela 6.5. Współczynniki korelacji dla parametrów fibrynowych i innych zmiennych w grupie kontrolnej przed leczeniem / po leczeniu

	K_s	Lag phase	Δ Abs	t_{50%}	CLT	D-D_{max}	D-D_{rate}
wiek	-0,26 / -0,05	-0,55*/ 0,08	0,40*/ 0,28	0,37 / 0,22	0,36 / 0,29	0,28 / 0,39	-0,15 / -0,28
fibrynogen	-0,57*/ -0,11	-0,77*/ 0,25	0,83*/ 0,76*	0,62*/ 0,15	0,84*/ 0,48*	0,69*/ 0,43*	-0,66*/ -0,14
CRP	-0,47*/ -0,41*	-0,28 / 0,01	0,26 / 0,45*	0,21 / 0,19	0,21 / 0,35	0,25/ 0,43*	-0,02 / -0,12
TC	-0,08 / -0,40*	-0,17 / -0,05	0,12 / 0,00	0,19 / 0,22	0,11 / 0,13	-0,13 / 0,28	-0,04 / -0,31
TG	0,10 / -0,49*	0,13 / -0,30	-0,15 / 0,23	-0,21 / 0,12	0,03 / 0,22	-0,35 / 0,13	-0,03 / -0,26
PAI-1	-0,20 / -0,37	-0,52*/ -0,39	0,56*/ 0,19	0,34 / 0,03	0,71*/ 0,38	0,54*/ 0,22	-0,62*/ -0,52*
F1.2	-0,14 / 0,12	-0,36 / -0,18	0,39*/ 0,23	0,30 / -0,09	0,44*/ 0,12	0,55*/ -0,20	-0,42*/ -0,17
Lp(a)	0,10 / -0,17	0,07 / -0,46*	-0,39 / -0,19	-0,17 / 0,36	-0,14 / 0,16	-0,31 / 0,01	0,03 / -0,04

* – korelacja istotna (p<0,05), pozostałe skróty jak w tabeli 6.2 i 6.3

6.2.2. Efekty atorwastatyny u pacjentów z ŻChZZ

W wyniku zastosowanej atorwastatyny 40 mg dziennie podawanej przez 3 kolejne dni zaobserwowano zmniejszenie stężenia cholesterolu całkowitego (o 18,2%), cholesterolu LDL (o 22,7%), HDL (o 5,3%), triglicerydów (o 1%), homocysteiny (o 31,6%), PAI-1 (o 19,4%) i Lp(a) (o 7,2%), natomiast stężenie F1.2 zwiększyło się (o 5%). Wyniki pozostałych oznaczeń nie zmieniły się (tabela 6.6).

Tabela 6.6. Wyniki badań laboratoryjnych u osób z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (n=28) wyjściowo i po 3 dniach atorwastatyny (40 mg dziennie)

Zmienna	Wyjściowo	Po atorwastatynie	p
Hb (g/dl)	14,5 ±1,12	-	-
WBC (x10 ³ /μl)	5,9 (4,9-6,2)	-	-
PLT (x10 ³ /μl)	221,5 (177-236)	-	-
AIAT (U/l)	21,5 (15,5-32,5)	20,0 (16-37)	0,70
Glukoza (mmol/l)	5,66 ±0,36	5,60 ±0,44	0,57
Kreatynina (μmol/l)	74 (68-83)	75 (69-81)	0,37
TC (mmol/l)	5,67 ±1,14	4,64 ±1,08	<0,0001
LDL-C (mmol/l)	3,44 ±0,88	2,66 ±0,84	<0,0001
HDL-C (mmol/l)	1,50 (1,19-1,65)	1,42 (1,21-1,57)	0,02
TG (mmol/l)	0,97 (0,83-1,35)	0,96 (0,73-1,22)	0,02
CRP (mg/l)	1,66 (0,74-2,22)	1,69 (0,77-2,72)	0,78
D-dimery (μg/L) >300 (%)	10 (35,7%)	6 (21,4%)	0,73
Fibrynogen (g/l)	3,11 ±0,67	3,16 ±0,71	0,48
tHcy (μmol/l)	7,75 (5,05-9,60)	5,30 (3,60-6,65)	0,006
t-PA (ng/ml)	14,05 (11,05 -17,35)	13,15 (10,05-17,20)	0,69
PAI-1 (ng/ml)	21,39 ±7,68	17,23 ±5,43	0,009
F1.2 (pmol/l)	106 (87-132)	111,5 (90-135,5)	0,034
Lp(a) (mg/dl)	4,97 (3,26-11,86)	4,61 (3,09-11,86)	0,0006

Wartości podane jako średnia ±SD, mediana (przedział międzykwartyłowy) lub procent

Skróty jak w tabeli 6.3

Parametry fibrynowe u pacjentów z ŻChZZ wyjściowo i po 3 dniach stosowania atorwastatyny przedstawiono w tabeli 6.7. W wyniku zastosowanej statyny zwiększeniu uległy K_s (o 23,2%, $p < 0,0001$), *lag phase* (o 4,5%, $p = 0,04$) oraz tempo uwalniania dimerów D (o 10,3%, $p = 0,0001$). Zmniejszyły się natomiast Δ Abs (o 4,5%, $p = 0,002$) i czasy lizy skrzepu ($t_{50\%}$ o 19,9% oraz CLT o 13,7%, $p < 0,0001$).

Korelacje między parametrami fibrynowymi a innymi zmiennymi u pacjentów z ŻChZZ po atorwastatynie zebrano w tabeli 6.8. Stwierdzono ujemną korelację fibrynogenu z K_s ($r = -0,65$, $p = 0,0002$) oraz korelacje dodatnie z maksymalną absorbancją ($r = 0,88$, $p < 0,0001$), czasem lizy $t_{50\%}$ ($r = 0,62$, $p = 0,0005$) i CLT ($r = 0,46$, $p = 0,01$) i maksymalnym stężeniem uwalnianych dimerów D ($r = 0,44$, $p = 0,02$). Nie stwierdzono istotnych korelacji między stężeniem fibrynogenu a *lag phase* czy tempem uwalniania dimerów D. Po 3 dniach atorwastatyny zaobserwowano ujemne korelacje CRP i K_s ($r = -0,54$, $p = 0,003$) oraz *lag phase* ($r = -0,38$, $p = 0,05$) oraz PAI-1 z K_s ($r = -0,63$, $p = 0,0003$), *lag phase* ($r = -0,63$, $p = 0,0002$) i tempem uwalniania dimerów D ($r = -0,44$, $p = 0,02$). PAI-1 dodatnio korelował natomiast z czasem lizy (dla $t_{50\%}$ $r = 0,53$, $p = 0,004$; dla CLT $r = 0,68$, $p < 0,0001$). Dla F1.2 wystąpiły korelacje ujemne z K_s ($r = -0,52$, $p = 0,004$) i z *lag phase* ($r = -0,42$, $p = 0,02$) oraz dodatnie z czasem lizy $t_{50\%}$ ($r = 0,5$, $p = 0,006$), CLT ($r = 0,4$, $p = 0,03$) i maksymalnym stężeniem dimerów D ($r = 0,39$, $p = 0,04$).

Po 3 dniach stosowania statyny nie stwierdzono istotnych korelacji między zmianą parametrów fibrynowych a zmianą stężenia cholesterolu, tHcy, t-PA, PAI-1, F1.2 czy Lp(a).

Tabela 6.7. Parametry fibrynowe u osób z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (n=28) wyjściowo i po 3 dniach atorwastatyny (40 mg dziennie)

Zmienna	Wyjściowo	Po atorwastatynie	p
K_s (10^{-9} cm ²)	6,9 ±0,9	8,5 ±0,98	<0,0001
<i>Lag phase</i> (s)	43,4 ±3,62	45,4 ±3,62	0,04
Δ Abs (405nm)	0,88 ±0,05	0,84 ±0,05	0,0023
$t_{50\%}$ (min)	9,67 ±1,12	7,74 ±1,12	<0,0001
CLT (min)	89,53 ±12,01	77,26 ±12,01	0,0004
D-D _{max} (mg/l)	4,11 (3,89-4,45)	4,00 (3,67-4,30)	0,22
D-D _{rate} (mg/l/min)	0,068 ±0,005	0,075 ±0,007	<0,0001

Wartości podane jako średnia ±SD lub mediana (przedział międzykwartyłowy)

Skróty jak w tabeli 6.2

Tabela 6.8. Współczynniki korelacji dla parametrów fibrynowych i innych zmiennych u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową przed leczeniem / po leczeniu

	K_s	Lag phase	Δ Abs	t_{50%}	CLT	D-D_{max}	D-D_{rate}
fibrynogen	-0,44*/ -0,65*	0,14 / -0,27	0,57*/ 0,88*	0,64*/ 0,62*	0,80*/ 0,46*	0,38*/ 0,44*	0,01 / -0,35
glukoza	-0,37 / 0,06	-0,20 / -0,02	0,09 / 0,05	0,38*/ -0,02	0,12 / -0,33	0,18 / 0,04	0,16 / 0,28
CRP	-0,27 / -0,54*	0,03 / -0,38*	0,52*/ 0,66*	0,44*/ 0,53*	0,44*/ 0,25	0,26 / 0,33	-0,10 / -0,32
TC	0,14 / 0,00	0,43*/ -0,09	-0,01 / 0,32	0,001 / 0,08	0,29 / -0,04	-0,12 / 0,19	0,05 / 0,07
LDL-C	-0,04 / -0,12	0,33 / -0,09	0,18 / 0,42	0,19 / 0,19	0,44*/ 0,00	-0,05 / 0,09	0,09 / 0,05
HDL-C	0,17 / 0,11	0,27 / 0,04	-0,28 / -0,14	-0,38*/ -0,15	-0,20 / 0,15	-0,37 / 0,22	-0,02 / -0,17
TG	0,11 / 0,11	0,04 / -0,1	0,004 / 0,26	0,11 / 0,02	0,03 / -0,2	0,11 / 0,3	0,2 / -0,3
PAI-1	0,02 / -0,63*	-0,02 / -0,63*	0,23 / 0,25	-0,10 / 0,53*	0,20 / 0,68*	0,02 / 0,30	0,08 / -0,44*
F1.2	0,00 / -0,52*	-0,07 / -0,42*	0,46*/ 0,28	0,19 / 0,50*	0,32 / 0,40*	-0,04 / 0,39*	0,12 / -0,24
Lp(a)	0,20 / 0,11	0,04 / 0,21	-0,1 / 0,10	-0,2 / -0,31	-0,1 / 0,03	0,10 / 0,01	-0,2 / -0,003

* – korelacja istotna (p<0,05), pozostałe skróty jak w tabeli 6.2 i 6.3

6.2.3. Zmiany parametrów fibrynowych w podgrupach pacjentów z ŻChZZ

U pacjentów z obecną rezydualną skrzepliną stwierdzono 10 razy bardziej nasilone zmniejszenie maksymalnej absorbancji żelu fibrynowego pod wpływem atorwastatyny niż u pacjentów bez skrzepliny ($0,10 \pm 0,07$ vs $0,01 \pm 0,07$, $p=0,005$), natomiast skrócenie czasu lizy (Δ CLT) obserwowano tylko w podgrupie pacjentów bez skrzepliny rezydualnej (tabela 6.9). W przypadku braku skrzepliny rezydualnej wystąpił większy przyrost tempa uwalniania dimerów D po zastosowaniu atorwastatyny ($0,009 \pm 0,01$ mg/l/min vs $0,003 \pm 0,01$ mg/l/min; $p= 0,04$).

Nie było różnic w wielkości zmian parametrów fibrynowych pod wpływem statyny u pacjentów z obecną lub nieobecną trombofilią. Pacjentów z zakrzepicą samoistną cechował większy (ok. 2,4 razy) przyrost tempa uwalniania dimerów D pod wpływem statyny niż w przypadkach zakrzepicy towarzyszącej przejściowym czynnikom ryzyka ($0,012 \pm 0,01$ mg/l/min vs $0,005 \pm 0,006$ mg/l/min, $p= 0,044$). Uwzględniając pierwotną lokalizację zakrzepicy (proksymalna /dystalna), korzystne zmniejszenie maksymalnej absorbancji żelu fibrynowego pod wpływem atorwastatyny stwierdzono jedynie w przypadkach zakrzepicy proksymalnej [$0,07 \pm 0,07$ (405nm) vs $-0,008 \pm 0,07$ (405nm), $p= 0,01$].

Tabela 6.9. Różnice w wielkości zmiany parametrów fibrynowych u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową po 3 dniach atorwastatyny 40 mg dziennie w zależności od obecności / braku skrzepliny rezydualnej

	Obecna RVT n=9	Brak RVT n=19	p t Studenta/ M-W
ΔK_s (10^{-9} cm^2)	1,8 \pm 0,9	1,5 \pm 1,4	0,54
Δ Lag phase (s)	1,5 \pm 5,4	2,1 \pm 4,4	0,70
$\Delta \Delta$ Abs (405nm)	0,1 \pm 0,07	0,0 \pm 0,07	0,005
Δ t_{50%} (min)	2,1 \pm 0,7	1,8 \pm 1,5	0,61
Δ CLT (min)	-0,4 \pm 12,5 *	17,4 \pm 6,4	<0,0001
Δ D-D_{max} (mg/l)	0,4 \pm 0,7	0,1 \pm 0,5	0,37
Δ D-D_{rate} (mg/l/min)	0,003 \pm 0,01	0,009 \pm 0,01	0,04

Wartości podane jako średnia \pm SD lub mediana (przedział międzykwartyłowy)

M-W – test Manna–Whitney’a

RVT – skrzeplina rezydualna, pozostałe skróty jak w tabeli 6.2

* u pacjentów z RVT czas lizy wydłużył się po leczeniu

6.2.4. Wyniki analizy statystycznej – moc testu

Analizowane zmienne K_s u pacjentów z ŻChZZ przed i po atorwastatinie cechują się rozkładem normalnym, przyjęto więc rozkład normalny w populacji. Za podstawę analizy liczebności przyjęto porównanie rozkładów w modelu parametrycznym powiązaniem ($k=2$ grupy: przed i po interwencji terapeutycznej). Wielkość efektu (*effect size*) „ d ” obliczono na podstawie zmiennych K_s przed [$n=28$; średnia=6,8; $SD=1,3$; współczynnik zmienności ($\%CV$)=19,1%] i po interwencji terapeutycznej ($n=28$; średnia=8,4; $SD=0,9$; $\%CV=10,7\%$) oraz istotnej ($p=0,03$; $r=0,4$) korelacji między zmiennymi. Wielkość efektu wyniosła 1,28, co klasyfikuje efekt interwencji w zakresie bardzo silnego wpływu. Zwraca także uwagę niska i niewielka liczbowo różnica $\%CV$ zmiennych przed i po interwencji, co świadczy o wysokiej jakości danych eksperymentalnych. Z powyższymi danymi moc testu na poziomie 0,05 (jednostronnie – wzrost wartości) osiągana jest dla wielkości grupy $n=9$ pacjentów, na poziomie 0,01 dla $n=17$, na poziomie 0,001 dla $n=29$. Można przyjąć, że wielkość grupy $n=28$ jest większa od założonego minimum $n=17$ zapewniającego bardzo wysoką moc testu i prawdopodobieństwo trafności wyników badania ($p=0,01$). Dla podniesienia mocy testu do $p=0,001$ (prawdopodobieństwo graniczące z pewnością) konieczne byłoby zwiększenie grupy tylko o jedną osobę tj. do $n=29$ osób.

Analizowane zmienne $t_{50\%}$ u pacjentów z ŻChZZ przed i po atorwastatinie cechują się brakiem zgodności rozkładu z rozkładem normalnym, przyjęto jednak rozkład normalny w populacji. Za podstawę analizy liczebności przyjęto porównanie rozkładów w modelu powiązaniem nieparametrycznym Wilcoxon (k=2 grupy, przed i po interwencji terapeutycznej). Wielkość efektu (*effect size*) „ d ” obliczono na podstawie zmiennych $t_{50\%}$ przed ($n=28$; średnia=9,7; $SD=1,5$; $\%CV=15,5\%$) i po interwencji terapeutycznej ($n=28$; średnia=7,8; $SD=1,2$; $\%CV=15,4\%$) oraz istotnej ($p=0,003$; $r=0,54$) korelacji między zmiennymi. Wielkość efektu wyniosła 1,44, co klasyfikuje go w zakresie bardzo silnego wpływu. Zwraca także uwagę niemalże identyczny liczbowo i niewielki współczynnik zmienności $\%CV$ zmiennych przed i po interwencji, co świadczy o wysokiej jakości danych eksperymentalnych. Z powyższymi danymi moc testu na poziomie 0,05 (jednostronnie – redukcja) osiągana jest dla wielkości grupy $n=8$ pacjentów, na poziomie 0,01 dla $n=15$, na poziomie 0,001 dla $n=25$. Można przyjąć, że wielkość grupy $n=28$ jest większa od założonego minimum $n=25$ zapewniającego prawdopodobieństwo graniczące z pewnością trafności wyników badania ($p=0,001$).

Analizowane zmienne CLT u pacjentów z ŻChZZ przed i po atorwastatynie cechują się rozkładem normalnym, przyjęto rozkład normalny w populacji. Za podstawę analizy liczebności przyjęto porównanie rozkładów w modelu parametrycznym powiązanym (k=2 grupy, przed i po interwencji terapeutycznej). Wielkość efektu (*effect size*) „d” obliczono na podstawie zmiennych CLT przed (n=28; średnia=89,2; SD=13,5; %CV=15,1%) i po interwencji terapeutycznej (n=28; średnia=77,6; SD=16,5; %CV=21,3%) oraz istotnej (p<0,001; r=0,69) korelacji między zmiennymi. Wielkość efektu wyniosła 0,96, co klasyfikuje go w zakresie silnego wpływu. Zwraca także uwagę niska i niewielka liczbowo różnica współczynnika zmienności %CV zmiennych przed i po interwencji, co świadczy o wysokiej jakości danych eksperymentalnych. Z powyższymi danymi moc testu na poziomie 0,05 (jednostronnie – redukcja) osiągnięta jest dla wielkości grupy n=14 pacjentów, na poziomie 0,01 dla n=27, na poziomie 0,001 dla n=47. Można przyjąć, że wielkość grupy n=28 jest większa od założonego minimum n=27 zapewniającego bardzo wysoką moc testu i prawdopodobieństwo trafności wyników badania (p=0,01). Dla podniesienia mocy testu do p=0,001 (prawdopodobieństwo graniczące z pewnością) konieczne byłoby zwiększenie grupy do n=47 osób.

7. Dyskusja

Przedstawione wyniki wskazują na istotne różnice struktury i funkcji skrzepów fibrynowych u osób bez ŻChZZ w porównaniu do pacjentów, którzy przebyli epizod ŻChZZ. Stwierdzono, że u pacjentów z ŻChZZ skrzepy fibrynowe mają mniejszą liczbę porów, grubsze włókna oraz są bardziej odporne na lizę. Co ważne, wykazano także, że trzydniowa terapia atorwastatyną 40 mg dziennie korzystnie wpływa na parametry fibrynowe u pacjentów po epizodzie ŻChZZ, a efekt ten jest niezależny od CRP, zmian w lipidogramie czy zmian stężenia homocysteiny, t-PA, PAI-1, F1.2 i Lp(a).

7.1. Wyjściowe właściwości skrzepów fibrynowych w ŻChZZ

W grupie pacjentów z ŻChZZ skrzepy fibrynowe cechowały się mniejszą (o ok. 30%) przepuszczalnością związaną z mniejszą liczbą porów oraz tworzeniem grubszych włókien w porównaniu do osób bez ŻChZZ, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami [118]. U pacjentów z ŻChZZ skrzepy fibrynowe tworzyły się szybciej oraz miały grubsze włókna, a czas lizy był o ok. 25% dłuższy niż u osób bez ŻChZZ. Wcześniejsze badania nie wskazywały na różnice w szybkości tworzenia skrzepu między grupą z samoistną ŻChZZ a osobami zdrowymi, co może wynikać z większej liczebności grupy pacjentów z samoistną ŻChZZ [118]. Aktualnie wykazano większą oporność na lizę u pacjentów z ŻChZZ w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, co potwierdza wyniki badań Undas i wsp., w których porównywano efektywność lizy (metodą z dodaniem trombiny) u osób zdrowych i z samoistną ŻChZZ z wykluczeniem trombofilii [118]. Podobne wnioski płyną z badania Lismana i wsp. porównującego sprawność lizy (metodą bez dodawania egzogennej trombiny) u osób zdrowych i pacjentów z ŻChZZ samoistną lub towarzyszącą przejściowym czynnikiem ryzyka [114].

W niniejszym badaniu nie było istotnych różnic w strukturze/funkcji skrzepów fibrynowych u pacjentów w zależności od lokalizacji zakrzepicy (proksymalna vs dystalna) ani od obecności lub braku trombofilii. Te kwestie nie były dotychczas badane w dostępnym piśmiennictwie, choć wydaje się, że na podstawie objawów klinicznych, wyników leczenia i częstości nawrotów zakrzepicy proksymalnej, można oczekiwać niekorzystnych zmian struktury/funkcji fibryny w tej grupie. Pacjenci z obecną skrzepliną rezydualną w żyłach

głębokich kończyn dolnych (w porównaniu do pacjentów bez takiej skrzepliny) cechowali się skrzepami o mniejszej przepuszczalności, grubszych włóknach oraz słabej podatności na lizę. Jest wysoce prawdopodobnym, że takie niekorzystne modyfikacje struktury/funkcji fibryny stanowią istotny czynnik odgrywający rolę w patogenezie tego powikłania, który może przyczyniać się do zwiększonej częstości nawrotów zakrzepicy u pacjentów ze skrzepliną rezydualną.

Zaskakujące wyniki uzyskano analizując wyjściowe parametry fibrynowe u pacjentów z samoistną ŻChZZ w porównaniu do zakrzepicy towarzyszącej przejściowym czynnikiem ryzyka. W grupie samoistnej ŻChZZ występowała większa przepuszczalność skrzepów, większa podatność na lizę, ale wolniejsze tempo uwalniania dimerów D.

7.2. Efekty atorwastatyny u osób bez ŻChZZ

Pod wpływem zastosowanej atorwastatyny w grupie kontrolnej nie wystąpiły istotne zmiany przepuszczalności skrzepów fibrynowych ani zmniejszenie stężenia CRP. W wcześniejszym badaniu, stosując simwastatynę przez 3 miesiące, obserwowano redukcję stężenia CRP i niewielki wzrost (o 4,4%) współczynnika przepuszczalności u osób z małym ryzykiem sercowo-naczyniowym [178]. Brak takich efektów w aktualnym badaniu może wynikać z mniejszego ryzyka sercowo-naczyniowego osób w grupie kontrolnej (młodszy wiek, mniejszy BMI, mniejsze wyjściowe stężenie CRP, mniejsza częstość nadciśnienia tętniczego oraz uczestnictwo kobiet). Nie można również wykluczyć, że w populacji o małym ryzyku sercowo-naczyniowym i wyjściowym stężeniu CRP 0,84 (0,54-1,12) mg/l, trzydniowe stosowanie atorwastatyny w dawce 40 mg dziennie jest niewystarczające do uzyskania zwiększenia przepuszczalności skrzepu oraz dalszej redukcji CRP.

U osób bez ŻChZZ po 3 dniach atorwastatyny jedynie czas lizy CLT skrócił się (o 11%), pozostałe parametry fibrynowe nie uległy zmianie. Wyjściowe wartości CLT korelowały dodatnio z PAI-1 i F1.2, jednak po zastosowaniu statyny obserwacja ta straciła istotność statystyczną. Podobną poprawę podatności skrzepu fibrynowego na lizę (skrócenie czasu lizy o 11,2%) wykazano wcześniej u ochotników otrzymujących simwastatynę 40 mg dziennie przez 90 ± 12 dni [178]. Wskazywano wówczas na związek między skróceniem czasu lizy (wyrażanym metodą Lismana i wsp.) a redukcją stężenia CRP pod wpływem simwastatyny, którego wyjściowe stężenie było większe ($1,89 \pm 0,82$ mg/l) niż aktualnej pracy. Korzystne efekty simwastatyny wiązano z plejotropowym i przeciwzapalnym działaniem tego leku

[178]. W aktualnej pracy uzyskano poprawę efektywności lizy skrzepów (mierzoną metodą Lismana i wsp.) bez zmiany stężenia CRP co wskazuje, że korzystna modyfikacja struktury/funkcji fibryny u osób z bardzo małym wyjściowym stężeniem CRP może wynikać z samego osłabienia generacji trombiny. Ocena sprawności lizy metodą Lismana i wsp. oparta jest na analizie przebiegu krzywej turbidymetrycznej powstawania i dezintegracji fibryny bez dodawania egzogennej trombiny, a w celu uzyskania fibryny wykorzystuje się TF na pęcherzykach fosfolipidowych. Wydaje się, że CLT jest stosunkowo czuły na niewielkie zmiany w endogennej generacji trombiny, jakich oczekuje się u osób z małym ryzykiem sercowo–naczyniowym otrzymujących statynę. Należy zwrócić uwagę na brak istotnych zmian w innych testach oceniających sprawność lizy u osób z grupy kontrolnej, co można wytłumaczyć odmiennosiami metodologicznymi. Badanie efektywności lizy oparte na analizie maksymalnego stężenia i tempa uwalniania dimerów D polega na dodaniu roztworu rt-PA w buforze na powierzchnię żelu fibrynowego uzyskanego podobnie jak przy badaniu przepuszczalności. rt-PA tworzy w miejscu dodania na żel fibrynowy wyraźne czoło fibrynolizy, które z czasem przenika w głąb fibryny na zasadzie przesiąkania i dyfuzji [43,44]. W warunkach *in vivo* fibrynoliza i polimeryzacja fibryny zachodzą jednocześnie i nie istnieje wyodrębnione czoło fibrynolizy, z tego powodu modele oparte na analizie przebiegu krzywej turbidymetrycznej polimeryzacji i lizy fibrynogenu/fibryny w obecności uprzednio dodanego rt-PA wydają się być bliżej fizjologii. Reasumując, można przypuszczać, że trzydniowe stosowanie atorwastatyny u osób z małym ryzykiem sercowo-naczyniowym i małym wyjściowym stężeniem CRP zmienia nieznacznie lub niemal nie ma wpływu na właściwości sieci fibrynowej.

7.3. Efekty atorwastatyny u pacjentów z ŻChZZ

Oryginalnym i ważnym spostrzeżeniem jest stwierdzenie, że w grupie pacjentów z ŻChZZ pod wpływem atorwastatyny podawanej jedynie przez 3 dni wykazano zwiększenie przepuszczalności skrzepu fibrynowego (o 23,2%), wydłużenie czasu tworzenia skrzepu (o 4,5%) zmniejszenie (o 4,5%) grubości powstających włókien fibryny, poprawę efektywności lizy skrzepów (skrócenie $t_{50\%}$ o 19,9% i CLT o 13,7%) i zwiększenie (o 10,3%) tempa uwalniania dimerów D pod wpływem rt-PA.

Dotychczas nie badano oddziaływania statyn na strukturę skrzepu u pacjentów z ŻChZZ. Badania prowadzone u osób z chorobą wieńcową [111] lub cukrzycą typu 1 [157]

potwierdzają podobne (o ok. 20%) zwiększenie wskaźnika przepuszczalności skrzepu fibrynowego pod wpływem zastosowanej atorwastatyny (40 mg dziennie przez 28 ±2 dni lub 80 mg przez 2 miesiące) bądź simwastatyny (40 mg dziennie przez 28 ±2 dni). Dotychczas modulujące działanie statyn na strukturę i funkcję skrzepu fibrynowego wiązano m.in. z ich działaniem przeciwzapalnym i zmniejszaniem stężenia białka CRP, które - jak wynika z prac *in vitro* Salonena i wsp. - może przyłączać się do fibrynogenu/fibryny [199]. W aktualnym badaniu wzrost przepuszczalności skrzepu po atorwastatynie u pacjentów z ŻChZZ był niezależny od zmian w lipidogramie, a stężenie CRP nie zmieniło się. Sugeruje to, że zależne od statyn korzystne modulowanie struktury skrzepu może wystąpić nawet wobec braku zmniejszenia stężenia CRP, co wynika zapewne z osłabienia generacji trombiny [111] i zmniejszonej ekspresji TF w ścianie naczynia. Badania Tehraniego i wsp. [157] z zastosowaniem atorwastatyny 80 mg dziennie przez 2 miesiące u dorosłych pacjentów z cukrzycą typu 1, dyslipidemią [stężenie cholesterolu całkowitego 4,86 ±0,45 mmol/l i cholesterolu LDL 3,15 (2,80–3,35) mmol/l] i bez powikłań makroangiopatycznych, potwierdziły zmniejszenie generacji trombiny (wyrażanej jako potencjał endogennej trombiny) oraz poprawę przepuszczalności skrzepu fibrynowego pod wpływem atorwastatyny bez zmian w stężeniu CRP, którego wyjściowe stężenie było małe i wynosiło 0,61 (0,47–0,83) mg/l.

Podatność skrzepu fibrynowego na lizę ma zasadnicze znaczenie w patofizjologii ŻChZZ, a gęsto upakowane skrzepy o małej liczbie porów są słabo penetrowane przez białka, czego efektem jest wydłużenie czasu lizy. Zwiększenie przepuszczalności skrzepu oraz zmniejszenie upakowania jego struktury poprawiają efektywność lizy [200]. W niniejszej pracy w grupie pacjentów z ŻChZZ istotnie poprawiła się podatność na lizę po zastosowanej atorwastatynie, co stanowi dowód na nowy mechanizm przeciwwakrzepowego działania statyn w ŻChZZ niezależny od CRP czy zmian lipidogramu. Aktualnie brakuje innych doniesień na temat wpływu statyn na zwiększenie podatności na lizę skrzepów w ŻChZZ. W badaniach u pacjentów z chorobą wieńcową leczonych atorwastatyną lub simwastatyną uzyskano również skrócenie czasu lizy (wyrażanym metodą Williama i wsp.) niezależne od CRP czy interleukiny-6 [111]. W niniejszym badaniu uzyskano zwiększenie tempa uwalniania dimerów D w teście przepuszczalności z rt-PA u pacjentów z ŻChZZ po 3 dniach stosowania atorwastatyny, co może sugerować ułatwioną penetrację wtórnie do zwiększonej średnicy porów skrzepu.

Od kilku lat pojawiają się doniesienia na temat znaczenia czasu lizy i czynników go determinujących u osób zdrowych [63] lub z zakrzepicą w łożysku żylnym [114,118] czy

tętnicznym [201,202]. W badaniu EUROCLLOT wykazano, że czynniki genetyczne jedynie umiarkowanie (w ok. 10-40%) modulują strukturę i funkcję skrzepu, a decydujące znaczenie mają nabyte czynniki środowiskowe. Wydłużenie czasu lizy koreluje dodatnio m.in. z występowaniem zespołu metabolicznego lub z jego poszczególnymi składowymi [63]. Stężenie białek osoczowych zaangażowanych w endogenną fibrylizę zwiększa się wraz ze wzrostem tkanki tłuszczowej i BMI [203,204], dodatkowo stężenie plazminogenu, PAI-1 i t-PA zależy do stanu zapalnego i jest markerem aktywowanego śródbłona [205,206]. Największy wpływ na zmienność czasu lizy oraz wyraźną korelację z ryzykiem ŻChZZ wykazuje PAI-1, a także (w mniejszym stopniu) plazminogen, TAFI, protrombina i α_2 -antyplazmina. W aktualnym badaniu po 3 dniach stosowania atorwastatyny 40 mg dziennie wystąpiło zmniejszenie stężenia PAI-1 i t-PA, co może być odzwierciedleniem plejotropowego i przeciwzapalnego wpływu tego leku na śródbłonek naczyniowy. Istotne korelacje między PAI-1 a większością parametrów fibrynowych występowały częściej po atorwastatynie, która prawdopodobnie zmniejszała wpływ czynników zakłócających, być może związanych z lipidami. Zwiększenie podatności na lizę było jednak niezależne od obserwowanych pod wpływem statyny zmian stężenia PAI-1 czy t-PA. Nie oznaczano natomiast stężenia plazminogenu, TAFI czy α_2 -antyplazminy, nie można zatem wykluczyć, że ewentualne zmiany tych parametrów mogły przyczynić się do korzystnego wpływu atorwastatyny na strukturę i funkcję fibryny. W badaniach z atorwastatyną (10 mg dziennie przez 90 dni) [207] lub simwastatyną (40 mg dziennie przez 56 dni) [208] podawaną osobom z hipercholesterolemią stwierdzono redukcję stężenia TAFI, które korelowało ujemnie ze stężeniem kompleksu plazmina-antyplazmina. Co ciekawe w czasie sześćdziesięciodniowego podawania atorwastatyny stężenie TAFI stopniowo malało z każdym kolejnym tygodniem podawania leku, a stężenie kompleksu plazmina-antyplazmina zwiększało się [207].

Należy podkreślić, że doniesienia na temat wpływu statyn na stężenie białek osoczowych zaangażowanych w fibrylizę w innych grupach pacjentów mogą odbiegać od wyników uzyskanych w ŻChZZ. Podawanie atorwastatyny pacjentom z chorobą wieńcową nie powodowało zmian stężenia t-PA [111,209] i wiązało się ze zmniejszeniem [209] lub brakiem zmiany stężenia PAI-1 [111].

Dotychczasowe dane wskazują, że kilka innych parametrów może również wpływać na zmienne fibrynowe, w tym tHcy, Lp(a) i F1.2. Hiperhomocysteinemia koreluje z tworzeniem skrzepów fibrynowych zbudowanych z cienkich, gęsto upakowanych włókien o zmniejszonej liczbie porów, co warunkuje ich oporność na lizę [83]. W aktualnej pracy stężenia tHcy uległy zmniejszeniu po zastosowaniu atorwastatyny u pacjentów z ŻChZZ, jednak poprawa

parametrów fibrynowych nie miała związku z tym zjawiskiem. Z uwagi na niewielką liczebność grup obserwowane zmniejszenie stężenia tHcy należy interpretować z ostrożnością. Wpływ statyn na stężenie tHcy jest niewielki - w metaanalizie Jankowskiego i wsp. zmniejszenie stężenia tHcy pod wpływem różnych statyn osiągnęło graniczną wartość istotności statystycznej [210].

Lp(a) wykazuje silne powinowactwo do fibryny zdeponowanej na uszkodzonej ścianie naczyń lub blaszce miażdżycowej [90]. Lp(a) konkuruje z plazminoginem o miejsca wiązania na fibrynie oraz bezpośrednio osłabia zdolności katalityczne kompleksu plazminogen – t-PA – fibryna poprzez hamowanie konwersji mało aktywnego Glu-plazminogenu do aktywnej postaci Lys-plazminogenu [88]. Zwiększone osoczowe stężenie Lp(a) koreluje ze zmniejszoną przepuszczalnością skrzepów fibrynowych zbudowanych z cienkich włókien i ich opornością na lizę [89]. W aktualnej pracy stężenie Lp(a) uległo zmniejszeniu po 3 dniach atorwastatyny 40 mg dziennie u pacjentów z ŻChZZ, jednak poprawa parametrów fibrynowych nie miała związku z tym zjawiskiem. Dostępne w piśmiennictwie dane na temat działania inhibitorów reduktazy HMG-CoA na stężenie Lp(a) są skąpe i niespójne [211].

Stężenie F1.2 w osoczu było jedynym parametrem generacji trombiny ocenianym w niniejszym badaniu. U pacjentów z ŻChZZ po 3 dniach stosowania atorwastatyny zaobserwowano niespodziewanie zwiększenie stężenia F1.2, bowiem istnieje wiele danych na zależne od statyn osłabienie generacji trombiny oceniane metodą *ex vivo* [110] czy za pomocą tzw. endogennego potencjału trombiny [157]. Oznaczanie F1.2 krążących w osoczu żylnym odzwierciedla ogólnoustrojową konwersję protrombiny do trombiny i jest znacznie mniej czułe na lokalne zmiany w dostępności TF w ścianie naczyń, jakich należy oczekiwać w trakcie stosowania inhibitorów reduktazy HMG-CoA. Wykazano, że zwiększenie generacji trombiny wyrażane jej endogennym potencjałem, a nie osoczowym stężeniem F1.2 wiąże się z ryzykiem ŻChZZ [212]. Warto zwrócić uwagę, że w aktualnym badaniu stężenia F1.2 pozostawały w dolnych granicach wartości prawidłowych, a ich niewielkie zwiększenie osiągnęło znamienność statystyczną najpewniej w związku z małą liczebnością grupy.

7.4. Ograniczenia badania

Zdecydowanie najważniejszym ograniczeniem tego badania była mała liczebność badanej populacji. Zwiększenie liczebności pozwoliłoby uzyskać lepszą dyskryminację między grupami oraz odnaleźć nowe korelacje między ocenianymi parametrami. Wobec niejednoznacznych i niespójnych korelacji między parametrami fibrynowymi, a innymi zmiennymi przed i po leczeniu statyną należy założyć istnienie pewnego czynnika zakłócającego (być może związanego z lipidami), którego siła oddziaływania zmniejszała się po 3 dniach przyjmowania atorwastatyny. Należy pamiętać, że analiza korelacji przy takiej liczebności jest obciążona dużym błędem typu II. Liczebność badanych grup była jednakże wystarczająca, aby stwierdzić wyjściowo wyraźne różnice między grupą kontrolną a pacjentami z ŻChZZ pod względem budowy i funkcji skrzepu fibrynowego, co potwierdza, że różnice między grupami są niewątpliwie duże.

Badanie było prowadzone metodą próby otwartej bez stosowania placebo, jednak nie wystąpiły inne niż omawiane powyżej zmiany czynników warunkujących strukturę i funkcję skrzepu fibrynowego. Należy więc założyć, że obserwowane zmiany parametrów fibrynowych zależały jedynie od zastosowanego leku.

Szczególnie istotne mogło być przebadanie większej grupy z ŻChZZ, aby stwierdzić czy korzystne zmiany struktury i funkcji skrzepu pod wpływem inhibitorów reduktazy HMG-CoA są niezależne od CRP. Być może należało by stosować większą dawkę atorwastatyny lub inną statynę (np. rozuwastatynę) przez dłuższy czas w takiej grupie.

Ważnym ograniczeniem niniejszej pracy jest brak oceny zmiany generacji trombiny pod wpływem atorwastatyny metodą automatycznego trombogramu, który coraz częściej uważany jest za lepszy marker potencjału krwi do generowania trombiny niż F1.2 mówiący o ilości powstałego enzymu [213]. Być może zastosowanie właśnie tego testu pozwoliłoby lepiej zbadać wpływ 3-dniowego stosowania atorwastatyny na generację trombiny oraz wykazać ewentualne korelacje z obserwowaną poprawą struktury i funkcji skrzepu. Należy także pamiętać, że wykonane w aktualnej pracy analizy osocza *in vitro* nie uwzględniają wpływu elementów morfotycznych krwi na strukturę i funkcję skrzepu, a one mogą modulować przebieg fibrynolizy [43]. Nie potwierdzano wreszcie efektów działania atorwastatyny na architekturę skrzepu fibrynowego na pomocą innej metodyki – np. z wykorzystaniem SEM. Pomiary grubości włókna fibrynowego czy wielkości porów w skrzepie wykonane za pomocą mikroskopii elektronowej zwykle dobrze korelują z wynikami testów opartych na przepuszczalności lub przebiegu krzywej turbidymetrycznej. Warto jednakże przypomnieć, że

w SEM analizuje się skrzepy przetworzone (odwodnione i utrwalone), a więc uzyskane wyniki nie jest łatwo ekstrapolować na warunki występujące *in vivo*. Przykładem takich rozbieżności jest praca Sjølanda i wsp., w której, analizując obrazy skrzepów uzyskane w SEM, nie potwierdzono wykazanych wcześniej w turbidymetrii wyraźnych różnic w grubości włókna fibryny między pacjentami z niewydolnością nerek a grupą kontrolną [126]. Być może więcej informacji dostarczyłoby obrazowanie skrzepów fizjologicznie uwodnionych, na co pozwala mikroskopia konfokalna [214].

7.5. Podsumowanie

Wyniki niniejszego badania rzucają nowe światło na działanie atorwastatyny u pacjentów po epizodzie ŻChZZ i u osób bez tej choroby. Jest to pierwsze badanie, w którym analizowano wpływ atorwastatyny na strukturę i funkcję skrzepu fibrynowego pacjentów z ŻChZZ. Po zastosowaniu atorwastatyny wykazano - niezależnie od stężenia CRP czy zmniejszenia stężenia cholesterolu lub innych czynników oddziałujących na endogenną fibrylizę - korzystny wpływ na strukturę i funkcje skrzepu szczególnie widoczny u pacjentów z ŻChZZ, u których skrzepy fibrynowe powstawały wolniej, były zbudowane z cieńszych włókien, miały większą średnicę porów oraz były bardziej podatne na lizę.

Wyniki badania przynoszą wnioski o potencjalnym znaczeniu praktycznym. Korzystna modulacja struktury i funkcji skrzepu fibrynowego u pacjentów z ŻChZZ stanowi dowód na nowy mechanizm przeciwwzkrzepowego działania atorwastatyny i może tłumaczyć zmniejszenie incydentów ŻChZZ u osób leczonych inhibitorami reduktazy HMG-CoA. Być może stosowanie statyn w prewencji wtórnej ŻChZZ przyczyni się do zmniejszenia częstości nawrotów tej choroby, wtedy gdy zaprzestaje się wtórnej profilaktyki za pomocą antywitamin K. Konieczne są jednak dalsze badania na dużych grupach chorych, aby ocenić którzy pacjenci mogą odnieść największą korzyść z tego dodatkowego działania statyn. Również mechanizmy molekularne tych efektów wymagają badań z wykorzystaniem modeli zwierzęcych i oczyszczonego fibrynogeny. Wobec ogromnej popularności statyn we współczesnej profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych na podłożu miażdżycy, wyjaśnienie przeciwwzkrzepowych działań statyn i ich odpowiedzialne wykorzystanie może mieć duży wpływ na chorobowość w skali nawet zdrowia publicznego.

8. Wnioski

- 1) Przebyty epizod ŻChZZ predysponuje do powstawania skrzepów o małej średnicy porów, grubych włóknach i zmniejszonej podatności na lizę w porównaniu do osób bez ŻChZZ.
- 2) Obecność rezydualnej skrzepliny w żyłach głębokich kończyn dolnych po przebytych epizodzie ŻChZZ predysponuje do szybszego tworzenia skrzepów o grubszych włóknach, mniejszej przepuszczalności i bardziej opornych na lizę w porównaniu do pacjentów z ŻChZZ bez skrzepliny rezydualnej.
- 3) Zastosowanie atorwastatyny w dawce 40 mg dziennie przez 3 dni prowadzi do zwiększenia efektywności lizy skrzepu fibrynowego u osób bez ŻChZZ i z małym ryzykiem sercowo–naczyniowym.
- 4) Poprawa struktury i funkcji skrzepu fibrynowego wskutek stosowania atorwastatyny w dawce 40 mg dziennie przez 3 dni u pacjentów z ŻChZZ polega na zwiększeniu przepuszczalności i podatności na lizę.
- 5) Działanie atorwastatyny na parametry fibrynowe jest niezależne od zmian stężenia cholesterolu lub nasilenia zapalenia.

9. Streszczenie

Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ), obejmująca zakrzepicę żył głębokich i/lub zatorowość płucną, rozwija się u 1-3 osób na 1000 dorosłych. Patogeneza ŻChZZ jest złożona i nie w pełni poznana. Ostatnio wykazano, że ŻChZZ charakteryzuje się zmienionymi właściwościami sieci fibrynowej, powstającej wskutek konwersji fibrynogenu do fibryny w końcowym etapie aktywacji krzepnięcia. Skrzepy fibrynowe utworzone z osocza chorych na ŻChZZ mają mniejszą przepuszczalność i podatność na lizę w porównaniu do osób zdrowych. Inhibitory reduktazy 3-hydroksy 3-metyloglutarylokoenzymu A (statyny) wykazują działanie przeciwwakrzepowe niezależne od zmniejszania stężenia cholesterolu, w tym korzystne zmiany struktury i funkcji skrzepu fibrynowego udowodnione u osób z małym ryzykiem sercowo-naczyniowym lub z chorobą wieńcową. Wykazano, że rozuwastatyna zmniejsza ryzyko rozwoju ŻChZZ już w czasie dwuletniej obserwacji. Nie wiadomo jednak czy poprawa czynności fibryny pod wpływem statyn występuje także w pacjentów z ŻChZZ.

Celem pracy było zbadanie oddziaływania atorwastatyny na strukturę i funkcję skrzepu fibrynowego u pacjentów po przebytych epizodzie ŻChZZ oraz w grupie kontrolnej bez ŻChZZ dopasowanej pod względem czynników ryzyka sercowo-naczyniowego.

Do badania interwencyjnego prowadzonego metodą próby otwartej zakwalifikowano 25 osób bez ŻChZZ (grupa kontrolna) i 28 pacjentów po przebytej ŻChZZ. Kryteriami włączenia ochotników było małe ryzyko sercowo-naczyniowe (SCORE <5%), a dla pacjentów z ŻChZZ potwierdzona badaniami obrazowymi zakrzepica żylna w ciągu ostatnich 30 miesięcy i niestosowanie antykoagulacji >1 miesiąca przed włączeniem do badania. Z grupy kontrolnej wykluczono osoby po epizodzie zakrzepicy żylniej lub tętniczej, a w grupie pacjentów z ŻChZZ osoby z zakrzepicą tętniczą w wywiadzie. Wspólnymi dla obu grup kryteriami wykluczenia były dławica piersiowa, ostra zakrzepica, cukrzyca, skaza krwotoczna, choroby autoimmunologiczne, aktywny stan zapalny, nadczynność lub niedoczynność tarczycy, stosowanie leków (poza lekami hipotensyjnymi) oraz ciężkie choroby współistniejące.

Osoby włączone do badania otrzymywały atorwastatynę (Sortis, Pfizer) przez 3 kolejne dni w dawce 40 mg dziennie. Krew pobierano na czczo przed pierwszą dawką leku i po 3 dniach zażywania atorwastatyny.

Uczestnikom badania oznaczano w surowicy krwi lipidogram, stężenie białka C-reaktywnego (CRP) oraz podstawowe parametry biochemiczne, a w osoczu stężenie fibrynogenu, dimeru

D, fragmentów F1+2 protrombiny (F1.2), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), lipoproteiny (a) [Lp(a)] i homocysteiny całkowitej (tHcy). Czynność i strukturę skrzepu fibrynowego oceniano za pomocą wskaźnika przepuszczalności (K_s), turbidymetrii powstawania fibryny za pomocą *lag phase* oraz maksymalnej absorbancji (Δ Abs), a także parametrów oceniających sprawność lizy skrzepu fibrynowego w obecności rekombinowanego t-PA przy użyciu egzogennej trombiny ($t_{50\%}$), bez trombiny (CLT), oraz w modelu degradacji skrzepu mierząc stężenie uwalnianego dimeru D [maksymalne stężenie ($D-D_{max}$) i szybkość narastania stężenia ($D-D_{rate}$)]. U pacjentów z ŻChZZ oceniano występowanie trombofilii oraz lokalizację zakrzepicy i ewentualną rezydualną skrzeplinę w zajęтым naczyniu.

Dwie grupy nie różniły się pod względem demograficznym, częstości występowania nadciśnienia tętniczego, przyjmowanych leków, poza częstszym występowaniem nadwagi u pacjentów z ŻChZZ. Wyjściowo nie było różnic w wynikach podstawowych badań laboratoryjnych między grupami, poza nieznacznie większym stężeniem CRP (1,66 [przedział międzykwartyłowy 0,74-2,22] mg/l vs 0,84 [0,54-1,12] mg/l, $p=0,03$), glukozy ($5,66 \pm 0,36$ mmol/l vs $5,44 \pm 0,36$ mmol/l, $p=0,03$) oraz t-PA (14,05 [11,05-17,35] ng/ml vs 10,80 [10,10-13,70] ng/ml, $p=0,015$) u pacjentów z ŻChZZ.

Wyniki oznaczeń parametrów fibrynowych przez zastosowaniem atorwastatyny istotnie różniły się w grupie kontrolnej i pacjentów z ŻChZZ. U pacjentów z ŻChZZ stwierdzono szybsze powstawanie protofibryli (o 9%, $p<0,0001$), tworzenie grubszych (o 14,2%, $p<0,0001$) włókien fibrynowych, a skrzepy były o 27,3% mniej przepuszczalne ($p<0,0001$) i o 25% mniej podane na lizę ($p<0,0001$) niż w grupie kontrolnej. Obecność rezydualnej skrzepliny w żyłach głębokich kończyn dolnych ($n=9$) związana była z przyspieszeniem powstawania protofibryli (*lag phase* $41,2 \pm 2,5$ s vs $44,5 \pm 2,8$ s, $p=0,005$) oraz tworzeniem skrzepów o grubszych włóknach (Δ Abs $0,9 \pm 0,04$ vs $0,8 \pm 0,06$, $p=0,005$), mniejszej przepuszczalności (K_s $6,0 \pm 0,9 \cdot 10^{-9}$ cm² vs $7,2 \pm 1,4 \cdot 10^{-9}$ cm², $p=0,03$) i bardziej opornych na lizę ($t_{50\%}$ 10,6 [9,5 – 11,3] min vs 9,9 [7,5 – 10,3] min, $p=0,03$).

W grupie kontrolnej po podaniu atorwastatyny zmniejszyło się stężenie cholesterolu całkowitego (TC), cholesterolu LDL (LDL-C) i triglicerydów (wszystkie $p<0,05$), a CRP nie uległo zmianie. Zaobserwowano skrócenie CLT o 11% ($p=0,003$), a pozostałe parametry fibrynowe pozostały niezmiennione.

U pacjentów z ŻChZZ po zastosowaniu atorwastatyny stwierdzono zmniejszenie TC ($p<0,0001$), LDL-C ($p<0,0001$) i brak zmiany poziomu CRP, ale także redukcję stężenia tHcy (o 31,6%, $p=0,006$), PAI-1 (o 19,4%, $p=0,009$) i Lp(a) (o 7,2%, $p=0,0006$). Analizując zmiany

właściwości fibryny po atorwastatinie u pacjentów z ŻChZZ stwierdzono zwiększenie K_s (o 23,2%, $p < 0,0001$), *lag phase* (o 4,5%, $p = 0,04$) oraz $D-D_{rate}$ (o 10,3%, $p < 0,0001$). Zmniejszyły się natomiast ΔAbs (o 4,5%, $p = 0,002$), $t_{50\%}$ (o 19,9%, $p < 0,0001$) oraz CLT (o 13,7%, $p = 0,0004$). U pacjentów z obecną rezydualną skrzepliną wystąpiła większa redukcja ΔAbs pod wpływem atorwastatyny niż u pacjentów bez skrzepliny (odpowiednio $0,10 \pm 0,07$ vs $0,01 \pm 0,07$, $p = 0,005$), natomiast skrócenie CLT obserwowano tylko w podgrupie pacjentów bez skrzepliny rezydualnej. W przypadku zakrzepicy samoistnej ($n=10$) po atorwastatinie wystąpił większy (o ok. 2,4 razy) przyrost $D-D_{rate}$ niż w zakrzepicy z obecnością przejściowych czynników ryzyka ($0,012 \text{ mg/l/min} \pm 0,01$ vs $0,005 \text{ mg/l/min} \pm 0,006$, $p = 0,044$). Po atorwastatinie u pacjentów z zakrzepicą proksymalną ($n=17$), w przeciwieństwie do dystalnej, wystąpiło zmniejszenie absorbancji ($p = 0,01$). Trombofilia stwierdzona u 14 pacjentów nie wpływała na parametry fibrynowe oceniane przed i po statynie. Zmiany właściwości sieci fibrynowej u pacjentów z ŻChZZ nie zależały od zmian stężenia cholesterolu, tHcy, t-PA, PAI-1, F1.2 ani Lp(a).

Podsumowując, przedstawione wyniki potwierdzają, iż u pacjentów po przebytej ŻChZZ skrzepki fibrynowe mają mniejszą przepuszczalność, są bardziej zbite i mniej podatne na lizę niż u osób bez ŻChZZ. Korzystne zmiany parametrów struktury i funkcji skrzepu fibrynowego w wyniku stosowania atorwastatyny 40 mg dziennie przez 3 dni jest znacznie silniej wyrażone u pacjentów z ŻChZZ niż u osób bez ŻChZZ, u których jedynie liza fibryny jest przyspieszona po statynie. Wywołana atorwastatiną poprawa przepuszczalności skrzepu i zwiększenie podatności na lizę nie zależy od zmian lipidogramu. Obecność rezydualnej skrzepliny ma wpływ na parametry fibrynowe i ich zmianę po statynie. Wyniki badania wskazują, że nawet krótkie 3-dniowe podawanie statyny korzystnie zmienia parametry sieci fibrynowej, co może stanowić dodatkowy mechanizm przeciwwakrzepowego działania tej klasy leków u pacjentów z ŻChZZ.

10. Summary

Venous thromboembolism (VTE), comprising deep vein thrombosis and pulmonary embolism, affects 1-3 per 1000 persons per year. The pathogenesis of VTE is multifactorial and not fully understood. Recently VTE patients have been shown to display unfavorably altered fibrin clots as compared to healthy individuals.

Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (statins) not only reduce cholesterol biosynthesis, but also attenuate blood coagulation including favorable alteration of fibrin clots properties, as seen in coronary artery disease patients and in low cardiovascular risk subjects. Rosuvastatin has been reported to reduce the risk of VTE within a 2-year period. It is unknown whether statin-related alteration of fibrin properties occurs in VTE patients.

The aim of the study was to evaluate atorvastatin induced alterations of fibrin clots in VTE patients and in disease control group matched for cardiovascular risk factors.

25 volunteers without VTE (control group) and 28 VTE patients were enrolled to the open-label intervention study. Inclusion criteria for control group were low cardiovascular risk (SCORE <5%) and - for VTE patients - documented venous thrombosis within previous 30 months with over 1 month anticoagulation withdrawal prior to the enrollment. Exclusion criteria from control group was a history of any thrombosis, and for VTE patients a history of arterial thrombosis. Angina, acute thrombosis, diabetes, haemorrhagic diathesis, autoimmune diseases, hypo- or hyperthyroidism, acute inflammation, medication usage (beside antihypertensive drugs) and severe comorbidities were the exclusion criteria for both groups. Study participants received atorvastatin (Sortis, Pfizer) 40 mg/day for 3 days. Fasting blood was collected before intake of the first dose and after 3 days of atorvastatin administration. Lipid profiles, high-sensitivity C-reactive protein (CRP), other serum routine parameters, fibrinogen concentrations, D-dimers, prothrombin fragment 1.2 (F1.2), tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), lipoprotein(a) [Lp(a)] and total homocysteine (tHcy) were determined.

Plasma fibrin clot properties were expressed as permeation coefficient (K_s), turbidity measurements of fibrin polymerization [lag phase, maximum absorbance (Δ Abs)], plasma clot lysis assays in presence of recombinant tissue-type plasminogen activator (rtPA) with ($t_{50\%}$) or without (CLT) exogenous thrombin and D-dimer levels [maximum concentration (D-D max) and rate of increase (D-D rate)] in a fibrin clot perfusion model. The location of

venous thrombosis in VTE patients was analyzed. Screening for thrombophilia and residual venous thrombosis (RVT) detection were also performed.

Two groups did not differ with respect to demographic data and arterial hypertension, however overweight was more common in VTE patients. There were no differences in laboratory data between the groups at the baseline, except for higher CRP (1.66 [interquartile range 0.74-2.22] mg/l vs 0.84 [0.54-1.12] mg/l, $p= 0.03$), glucose (5.66 ± 0.36 mM vs. 5.44 ± 0.36 mM, $p= 0.03$) and t-PA levels (14.05 [11.05-17.35] ng/ml vs 10.80 [10.10-13.70] ng/ml, $p= 0.015$) in VTE patients.

Plasma fibrin clot variables prior to atorvastatin administration significantly differed between two groups. VTE patients displayed 9% faster protofibril formation and 14.2% thicker fibrin fiber formation, together with 27.4% lower clot permeability and 25% lysability compared to control group (p for all <0.0001).

The presence of RVT in the lower extremity deep veins ($n=9$) led to faster protofibril (lag phase 41.2 ± 2.5 s vs 44.5 ± 2.8 s, $p= 0.005$) and thicker fibrin fiber (Δ Abs 0.9 ± 0.04 vs 0.8 ± 0.06 , $p= 0.005$) formation together with lower clot permeability (K_s $6.0 \pm 0.9 \cdot 10^{-9}$ cm² vs $7.2 \pm 1.4 \cdot 10^{-9}$ cm², $p= 0.03$) and lysability ($t_{50\%}$ 10.6 [9.5 – 11.3] min vs 9.9 [7.5 – 10.3] min, $p= 0.03$).

In control group atorvastatin decreased total (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and triglyceride levels (p for all <0.05), while CRP level remained unchanged. A reduction in CLT (by 11%, $p= 0.003$) was noted; other fibrin parameters were unaltered.

Atorvastatin in VTE patients resulted in TC, LDL-C reduction (p for all < 0.0001), no change in CRP concentration and a decrease in tHcy (by 31.6%, $p= 0.006$), PAI-1 (by 19.4%, $p= 0.009$), Lp(a) (by 7.2%, $p= 0.0006$) levels. VTE patients following atorvastatin administration had an increase in K_s (by 23.2%, $p< 0.0001$), lag phase (by 4.5%, $p= 0.04$), D-D_{rate} (by 10.3%, $p< 0.0001$) and decrease in Δ Abs (by 4.5%, $p= 0.002$), $t_{50\%}$ (by 19.9%, $p< 0.0001$) and CLT (by 13.7%, $p= 0.0004$). Atorvastatin-induced reduction of Δ Abs was more pronounced in patients with RVT as compared to patients without RVT (0.10 ± 0.07 vs 0.01 ± 0.07 , $p= 0.005$), while CLT reduction was seen only in patients without RVT. D-D_{rate} increase following atorvastatin was higher in unprovoked ($n=10$) than provoked VTE (0.012 mg/l/min ± 0.01 vs 0.005 mg/l/min ± 0.006 , $p= 0.044$, respectively). Patients with proximal venous thrombosis ($n=17$), contrary to distal thrombosis patients, displayed Δ Abs reduction following atorvastatin administration ($p= 0,01$). Thrombophilia ($n=14$) did not alter fibrin clot properties either before or after statin administration. The improvement of fibrin clot

structure/function in VTE patients after atorvastatin was unrelated to TC or tHcy, t-PA, PAI-1, F1.2, Lp(a) changes.

In conclusion, the present study confirms that fibrin clots in VTE patients are less permeable, more compact and resistant to lysis compared with controls without VTE. A 3-day administration of atorvastatin (40 mg/d) alters favorably fibrin clot properties, however more explicitly in VTE patients than in controls, in whom only lysis is accelerated. Atorvastatin-induced improvement in fibrin clot permeability and susceptibility to lysis is independent to any changes in lipid profile. The presence of RVT modulates fibrin clot properties and its alteration following statin use. The current study demonstrates that even a 3-day course of atorvastatin alters favorably fibrin clot structure/function, which might reflect additional antithrombotic properties of statins in VTE patients.

Piśmiennictwo:

1. Cushman M, Tsai AW, White RH, et al. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Am J Med* 2004;117:19-25
2. Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:370-372
3. Kearon C. Natural history of venous thromboembolism. *Circulation* 2003;107:122-30
4. Kearon C, Julian JA, Newman TE, Ginsberg JS. Noninvasive diagnosis of deep venous thrombosis. McMaster Diagnostic Imaging Practice Guidelines Initiative. *Ann Intern Med* 1998;128:663-677
5. Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, et al. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2008;29:2276-2315
6. Zawilska K, Jaeschke R, Tomkowski W, et al. [Polish guidelines for the prevention and treatment of venous thromboembolism: 2009 update]. *Pol Arch Med Wewn* 2009;119 Suppl 1:1-69
7. Iorio A, Kearon C, Filippucci E, et al. Risk of recurrence after a first episode of symptomatic venous thromboembolism provoked by a transient risk factor: a systematic review. *Arch Intern Med* 2010;170:1710-1716
8. Prandoni P, Lensing AW, Cogo A, et al. The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1996;125:1-7
9. Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 2009;30:2493-2537

10. Anderson FA, Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation* 2003;107:19-16
11. Rees DC, Chapman NH, Webster MT, et al. Born to clot: the European burden. *Br J Haematol* 1999;105:564-566
12. Heit JA. Venous thromboembolism: disease burden, outcomes and risk factors. *J Thromb Haemost* 2005;3:1611-1617
13. Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, et al. Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:511-518
14. Owens AP, Mackman N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost* 2010;104:432-439
15. Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost* 2007;5:1097-1105
16. Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:456-461
17. Osterud B. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res* 2010;125 Suppl 1:S31-34
18. 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;197:1585-1598
19. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2594-2604
20. 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;267:15447-15454
21. Chen VM, Ahamed J, Versteeg HH, et al. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry* 2006;45:12020-12028

22. Cho J, Furie BC, Coughlin SR, Furie B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1123-1131
23. Mann K, Orfeo T, Butenas S, Undas A, Brummel-Ziedins K. Blood coagulation dynamics in haemostasis. *Hamostaseologie* 2009;29:7-16
24. Rao LV, Williams T, Rapaport SI. Studies of the activation of factor VII bound to tissue factor. *Blood* 1996;87:3738-3748
25. Rao LV, Rapaport SI, Bajaj SP. Activation of human factor VII in the initiation of tissue factor-dependent coagulation. *Blood* 1986;68:685-691
26. Ovanesov MV, Ananyeva NM, Panteleev MA, Ataulakhanov FI, Saenko EL. Initiation and propagation of coagulation from tissue factor-bearing cell monolayers to plasma: initiator cells do not regulate spatial growth rate. *J Thromb Haemost* 2005;3:321-331
27. Neuenschwander PF, Jesty J. Thrombin-activated and factor Xa-activated human factor VIII: differences in cofactor activity and decay rate. *Arch Biochem Biophys* 1992;296:426-434
28. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001;86:66-74
29. Schmaier AH. Contact activation: a revision. *Thromb Haemost* 1997;78:101-107
30. Esmon CT, Ding W, Yasuhiro K, et al. The protein C pathway: new insights. *Thromb Haemost* 1997;78:70-74
31. van 't Veer C, Butenas S, Golden NJ, Mann KG. Regulation of prothrombinase activity by protein S. *Thromb Haemost* 1999;82:80-87
32. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002;296:1880-1882

33. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:11199-11203
34. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005;105:3178-3184
35. Kamath S, Lip GY. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM* 2003;96:711-729
36. Kollman JM, Pandi L, Sawaya MR, Riley M, Doolittle RF. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry* 2009;48:3877-3886
37. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005;3:1894-1904
38. Olexa SA, Budzynski AZ. Evidence for four different polymerization sites involved in human fibrin formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1374-1378
39. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev* 2007;21:131-142
40. Hoffman M. Alterations of fibrinogen structure in human disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6:206-211
41. Spraggon G, Everse SJ, Doolittle RF. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature* 1997;389:455-462
42. Bowley SR, Merenbloom BK, Okumura N, et al. Polymerization-defective fibrinogen variant gammaD364A binds knob "A" peptide mimic. *Biochemistry* 2008;47:8607-8613
43. Weisel JW, Litvinov RI. The biochemical and physical process of fibrinolysis and effects of clot structure and stability on the lysis rate. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6:161-180

44. Weisel JW. Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:116-124
45. Moen JL, Gorkun OV, Weisel JW, Lord ST. Recombinant BbetaArg14His fibrinogen implies participation of N-terminus of Bbeta chain in desA fibrin polymerization. *Blood* 2003;102:2466-2471
46. Collet JP, Moen JL, Veklich YI, et al. The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood* 2005;106:3824-3830
47. Lord ST. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:494-499
48. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 1999;94:271-305
49. Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 2002;100:743-754
50. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005;129:307-321
51. Fraser SR, Booth NA, Mutch NJ. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through {alpha}2-antiplasmin cross-linking. *Blood* 2011;117:6371-6374
52. Collet JP, Soria J, Mirshahi M, et al. Dusart syndrome: a new concept of the relationship between fibrin clot architecture and fibrin clot degradability: hypofibrinolysis related to an abnormal clot structure. *Blood* 1993;82:2462-2469
53. Campbell RA, Overmyer KA, Selzman CH, Sheridan BC, Wolberg AS. Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability. *Blood* 2009;114:4886-4896
54. Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, et al. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. *Blood* 2011;117:661-668

55. Carr ME. Fibrin formed in plasma is composed of fibers more massive than those formed from purified fibrinogen. *Thromb Haemost* 1988;59:535-539
56. Nair CH, Azhar A, Dhall DP. Studies on fibrin network structure in human plasma. Part One: Methods for clinical application. *Thromb Res* 1991;64:455-476
57. Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, et al. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989;997:96-110
58. Chernysh IN, Weisel JW. Dynamic imaging of fibrin network formation correlated with other measures of polymerization. *Blood* 2008;111:4854-4861
59. Collet JP, Park D, Lesty C, et al. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1354-1361
60. Lisman T, Leebeek FW, Mosnier LO, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis. *Gastroenterology* 2001;121:131-139
61. Wolberg AS, Aleman MM. Influence of cellular and plasma procoagulant activity on the fibrin network. *Thromb Res* 2010;125 Suppl 1:S35-37
62. Dunn EJ, Ariëns RA, de Lange M, et al. Genetics of fibrin clot structure: a twin study. *Blood* 2004;103:1735-1740
63. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ, Investigators E. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2783-2789
64. Standeven KF, Uitte de Willige S, Carter AM, Grant PJ. Heritability of clot formation. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:458-467
65. Williams FM, Carter AM, Kato B, et al. Identification of quantitative trait loci for fibrin clot phenotypes: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:600-605

66. Kotlín R, Reicheltová Z, Suttnar J, et al. Two novel fibrinogen variants in the C-terminus of the B β -chain: fibrinogen Rokycany and fibrinogen Znojmo. *J Thromb Thrombolysis* 2010;30:311-318
67. Undas A, Zdziarska J, Iwaniec T, et al. Fibrinogen Krakow: a novel hypo/dysfibrinogenemia mutation in fibrinogen gamma chain (Asn325Ile) affecting fibrin clot structure and function. *Thromb Haemost* 2009;101:975-976
68. Jaleel A, Halvatsiotis P, Williamson B, et al. Identification of Amadori-modified plasma proteins in type 2 diabetes and the effect of short-term intensive insulin treatment. *Diabetes Care* 2005;28:645-652
69. Dunn EJ, Philippou H, Ariëns RA, Grant PJ. Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006;49:1071-1080
70. Ariëns RA, Philippou H, Nagaswami C, et al. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood* 2000;96:988-995
71. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Elevated prothrombin results in clots with an altered fiber structure: a possible mechanism of the increased thrombotic risk. *Blood* 2003;101:3008-3013
72. Lim BC, Ariëns RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet* 2003;361:1424-1431
73. Maghzal GJ, Brennan SO, George PM. Fibrinogen B beta polymorphisms do not directly contribute to an altered in vitro clot structure in humans. *Thromb Haemost* 2003;90:1021-1028
74. Jörneskog G, Egberg N, Fagrell B, et al. Altered properties of the fibrin gel structure in patients with IDDM. *Diabetologia* 1996;39:1519-1523
75. Alzahrani SH, Ajjan RA. Coagulation and fibrinolysis in diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 2010;7:260-273

76. Dunn EJ, Ariëns RA, Grant PJ. The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function. *Diabetologia* 2005;48:1198-1206
77. Pieters M, Covic N, Loots dT, et al. The effect of glycaemic control on fibrin network structure of type 2 diabetic subjects. *Thromb Haemost* 2006;96:623-629
78. Jörneskog G, Hansson LO, Wallen NH, Yngen M, Blombäck M. Increased plasma fibrin gel porosity in patients with Type I diabetes during continuous subcutaneous insulin infusion. *J Thromb Haemost* 2003;1:1195-1201
79. Barua RS, Sy F, Srikanth S, et al. Effects of cigarette smoke exposure on clot dynamics and fibrin structure: an ex vivo investigation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:75-79
80. Barua RS, Sy F, Srikanth S, et al. Acute cigarette smoke exposure reduces clot lysis--association between altered fibrin architecture and the response to t-PA. *Thromb Res* 2010;126:426-430
81. Undas A, Topór-Madry R, Tracz W, Pasowicz M. Effect of cigarette smoking on plasma fibrin clot permeability and susceptibility to lysis. *Thromb Haemost* 2009;102:1289-1291
82. Cayla G, Sié P, Silvain J, et al. Short-term effects of the smoke-free legislation on haemostasis and systemic inflammation due to second hand smoke exposure. The AERER study. *Thromb Haemost* 2011;105:1024-1031
83. Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M. Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost* 2003;1:300-306
84. Lauricella AM, Quintana IL, Kordich LC. Effects of homocysteine thiol group on fibrin networks: another possible mechanism of harm. *Thromb Res* 2002;107:75-79
85. Jakubowski H. The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1704-1716

86. Sauls DL, Lockhart E, Warren ME, et al. Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia. *Biochemistry* 2006;45:2480-2487
87. Undas A, Brozek J, Jankowski M, et al. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1397-1404
88. Feric NT, Boffa MB, Johnston SM, Koschinsky ML. Apolipoprotein(a) inhibits the conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen: a novel mechanism for lipoprotein(a)-mediated inhibition of plasminogen activation. *J Thromb Haemost* 2008;6:2113-2120
89. Undas A, Stepien E, Tracz W, Szczeklik A. Lipoprotein(a) as a modifier of fibrin clot permeability and susceptibility to lysis. *J Thromb Haemost* 2006;4:973-975
90. Tsurupa G, Ho-Tin-Noé B, Anglés-Cano E, Medved L. Identification and characterization of novel lysine-independent apolipoprotein(a)-binding sites in fibrin(ogen) alphaC-domains. *J Biol Chem* 2003;278:37154-37159
91. Wolberg AS, Allen GA, Monroe DM, et al. High dose factor VIIa improves clot structure and stability in a model of haemophilia B. *Br J Haematol* 2005;131:645-655
92. Campbell RA, Overmyer KA, Bagnell CR, Wolberg AS. Cellular procoagulant activity dictates clot structure and stability as a function of distance from the cell surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2247-2254
93. Olinescu RM, Kummerow FA. Fibrinogen is an efficient antioxidant. *J Nutr Biochem* 2001;12:162-169
94. Upchurch Jr, 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
95. 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;196:551-557

96. Collet JP, Montalescot G, Lesty C, et al. Disaggregation of in vitro preformed platelet-rich clots by abciximab increases fibrin exposure and promotes fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:142-148
97. Jerome WG, Handt S, Hantgan RR. Endothelial cells organize fibrin clots into structures that are more resistant to lysis. *Microsc Microanal* 2005;11:268-277
98. Amelot AA, Tagzirt M, Ducouret G, Kuen RL, Le Bonniec BF. Platelet factor 4 (CXCL4) seals blood clots by altering the structure of fibrin. *J Biol Chem* 2007;282:710-720
99. Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood* 2008;112:2810-2816
100. Mutch NJ, Engel R, Uitte de Willige S, Philippou H, Ariëns RA. Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood* 2010;115:3980-3988
101. Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood* 2010;116:4353-4359
102. Williams S, Fatah K, Hjemdahl P, Blombäck M. Better increase in fibrin gel porosity by low dose than intermediate dose acetylsalicylic acid. *Eur Heart J* 1998;19:1666-1672
103. Antovic A, Perneby C, Ekman GJ, et al. Marked increase of fibrin gel permeability with very low dose ASA treatment. *Thromb Res* 2005;116:509-517
104. Fatah K, Beving H, Albåge A, Ivert T, Blombäck M. Acetylsalicylic acid may protect the patient by increasing fibrin gel porosity. Is withdrawing of treatment harmful to the patient? *Eur Heart J* 1996;17:1362-1366
105. Williams S, Fatah K, Ivert T, Blombäck M. The effect of acetylsalicylic acid on fibrin gel lysis by tissue plasminogen activator. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:718-725
106. Bjornsson TD, Schneider DE, Berger H. Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis. Fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;250:154-161

107. Undas A, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Blood coagulation at the site of microvascular injury: effects of low-dose aspirin. *Blood* 2001;98:2423-2431
108. Undas A, Sydor WJ, Brummel K, et al. Aspirin alters the cardioprotective effects of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Circulation* 2003;107:17-20
109. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood* 2007;109:2285-2292
110. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Statins and blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:287-294
111. Undas A, Celinska-Löwenhoff M, Löwenhoff T, Szczeklik A. Statins, fenofibrate, and quinapril increase clot permeability and enhance fibrinolysis in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 2006;4:1029-1036
112. Fanghänel G, Silva U, Sanchez-Reyes L, et al. Effects of metformin on fibrinogen levels in obese patients with type 2 diabetes. *Rev Invest Clin* 1998;50:389-394
113. Curnow JL, Morel-Kopp MC, Roddie C, Aboud M, Ward CM. Reduced fibrinolysis and increased fibrin generation can be detected in hypercoagulable patients using the overall hemostatic potential assay. *J Thromb Haemost* 2007;5:528-534
114. Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2005;105:1102-1105
115. Meltzer ME, Lisman T, de Groot PG, et al. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood* 2010;116:113-121
116. Meltzer ME, Lisman T, Doggen CJ, de Groot PG, Rosendaal FR. Synergistic effects of hypofibrinolysis and genetic and acquired risk factors on the risk of a first venous thrombosis. *PLoS Med* 2008;5:e97
117. Hoekstra J, Guimarães AH, Leebeek FW, et al. Impaired fibrinolysis as a risk factor for Budd-Chiari syndrome. *Blood* 2010;115:388-395

118. Undas A, Zawilska K, Ciesla-Dul M, et al. Altered fibrin clot structure/function in patients with idiopathic venous thromboembolism and in their relatives. *Blood* 2009;114:4272-4278
119. Fatah K, Hamsten A, Blombäck B, Blombäck M. Fibrin gel network characteristics and coronary heart disease: relations to plasma fibrinogen concentration, acute phase protein, serum lipoproteins and coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1992;68:130-135
120. Fatah K, Silveira A, Tornvall P, et al. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age. *Thromb Haemost* 1996;76:535-540
121. Collet JP, Allali Y, Lesty C, et al. Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2567-2573
122. Mills JD, Ariëns RA, Mansfield MW, Grant PJ. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 2002;106:1938-1942
123. Undas A, Podolec P, Zawilska K, et al. Altered fibrin clot structure/function in patients with cryptogenic ischemic stroke. *Stroke* 2009;40:1499-1501
124. Palka I, Nessler J, Nessler B, et al. Altered fibrin clot properties in patients with chronic heart failure and sinus rhythm: a novel prothrombotic mechanism. *Heart* 2010;96:1114-1118
125. Nowakowski T, Undas A, Szczeklik A. Low fibrin clot permeability and susceptibility to fibrinolysis in patients with advanced peripheral artery occlusive disease. *Eur Heart J* 2007;28 (suppl.):P565
126. Sjøland JA, Sidelmann JJ, Brabrand M, et al. Fibrin clot structure in patients with end-stage renal disease. *Thromb Haemost* 2007;98:339-345

127. Undas A, Kolarz M, Kopeć G, Tracz W. Altered fibrin clot properties in patients on long-term haemodialysis: relation to cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2010-2015
128. Undas A, Kaczmarek P, Sladek K, et al. Fibrin clot properties are altered in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Beneficial effects of simvastatin treatment. *Thromb Haemost* 2009;102:1176-1182
129. Kwasny-Krochin B, Gluszko P, Undas A. Unfavorably altered fibrin clot properties in patients with active rheumatoid arthritis. *Thromb Res* 2010;126:e11-16
130. Werner N, Nickenig G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 2002;97:105-116
131. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005;118:843-846
132. Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 2006;98:322-334
133. van Nieuw Amerongen GP, Beckers CM, Achekar ID, et al. Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2332-2339
134. Kosmidou I, Moore JP, Weber M, Searles CD. Statin treatment and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2642-2649
135. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998;273:24266-24271
136. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-605
137. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6:1004-1010

138. Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 2001;103:113-118
139. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, et al. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 2001;59:646-654
140. Takemoto M, Node K, Nakagami H, et al. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 2001;108:1429-1437
141. Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res* 2006;98:730-742
142. Rashid M, Tawara S, Fukumoto Y, et al. Importance of Rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Circ J* 2009;73:361-370
143. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-650
144. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997;99:2416-2422
145. Cunard R, Eto Y, Muljadi JT, et al. Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* 2004;172:7530-7536
146. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, et al. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res* 2007;100:1442-1451
147. Zelvyte I, Dominaitiene R, Crisby M, Janciauskiene S. Modulation of inflammatory mediators and PPARgamma and NFkappaB expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes in vitro. *Pharmacol Res* 2002;45:147-154

148. Paumelle R, Blanquart C, Briand O, et al. Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 2006;98:361-369
149. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001;7:687-692
150. Colli S, Eligini S, Lalli M, et al. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:265-272
151. Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T, et al. Rho/Rho-kinase is involved in the synthesis of tissue factor in human monocytes. *Atherosclerosis* 2002;163:39-47
152. 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
153. 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;105:1756-1759
154. Eto M, Luscher TF. Modulation of coagulation and fibrinolytic pathways by statins. *Endothelium* 2003;10:35-41
155. Cortellaro M, Cofrancesco E, Arbustini E, et al. Atorvastatin and thrombogenicity of the carotid atherosclerotic plaque: the ATROCAP study. *Thromb Haemost* 2002;88:41-47
156. Andrié RP, Bauriedel G, Braun P, et al. Increased expression of C-reactive protein and tissue factor in acute coronary syndrome lesions: Correlation with serum C-reactive protein, angioscopic findings, and modification by statins. *Atherosclerosis* 2009;202:135-143
157. Tehrani S, Mobarrez F, Antovic A, et al. Atorvastatin has antithrombotic effects in patients with type 1 diabetes and dyslipidemia. *Thromb Res* 2010;126:e225-231

158. Morishita E, Minami S, Ishino C, et al. Atorvastatin reduces plasma levels of factor VII activity and factor VII antigen in patients with hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2002;9:72-77
159. Porreca E, Di Febbo C, Amore C, et al. Effect of lipid-lowering treatment on factor VII profile in hyperlipidemic patients. *Thromb Haemost* 2000;84:789-793
160. Sbarouni E, Melissari E, Kyriakides ZS, Kremastinos DT. Effects of simvastatin or hormone replacement therapy, or both, on fibrinogen, factor VII, and plasminogen activator inhibitor levels in postmenopausal women with proven coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2000;86:80-83
161. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Kaczor M, Musial J. New nonlipid effects of statins and their clinical relevance in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 2004;91:1065-1077
162. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA* 1998;279:1643-1650
163. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-1719
164. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Brummel-Ziedins KE, et al. 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;25:1524-1525
165. 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;94:193-199
166. 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;103:2248-2253

167. Masamura K, Oida K, Kanehara H, et al. Pitavastatin-induced thrombomodulin expression by endothelial cells acts via inhibition of small G proteins of the Rho family. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:512-517
168. Lin Z, Kumar A, SenBanerjee S, et al. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function. *Circ Res* 2005;96:e48-57
169. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003;124:26S-32S
170. Fu Q, Wang J, Boerma M, et al. Involvement of heat shock factor 1 in statin-induced transcriptional upregulation of endothelial thrombomodulin. *Circ Res* 2008;103:369-377
171. Shi J, Wang J, Zheng H, et al. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:575-585
172. Tousoulis D, Bosinakou E, Kotsopoulou M, et al. Effects of early administration of atorvastatin treatment on thrombotic process in normocholesterolemic patients with unstable angina. *Int J Cardiol* 2006;106:333-337
173. Ishibashi T, Nagata K, Ohkawara H, et al. Inhibition of Rho/Rho-kinase signaling downregulates plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in cultured human monocytes. *Biochim Biophys Acta* 2002;1590:123-130
174. Bourcier T, Libby P. HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:556-562
175. Essig M, Nguyen G, Prié D, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res* 1998;83:683-690
176. Blum A, Shamburek R. The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis. *Atherosclerosis* 2009;203:325-330

177. Undas A, Plicner D, Stepień E, Drwiła R, Sadowski J. Altered fibrin clot structure in patients with advanced coronary artery disease: a role of C-reactive protein, lipoprotein(a) and homocysteine. *J Thromb Haemost* 2007;5:1988-1990
178. Undas A, Topor-Madry R, Tracz W. Simvastatin increases clot permeability and susceptibility to lysis in patients with LDL cholesterol below 3.4 mmol/l. *Pol Arch Med Wewn* 2009;119:354-359
179. Schäfer A, Fraccarollo D, Eigenthaler M, et al. Rosuvastatin reduces platelet activation in heart failure: role of NO bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1071-1077
180. Malmström RE, Settergren M, Böhm F, Pernow J, Hjemdahl P. No effect of lipid lowering on platelet activity in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Thromb Haemost* 2009;101:157-164
181. Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, et al. Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2002;32:901-908
182. Notarbartolo A, Davì G, Averna M, et al. Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:247-251
183. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Potaczek DP, et al. Atorvastatin and quinapril inhibit blood coagulation in patients with coronary artery disease following 28 days of therapy. *J Thromb Haemost* 2006;4:2397-2404
184. Ray J, Mamdani M, Tsuyuki R, et al. Use of statins and the subsequent development of deep vein thrombosis. *Arch Intern Med* 2001;161:1405-1410
185. Yang C, Jick S, Jick H. Statins and the risk of idiopathic venous thromboembolism. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:101-105
186. Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, et al. Statin therapy, cardiovascular events, and total mortality in the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS). *Circulation* 2002;105:2962-2967

187. Lacut K, Oger E, Le Gal G, et al. Statins but not fibrates are associated with a reduced risk of venous thromboembolism: a hospital-based case-control study. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18:477-482
188. Smeeth L, Douglas I, Hall A, Hubbard R, Evans S. Effect of statins on a wide range of health outcomes: a cohort study validated by comparison with randomized trials. *Br J Clin Pharmacol* 2009;67:99-109
189. Sørensen H, Horvath-Puho E, Søgaaard K, et al. Arterial cardiovascular events, statins, low-dose aspirin and subsequent risk of venous thromboembolism: a population-based case-control study. *J Thromb Haemost* 2009;7:521-528
190. Ramcharan A, Van Stralen K, Snoep J, et al. HMG-CoA reductase inhibitors, other lipid-lowering medication, antiplatelet therapy, and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009;7:514-520
191. 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;359:2195-2207
192. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, et al. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2009;360:1851-1861
193. Głowacki R, Bald E. Fully automated method for simultaneous determination of total cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine in plasma by HPLC with UV absorbance detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:3400-3404
194. Shah GA, Nair CH, Dhall DP. Comparison of fibrin networks in plasma and fibrinogen solution. *Thromb Res* 1987;45:257-264
195. Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, et al. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989;997:96-110
196. Undas A, Wypasek E, Kapelak B, Sadowski J. Shorter preoperative fibrin clot lysis time predisposes to higher chest tube drainage in patients undergoing elective coronary artery bypass grafting surgery. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010;21:380-381

197. Colle JP, Mishal Z, Lesty C, et al. Abnormal fibrin clot architecture in nephrotic patients is related to hypofibrinolysis: influence of plasma biochemical modifications: a possible mechanism for the high thrombotic tendency? *Thromb Haemost* 1999;82:1482-1489
198. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39:175-191
199. Salonen EM, Vartio T, Hedman K, Vaheri A. Binding of fibronectin by the acute phase reactant C-reactive protein. *J Biol Chem* 1984;259:1496-1501
200. Scott EM, Ariëns RA, Grant PJ. Genetic and environmental determinants of fibrin structure and function: relevance to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1558-1566
201. Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Rosendaal FR, Lisman T. Reduced plasma fibrinolytic capacity as a potential risk factor for a first myocardial infarction in young men. *Br J Haematol* 2009;145:121-127
202. 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;116:529-536
203. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, et al. 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;94:2057-2063
204. Folsom AR, Aleksic N, Park E, et al. Prospective study of fibrinolytic factors and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:611-617
205. Jenkins GR, Seiffert D, Parmer RJ, Miles LA. Regulation of plasminogen gene expression by interleukin-6. *Blood* 1997;89:2394-2403

206. Kooistra T, Schrauwen Y, Arts J, Emeis JJ. Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release. *Int J Hematol* 1994;59:233-255
207. Bruni F, Pasqui AL, Pastorelli M, et al. Effect of atorvastatin on different fibrinolysis mechanisms in hypercholesterolemic subjects. *Int J Cardiol* 2004;95:269-274
208. Guven GS, Atalar E, Yavuz B, et al. Simvastatin treatment improves endothelial function and increases fibrinolysis in patients with hypercholesterolemia. *J Natl Med Assoc* 2006;98:627-630
209. Walter T, Szabo S, Suselbeck T, et al. Effect of atorvastatin on haemostasis, fibrinolysis and inflammation in normocholesterolaemic patients with coronary artery disease: a post hoc analysis of data from a prospective, randomized, double-blind study. *Clin Drug Investig* 2010;30:453-460
210. Jankowski P, Kawecka-Jaszcz K. Lipid-lowering drugs and homocysteine. A comparison between statins and other lipid-lowering drugs. *Atherosclerosis* 2004;172:191-194
211. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 2010;31:2844-2853
212. Tripodi A, Martinelli I, Chantarangkul V, et al. The endogenous thrombin potential and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res* 2007;121:353-359
213. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2008;6:219-226
214. Chernysh IN, Nagaswami C, Weisel JW. Visualization and identification of the structures formed during early stages of fibrin polymerization. *Blood* 2011;117:4609-4614