Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Konstanty Szułdrzyński

Nowe mechanizmy aktywacji układu krzepnięcia w ostrych zespołach wieńcowych

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Anetta Undas

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik jednostki: prof. dr hab. med. Jacek Musiał

Kraków, 2008

Przeklęty roztwór. A ma on tę własność

Że w mig roznosi się korytarzami

Żył do najdalszych zakamarków ciała,

Po czym z gwałtownym wigorem – jak kropla

Kwasu, co mleko nagle ścina w twaróg –

Klarowną krew przemienia w gęsty skrzep.

William Shakespeare *Hamlet*

tłum. St. Barańczak

SPIS TREŚCI

1. Wprowadzenie 7
1.1 Miażdżyca – przyczyna choroby niedokrwiennej serca 7
1.1.1 Ewolucja blaszki miażdżycowej 7
1.1.2 Niestabilna blaszka miażdżycowa 9
1.2 Czynnik tkankowy – mechanizm spustowy krzepnięcia w ostrych zespołach wieńcowych 10
1.2.1 Rola czynnika tkankowego 10
1.2.2 Charakterystyka czynnika tkankowego 10
1.2.3 „Ukrywanie" czynnika tkankowego 11
1.2.4 Alternatywnie przycięty czynnik tkankowy 12
1.3 Aktywacja osoczowego układu krzepnięcia: generacja trombiny 13
1.3.1 Zewnątrzpochodny i wewnątrzpochodny szlak krzepnięcia 13
1.3.2 Czynnik XI na nowo odkryty 15
1.3.3 Generacja trombiny 16
1.4 Rola płytek krwi w ostrym zespole wieńcowym 17
1.4.1 Szlak sygnałowy CD40-sCD40L 19
1.5 Działanie statyn 20
1.5.1 Molekularne podstawy plejotropowego działania statyn 21
1.5.2 Wpływ statyn na układ krzepnięcia 22
1.5.3 Znaczenie statyn w chorobie niedokrwiennej serca i ostrych zespołach wieńcowych 23
2. Założenia i cele pracy 26
3. Badani 27
3.1 Chorzy na zawał serca 27
3.1.1 Kryteria kwalifikacji 27
3.1.2 Kryteria wyłączające 27
3.2 Grupa kontrolna 28
3.2.1 Kryteria kwalifikacji 29
3.2.2 Kryteria wyłączające 29
3.3 Chorzy na zawał leczeni heparyną 31
3.4 Podział chorych na zawał 31
4. Metodyka 32
4.1 Schemat organizacyjny badania 32
4.2 Wykonywane oznaczenia 32
4.2.1 Podstawowe oznaczenia 33
4.2.2 Markery stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego 33
4.2.3 Markery aktywacji płytek 34

4.2.4 Stężenia czynników krzepnięcia 34
4.2.5 Stężenie aktywnego czynnika XI oraz aktywnego czynnika tkankowego 35
4.2.6 Stężenie immunoreaktywnego czynnika tkankowego 35
4.2.7 Parametry układu krzepnięcia 36
4.2.8 Inhibitory krzepnięcia 37
4.3 Badanie krzepnięcia w modelu uszkodzenia mikrokrążenia 37
4.4 Analiza statystyczna 39
5. Wyniki 40
5.1 Charakterystyka badanych grup 40
5.2 Pomiary w krwi obwodowej 42
5.2.1 Markery zapalenia i stresu oksydacyjnego 42
5.2.2 Aktywacja płytek krwi 43
5.3 Stężenie czynników krzepnięcia 44
5.3.1 Czynnik tkankowy 45
5.3.2 Czynniki kompleksu protrombiny 46
5.3.3 Poziomy pozostałych czynników krzepnięcia i inhibitorów 47
5.4 Markery generacji trombiny w krwi żylnej 48
5.5 Model uszkodzenia mikrokrążenia 50
5.5.1 Generacja trombiny 50
5.5.2 Aktywacja płytek 55
5.6 Wpływ statyn 58
5.6.1 Wpływ statyn na aktywację osoczowego układu krzepnięcia 59
5.6.2 Wpływ statyn na aktywację płytek 61
5.7 Wpływ heparyny niefrakcjonowanej 63
5.7.2 Model uszkodzenia mikrokrążenia 64
6. Dyskusja 68
6.1 Czynnik tkankowy 69
6.1.1 Aktywny czynnik tkankowy 69
6.1.2 Immunoreaktywny czynnik tkankowy 70
6.2 Czynniki krzepnięcia 72
6.2.1 Aktywny czynnik XI 72
6.3 Generacja trombiny 75
6.3.1 Ocena generacji trombiny w modelu uszkodzenia mikrokrążenia 76
6.4 Aktywacja płytek krwi 77
6.4.1 Ocena aktywacji płytek w modelu uszkodzenia mikrokrążenia 78
6.5 Markery stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w zawale serca 79
6.6 Wpływ wcześniejszego stosowania statyn na aktywację układu krzepnięcia 80

6.7 Wpływ heparyny na aktywację układu krzepnięcia w zawale serca 83
6.8 Ograniczenia badania 85
6.9 Podsumowanie 86
7. Wnioski 87
8. Streszczenie 88
9. Summary 92
10. Piśmiennictwo 96

1. Wprowadzenie

1.1 Miażdżyca – przyczyna choroby niedokrwiennej serca

Choroby układu sercowo-naczyniowego, na czele z chorobą niedokrwienną serca stanowią poważny problem kliniczny i społeczny będąc wciąż jedną z głównych przyczyn śmiertelności w krajach rozwiniętych. W Polsce na chorobę wieńcową cierpi około 8,6% dorosłej populacji i jest ona przyczyną niemal 50% zgonów (GUS, 2004). Choroba niedokrwienna serca obejmuje szereg stanów klinicznych od stabilnej dławicy piersiowej poprzez dławicę niestabilną, aż po świeży zawał serca. Objawy choroby wieńcowej są spowodowane postępem zmian miażdżycowych w tętnicach nasierdziowych. Patomorfologicznie miażdżyca tętnic manifestuje się powstawaniem blaszek miażdżycowych.

1.1.1 Ewolucja blaszki miażdżycowej

Powstawanie i rozwój blaszek miażdżycowych jest dość dobrze poznanym procesem (1, 2). Pierwszym etapem ewolucji blaszki jest dysfunkcja (zaburzenie czynności) śródbłonka tętnicy. Śródbłonek jest tkanką o złożonej funkcji autokrynnej i parakrynnej, regulującą nasilenie procesów stanu zapalnego i krzepnięcia oraz kurczliwość ściany naczynia (3). Istotną rolę regulacyjną w wymienionych procesach odgrywa tlenek azotu - NO (4). Jednym z wykładników dysfunkcji śródbłonka jest zmniejszenie produkcji NO prowadzące do zwiększenia przepuszczalności śródbłonka, oksydacji lipidów i infiltracji ściany naczynia przez monocyty. Powstałe z nich makrofagi fagocytują utlenione lipidy (zwłaszcza oksy-LDL) a uwalniane przez nie cytokiny wywołują stan zapalny w ścianie naczynia, proliferację komórek mięśni gładkich, odkładanie się białek i proteoglikanów macierzy pozakomórkowej

oraz skurcz naczynia (5). Dysfunkcja śródbłonka pojawia się najwcześniej w miejscach naczynia narażonych na duże siły ścinające (ang. shear stress) wywierane przez zaburzony przepływ krwi a proces ten dodatkowo nasila współistniejące nadciśnienie tętnicze (6,7). Inne poza nadciśnieniem ogólnoustrojowe czynniki sprzyjające rozwojowi dysfunkcji śródbłonka to hiperlipidemia, glikacja białek w przebiegu cukrzycy, substancje zawarte w dymie tytoniowym oraz krążące aminy biogenne i kompleksy immunologiczne (8,9). Wiele z tych czynników zmniejsza zdolność ustroju do eliminacji wolnych rodników tlenowych i nasila stres oksydacyjny (8,10,11).

Zaburzenie czynności blaszki miażdżycowej oraz gromadzenie się w jej wnętrzu proteoglikanów sprzyja przenikaniu lipoprotein LDL do błony wewnętrznej (12,13). Pewną rolę ochronną może wywierać zwiększone stężenie lipoprotein o dużej gęstości (HDL) ułatwiających transport cholesterolu na zewnątrz blaszki miażdżycowej (14,15) i wywierających działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne (15). W rozwoju blaszki istotną rolę odgrywają reakcje immunologiczne. Dużą uwagę poświęca się receptorom Toll podobnym (Toll-like receptors), które wiążą oksydowane LDL, toksyny bakteryjne, fragmenty DNA i resztki rozpadłych komórek oraz białko szoku cieplnego 60 (HSP 60) (16,17). Receptory zmiatające (scavenger receptors) m.in. SR-A i CD36 odpowiadają za pochłanianie przez makrofagi oksy-LDL, co prowadzi do powstania komórek piankowatych (18,19). Rolę receptorów Toll podobnych w patomechanizmie stanu zapalnego toczącego się wewnątrz blaszki miażdżycowej potwierdzają wyniki badań na zwierzętach – zablokowanie szlaku pobudzenia zapoczątkowanego przez te receptory u myszy pozbawionych genów apolipoproteiny E hamuje rozwój miażdżycy (20). Komórki znajdujące się w blaszce miażdżycowej uwalniają liczne cytokiny, w tym białko chemotaktyczne monocytów-1 (MCP-1), leukotrien B_4 (LTB_4), oraz czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów (M-CSF) wywołujące migrację monocytów i proliferację makrofagów (21). Makrofagi i komórki

piankowate wydzielają cytokiny pobudzające komórki mięśni gładkich do produkcji macierzy zewnątrzkomórkowej oraz aktywujące limfocyty Th_1 (22). Cytokiny wytwarzane przez makrofagi stymulują wnikanie drobnych naczyń krwionośnych do wnętrza blaszki miażdżycowej (23). Naczynia te są odgałęzieniami drobnych tętniczek zaopatrujących ścianę tętnicy (*vasa vasorum*). Rozpad komórek piankowatych prowadzi do powstawania bezpostaciowych, pozakomórkowych złogów lipidów składających się głównie z cholesterolu w postaci wolnej i jego estrów. Wraz z licznymi komórkami i pozakomórkowymi białkami macierzy międzykomórkowej złogi lipidów tworzą wnętrze blaszki miażdżycowej. Od światła tętnicy blaszkę miażdżycową oddziela warstwa łącznotkankowa nazywana pokrywą blaszki.

1.1.2 Niestabilna blaszka miażdżycowa

Nasilenie stanu zapalnego wewnątrz blaszki miażdżycowej znacznie zwiększa ryzyko pęknięcia pokrywy łącznotkankowej. Blaszkę grożącą pęknięciem określa się mianem niestabilnej. Aktywne komórki stanu zapalnego wytwarzają cytokiny prozapalne, wolne rodniki, czynniki krzepnięcia i enzymy proteolityczne (24,25). Substancje te uszkadzają pokrywę łącznotkankową (26,27). Kluczową rolę w destabilizacji blaszki i przerwaniu ciągłości jej pokrywy odgrywają metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP) i proteinazy cysteinowe (28,29). Osłabiona blaszka pęka pod wpływem obciążenia wywieranego przez siły ścinające i ciśnienie tętnicze. Najczęstszym miejscem pęknięcia jest region znajdujący się w okolicy połączenia pokrywy blaszki ze ścianą tętnicy określany mianem regionu zawiasowego.

1.2 Czynnik tkankowy – mechanizm spustowy krzepnięcia w ostrych zespołach wieńcowych

1.2.1 Rola czynnika tkankowego

Pęknięcie blaszki miażdżycowej z odsłonięciem jej bogatego w lipidy wnętrza prowadzi do powstania zakrzepu i jest najważniejszym mechanizmem leżącym u podłoża ostrych zespołów wieńcowych (30-34). Jak stwierdzono, mechanizmem bezpośrednio uruchamiającym kaskadę krzepnięcia jest odsłonięcie czynnika tkankowego (TF) obecnego w znacznych ilościach w uszkodzonej blaszce miażdżycowej (33,34,35). Ta pula TF pochodzi najprawdopodobniej głównie z komórek piankowatych, które uległy apoptozie (36).

1.2.2 Charakterystyka czynnika tkankowego

Czynnik tkankowy jest białkiem o masie cząsteczkowej 47 kDa. Jego gen znajduje się na chromosomie 1. TF jest produkowany przez wiele rodzajów komórek wewnątrz- i pozanaczyniowych. Rola czynnika tkankowego nie ogranicza się jednak do aktywacji krzepnięcia – jest niezbędny w procesach embriogenezy i angiogenezy pełniąc także funkcję sygnałową. Przekazywanie sygnałów międzykomórkowych przez TF odbywa się za pośrednictwem receptorów aktywowanych przez proteazy (PAR) (37). Czynnik tkankowy jest niezbędny do życia – nie opisano przypadku braku TF u ludzi, natomiast świnki morskie pozbawione genu dla TF ginęły najczęściej już w stadium embrionalnym (34).

W zdrowym naczyniu TF nie jest dostępny na powierzchni komórek nabłonka i znajduje się w głębszych warstwach ściany naczynia: na komórkach mięśni gładkich i fibroblastach (38). W blaszce miażdżycowej TF znajduje się dodatkowo na powierzchni licznych komórek stanu zapalnego a w szczególności makrofagów (39). Potwierdzono również obecność czynnika tkankowego w bezpostaciowej substancji międzykomórkowej blaszki miażdżycowej (36,39).

Wyniki badań wskazują, że u osób z niestabilną postacią choroby niedokrwiennej serca stężenie TF w blaszce miażdżycowej jest znacznie większe i wyraźnie nasila miejscową generację trombiny (35).

1.2.3 „Ukrywanie" czynnika tkankowego

Pierwsze badania przeprowadzone po wykryciu TF wskazywały na jego dużą aktywność na komórkach otaczających naczynia krwionośne, ale nie na komórkach wewnątrznaczyniowych. Wyniki wielu późniejszych badań wykazały obecność aktywnego TF w krwi zdrowych ludzi (40,41). Większość krążącego TF jest związana z błonami komórkowymi, pewna część znajduje się na powierzchni mikrocząstek a niewielka ilość występuje w postaci wolnej (42). Zaobserwowano także, że w komórkach produkujących TF większość tego białka była zlokalizowana na powierzchni komórek a nie w ich wnętrzu (43,44). Jednak eksperymenty *in vitro* wykazały dobitnie, że obecność aktywnego TF w krwi nawet w bardzo niedużym stężeniu powoduje natychmiastowe krzepnięcie (45). Poszukując wyjaśnienia tej ewidentnej sprzeczności Ronald Bach z zespołem odkryli zjawisko ukrywania (ang.: encryption) aktywności TF (42,46). Tworzenie ukrytego TF polega na posttranslacyjnym zahamowaniu jego aktywności prozakrzepowej. Ukryty TF pozostaje na powierzchni błony komórkowej w postaci homodimerów i zachowuje zdolność wiązania czynnika (F) VII/VIIa, jednak powstały kompleks charakteryzuje się znikomą zdolnością prozakrzepową (44). Ukrywanie nie polega zatem na przesunięciu TF do wnętrza komórki lecz na zasłonięciu jego miejsc aktywnych.

Proces ukrywania i odkrywania TF jest regulowany przez stężenie jonów wapnia w cytoplazmie. W wyniku pobudzenia komórki jony wapnia napływają do cytoplazmy z cystern wewnątrzkomórkowych i z zewnątrz. Silny wpływ na aktywność kompleksu FVIIa/TF wywiera także skład fosfolipidów zewnętrznej warstwy błony komórkowej. W niepobudzonej

komórce fosfatydyloseryna znajduje się na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Utrzymanie takiego stanu wymaga działania 2 enzymów: flipazy i flopazy oraz wydatku energii pochodzącej z ATP (42). Pobudzenie komórki i napływ jonów wapnia powoduje zwiększenie stężenia fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej i tworzenie się „tratw" złożonych z cząsteczek fosfatydyloseryny, co ostatecznie prowadzi do odsłonięcia (ang.: decryption) TF poprzez zmianę jego struktury czwartorzędowej i ujawnienie pełnej aktywności prozakrzepowej (42).

Istnieją dane wskazujące, że pewną rolę w tym procesie odgrywają także cytoplazmatyczne fragmenty łańcucha TF ulegające fosforylacji i łączące się z aktyną cytoszkieletu (47,48). Z drugiej strony zaobserwowano, że brak domeny cytoplazmatycznej nie zaburza procesu ukrywania i odkrywania TF (49).

Ukrywanie czynnika tkankowego na powierzchni komórek jest zatem mechanizmem regulującym aktywność prozakrzepową i umożliwiającym utrzymanie płynności krwi, przy jednoczesnym zachowaniu zapasowej puli TF. Czynnik tkankowy z tej puli jest łatwo i szybko dostępny w przypadku pobudzenia komórki (50). Dodatkowo pojawia się coraz więcej dowodów przemawiających na rzecz sygnałowej roli ukrytego TF (51).

1.2.4 Alternatywnie przycięty czynnik tkankowy

Innym ważnym rodzajem czynnika tkankowego jest alternatywnie przycięty TF (ang.: alternatively spliced TF, asTF). Jest to rozpuszczalna postać TF o krótszym łańcuchu pozbawionym domeny cytoplazmatycznej i zakończonym inną sekwencją aminokwasów niż pełna wersja TF (52). Alternatywnie przycięty TF odkryty przez zespół Yale Nemersona stanowi najprawdopodobniej większość wolnego, rozpuszczalnego TF krążącego w krwi (52). Wyniki badań *in vitro* wskazują jednak, że aktywność prozakrzepowa wolnego TF jest o kilka rzędów wielkości mniejsza od „właściwego" TF (53).

1.3 Aktywacja osoczowego układu krzepnięcia: generacja trombiny

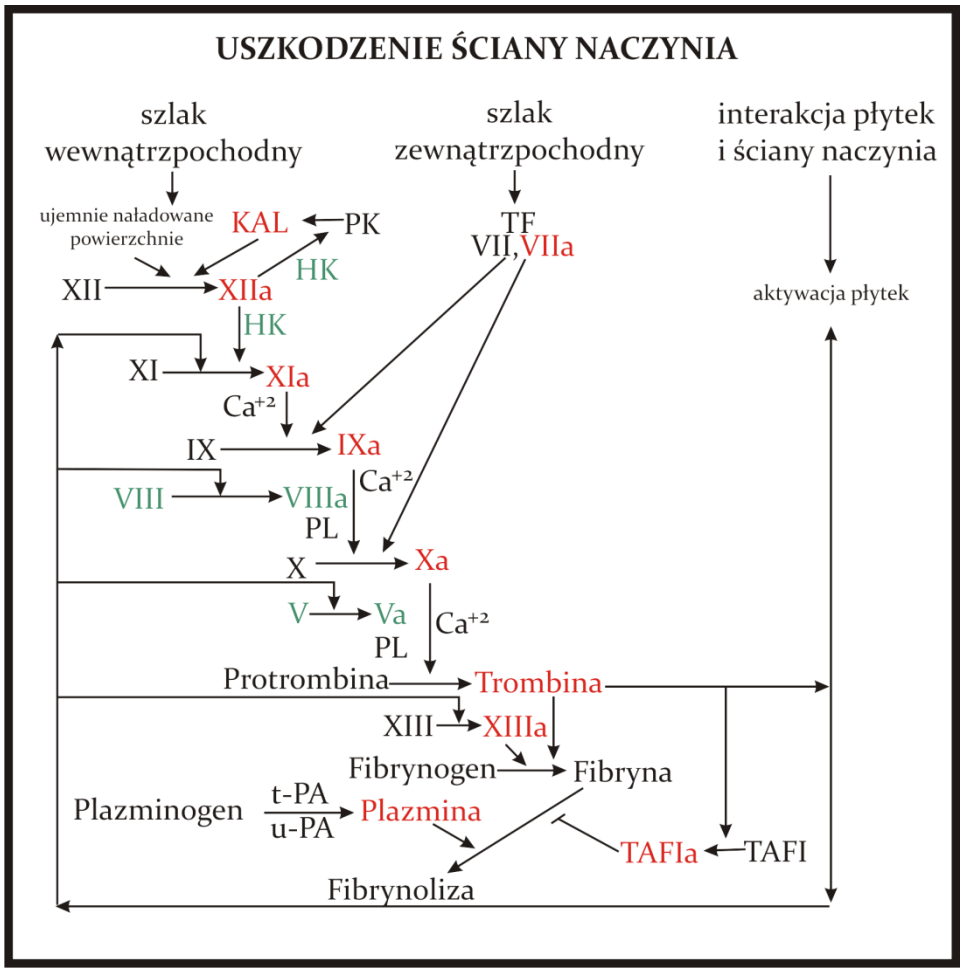
TF jest przede wszystkim kluczowym elementem układu krzepnięcia a jego najważniejszym zadaniem jest inicjowanie produkcji (generacji) trombiny. Celem układu krzepnięcia jest utrzymanie ciągłości naczyń i zapobieganie utracie krwi. Odsłonięcie TF sygnalizuje uszkodzenie ściany naczynia i daje początek procesowi prowadzącemu do powstawania trombiny a ostatecznie zakrzepu fibrynowego. Sekwencję zdarzeń wiodących do powstania trombiny określa się tradycyjnie mianem kaskady krzepnięcia, choć w rzeczywistości proces ten jest zjawiskiem wielowątkowym. Generacja trombiny jest procesem o dużej dynamice, w którym można wyróżnić 2 fazy – inicjacji i propagacji. W fazie inicjacji zostają uruchomione procesy krzepnięcia, natomiast w fazie propagacji wszystkie mechanizmy enzymatyczne osiągają maksymalną wydajność produkując znaczne ilości trombiny. W generacji trombiny biorą udział 3 kompleksy enzymatyczne o zbliżonej strukturze, z których każdy składa się z proteazy serynowej zależnej od witaminy K (FVII, FIX, FX), kofaktora białkowego zwiększającego aktywność proteazy (TF, FV, FVIII) oraz wielkocząsteczkowego substratu białkowego (protrombina – FII).

1.3.1 Zewnątrzpochodny i wewnątrzpochodny szlak krzepnięcia

Inicjacja generacji trombiny przez TF nosi nazwę szlaku zewnątrzpochodnego. TF jako kofaktor przyspiesza autoaktywację FVII do FVIIa (54), zaś po połączeniu się z czynnikiem VII/VIIa tworzy kompleks tenazy zewnątrzpochodnej aktywującej niewielkie ilości czynników IX i X (55,56) niezbędnych w fazie inicjacji krzepnięcia (Rys. 1.1). Czynnik IXa po połączeniu z FVIII aktywuje FX do FXa, zaś Xa łączy się z Va i protrombiną tworząc kompleks protrombinazy. Niewielka ilość wyprodukowanej początkowo trombiny jest niezbędna dla aktywacji FVIII do FVIIIa (57) i ostatecznie kompleks FVIIIa/FIXa (tenaza wewnątrzpochodna) staje się źródłem istotnych ilości FXa niezbędnych do wydajnej

produkcji trombiny w fazie propagacji krzepnięcia. Tenaza wewnątrzpochodna jest około 50-krotnie bardziej wydajna w porównaniu z tenazą zewnątrzpochodną (58). Niedobór czynników VIII lub IX uniemożliwia działanie tenazy wewnątrzpochodnej i amplifikację aktywacji FX do FXa leżąc u podstaw patomechanizmów hemofilii A i B.

Poza szlakiem zewnątrzpochodnym zależnym od TF generacja trombiny może zostać zainicjowana na drodze wewnątrzpochodnej (Rys. 1.1). W szlaku tym biorą udział FXII, prekallikreina i wielkocząsteczkowy kininogen (HMWK) ulegające aktywacji w wyniku kontaktu z ujemnie naładowanymi powierzchniami. Czynnik XII jest proteazą rozkładającą prekallikreinę do kallikreiny i aktywującą czynniki IX i XI. Aktywny czynnik XI, w obecności HMWK i fosfolipidów aktywuje czynnik IX. Dalsza część kaskady krzepnięcia jest wspólna dla obu szlaków. Wewnątrzpochodny szlak aktywacji generacji trombiny wydaje się mieć marginalne znaczenie w ostrych zespołach wieńcowych (59).



Rysunek 1.1. Kaskada krzepnięcia

KAL – kallikreina; PK – prekallikreina; HK – kininogen wielkocząsteczkowy; PL – fosfolipidy; t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu; TAFI – inhibitor fibrynolizy aktywowany przez trombinę

1.3.2 Czynnik XI na nowo odkryty

Do niedawna sądzono, iż jedyną rolą czynnika XI jest aktywacja FIX i FX w wewnątrzpochodnym szlaku krzepnięcia (patrz Rys. 1.1). Jednak wyniki badań von den Borme (60) dobitnie wykazały, że przy malejących stężeniach TF zwiększa się wpływ FXI na tempo generacji trombiny. To zupełnie nowe odkrycie zyskało potwierdzenie w kolejnych badaniach (61,62) pozwalając na zrozumienie znaczenia zaobserwowanego uprzednio

mechanizmu aktywacji FXI przez trombinę (63). Wyjaśniono przy tym odkryty dużo wcześniej fenomen polegający na skłonności do krwawień występującej u osób z niedoborem FXI, której nie stwierdzano u chorych z niedoborami pozostałych czynników szlaku wewnątrzpochodnego.

Aktualny model krzepnięcia zakłada, że czynnik XI ulega aktywacji pod wpływem trombiny powstałej na drodze zależnej od TF i stanowi dodatkowe źródło FIXa niezbędnego do propagacji zakrzepu w miejscach oddalonych od uszkodzonej ściany naczynia, gdzie TF nie jest dostępny w wystarczającej ilości (64). Dodatkowo, dzięki FXIa po uformowaniu się zakrzepu powstają dodatkowe ilości trombiny, która hamuje fibrynolizę poprzez aktywację zależnego od trombiny inhibitora fibrynolizy TAFI (trombin-activatable fibrinolysis inhibitor) (64). Podsumowując, zgodnie z nową teorią krzepnięcia FXI/FXIa jest niezbędny do propagacji zakrzepu i zwiększa jego trwałość.

Implikacje kliniczne tych obserwacji nie są jednoznaczne: z jednej strony niedobór FXI sprzyja krwawieniom, z drugiej zaś nie dowiedziono, aby jego nadmiar zwiększał ryzyko zakrzepicy (64). W nielicznych dotychczas badaniach donoszono o obecności aktywnego FXI w ostrych zespołach wieńcowych (59).

1.3.3 Generacja trombiny

Kompleks protrombinazy składający się z czynników Xa, Va 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. Meizotrombina może

ulec samostrawieniu do trombiny, sama zaś nie posiada zdolności rozszczepiania fibrynogenu i nie aktywuje płytek natomiast silnie aktywuje białko C.

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 powstaje fibryna – główne białko zakrzepu. Trombina oddziela fibrynopeptyd A (FPA) poprzez rozerwanie łańcucha Aα przy Arg 16. W ten sposób tworzy się fibryna I, od której trombina oddziela fibrynopeptyd B poprzez proteolizę łańcucha Bβ przy Arg 14. Tak powstała fibryna II samorzutnie polimeryzuje. Powstały zakrzep zyskuje na własnościach mechanicznych i oporności na lizę dzięki powstaniu poprzecznych wiązań utworzonych przez FXIIIa aktywowany uprzednio przez trombinę.

Od końca lat 70. XX wieku, wraz z wprowadzeniem do powszechnego użytku prostych metod oznaczania markerów trombinogenezy (TAT, F1+2) oraz wskaźników produkcji fibryny (FPA), wiadomo, że ACS wiąże się ze zwiększeniem generacji trombiny oznaczanej z ich pomocą w krwi żylnej, a także udokumentowano ich dalszy wzrost w czasie leczenia trombolitycznego (65-67).

1.4 Rola płytek krwi w ostrym zespole wieńcowym

Uszkodzenie pokrywy blaszki miażdżycowej jest silnym bodźcem wywołującym aktywację i agregację płytek. Z odsłoniętymi włóknami kolagenu łączy się czynnik von Willebranda. Pobliskie komórki śródbłonka, pobudzone przez cytokiny prozapalne i prozakrzepowe, uwalniają vWF z ciałek Weibel-Paladego zaś płytki krwi z ziarnistości alfa. Czynnik von

Willebranda ułatwia adhezję płytek do miejsca uszkodzenia zwłaszcza przy dużych siłach ścinających oraz ich wzajemne połączenie za pośrednictwem receptora błonowego GPIb-IX-V (68). Płytki krwi połączone z uszkodzoną blaszką miażdżycową są początkowo nieaktywne ale ulegają szybkiemu pobudzeniu w obecności kolagenu, difosforanu adenozyny (ADP), adrenaliny i trombiny (69). Pobudzenie płytek prowadzi do zmiany ich struktury, uwolnienia ADP z ziarnistości oraz uruchomienia produkcji tromboksanu A_2 przez cyklooksygenazę 1. Na powierzchni płytek uaktywnia się kompleks glikoproteiny IIb-IIIa (integryna αIIbβ3) uzyskując zdolność wiązania fibrynogenu, co zwiększa siłę związania zakrzepu płytkowego (70). Jednym z najsilniejszych czynników pobudzających płytki jest trombina (71,72), wiążąca się z płytkami za pośrednictwem receptora aktywowanego przez proteazy (PAR) a zwłaszcza jego podtypów PAR1 i PAR4 (73). Aktywacja płytek jest znacznie ułatwiona w obecności dysfunkcjonalnego śródbłonka, który produkuje zmniejszone ilości NO i prostacykliny.

Aktywację płytek możemy oceniać na podstawie markerów oznaczanych w surowicy – to jest β-tromboglobuliny, selektyny P (P-sel) i rozpuszczalnego ligandu CD40 (sCD40L). β-tromboglobulina jest białkiem wydzielanym podczas aktywacji płytek z ziarnistości alfa. Jest to jeden z najwcześniej odkrytych i stosowanych wskaźników aktywacji płytek. Nie jest znana funkcja tego białka ani jego potencjalny udział w mechanizmach krzepnięcia. Selektyna P pośredniczy w przyleganiu płytek do aktywowanych komórek śródbłonka i leukocytów. Ostatnio spore zainteresowanie budzi rola szlaku sygnałowego CD40-sCD40L stanowiącego wspólny element mechanizmów aktywacji krzepnięcia i stanu zapalnego.

1.4.1 Szlak sygnałowy CD40-sCD40L

Rozpuszczalny ligand CD40 (oznaczany również jako sCD154) i jego receptor CD40 stanowią wspólne ogniwo układu krzepnięcia i stanu zapalnego. Rozpuszczalny ligand sCD40L jest uwalniany w znacznych ilościach przez aktywowane płytki krwi (74), które są źródłem większości sCD40L oznaczanego w surowicy i osoczu krwi (74-76). sCD40L należy do nadrodziny genów czynnika martwicy nowotworów (TNF) i jest strukturalnie zbliżony do TNFα. CD40 stanowiący receptor dla ligandu sCD40L występuje na powierzchni wielu typów komórek, między innymi monocytów, limfocytów, neutrofili, komórek śródbłonka i mięśni gładkich (77) oraz na płytkach (78). CD40, podobnie jak sCD40L po raz pierwszy opisano jako receptor powierzchniowy limfocytów, uczestniczący w wymianie sygnałów między limfocytami T i B (79,80). Aktywacja płytek krwi w warunkach *in vitro* z zastosowaniem trombiny prowadzi do ekspresji CD40L na powierzchni błony komórkowej a w następnym etapie do złuszczania i uwalniania jego rozpuszczalnej postaci sCD40L, który może jednocześnie stanowić wiarygodny marker aktywacji płytek (74). Płytki uwalniają sCD40L również w przebiegu reakcji krzepnięcia *in vivo* (74). Na powierzchni aktywowanych płytek zachodzi interesująca sytuacja współwystępowania CD40 i jego ligandu CD40L. Jak się jednak wydaje, połączenie CD40 i sCD40L, choć nasila aktywację płytek nie jest niezbędne dla prawidłowej agregacji (74). Uwalnianie sCD40L przez pobudzone płytki po jego połączeniu z CD40 prowadzi do stymulacji reakcji zapalnej w komórkach śródbłonka i ekspresji na ich powierzchni molekuł adhezyjnych i TF (81,82) oraz uwalniania cytokin, między innymi interleukiny 6 (78,83). sCD40L zwrotnie pobudza płytki do uwalniania mediatorów zapalnych i wolnych rodników (84). Zgodne wyniki licznych badań wskazują, że układ CD40-sCD40L odgrywa kluczową rolę nie tylko w procesach krzepnięcia i stanu zapalnego ale także w progresji miażdżycy i destabilizacji blaszki miażdżycowej (85-88). Jego aktywacja prowadzi do ekspresji licznych cytokin,

chemokin, czynników wzrostu i metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej oraz czynników krzepnięcia w licznych komórkach związanych z blaszką miażdżycową (89,90). Z drugiej strony, obserwuje się zwiększenie ekspresji CD40 na pobudzonych zapalnie komórkach śródbłonka i innych komórkach blaszki miażdżycowej, co uwrażliwia te komórki na prozapalne działanie sCD40L (91).

W badaniach klinicznych zaobserwowano, że u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca stężenie sCD40L w surowicy korelowało ze stężeniem selektyny P (92). Stężenie sCD40L było znamiennie większe u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w porównaniu z osobami ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (92,93) a jego stężenie było silnym, niezależnym czynnikiem ryzyka pierwszego i kolejnego incydentu wieńcowego (92,94). Zwiększone stężenie sCD40L w surowicy obserwowano także w innych stanach związanych z aktywacją układu krzepnięcia i stanu zapalnego, na przykład u chorych na cukrzycę (95,96). W wielu badaniach potwierdzono, że stężenie sCD40L zmniejszało się znamiennie w wyniku stosowania statyn (92,96,97)

Podsumowując, aktywacja układu CD40-sCD40L zapoczątkowana pobudzeniem płytek odgrywa istotną rolę w patomechanizmie krzepnięcia i stanu zapalnego jak również w rozwoju miażdżycy. Rozpuszczalny ligand sCD40L może ponadto stanowić wiarygodny wskaźnik aktywacji płytek.

1.5 Działanie statyn

Statyny, czyli inhibitory reduktazy 3-hydroksy 3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA) są stosowane od połowy lat 80 ubiegłego wieku w celu zmniejszenia stężeń lipidów w surowicy krwi. Ich działanie polega na hamowaniu syntezy cholesterolu w wątrobie, co

prowadzi do wyrównawczego zwiększenia ekspresji receptora dla lipoprotein o małej gęstości (LDL-C) na powierzchni hepatocytów i nasilenia wychwytu tych lipoprotein z krążenia. W rezultacie dochodzi do redukcji stężenia cholesterolu całkowitego (TC), frakcji cholesterolu LDL i triglicerydów (TG) oraz zwiększenia stężenia frakcji cholesterolu zawartego w lipoproteinach o dużej gęstości (HDL-C).

1.5.1 Molekularne podstawy plejotropowego działania statyn

Statyny wywierają również działanie niezależne od zmniejszenia stężenia lipidów. Efekty te, związane z zahamowaniem syntezy kwasu mewalonowego są określane mianem plejotropowych. Upośledzenie syntezy mewalonianiu hamuje powstawanie farnezylu i geranylu – niesteroidowych grup lipidowych niezbędnych do izoprenylacji czyli posttranslacyjnej modyfikacji wielu białek. Izoprenylacja zmienia aktywność białek sygnałowych wiążących GTP poprzez ułatwienie ich połączenia z błoną cytoplazmatyczną. Proces ten dotyczy w szczególności kinaz białkowych należących przede wszystkim do rodzin Ras, Rho i Rab. Zahamowanie izoprenylacji zwiększa ilość nieaktywnych postaci kinaz w cytoplazmie. Kinazy Ras są istotne z powodu ich udziału w onkogenezie zaś Rho budzą zainteresowanie z uwagi na ich znaczenie w regulacji funkcji śródbłonka. W kilku badaniach stwierdzono, że kinazy Rho regulują aktywność cytoszkieletu, migrację komórek i przepuszczalność śródbłonka (98,99). Ich aktywność realizuje się po połączeniu z błoną cytoplazmatyczną, do czego niezbędna jest wcześniejsza prenylacja. Na przestrzeni ostatnich kilku lat dokonał się znaczny postęp w poznaniu molekularnych mechanizmów plejotropowego działania statyn. Stwierdzono, że stosowanie statyn zmniejsza aktywność jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB i zwiększa aktywność szlaku kinaz Pl3/Akt poprzez zahamowanie izoprenylacji. Zwiększenie aktywności Akt zwiększa biodostępność tlenku azotu poprzez indukcję ekspresji i aktywności eNOS. Dodatkowo Akt wpływa na

czynność cytoszkieletu regulując aktywność, kształt i przepuszczalność komórek śródbłonka oraz hamując apoptozę (100). Kureishi i wsp. wykazali *in vitro*, że simwastatyna zwiększa aktywność układu kinaz Pl3/Akt i fosforylację eNOS a efekty te można zablokować inkubując komórki z kwasem mewalonowym lub wortmaniną – inhibitorem kinazy Pl3 (101).

1.5.2 Wpływ statyn na układ krzepnięcia

Statyny wywierają hamujący wpływ na układ krzepnięcia poprzez działanie na wielu etapach. Stwierdzono, że simwastatyna i fluwastatyna zmniejszają ekspresję RNA dla TF w hodowlach komórkowych (102), efekt ten był rezultatem zahamowania aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB. W podobnym badaniu *in vitro* zaobserwowano, że siła wpływu statyn na ekspresję TF była ściśle zależna od stopnia zahamowania NF-κB (103). Dodatkowo potwierdzono, że zmniejszenie ekspresji TF pod wpływem statyn było związane z zahamowaniem aktywności szlaku kinaz RhoA (104). Podobne wyniki uzyskano w badaniach u ludzi. Uwagę zwracają szczególnie 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 antygenu TF jak i jego aktywności w blaszkach miażdżycowych usuniętych z tętnic szyjnych (105). W kilku badaniach stwierdzono, że stosowanie atorwastatyny zmniejszało również aktywność prozakrzepową czynnika VII w sposób niezależny od działania hipolipemizującego (106,107). Jednak niektóre zespoły badając inne statyny nie potwierdziły tych obserwacji (108).

Badania Undas i wsp. (109) oraz innych zespołów wykazały hamujący wpływ stosowania statyn na generację trombiny (110,111). Podobnie w kilku badaniach wykonanych w naszym ośrodku zaobserwowano, że stosowanie statyn hamowało aktywację krzepnięcia w krwi wypływającej z nacięć skóry w modelu uszkodzenia drobnych naczyń u osób

z hipercholesterolemią (112-114). W nielicznych przeprowadzonych dotychczas badaniach u chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi nie stwierdzono, by stosowanie statyn miało wpływ na parametry aktywacji krzepnięcia (115,116).

Wyniki przeprowadzonego w naszym ośrodku przez Undas i wsp. badania *in vivo* wykazały, że stosowanie simwastatyny przez 3 miesiące zmniejsza tempo wytwarzania FVa i FXIIa, przyspiesza eliminację FVa oraz zmniejsza stężenie FPA i FPB w krwi wypływającej z nacięć skóry (117).

Stosowanie statyn wpływa także na mechanizmy hamujące układ krzepnięcia. W szeregu badań stwierdzono, że statyny zwiększają stężenie trombomoduliny – istotnego elementu układu białka C (118,119). Efekt ten był zależny od zahamowania szlaku sygnałowego Rho i ustępował po podaniu mewalonianu lub pirofosforanu geranogeranylu (120). Udało się także wykazać, że zwiększenie ekspresji trombomoduliny było związane z mechanizmem zależnym od NO (121). W kontekście powyższych odkryć pewną konfuzję wprowadzają wyniki badań świadczących o hamującym wpływie statyn na inhibitor szlaku zależnego od TF (TFPI) (122-124). Z drugiej strony w niedawnym badaniu zaobserwowano korzystny wpływ statyn na proporcję TF/TFPI wewnątrz blaszki miażdżycowej (125).

1.5.3 Znaczenie statyn w chorobie niedokrwiennej serca i ostrych zespołach wieńcowych

Korzystne działanie statyn na układ krzepnięcia powinno mieć szczególne znaczenie w chorobie niedokrwiennej serca. Rzeczywiście, wyniki licznych badań klinicznych potwierdziły korzystny wpływ stosowania statyn u osób z chorobami układu krążenia. Pierwszym badaniem, które zwróciło uwagę badaczy na takie efekty działania statyn było badanie 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study), opublikowane w 1994 roku (126). Innym ważnym badaniem było CARE (Cholesterol and Recurrent Events), którego wyniki opublikowano w 1996 roku (127). Korzyści związane ze stosowaniem statyn w prewencji

pierwotnej i wtórnej choroby niedokrwiennej serca wykazano także w badaniach: LIPID (128) i WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study) (129). Spośród nowszych badań uwagę zwracają wyniki badania TNT, w którym stwierdzono, że u chorych na stabilną chorobę wieńcową intensywne leczenie hipolipemizujące atorwastatyną w dawce 80 mg/d przez 4,9 roku (mediana), w porównaniu z leczeniem atorwastatyną w dawce 10 mg/d, wiązało się ze zmniejszeniem ryzyka poważnych incydentów sercowo-naczyniowych ocenianych łącznie oraz poważnych incydentów wieńcowych, nie wpływając znamiennie na ryzyko zgonu (130).

Obserwacje poczynione w wymienionych badaniach oraz licznych innych pracach potwierdzają wyniki niedawnych metaanaliz. W metaanalizie obejmującej ponad 40000 pacjentów stwierdzono, iż stosowanie statyny u osób bez choroby niedokrwiennej serca, naczyń mózgowych i tętnic obwodowych zmniejsza ryzyka zawału serca, udaru mózgu i konieczności wykonania rewaskularyzacji wieńcowej (131). W jeszcze większym przeglądzie systematycznym obejmującym badania, w których udział wzięło łącznie ponad 120000 osób stwierdzono, że stosowanie statyn w profilaktyce pierwotnej i wtórnej znamiennie zmniejsza ryzyko zgonu z jakiejkolwiek przyczyny i z przyczyn sercowo-naczyniowych, ryzyko jakiegokolwiek udaru mózgu i niekrwotocznych incydentów naczyniowo-mózgowych (132).

Jednak stabilna choroba niedokrwienna serca i ostry zespół wieńcowy znacznie się różnią. Stąd też dla niniejszego badania większe znaczenie mają badania dotyczące wpływu stosowania statyn u chorych w trakcie zawału serca. Korzyści wynikające ze stosowania statyn u chorych na zawał serca zaobserwowano przy okazji badań prowadzonych w innych celach, takich jak PRISM (133), czy PURSUIT (134). Pierwszym badaniem dotyczącym wyłącznie intensywnego leczenia statynami w ostrych zespołach wieńcowych było MIRACL

(135), w którym u ponad 3000 chorych stosowano atorwastatynę w dawce 80 mg od pierwszych dób zawału serca. Główny punkt końcowy (zgon, nagłe zatrzymanie krążenia, zawał serca lub zaostrzenie niestabilnej choroby wieńcowej) wystąpił u 17,4% chorych w grupie placebo i u 14,8% w grupie atorwastatyny (RRR: 16%, 95% CI: 0-30%). W 2004 roku opublikowano także wyniki badania PROVE IT-TIMI 22 (136), w którym porównywano wyniki intensywnego leczenia hipolipemizującego atorwastatyną z leczeniem standardowym prawastatyną. Trwające 2 lata leczenie rozpoczynano u chorych po niedawno przebytym ostrym zespole wieńcowym. Stwierdzono, że bardziej intensywnej leczenie atorwastatyną w porównaniu z leczeniem prawastatyną w dawce standardowej 40 mg dziennie, zmniejszyło ryzyko zgonu i poważnych incydentów sercowo-naczyniowych ocenianych łącznie o 14% (95% CI: 4-23). W badaniu „A to Z" obejmującym najliczniejszą grupę chorych (niemal 4500) zaobserwowano, że intensywne leczenie simwastatyną rozpoczęte bezpośrednio po zawale serca nieznamiennie zmniejsza ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych i poważnych incydentów sercowo-naczyniowych ocenianych łącznie (RRR: 10%, 95% CI: od -4 do 22) oraz zmniejsza ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych i ryzyko świeżo rozpoznanej zastoinowej niewydolności serca (137). Wyniki opublikowanego w 2007 roku badania ARMYDA-ACS wykazały, że nawet krótkotrwałe leczenie statyną zmniejsza ryzyko powikłań u chorych na zawał leczonych inwazyjnie (138).

2. Założenia i cele pracy

Wyniki dotychczasowych badań przynoszą niewiele danych na temat przebiegu procesów aktywacji osoczowego układu krzepnięcia w trakcie ostrych zespołów wieńcowych i wzajemnych relacji miedzy aktywacją płytek krwi a produkcją trombiny. Nie znamy zatem odpowiedzi na pytanie czym różni się aktywacja układu krzepnięcia w czasie ostrego zespołu wieńcowego od stanu tego układu u chorych ze stabilną postacią choroby niedokrwiennej serca.

Ponadto, mimo badań wskazujących na korzyści płynące ze stosowania statyn u osób z chorobą niedokrwienną serca nadal nie jest jasne, czy wcześniejsze stosowanie tych leków wpływa na aktywację układu krzepnięcia i markery stanu zapalnego w ostrej fazie zawału serca.

Przystępując do niniejszego badania postawiono zatem następujące cele:

1. Ocena nasilenia generacji trombiny i aktywacji płytek krwi podczas ostrego zespołu wieńcowego w porównaniu ze stabilną dławicą piersiową
2. Określenie czynników warunkujących przebieg aktywacji układu krzepnięcia i płytek krwi w ostrych zespołach wieńcowych, w tym markerów zapalenia, stresu oksydacyjnego i układu hemostazy
3. Ocena wpływu wcześniejszego leczenia statynami na przebieg powyższych procesów

3. Badani

Do udziału w badaniu zakwalifikowano 53 chorych, w wieku 46 – 75 lat (średni wiek 61 lat), w tym 42 mężczyzn i 11 kobiet.

Do badania włączono 28 chorych ze świeżym zawałem serca, przyjętych do Centrum Interwencyjnego Leczenia Serca i Naczyń Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II w Krakowie oraz 25 pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca.

3.1 Chorzy na zawał serca

3.1.1 Kryteria kwalifikacji

Kryteriami włączenia do grupy chorych z ostrym zespołem wieńcowym były:

- rozpoznanie ostrego zespołu wieńcowego – niestabilna dławica piersiowa lub świeży zawał serca bez lub z uniesieniem odcinka ST w ciągu 12 godzin od początku objawów. Zawał serca zdefiniowano zgodnie z kryteriami przyjętymi przez ACC/ESC w 1999 roku z modyfikacją z 2004 roku. (139)
- przyjęcie 75-300 mg kwasu acetylosalicylowego co najmniej 1 godzinę przed przyjęciem do szpitala

3.1.2 Kryteria wyłączające

Kryteria wyłączenia z udziału w badaniu obejmowały:

- ostry incydent sercowo-naczyniowy w ciągu ostatnich 3 miesięcy przed badaniem,
- wstrząs kardiogenny
- skaza krwotoczna

- choroby autoimmunologiczne,
- ostra choroba infekcyjna,
- nadczynność lub niedoczynność tarczycy,
- cukrzyca wymagająca insulinoterapii,
- leczenie tienopirydynami, doustnymi antykoagulantami lub innymi niż ASA niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, kortykosteroidami podawanymi doustnie, lekami hipolipemizującymi innymi niż statyny,
- choroby mięśni,
- schorzenia psychiatryczne,
- ciężkie choroby współistniejące: nowotwór złośliwy, uszkodzenie wątroby (zwiększenie aktywności aminotransferazy alaninowej ≥ 1,5 razy górnej granicy normy), niewydolność nerek (stężenie kreatyniny >140 μM),
- brak zgody pacjenta na udział w badaniu

3.2 Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowili dobrani pod względem płci, wieku i stosowanego leczenia chorzy ze stabilną dławicą piersiową objęci opieką Poradni Chorób Serca i Naczyń II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz chorzy przyjmowani do Centrum Interwencyjnego Leczenia Serca i Naczyń Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II w Krakowie celem wykonania planowego badania koronarograficznego.

3.2.1 Kryteria kwalifikacji

Kryterium włączenia chorych do grupy kontrolnej stanowiła stabilna dławica piersiowa u chorego obarczonego czynnikami ryzyka choroby niedokrwiennej serca, potwierdzona poprzez spełnienie przynajmniej jednego z poniższych warunków:

- dodatni wynik próby wysiłkowej
- dodatni wynik badania scyntygrafii perfuzyjnej mięśnia serca
- dodatni wynik angiografii tętnic wieńcowych metodą wielorzędowej, spiralnej tomografii komputerowej (MSCT)
- przebyty ostry zespół wieńcowy (>3 miesiące wcześniej)

Dodatkowym warunkiem *sine qua non* włączenia do badania było przyjęcie kwasu acetylosalicylowego (75-300 mg) przynajmniej 1 godzinę przed badaniem.

3.2.2 Kryteria wyłączające

- ostry incydent sercowo-naczyniowy w ciągu ostatnich 3 miesięcy przed badaniem,
- niewydolność serca III i IV stopnia skali NYHA
- skaza krwotoczna
- choroby autoimmunologiczne,
- ostra choroba infekcyjna,
- nadczynność lub niedoczynność tarczycy,
- cukrzyca wymagająca insulinoterapii,
- leczenie tienopirydynami, doustnymi antykoagulantami lub innymi niż ASA niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, kortykosteroidami podawanymi doustnie, lekami hipolipemizującymi innymi niż statyny,
- choroby mięśni,
- choroby psychiatryczne,

- ciężkie choroby współistniejące: nowotwór złośliwy, uszkodzenie wątroby (zwiększenie aktywności aminotransferazy alaninowej ≥ 1,5 razy górnej granicy normy), niewydolność nerek (stężenie kreatyniny >140 μM),
- brak zgody pacjenta na udział w badaniu

Tabela 3.1. Charakterystyka badanych grup

	Średnia (zakres)		
	Razem	AMI	CAD
Badani (n)	53	28	25
Wiek (w latach)	61 (46 – 75)	61 (46 – 75)	61 (47 – 73)
Mężczyźni (n)	42	22	20
Kobiety (n)	11	6	5
Przebyty zawał serca, n (%)	12 (23)	7 (25)	5 (20)
BMI (kg/m^2)	27,2 (20,5 – 40,1)	29,3 (20,5 – 40,1)	26,2 (21 – 31)
Nadciśnienie tętnicze (n)	38	22	16
Cukrzyca (n)	6	4	2
Obciążający wywiad rodzinny (n)	41	19	22
Palenie tytoniu (n)	22	11	12
Leki:			
Kwas acetylosalicylowy (n)	53	28	25
Statyny (n)	12	7	5
Beta-blokery (n)	27	12	14
Inhibitory ACE (n)	24	11	13

Antagoniści wapnia (n)	10	3	7
Diuretyki (n)	7	3	4
Antagoniści receptora angiotensyny II (ARB) (n)	2	1	1

AMI – chorzy na zawał serca; CAD – osoby ze stabilną chorobą niedokrwienną serca BMI – wskaźnik masy ciała, ACE – konwertaza angiotensyny

3.3 Chorzy na zawał leczeni heparyną

Na podstawie wykonanych przy przyjęciu rutynowych badań krzepnięcia wyodrębniono 4 osoby z wydłużonym czasem aPTT, które wcześniej otrzymały heparynę niefrakcjonowaną. Grupę tę wyłączono do osobnej analizy.

3.4 Podział chorych na zawał

Grupę chorych na zawał serca podzielono następnie na 2 podgrupy na podstawie zmian stwierdzanych w zapisie EKG:

1. Chorzy na zawał z uniesieniem odcinka ST (STEMI)
2. Chorzy na zawał bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI)

4. Metodyka

4.1 Schemat organizacyjny badania

Badanie miało charakter kliniczno-kontrolny. Po przyjęciu zbierano wywiad, przeprowadzano badanie fizykalne, wykonywano zapis EKG z 12 odprowadzeń oraz pobierano krew żylną do badań laboratoryjnych. Po pobraniu krwi wykonywano nacięcia skóry metodą opisaną poniżej. U chorych na zawał odnotowywano również wyniki badania koronarograficznego a w szczególności rodzaj naczynia dozawałowego czyli zamkniętej lub krytycznie zwężonej tętnicy zaopatrującej obszar objęty zawałem. W przypadku, gdy stwierdzono zamknięcie więcej niż 1 naczynia odnotowywano rodzaj naczynia, którego zakres unaczynienia odpowiadał zmianom w zapisie EKG. U chorych na zawał sprawdzano także wyniki kolejnych oznaczeń troponiny I dokonywanych w trakcie hospitalizacji i rejestrowano wartość maksymalną.

Na podstawie wyników badania EKG chorych na zawał przydzielano do grupy z uniesieniem odcinka ST lub bez uniesienia ST. Jako diagnostyczne uznawano uniesienie ST w 2 sąsiadujących uniesieniach o co najmniej 2 mm (0,2 mV) w stosunku do linii izoelektrycznej w odprowadzeniach V_1-V_3 lub o co najmniej 1 mm (0,1 mV) w pozostałych odprowadzeniach.

4.2 Wykonywane oznaczenia

Krew żylną do badań laboratoryjnych pobierano jednokrotnie, za pomocą zestawów probówek próżniowych firm Becton-Dickinson zawierających wersenian sodu, cytrynian sodu

oraz na skrzep. Oznaczenia morfologii krwi oraz podstawowych parametrów krzepnięcia (INR, APTT) wykonywano bezpośrednio po pobraniu. Pozostałą objętość krwi wirowano przez 10 minut z prędkością 3500 obrotów na minutę w temperaturze 4°C, następnie w części objętości wykonywano oznaczenia lipidogramu, stężeń kreatyniny, glukozy i troponiny I oraz aktywności izoenzymu MB kinazy kreatynowej (CK-MB) w surowicy krwi. W osoczu oznaczano stężenie fibrynogenu. 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.

4.2.1 Podstawowe oznaczenia

Podstawowe badania biochemiczne (stężenia kreatyniny, glukozy) wykonywano za pomocą analizatora Hitachi. Morfologię krwi oraz liczbę płytek oznaczano standardowymi metodami w laboratorium szpitalnym. Stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji HDL oraz triglicerydów oznaczano metodami enzymatycznymi w laboratorium szpitalnym (140,141). Stężenie cholesterolu LDL w surowicy określano zgodnie ze wzorem Friedewalda (142).

4.2.2 Markery stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego

Białko C-reaktywne

Stężenie białka C-reaktywnego w surowicy krwi oznaczano metodą o wysokiej czułości (metoda nefelometryczna, Dade Behring, Niemcy). Zmienność wewnątrz serii: 3,8%.

Interleukina 6

Stężenie interleukiny 6 (IL-6) w surowicy krwi oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA (R&D Systems, Wielka Brytania). Zmienność wewnątrz serii: 6,7%.

8-izo-prostaglandyna $F_{2\alpha}$

W surowicy krwi oznaczano stężenie 8-izo-prostaglandyny $F_{2\alpha}$ metodą ELISA (Cayman Chemicals, USA). Zmienność wewnątrz serii: 7,6%.

4.2.3 Markery aktywacji płytek

β-tromboglobulina

W osoczu mierzono stężenie β-tromboglobuliny metodą ELISA (Diagnostica Stago, Francja). Zmienność wewnątrz serii: 7,3%.

Selektyna P

W osoczu oznaczano stężenie selektyny P (P-sel) metodą ELISA (R&D Systems, Wielka Brytania); zmienność wewnątrz serii: 7,4%.

Rozpuszczalny ligand CD40

Stężenie rozpuszczalnego ligandu CD40 (sCD40L) w osoczu oznaczano metodą ELISA (R&D Systems, Wielka Brytania). Zmienność wewnątrz serii: 5,8%.

4.2.4 Stężenia czynników krzepnięcia

W osoczu krwi oznaczano metodą koagulometryczną poziomy następujących czynników krzepnięcia: II, V, VII, VIII, IX, X. Stosowano osocza kontrolne pozbawione poszczególnych czynników krzepnięcia (Dade Behring). Zmienność wewnątrz serii wynosiła dla wszystkich oznaczeń 6,1%.

4.2.5 Stężenie aktywnego czynnika XI oraz aktywnego czynnika tkankowego

W osoczu cytrynianowym oznaczano stężenia aktywnego czynnika XI oraz aktywnego czynnika tkankowego oryginalną metodą:

Osocze rozmrożono w temperaturze 37° C w obecności antytrypsyny kukurydzianej (CTI: hamuje aktywację krzepnięcia na drodze zewnątrzpochodnej; przygotowanie opisano wcześniej (143)). Następnie dodano $CaCl_2$ do ostatecznego stężenia 15 mM I zainicjowano krzepnięcie poprzez dodanie 2 μM pęcherzyków fosfolipidowych (PCPS) składających się z 25% dioleoilo-*sn*-glicero-3-fosfo-L-seryny oraz 75% 1,2-dioleoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (oba odczynniki pochodziły z Avanti Polar Lipids, Inc; Alabaster, AL, USA), które przygotowano w sposób wcześniej opisany (144). Stosowanie do planowanego oznaczenia do osocza dodawano hamujące przeciwciała monoklonalne anty-FXI (αFXI-2) lub anty-TF (αTF-5) do osiągnięcia stężenia 0,1 mg/ml, przed dodaniem chlorku wapnia. Czas krzepnięcia oznaczano z zastosowaniem koagulometru ST8 (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ). Aktywność czynnika XIa i TF w osoczu obliczano na podstawie krzywych kalibracyjnych uzyskanych poprzez oznaczenia kolejnych rozcieńczeń ludzkiego FXIa (dar Dr R. Jenny z Haematologic Technologies, Inc., Essex Junction, VT, USA) lub lipidowanego (143) TF_{1-242} (dar Dr. R. Lundblad z Baxter Healthcare Corp., Duarte, CA) w połączonym osoczu od 10 dawców. Metoda ta cechuje się dużą czułością i umożliwia wykrywanie stężeń aktywnego TF do 0,4 pM. Oznaczenie zostało wykonane we współpracy z laboratorium K.G. Manna (Departament of Biochemistry, Burlington, VT, USA).

4.2.6 Stężenie immunoreaktywnego czynnika tkankowego

Stężenie immunoreaktywnego TF metodą immunofluorescencyjną z użyciem przeciwciał monoklonalnych (145) oznaczano we współpracy z laboratorium K.G. Manna (Departament of Biochemistry, Burlington, VT, USA):

Mikrosfery luminescencyjne o określonym współczynniku emisji 658:712 nm (klasyfikacja Luminex #035) połączono z przeciwciałami mysimi przeciwko TF (TF-5 mAb) zgodnie z instrukcją producenta (Luminex, Austin, TX, USA). Znakowane przeciwciała umieszczano w otworach płytki pokrytej 1,2 µm warstwą PVDF (Multi-Screen filter – Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Dodawano 50 µL osocza z dodatkiem buforu (HBS 1%, BSA 1%, Triton X-100 0,2-1%). Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wypłukiwano nadmiar roztworu i dodawano 100 µL przeciwciał anty TF-48 mAb (10 µg/mL, HBS, 1% BSA 0,2% Triton X-100); inkubowano przez kolejne 30 minut. Po 3 kolejnych płukaniach dodawano R-Phycoerytrynostreptawidynę (100 µL roztworu 5 µg/ml z buforem: HBS, 1% BSA, 0,2% Triton X-100). Stężenia odczytywano z uprzednio przygotowanych krzywych standardowych (145).

4.2.7 Parametry układu krzepnięcia

Fibrynogen

Stężenie fibrynogenu w osoczu oznaczano metodą koagulometryczną za pomocą zestawu Multifibren U, na aparacie BCT (Behring Coagulation Timer, Dade-Behring, Niemcy). Zakres wartości prawidłowych: 1,8 – 3,5 g/l.

Markery generacji trombiny

W osoczu krwi oznaczano stężenie kompleksów trombina-antytrombina (TAT) metodą ELISA (Dade Behring, Niemcy). Zmienność wewnątrz serii: 5,3%.

Fragmenty F1+2 protrombiny w osoczu oznaczano metodą ELISA (Dade Behring, Niemcy). Zmienność wewnątrz serii: 5,2%.

4.2.8 Inhibitory krzepnięcia

Antytrombina

W osoczu krwi oznaczano aktywność antytrombiny (AT) metodą koagulometryczną (Dade Behring, Niemcy). Zmienność wewnątrz serii: 4,4%.

α_2-makroglobulina

Stężenie α_2-makroglobuliny w osoczu krwi oznaczano metodą nefelometryczną (Dade Behring, USA), zmienność wewnątrz serii: 4,7%.

Inhibitor zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia

W osoczu oznaczano całkowite stężenie inhibitora zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia (TFPI) metodą ELISA (TFPI; Diagnostica Stago, USA); zmienność wewnątrz serii: 5,4%.

α_1-antytrypsyna

W osoczu oznaczano stężenie α_1-antytrypsyny metodą nefelometryczną (Dade Behring, USA), zmienność wewnątrz serii: 4,1%.

4.3 Badanie krzepnięcia w modelu uszkodzenia mikrokrążenia

Przeprowadzono badanie aktywacji układu krzepnięcia w modelu uszkodzenia mikrokrążenia (146,147). Na bocznej powierzchni przedramienia (ok. 4-5 cm od zgięcia łokciowego) wykonywano nacięcie za pomocą aparatu Simplate RI (Organon Teknika, USA). Nacięcia wykonywano przy stazie żylnej uzyskanej z zastosowaniem mankietu aparatu do pomiaru ciśnienia tętniczego napompowanego do ciśnienia 40 mm Hg. Krew wypływającą z nacięć

zbierano do heparynizowanych kapilar (Baxter, USA) w odstępach jednominutowych, aż do ustania krwawienia. Jednocześnie oznaczano czas krwawienia zgodnie z metodą Mielkego (148). Próbki krwi natychmiast przenoszono w stosunku 4:1 do mieszaniny antykoagulantów o następującym składzie: 100 mM EDTA, 20 mM benzamidyny i 10 μM chlorometyloketon, inhibitor proteaz serynowych (Sigma, USA). Po odwirowaniu (w ciągu 20 minut z prędkością 6000 obr./min. w temperaturze 4°C) nadsącz odpipetowywano i zamrażano w mniejszych probówkach w temperaturze –80°C do czasu wykonywania oznaczeń.

Po rozmrożeniu, w próbkach supernatantu uzyskanych tą metodą oznaczono:

1. Stężenie kompleksów TAT metodą ELISA (Dade Behring, Niemcy). Zmienność wewnątrz serii: 5,6%.
2. Stężenie sCD40L metodą ELISA (R&D Systems, Wielka Brytania). Zmienność wewnątrz serii: 6,1%.

Po ustaleniu stężeń sCD40L i TAT w próbkach krwi wypływającej z nacięć skóry w poszczególnych minutach stworzono krzywe narastania stężeń w czasie i obliczono następujące parametry:

1. Maksymalne stężenie TAT i sCD40L
2. Maksymalna prędkość narastania stężeń (dla TAT w okresie między 2 i 3 minutą, dla sCD40L między 1 i 2 minutą)
3. Prędkość początkowa między punktem 0 a stężeniem w 1 minucie. Na podstawie wstępnych obliczeń zaniechano przedstawiania prędkości początkowej narastania stężeń sCD40L, która nie różniła się istotnie od prędkości maksymalnej. Przedstawiono tylko prędkość początkową narastania TAT.

4. Pole powierzchni pod krzywą odpowiadające średniemu całkowemu stężeniu substancji powstałej w czasie obserwowanej reakcji

4.4 Analiza statystyczna

Obliczenia wykonano na komputerze typu PC (Windows, Microsoft) oraz Apple Macintosh (Apple OS X, Apple Computers) z zastosowaniem programów MATLAB (MathWorks), Statistica (Statsoft) i Excel (Microsoft).

Wartości przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± odchylenie standardowe (SD) lub błąd standardowy średniej (SEM), zaś w przypadku rozkładów nie spełniających kryteriów rozkładu normalnego jako medianę (1 i 3 kwartyl). Zgodność z rozkładem normalnym sprawdzano z zastosowaniem testu Shapiro-Wilka. Dla porównania wyników w poszczególnych grupach w przypadku rozkładu normalnego stosowano test t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych, a w pozostałych sytuacjach test U Manna-Whitney'a dla zmiennych niepowiązanych. Korelacje oceniano testem Spearmana lub Pearsona, odpowiednio do rozkładu zmiennych.

Za istotną statystycznie przyjęto wartość prawdopodobieństwa $p < 0,05$.

5. Wyniki

5.1 Charakterystyka badanych grup

Chorzy na zawał serca (AMI) oraz osoby ze stabilną dławicą piersiową (CAD) nie różniły się pod względem płci, wieku, stosowanego leczenia, najważniejszych czynników ryzyka miażdżycy oraz wcześniejszych incydentów wieńcowych (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Charakterystyka badanych populacji: chorych na zawał serca (AMI) oraz osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (CAD)

	Średnia (zakres)		
	AMI	CAD	p
Badani (n)	24	25	
STEMI/NSTEMI (%)	14 (58)/10 (42)	0	
Wiek, lata	61 (46–76)	61 (47–73)	0,9
Mężczyźni, n (%)	19 (79)	20 (83)	0,96
BMI (kg/m^2)	27,3 (21–40)	26,2 (21–31)	0,93
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	18 (75)	16 (64)	0,52
Cukrzyca, n (%)	3 (13)	2 (8)	0,79
Obciążający wywiad rodzinny, n (%)	13 (54)	22 (73)	0,86
Przebyty zawał serca, n (%)	7 (30)	5 (20)	0,7
Palenie tytoniu, n (%)	9 (38)	12 (48)	0,53
Liczba płytek, (/µL)	243.000 ± 49.900	245.000 ± 61.500	0,67
Kreatynina, µM	81,96 ± 25,43	79,6 ± 18,2	0,91
Glukoza, mM	8,02 ± 3,16	5,79 ± 1,28	<0,0001
Leki:			
Kwas acetylosalicylowy, n (%)	24 (100)*	25 (100)	1,0

Statyny, n (%)	5 (21)	5 (20)	0,96
Beta-blokery, n (%)	10 (42)	14 (56)	0,4
Inhibitory ACE, n (%)	8 (33)	13 (52)	0,27
Antagoniści wapnia, n (%)	3 (13)	7 (28)	0,38
Diuretyki, n (%)	3 (13)	4 (16)	0,98
Antagoniści receptora angiotensyny II (ARB), n (%)	0 (0)	1 (4)	0,82

* wśród osób ze świeżym zawałem serca 15 przewlekle stosowało ASA przed wystąpieniem bólu

Charakterystykę podgrupy ze STEMI i NSTEMI przedstawiono w Tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Charakterystyka chorych na zawał serca

	STEMI	NSTEMI	P
Liczba chorych, n (%)	14 (58)	10 (42)	
Czas trwania bólu, mediana (zakres) [h]	4 (1—7)	6 (1—12)	0,1
Troponina I przy przyjęciu [ng/mL]	1,55 ± 1,51	5,57 ± 9,34	0,6
Maksymalne stężenie troponiny I [ng/mL]	33,84 ± 53,01	11,22 ± 14,1	0,4
Maksymalne stężenie CK-MB (U/L)	210,5 ± 223,4	92,3 ± 111,9	0,2
	Zamknięta tętnica wieńcowa		
LAD, n (%)	6 (43)	4 (40)	1,0
RCA, n (%)	3 (21)	2 (20)	1,0
Cx, n (%)	4 (29)	4 (40)	0,8
Brak zmian, n (%)	1 (7)	0	0,8

STEMI – grupa chorych na zawał serca z uniesieniem odcinka ST w zapisie EKG, NSTEMI – grupa chorych na zawał bez uniesienia odcinka ST w zapisie EKG, CK-MB – izoenzym MB kinazy kreatynowej, LAD – gałąź międzykomorowa przednia lewej tętnicy wieńcowej, RCA – prawa tętnica wieńcowa, Cx – gałąź okalająca lewej tętnicy wieńcowej

Nie stwierdzono znamiennych różnic między chorymi ze STEMI i NSTEMI pod względem czasu trwania bólu zawałowego, początkowego i maksymalnego stężenia troponiny I, maksymalnego stężenia CK-MB oraz rodzaju naczynia zaopatrującego obszar mięśnia serca objęty zawałem. Nie stwierdzono także znamiennych różnic pomiędzy chorymi na zawał w zależności od rodzaju zamkniętego naczynia ani ściany serca objętej zawałem.

5.2 Pomiary w krwi obwodowej

5.2.1 Markery zapalenia i stresu oksydacyjnego

W krwi żylnej chorych na zawał w porównaniu z pacjentami ze stabilną chorobą wieńcową stwierdzono czterokrotnie większe stężenia CRP (10,26 ± 20,58 *vs* 2,45 ± 3,06 mg/L; p=0,013) i o 76% większe stężenie interleukiny 6 (IL-6) (3,53 ± 1,22 *vs* 2,03 ± 0,72 pg/mL; p< 0,0001). Zaobserwowano także, iż stężenie IL-6 było o 66% większe w grupie chorych na zawał STEMI w porównaniu z chorymi na zawał NSTEMI (4,23 ± 1,01 *vs* 2,54 ± 0,70 pg/mL; p=0,0006). Nie stwierdzono różnicy między chorymi na zawał STEMI i NSTEMI pod względem stężenia CRP. W żadnej z grup nie stwierdzono korelacji między stężeniem IL-6 i CRP.

W krwi żylnej chorych na zawał w porównaniu z pacjentami ze stabilną chorobą wieńcową stwierdzono o 10% większe stężenie 8-izoPGF_2 (363,2 ± 45,94 *vs* 328,2 ± 31,96 pg/mL; p=0,011).

Nie zaobserwowano różnic pod względem poziomu markerów stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w zależności od wieku i płci badanych oraz występowania najważniejszych czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, palenie papierosów, obciążający wywiad rodzinny).

5.2.2 Aktywacja płytek krwi

Nie stwierdzono różnic między badanymi grupami pod względem liczby płytek krwi. Stężenie sCD40L w krwi żylnej było znamiennie większe u chorych z grupy AMI w porównaniu z osobami z grupy CAD (807,1 ± 295,6 *vs* 226,2 ± 52,3 ng/mL, p<0,0001) a różnica sięgała 360%. U chorych na zawał, w porównaniu z osobami ze stabilną chorobą niedokrwienną serca, zaobserwowano również znamiennie większe poziomy innych wskaźników aktywacji płytek: selektyny P o 53% (158,1 ± 37,3 *vs* 102,7 ± 13,5 ng/mL; p<0,0001) oraz β-tromboglobuliny o 19% (65,8 ± 11,4 *vs* 55,1 ± 6,8 IU/mL; p=0,0009). Wykryto także znamienną różnicę wewnątrz grupy chorych na zawał serca: u chorych na zawał STEMI stężenie sCD40L w krwi żylnej było o 85% większe w porównaniu z chorymi na zawał NSTEMI (998,7 ± 188,32 *vs* 538,9 ± 187,2 pg/mL; p=0,0003).

Nie zaobserwowano różnic pod względem poziomu markerów aktywacji płytek w zależności od wieku i płci badanych oraz występowania najważniejszych czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, palenie papierosów, obciążający wywiad rodzinny). W grupie chorych na zawał serca stwierdzono korelację między stężeniem sCD40L w krwi żylnej a IL-6 (r=0,61; p<0,0001). Zaobserwowano również silną korelację z poziomem CK-MB (r=0,72; p<0,0001) i słabiej wyrażoną ze stężeniem cholesterolu

całkowitego w surowicy krwi (r=0,42; p=0,047). Nie stwierdzono natomiast znamiennej korelacji między stężeniem sCD40L w krwi żylnej a początkowym i maksymalnym stężeniem troponiny I.

W grupie chorych na zawał zaobserwowano znamienną korelację stężenia selektyny P z 8-izo-$PGF_{2\alpha}$ (r=0,66; p=0,0005) oraz bardzo silną korelację ze stężeniem β-tromboglobuliny (r=0,94; p<0,0001). Stężenie β-tromboglobuliny w tej grupie było również skorelowane ze stężeniem 8-izo-$PGF_{2\alpha}$ (r=0,62; p=0,001). Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem sCD40L w krwi żylnej a stężeniami selektyny P i β-tromboglobuliny.

W grupie CAD zaobserwowano podobne, choć mniej wydatne korelacje stężenia selektyny P z 8-izo-$PGF_{2\alpha}$ (r=0,46; p=0,02) oraz ze stężeniem β-tromboglobuliny (r=0,74; p<0,0001). Również stężenie β-tromboglobuliny w tej grupie było skorelowane ze stężeniem 8-izo-$PGF_{2\alpha}$ (r=0,49; p=0,01). Podobnie jak w grupie ACS nie stwierdzono znamiennej korelacji między stężeniem sCD40L w krwi żylnej a stężeniami selektyny P i β-tromboglobuliny.

W żadnej z grup nie zaobserwowano korelacji między liczbą płytek a stężeniem markerów aktywacji płytek.

5.3 Stężenie czynników krzepnięcia

Nie zaobserwowano różnic pod względem stężenia czynników krzepnięcia i inhibitorów w zależności od wieku i płci badanych oraz występowania najważniejszych czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, palenie papierosów, obciążający wywiad rodzinny).

5.3.1 Czynnik tkankowy

5.3.1.1 Aktywny TF

Aktywność czynnika tkankowego wykryto u 9 z 24 (26,7%) badanych w grupie AMI i u ani jednego chorego (0%) w grupie CAD (p<0,0001). Wykryte stężenia aktywnego TF mieściły się w zakresie 0,3-0,8 pM (mediana 0,5 pM), u 2 badanych wynik wyniósł <0,4 pM, czyli poniżej granicy czułości metody.

Aktywny czynnik tkankowy wykryto w krwi u 7 chorych na zawał STEMI (50%) i 2 chorych na zawał NSTEMI (20%, p<0,0001). Iloraz szans wykrycia obecności aktywnego czynnika tkankowego w zawale STEMI w porównaniu z NSTEMI był nieznamienny i wyniósł OR=4,0 (95% CI 0,78-20,6). Po uwzględnieniu wyłącznie osób z mierzalnym aktywnym czynnikiem tkankowym nie wykryto żadnych dodatkowych znamiennych korelacji między jego stężeniem a innymi parametrami.

5.3.1.2 Immunoreaktywny TF

W grupie chorych na zawał stwierdzono znamiennie większe stężenia immunoreaktywnego czynnika tkankowego (mediana w grupie AMI i CAD odpowiednio 3,4 i 2,1 pM; p=0,046). Stężenie immunoreaktywnego czynnika tkankowego było znamiennie większe w grupie chorych na zawał STEMI w porównaniu z chorymi na zawał NSTEMI (4,85 ± 4,6 *vs* 2,2 ± 1,6 pM; p=0,005).

W grupie AMI stężenie TF immunoreaktywnego było silnie skorelowane ze stężeniami TF aktywnego (r=0,71; p=0,0001) oraz stężeniami sCD40L w krwi żylnej (r=0,61; p=0,002) i stężeniem IL-6 (r=0,44; p=0,03). W grupie CAD stężenie immunoreaktywnego TF korelowało ujemnie ze stężeniem sCD40L w krwi żylnej (r=-0,44; p=0,03).

5.3.2 Czynniki kompleksu protrombiny

W grupie chorych na zawał serca w porównaniu z chorymi na stabilną chorobę niedokrwienną serca stwierdzono znamiennie większe stężenia czynnika II. Zaobserwowano również znamiennie większe stężenie czynnika VII w grupie chorych na STEMI w porównaniu z chorymi na NSTEMI (127,5 ± 34 % *vs* 100,5 ± 28 %; p=0,006). Poziomy wszystkich czynników kompleksu protrombiny przedstawiono w Tabeli 5.3.

Tabela 5.3. Poziomy czynników kompleksu protrombiny w osoczu krwi żylnej

Dane przedstawiono jako mediany (rozstęp międzykwartylowy). Wynik przedstawiony w procentach odpowiada % średniego poziomu w populacji.

	AMI	CAD	p
F II [%]	125,5 (37,5)	98 (21)	0,001
F VII [%]	111 (33)	111 (39)	NS
F IX [%]	115 (45,5)	109 (41)	NS
F X [%]	104 (39,5)	110 (33)	NS

W grupie chorych na zawał serca poziom czynnika VII było znamiennie skorelowane ze stężeniem sCD40L w krwi żylnej (r=0,53; p=0,009), stężeniem IL-6 (r=0,69; p=0,0002), 8-izo-$PGF_{2\alpha}$ (r=0,41; p=0,04) oraz ujemnie ze stężeniem CRP (r=-0,43; p=0,04). W grupie CAD nie stwierdzono podobnych korelacji.

W grupie AMI poziom czynnika X był ujemnie skorelowany ze stężeniem markerów uszkodzenia mięśnia serca tj. maksymalnym stężeniem troponiny (r=-0,62, p=0,004) i CK-MB (r=-0,44; p=0,03).

5.3.3 Poziomy pozostałych czynników krzepnięcia i inhibitorów

Poziomy pozostałych czynników krzepnięcia oraz inhibitorów krzepnięcia przedstawiono w Tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Poziomy czynników krzepnięcia i inhibitorów krzepnięcia w osoczu krwi żylnej. Dane przedstawiono jako mediany (rozstęp międzykwartylowy). Wynik przedstawiony w procentach odpowiada % średniego poziomu w populacji.

	AMI	CAD	p
TF immunoreaktywny [pM]	3,4 (3,5)	2,1 (2)	0,046
TF aktywny [pM][a]	0,5 (0,5)	0 (0)	0,024
Fibrynogen [g/L]	3,72 (2,1)	2,63 (1,78)	0,006
F V [%]	114 (32,5)	125 (41)	NS
F VIII [%]	172 (45)	114 (39)	<0,0001
FXIa [pM]	45,5 (43)	15 (50)	0,02
TFPI [pM]	117 (23)	100 (18)	0,04
AT [%]	87 (14)	113 (22)	<0,0001
α_1-antytrypsyna [g/L]	2,55 (0,66)	2,3 (0,47)	0,009
α_2-makroglobulina [g/L]	2,43 (0,36)	2,37 (0,21)	NS

[a] – u chorych z oznaczalnym stężeniem aktywnego TF

W grupie chorych na zawał serca w porównaniu z chorymi na stabilną chorobę niedokrwienną serca stwierdzono znamiennie większe stężenia fibrynogenu i czynnika VIII.

Spośród inhibitorów krzepnięcia w grupie AMI w porównaniu z grupą CAD stwierdzono znamiennie mniejszy poziom antytrombiny oraz większe poziomy TFPI i α_1-antytrypsyny. Nie stwierdzono znamiennych różnic stężenia α_2-makroglobuliny.

W grupie chorych na zawał stwierdzono korelację między stężeniem sCD40L w krwi żylnej a stężeniem czynnika VII (r=0,52; p=0,01) i TF immunoreaktywnego (r=0,61; p=0,002).

W grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca stężenie sCD40L w krwi żylnej korelowało ujemnie z poziomem immunoreaktywnego TF (r=-0,44; p=0,03) i stężeniem czynnika V (r=-0,53; p=0,007).

5.3.3.1 Poziom czynnika XIa

W grupie chorych na zawał serca w porównaniu z grupą CAD stwierdzono znamiennie, trzykrotnie większy poziom czynnika XIa (p=0,02).

U chorych na zawał serca poziom czynnika XIa był skorelowany ze stężeniem IL-6 (r=0,57; p=0,004), poziomem TF – aktywnego i immunoreaktywnego – (odpowiednio r=0,47, p=0,02 i r=0,42, p=0,04) oraz ze stężeniem sCD40L w krwi żylnej (r=0,55; p=0,006). W grupie AMI poziom FXIa był także silnie skorelowany z markerami uszkodzenia mięśnia serca tj. maksymalnym stężeniem troponiny I (r=0,63; p=0,004) i CK-MB (r=0,81; p<0,0001).

W grupie CAD poziom FXIa był znamiennie skorelowany ze stężeniem immunoreaktywnego TF (r=0,58, p=0,002).

5.4 Markery generacji trombiny w krwi żylnej

Nie zaobserwowano różnic pod względem poziomów markerów generacji trombiny w krwi żylnej w zależności do wieku i płci badanych oraz występowania najważniejszych czynników

ryzyka choroby niedokrwiennej serca (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, palenie papierosów, obciążający wywiad rodzinny).

U chorych na zawał serca stwierdzono silną aktywację układu krzepnięcia w krwi żylnej. Stężenie fragmentów F1+2 protrombiny było znamiennie większe w grupie AMI w porównaniu z grupą CAD (1,4 ± 0,59 *vs* 0,8 ± 0,17 nM; p<0,0001), podobnie stężenie kompleksów TAT w krwi żylnej (6,93 ±1,33 *vs* 3,19 ± 0,64 μg/L; p<0,0001). Zaobserwowano także znamienną różnicę stężenia TAT i fragmentów F1+2 protrombiny w krwi żylnej między chorymi na zawał STEMI i NSTEMI (odpowiednio 7,42 ± 1,31 *vs* 6,25 ± 1,08 μg/L; p=0,02 oraz 1,56 ± 0,60 *vs* 1,18 ± 0,52 nM; p=0,04).

W grupie chorych na zawał stwierdzono silną korelację między markerami generacji trombiny i aktywacji płytek w krwi żylnej: między stężeniami TAT i sCD40L (r=0,78; p<0,0001) oraz między stężeniami F1+2 i sCD40L (r=0,47; p=0,02). Stężenie TAT w krwi żylnej u chorych na zawał było także bardzo silnie skorelowane z poziomem czynnika XIa (r=0,77; p<0,0001), nieco słabiej ze poziomem czynnika tkankowego immunoreaktywnego i aktywnego (odpowiednio r=0,51; p=0,01 i r=0,52; p=0,01). Stężenie TAT w krwi żylnej korelowało także z poziomem IL-6 (r=0,67; p<0,0001), maksymalnym stężeniem troponiny I (r=0,52; p=0,02), poziomem CK-MB (r=0,80; p<0,0001), stężeniem TC (r=0,46; p=0,03) i cholesterolu LDL (r=0,53; p=0,01). Nie stwierdzono istotnej korelacji ze stężeniem CRP. Stężenie F1+2 korelowało z poziomem czynnika XIa (r=0,46; p=0,02), IL-6 (r=0,42; p=0,04) i cholesterolu całkowitego (r=0,45; p=0,03). Nie stwierdzono istotnych korelacji TAT i F1+2 w krwi żylnej ze stężeniem CRP.

U badanych ze stabilną chorobą niedokrwienną serca stężenie TAT w krwi żylnej korelowało z poziomem czynnika IX (r=0,49; p=0,01) i stężeniem IL-6 (r=0,69; p=0,0001). Nie stwierdzono natomiast istotnej korelacji ze stężeniem CRP. Stężenie F1+2 w krwi żylnej

u tych chorych było skorelowane poziomem TFPI (R=0,46; p=0,02) i ujemnie ze stężeniem cholesterolu HDL (r=-0,41; p=0,04). U chorych na zawał serca nie zaobserwowano znamiennych korelacji między stężeniami TAT i F1+2 a markerami aktywacji płytek w krwi żylnej a zwłaszcza sCD40L.

5.5 Model uszkodzenia mikrokrążenia

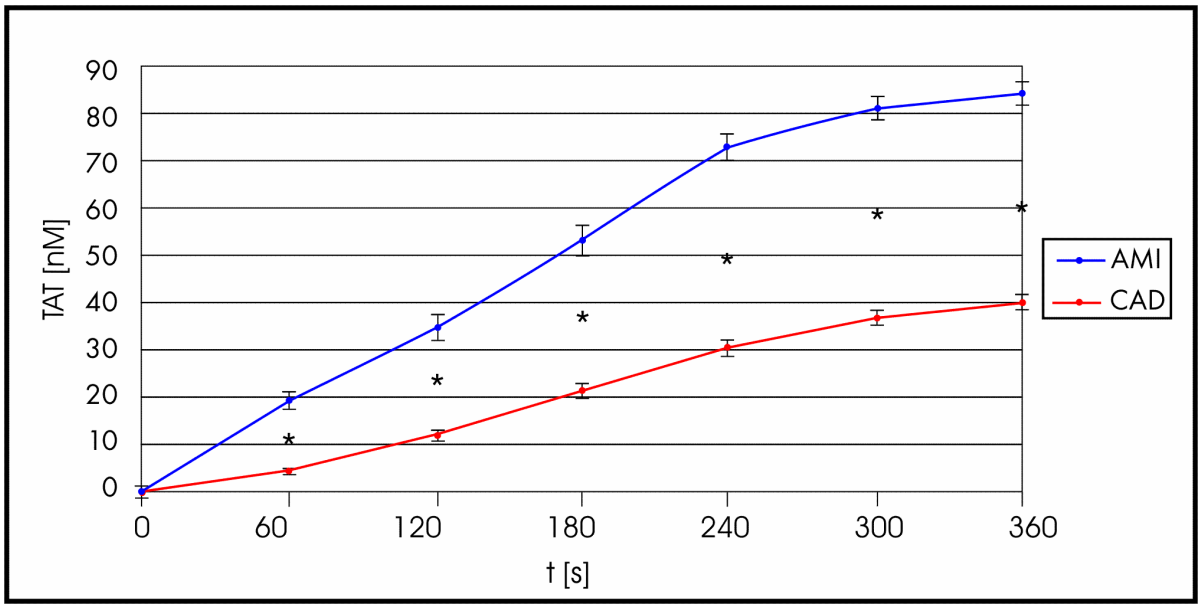
Nie stwierdzono znamiennej różnicy między chorymi na zawał serca i osobami ze stabilną chorobą niedokrwienną serca pod względem objętości krwi wypływającej z nacięć skóry w poszczególnych minutach.

Nie stwierdzono także znamiennej różnicy pod względem czasu krwawienia w grupach AMI i CAD (odpowiednio 393,8 ± 129,7 s i 407,2 ± 97,9 s; p=0,68).

5.5.1 Generacja trombiny

Nie zaobserwowano różnic pod względem poziomów markerów generacji trombiny w modelu uszkodzenia mikrokrążenia w zależności od wieku i płci badanych oraz występowania najważniejszych czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, palenie papierosów, obciążający wywiad rodzinny).

W grupie chorych na zawał w porównaniu z osobami ze stabilną chorobą wieńcową stwierdzono znamiennie bardziej intensywną generację trombiny mierzoną za pomocą stężenia kompleksów TAT w krwi wypływającej z nacięć (Rys. 5.1).



Rys. 5.1. Stężenia kompleksów TAT w krwi wypływającej z nacięć skóry u chorych na zawał serca (AMI) i osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (CAD). Dane przedstawiono jako średnią ± błąd standardowy średniej (SEM). Znamienne różnice oznaczono gwiazdką *.

Zaobserwowano znamienne różnice szybkości reakcji: początkowa prędkość generacji TAT w pierwszej minucie była znamiennie większa w grupie AMI (0,326 ± 0,11 *vs* 0,0785 ± 0,030 nmol/L/s; p<0,0001; rys. 2), natomiast prędkość maksymalna reakcji przypadająca w okresie między 2 i 3 minutą była niemal dwukrotnie większa w grupie AMI w porównaniu z grupą CAD (0,31 ± 0,11 *vs* 0,15 ± 0,05 nmol/L/s, p<0,0001; rys. 3). U badanych w grupie chorych na zawał stwierdzono także dwukrotnie większe maksymalne stężenia TAT w 6 minucie (84,2 ± 11,2 *vs* 40,2 ± 7,4 nM, p< 0,0001; rys. 4) zaś średnie całkowite stężenie powstałej substancji określone jako pole powierzchni pod krzywą narastania stężenia TAT w czasie było w grupie AMI niemal trzykrotnie większe w porównaniu z chorymi w grupie CAD (144,5 ± 33,3 *vs* 53,4 ± 12,7 nM; p<0,0001; rys. 5). Różnice stężeń między grupami były znamienne również w pozostałych minutach. Wśród chorych na zawał nie zaobserwowano znamiennych różnic generacji trombiny pomiędzy grupami STEMI i NSTEMI.

5.5.1.1 Korelacje w grupie chorych na zawał

U chorych na zawał zaobserwowano korelację pomiędzy stężeniem TAT w krwi żylnej a parametrami generacji trombiny w krwi wypływającej z nacięć skóry: maksymalnym stężeniem TAT (r=0,46; p=0,02), powierzchnią pod krzywą stężeń TAT (r=0,53; p=0,007) i maksymalną prędkością narastania stężeń TAT (r=0,43; p=0,04).

Podobnie stężenie fragmentów F1+2 protrombiny w krwi żylnej u chorych na zawał korelowało z parametrami generacji trombiny w modelu uszkodzenia mikrokrążenia: powierzchnią pod krzywą stężenia TAT (r=0,68; p=0,0002), maksymalnym stężeniem TAT (r=0,42; p=0,04) i prędkością początkową generacji trombiny (r=0,48; p=0,02).

W grupie chorych na zawał stwierdzono korelację między stężeniem sCD40L w krwi żylnej a TAT w krwi żylnej (r=0,78; p<0,0001), maksymalnym stężeniem TAT w krwi wypływającej z nacięć skóry (r=0,55; p=0,006), polem powierzchni pod krzywą stężeń TAT (r=0,62; p=0,001) oraz stężeniem fragmentów F1+2 w osoczu krwi żylnej (r=0,47; p=0,02).

Stwierdzono także istotne korelacje ze stężeniem IL-6 ale nie CRP. Wszystkie istotne korelacje między parametrami generacji trombiny i wybranymi oznaczonymi parametrami w grupie chorych na zawał serca przestawiono w Tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Korelacje między wskaźnikami generacji trombiny i wybranymi oznaczonymi parametrami w grupie chorych na zawał serca (przedstawiono wyłącznie istotne korelacje).

	TAT max	TAT V_{max}	TAT V_1	TAT area
IL-6	r=0,43; p=0,04	NS	r=0,42; p=0,04	r=0,51; p=0,01
F IX	NS	r=-0,42; p=0,04	NS	NS
F XIa	r=0,43; p=0,03	NS	NS	r=0,5; p=0,01
AT	NS	r=0,43; p=0,03	NS	NS
sCD40L żylne	r=0,55; p=0,005	NS	r=0,68; p=0,0002	r=0,62; p=0,001
TAT żylne	r=0,46; p=0,03	NS	r=0,49; p=0,01	r=0,53; p=0,007
F1+2 żylne	r=0,42; p=0,04	NS	r=0,48; p=0,02	r=0,68; p=0,0002
P-sel	r=0,45; p=0,03	NS	NS	NS
β- TG	r=0,47; p=0,02	NS	r=0,41; p=0,049	NS
Trop. max.	NS	r=0,47; p=0,03	NS	r=0,58; p=0,005
CK-MB	r=0,42; p=0,04	NS	r=0,58; p=0,003	r=0,57; p=0,004
TC	r=0,59; p=0,03	NS	NS	r=0,62; p=0,002
LDL-C	r=0,43; p=0,04	NS	NS	r=0,54; p=0,008

TAT max – maksymalne stężenie TAT; TAT area – pole pod krzywą stężenia TAT; TAT V_1 – początkowa prędkość generacji TAT; TAT Vmax – maksymalna prędkość generacji TAT; β-TG – stężenie β-tromboglobuliny; trop.max. – maksymalne stężenie troponiny; TC – stężenie cholesterolu całkowitego, LDL-C – stężenie cholesterolu LDL

5.5.1.2 Korelacje w grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca

U badanych ze stabilną chorobą niedokrwienną serca maksymalna prędkość generacji TAT w modelu uszkodzenia mikrokrążenia była skorelowana ze stężeniem TAT w krwi żylnej (r=0,44; p=0,03) oraz stężeniem F1+2 w krwi żylnej (r=0,43; p=0,03).

W grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca maksymalne stężenie TAT w krwi wypływającej z nacięć korelowało ze stężeniem sCD40L w krwi żylnej (r=-0,46; p=0,02).

Nie stwierdzono korelacji parametrów generacji trombiny z IL-6 ani CRP.

Jedynym czynnikiem krzepnięcia korelującym z parametrami generacji trombiny był czynnik VII. Zaobserwowano istotną korelację między poziomem TFPI a maksymalnym stężeniem TAT. Nie stwierdzono natomiast istotnych korelacji między poziomami innych inhibitorów krzepnięcia a parametrami generacji trombiny. Wszystkie istotne korelacje między parametrami generacji trombiny i wybranymi oznaczonymi parametrami w grupie chorych ze stabilną chorobą niedokrwienną serca przestawiono w Tabeli 5.6.

Tabela 5.6. Korelacje między parametrami generacji trombiny i innymi wybranymi parametrami oznaczonymi w grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca.

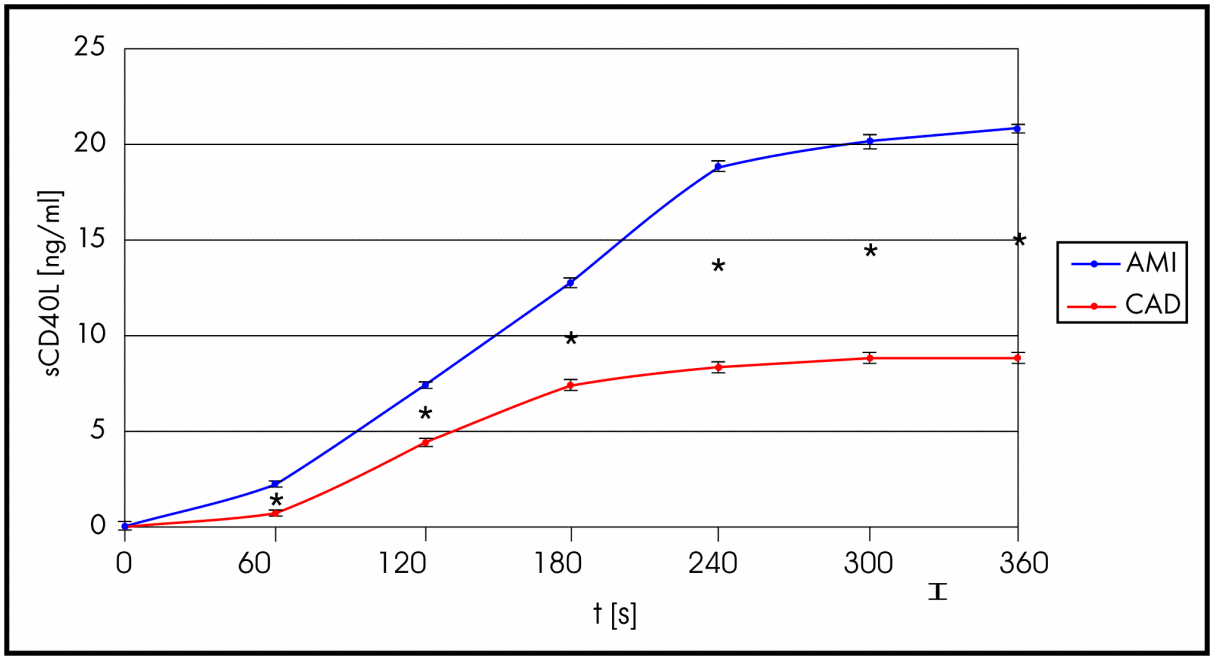
	TAT max	TAT V_{max}	TAT area	TAT V_1
TAT żylne	NS	r=0,44; p=0,03	NS	NS
F1+2 żylne	NS	r=0,43; p=0,03	NS	NS
TFPI	r=0,58; p=0,003	NS	NS	NS
TC	NS	NS	r=0,47; p=0,02	NS

TAT max – maksymalne stężenie TAT; TAT area – pole pod krzywą stężenia TAT; TAT V1 – początkowa prędkość generacji TAT; TAT V_{max} – maksymalna prędkość generacji TAT; TC – stężenie cholesterolu całkowitego

5.5.2 Aktywacja płytek

Nie zaobserwowano różnic pod względem poziomów markerów aktywacji płytek w modelu uszkodzenia mikrokrążenia w zależności od wieku i płci badanych oraz występowania najważniejszych czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, palenie papierosów, obciążający wywiad rodzinny).

W grupie chorych na zawał w porównaniu z chorymi na stabilną chorobę niedokrwienną serca stwierdzono znamiennie większe stężenie sCD40L w krwi wypływającej z nacięć skóry (Rys. 5.2).



Rys 5.2. Stężenie rozpuszczalnego ligandu CD40 w krwi wypływającej z nacięć skóry u chorych na zawał i osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM. Znamienne różnice oznaczono gwiazdką *.

Zaobserwowano znamienną, ponaddwukrotną różnicę maksymalnego stężenia sCD40L (w 6 minucie) pomiędzy chorymi w grupie AMI i w grupie CAD (20,7 ± 2,1 *vs* 8,8 ± 1,2 ng/mL; $p<0,0001$) oraz znamiennie większe średnie całkowite stężenie substancji powstałej w czasie reakcji przedstawione jako pole powierzchni pod krzywą narastania stężenia sCD40L

w czasie (31,6 ± 2,2 *vs* 16,6 ± 2,6 ng/mL; p<0,0001). Różnice stężeń między grupami były znamienne także w pozostałych minutach.

W grupie chorych na zawał znamiennie większa była również maksymalna prędkość uwalniania sCD40L przypadająca między 1 i 2 minutą (0,0867 ± 0,005 *vs* 0,0641 ±0,012 ng/mL/s; p<0,0001). Nie zaobserwowano znamiennych różnic pod względem parametrów aktywacji płytek ocenianych w modelu uszkodzenia mikrokrążenia pomiędzy chorymi na STEMI i NSTEMI.

5.5.2.1 Korelacje w grupie chorych na zawał serca

W grupie chorych na zawał serca zaobserwowano silną korelację między maksymalną prędkością uwalniania sCD40L w krwi wypływającej z nacięć a stężeniem selektyny P i β-tromboglobuliny. Nie wykryto istotnych korelacji ze stężeniem IL-6 ani CRP.

W modelu uszkodzenia mikrokrążenia stwierdzono również występowanie znamiennych korelacji między markerami aktywacji płytek i generacji trombiny: między maksymalnym stężeniem TAT w krwi wypływającej z nacięć a maksymalnym stężeniem sCD40L i maksymalną uwalniania sCD40L jak również między stężeniem sCD40L w krwi żylnej a powierzchnią pod krzywą stężeń sCD40L wypływających z nacięć skóry. Korelacje między markerami aktywacji płytek w modelu uszkodzenia drobnych naczyń a innymi zmierzonymi parametrami w grupie chorych na zawał serca zebrano w Tabeli 5.7.

Tabela 5.7. Korelacje między markerami aktywacji płytek a innymi zmierzonymi parametrami w grupie chorych na zawał serca (przedstawiono jedynie istotne korelacje).

	sCD40L max	sCD40L V_{max}	sCD40L area
P-sel	r=0,59; p=0,002	r=0,65; p=0,0005	NS
β-TG	r=0,56; p=0,004	r=0,62; p=0,001	NS
FXI	NS	r=0,44; p=0,03	NS
TAT area	r=0,45; p=0,03	r=0,54; p=0,007	NS
TAT max	r=0,67; p=0,0004	r=0,61; p=0,002	NS
TAT Vmax	NS	r=0,48; p=0,02	r=0,59; p=0,002
sCD40L żylny	NS	NS	r=0,49; p=0,02
TAT żylny	NS	NS	r=0,52, p=0,01
8-izo-PGF2α	r=0,50; p=0,01	NS	NS
CK-MB	r=0,48; p=0,02	r=0,54; p=0,006	r=0,59; p=0,003
Trop. max.	NS	NS	r=0,66; p=0,001
TC	NS	r=0,55; p=0,006	r=0,44; p=0,04

sCD40L max – maksymalne stężenie sCD40L; sCD40L V_{max} – maksymalna prędkość uwalniania sCD40L; sCD40L area – pole pod krzywą stężeń sCD40L

5.5.2.2 Korelacje w grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca

U osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca stwierdzono niewielką ilość znamiennych korelacji między markerami aktywacji płytek w modelu uszkodzenia mikrokrążenia a innymi oznaczonymi parametrami. Uwagę zwracają istotne korelacje między sCD40L a markerami generacji trombiny. Stwierdzono także istotną korelację ze stężeniem IL-6 ale nie CRP. Korelacje między markerami aktywacji płytek w modelu uszkodzenia drobnych naczyń a innymi zmierzonymi parametrami zebrano w Tabeli 5.8.

Tabela 5.8. Korelacje między markerami aktywacji płytek a innymi zmierzonymi parametrami w grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (przedstawiono wyłącznie istotne korelacje).

	sCD40L max	sCD40L V_{max}	sCD40L area
IL-6	r=-0,43; p=0,03	NS	NS
FV	NS	r=0,54; p=0,005	r=0,54; p=0,005
TAT area	r=0,54; p=0,005	NS	r=0,50; p=0,01
TAT V_{max}	NS	r=0,42; p=0,04	r=0,53; p=0,007
TC	NS	NS	r=0,44; p=0,03
LDL-C	NS	NS	r=0,4; p=0,047

sCD40L max – maksymalne stężenie sCD40L; sCD40L V_{max} – maksymalna prędkość uwalniania sCD40L; sCD40L area – pole pod krzywą stężeń sCD40L

5.6 Wpływ statyn

W grupie chorych na zawał i osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca było po 5 osób uprzednio leczonych statyną (odpowiednio 21 i 20% badanych).

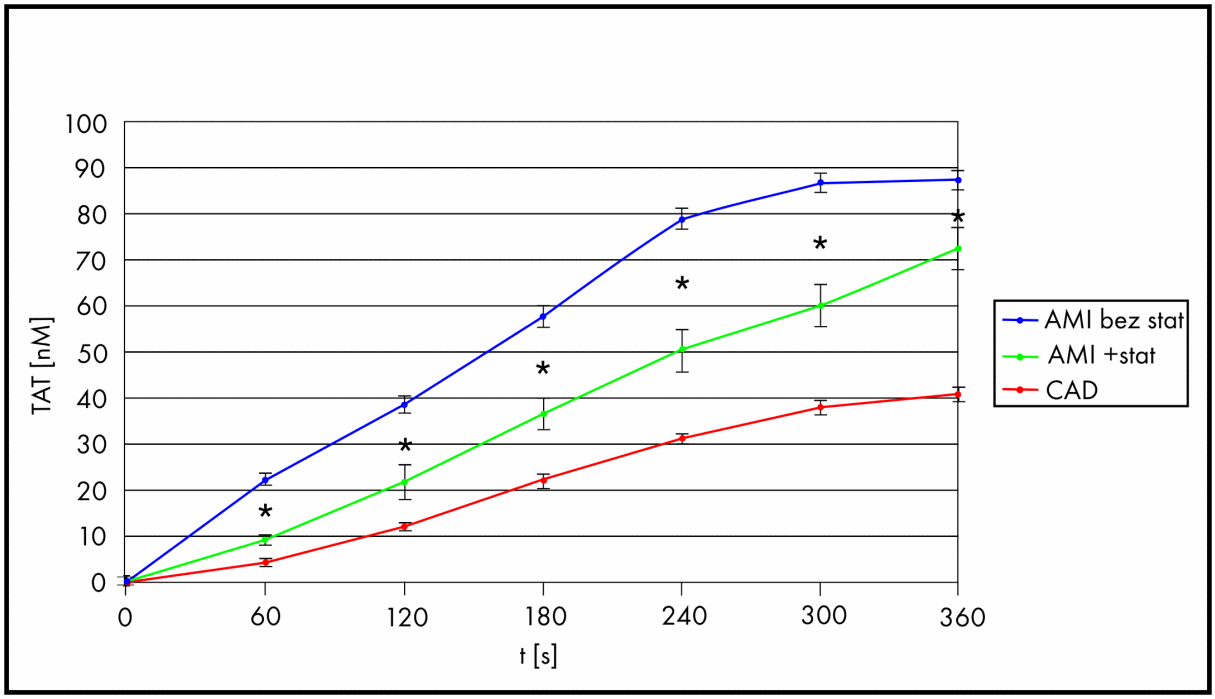
W grupie chorych na zawał nie stwierdzono znamiennych różnic pod względem stężenia cholesterolu całkowitego, LDL-C, HDL-C i triglicerydów w zależności od wcześniejszego stosowania statyny.

W grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca stosowanie statyn wiązało się ze znamiennie mniejszym stężeniem cholesterolu całkowitego (4,37 ±0,86 *vs* 6,04 ± 0,68 mM; p=0,003) i cholesterolu LDL (2,45 ±0,77 *vs* 3,78 ± 0,77 mM; p=0,007). Różnice stężeń HDL-C i triglicerydów były nieznamienne.

Nie stwierdzono aby stosowanie statyn miało znamienny wpływ na markery stanu zapalnego lub stresu oksydacyjnego.

5.6.1 Wpływ statyn na aktywację osoczowego układu krzepnięcia

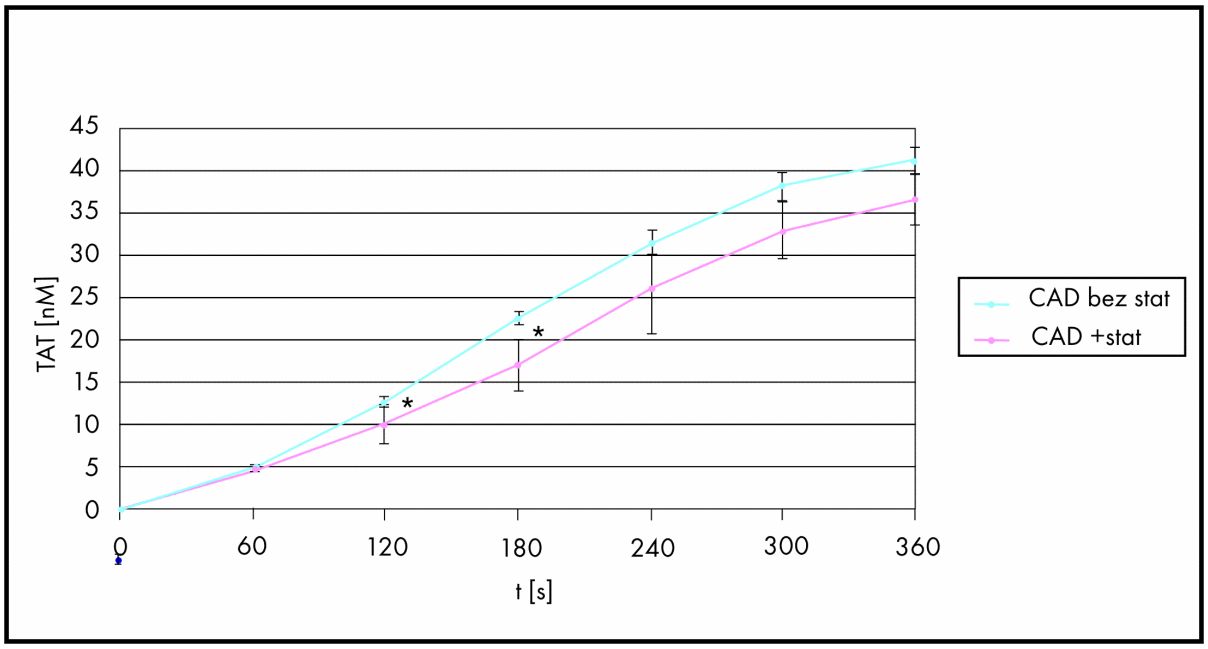
Nie zaobserwowano, aby wcześniejsze stosowanie statyn u chorych na zawał było związane z różnicami stężeń czynników krzepnięcia oraz inhibitorów ani wskaźników generacji trombiny ocenianych w krwi żylnej. W grupie chorych na zawał serca wcześniejsze stosowanie statyny było związane ze znamiennie mniejszą generacją TAT w modelu uszkodzenia mikrokrążenia (Rys. 5.3).



Rys. 5.3. Stężenie kompleksów TAT w krwi wypływającej z nacięć skóry u chorych na zawał w zależności od wcześniejszego leczenia statyną oraz dla porównania w grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM. Znamienne różnice oznaczono gwiazdką *.

W grupie chorych na zawał u osób leczonych statyną w porównaniu z osobami nie przyjmującymi wcześniej statyn w krwi wypływającej z nacięć skóry stwierdzono znamiennie mniejsze wartości następujących parametrów: prędkości początkowej generacji TAT (0,15 ± 0,031 *vs* 0,37 ± 0,061 nmol/L/s; p<0,0001), maksymalnego stężenia TAT (72,2 ± 10,71 *vs* 87,3 ± 9,22 nM; p=0,009) oraz pola powierzchni pod krzywą stężenia TAT (92,4 ± 18,13 *vs* 158,1 ± 20,61 nM; p=0,0007). Różnice stężeń TAT w krwi w modelu uszkodzenia mikrokrążenia między leczonymi i nieleczonymi statyną były znamienne także w pozostałych minutach.

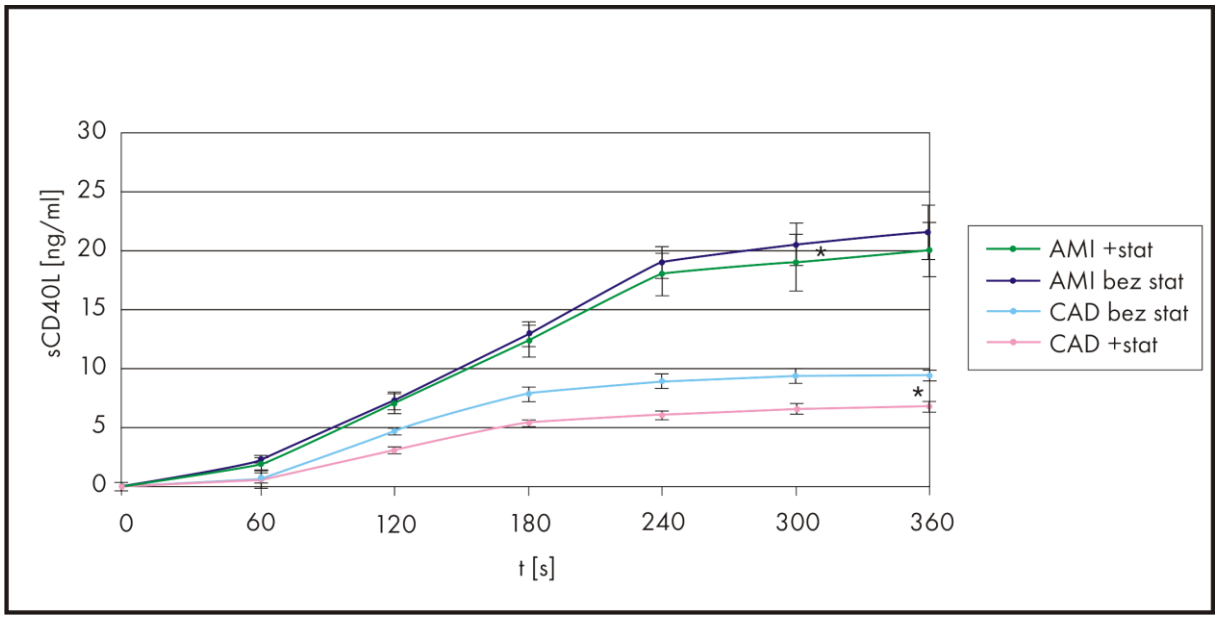
W grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca nie stwierdzono wpływu statyn na markery generacji trombiny oceniane w krwi żylnej. W modelu uszkodzenia mikrokrążenia w grupie tej stosowanie statyny było związane ze znamiennie mniejszym polem pod krzywą stężenia TAT (44,88 ±19,89 *vs* 55,55 ± 9,85 nM; p=0,4) oraz znamiennie mniejszymi stężeniami TAT w 2 (p=0,4) i 3 minucie (p=0,3) (Rys. 5.4).



Rys. 5.4 Stężenie TAT w krwi wypływającej z nacięć skóry u chorych z grupy CAD w zależności od wcześniejszego leczenia statynami. Dane przedstawiono w postaci średniej ± SEM. Znamienne różnice oznaczono gwiazdką *.

5.6.2 Wpływ statyn na aktywację płytek

W grupie chorych na zawał nie stwierdzono znaczącego wpływu stosowania statyn na markery aktywacji płytek oceniane w krwi żylnej ani na stężenie sCD40L w krwi wypływającej z nacięć (Rys. 5.5). Jedyną znamienną statystycznie różnicę stanowiło stężenie sCD40L w 5 minucie (p=0,04).



Rys. 5.5. Stężenie sCD40L w krwi wypływającej z nacięć skóry u chorych z AMI i CAD w zależności od wcześniejszego przyjmowania statyn. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM. Znamienne różnice oznaczono gwiazdką *.

AMI+stat – chorzy na zawał, którzy otrzymywali statynę; AMI bez stat – chorzy na zawał nie otrzymujący statyny; CAD+stat – chorzy na stabilną chorobę niedokrwienną serca leczeni statyną; CAD bez stat – chorzy na stabilną chorobę niedokrwienną serca, którzy nie otrzymywali statyny

W grupie osób ze stabilną chorobą wieńcową nie stwierdzono znaczącego wpływu stosowania statyn na markery aktywacji płytek oceniane w krwi żylnej. W modelu uszkodzenia mikrokrążenia stwierdzono natomiast u chorych stosujących statyny, w porównaniu z osobami nie przyjmującymi statyn, znamiennie mniejsze stężenie maksymalne sCD40L w 6 minucie (6,69 *vs* 9,41 ng/mL; p=0,003), mniejszą prędkość maksymalną uwalniania sCD40L (0,044 *vs* 0,069 ng/mL/s; p=0,0007), mniejsze pole powierzchni pod wykresem (11,85 *vs* 17,76 ng/mL; p=0,0007). Znamiennie mniejsze były również różnice stężenia sCD40L we wszystkich pozostałych minutach.

5.7 Wpływ heparyny niefrakcjonowanej

Tabela 5.9. Charakterystyka chorych leczonych heparyną niefrakcjonowaną

Badany nr	1	2	3	4
STEMI/NSTEMI	NSTEMI	NSTEMI	STEMI	STEMI
Wiek, lata	56	72	57	50
Płeć	K	M	M	M
BMI (kg/m^2)	31,6	28,9	23,3	23,5
Nadciśnienie tętnicze	+	+	+	+
Cukrzyca	-	+	-	-
Obciążający wywiad rodzinny	+	+	-	-
Palenie tytoniu	-	-	-	+
Kreatynina, μM	70	61	70	119
Glukoza, mM	6,0	6,8	8,1	5,8
Leki:				
Kwas acetylosalicylowy	+	+	+	+
Statyna	+	-	+	-
Beta-bloker	+	-	+	-
Inhibitory ACE	+	+	+	-
Antagonista wapnia	-	-	-	-
Diuretyk	-	-	-	-
Antagoniści receptora angiotensyny II	+	-	-	-

Dane demograficzne i kliniczne 4 pacjentów leczonych heparyną były podobne do stwierdzanych u 24 chorych uczestniczących w badaniu.

Zastosowanie heparyny u 4 badanych chorych na zawał było związane ze znamiennym wydłużeniem czasu APTT (186,3 ± 58,9 *vs* 31,0 ± 7,53 s; p=0,002), zwiększeniem wskaźnika

INR (1,15 ± 0,11 *vs* 1,02 ±0,08; p=0,03) oraz wydłużeniem czasu krwawienia (627,5 ± 189,8 *vs* 393,8 ± 129,7 s; p=0,02).

W krwi żylnej chorych na zawał otrzymujących heparynę w porównaniu z chorymi z grupy AMI nie otrzymującymi heparyny zaobserwowano znamiennie mniejsze poziomy czynnika II (55,5 ± 4,8 % *vs* 124,3 ± 21,9 %; p=0,002), czynnika VII (69,8 ± 14,4 % *vs* 118,3 ± 30,3 %; p=0,004), czynnika VIII (132,8 ± 7,3 % *vs* 167,3 ± 32,9 %; p=0,03), czynnika IX (60,0 ± 8,9 % *vs* 119,9 ± 29,9 %; p=0,002), czynnika X (63,3 ± 6,3 % *vs* 111,1 ± 26,0 %; p=0,002) i antytrombiny (70,5 ±6,6 *vs* 88,5 ± 11,6 %; p=0,006) oraz większe stężenie TFPI (130,3 ± 11,8 *vs* 116,3 ±18,7 pM; p=0,002). U żadnego z chorych leczonych heparyną nie wykryto w krwi aktywności czynnika XIa (p=0,002). Nie stwierdzono różnic pod względem stężeń czynnika tkankowego i pozostałych inhibitorów krzepnięcia, czyli α_1-antytrypsyny i α_2-makroglobuliny.

W krwi żylnej chorych na zawał otrzymujących heparynę zaobserwowano znamiennie mniejsze stężenie sCD40L (485,5 ± 208,8 *vs* 807,1 ± 295,6 pg/mL; p=0,048). Nie stwierdzono istotnych różnic stężenia selektyny P i β-tromboglobuliny.

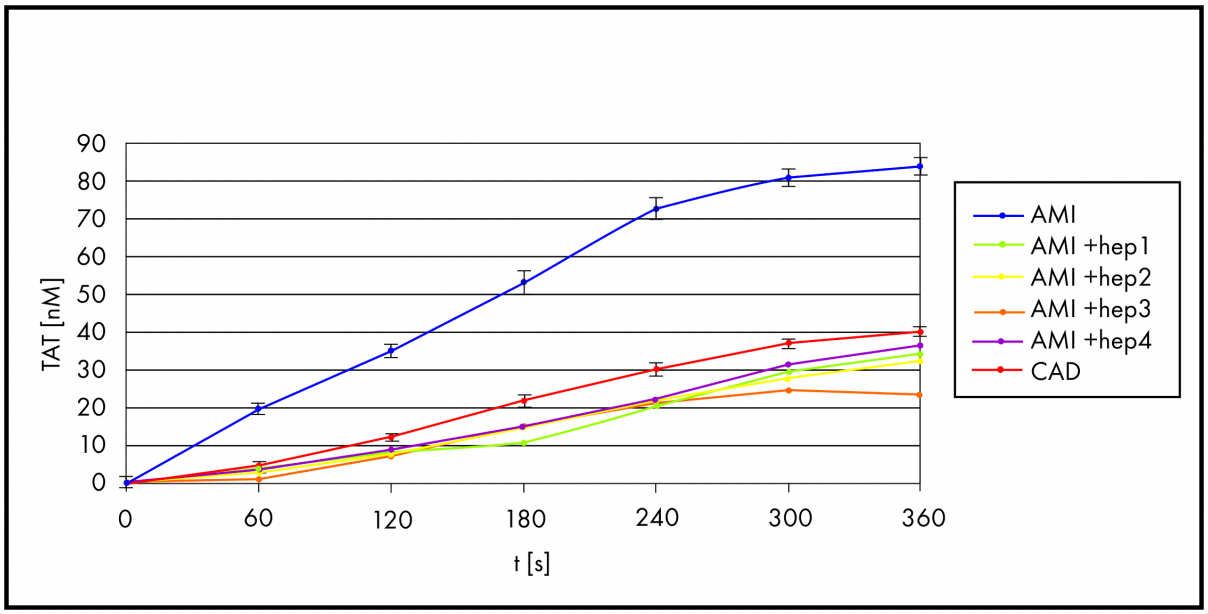
W krwi żylnej chorych z grupy AMI leczonych heparyną w porównaniu z pozostałymi chorymi na zawał serca zaobserwowano również znamiennie mniejsze stężenia kompleksów TAT (4,75 ± 0,65 *vs* 6,93 ±1,33 µg/mL; p=0,004) i fragmentów F1+2 (0,91 ± 0,18 *vs* 1,4 ± 0,59 nM; p=0,03).

5.7.2 Model uszkodzenia mikrokrążenia

5.7.2.1 Generacja trombiny

W grupie chorych na zawał u osób otrzymujących heparynę w porównaniu z osobami nie leczonymi heparyną w krwi wypływającej z nacięć skóry (Rys. 5.6) stwierdzono znamiennie

mniejszą prędkość maksymalną generacji TAT (6,0 ±2,15 *vs* 18,43 ± 6,87 nmol/L/s; p=0,003), początkową prędkość wytwarzania TAT (2,6 ±1,0 *vs* 19,6 ± 6,47 nmol/L/s; p=0,002), maksymalne stężenie TAT w 6 minucie (31,48 ±5,96 *vs* 84,16 ±11,22 nM; p=0,002) oraz pole powierzchni pod krzywą stężenia TAT (34,81 ± 2,61 *vs* 144,46 ± 33,33 nM; p=0,002).



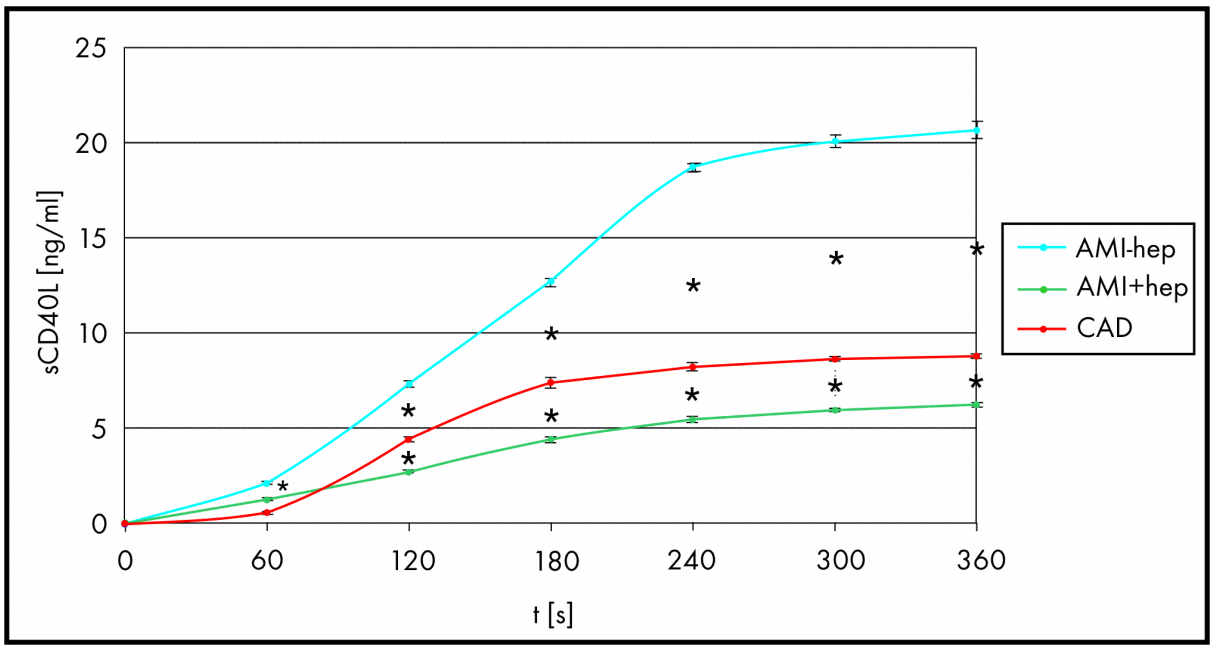
Rys. 5.6. Stężenie TAT w krwi wypływającej z nacięć skóry u chorych na zawał nie otrzymujących heparyny (AMI; przedstawiono średnie ± SEM), u 4 chorych, którzy otrzymali heparynę (hep1-hep4; przedstawiono wartości zmierzone) oraz u osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (CAD; przedstawiono średnie ± SEM).

W porównaniu z osobami ze stabilną chorobą niedokrwienną serca u chorych na zawał serca leczonych heparyną stwierdzono znamiennie mniejsze stężenia TAT w każdej minucie: w 1 minucie o 45% (2,6 ± 1,0 *vs* 4,7 ± 1,83 nM; p=0,01), w 2 minucie o 35% (7,83 ± 0,86 *vs* 12,14 ± 3,35 nM; p=0,006), w 3 minucie o 35% (13,8 ± 2,04 *vs* 21,4 ± 4,94 nM; p=0,006), w 4 minucie o 30% (21,13 ± 0,85 *vs* 30,4 ± 8,22 nM; p=0,03), w 5 minucie o 23% (28,38 ± 3,1 *vs* 36,96 ± 7,98 nM; p=0,03), stężenie maksymalne w 6 minucie o 22% (31,48 ± 5,96 *vs* 40,17 ± 7,44 nM; p=0,04), prędkość początkową generacji trombiny o 45% (2,6 ± 1,0 *vs* 4,71

±1,83 nmol/L/s; p=0,02), maksymalną prędkość generacji trombiny o 35% (6,0 ± 2,15 *vs* 9,24 ± 2,83 nmol/L/s; p=0,05) i pole powierzchni pod krzywą stężeń TAT o 35% (34,8 ± 2,61 *vs* 53,42 ± 12,72 nM; p=0,004).

5.7.2.2 Aktywacja płytek krwi

W krwi wypływającej z nacięć skóry w grupie chorych na zawał serca otrzymujących heparynę (Rys. 5.7) w porównaniu z osobami nie otrzymującymi heparyny zaobserwowano znamiennie mniejszą prędkość maksymalną uwalniania sCD40L (0,024± 0,0015 *vs* 0,087 ± 0,001 ng/mL/s; p=0,002), mniejsze stężenie maksymalne sCD40L (6,29 ±0,19 *vs* 20,68 ± 2,09 ng/mL; p=0,002) i mniejsze pole pod krzywą stężenia sCD40L (11,13 ± 0,39 *vs* 31,58 ± 2,24 ng/mL; p=0,002). Stwierdzono także znamienne różnice stężeń we wszystkich pozostałych minutach.



Rys. 5.7. Stężenie sCD40L w krwi wypływającej z nacięć skóry u chorych na zawał leczonych heparyną (AMI+hep), nie otrzymujących heparyny (AMI-hep) oraz u osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM. Znamienne różnice oznaczono gwiazdką *.

W porównaniu z osobami ze stabilną chorobą niedokrwienną serca u chorych na zawał serca leczonych heparyną zaobserwowano także znamiennie mniejsze (o około 30%) stężenia sCD40L w krwi wypływającej z nacięć skóry od 2 do 6 minuty (Rys. 11), trzykrotnie mniejszą prędkość uwalniania sCD40L (0,021 ± 0,001 *vs* 0,065 ± 0,01 ng/mL/s; p=0,002) i mniejsze o 33% pole powierzchni pod wykresem stężeń sCD40L (11,13 ± 0,39 *vs* 16,58 ± 2,54 ng/mL; p=0,0003).

6. Dyskusja

Przedstawione w pracy wyniki wskazują, że w ostrych zespołach wieńcowych dochodzi do znacznych zmian w kinetyce reakcji krzepnięcia i aktywacji płytek krwi w odpowiedzi na uszkodzenia naczynia, które zachodzą w naczyniach obwodowych. Ostra zakrzepica w tętnicy średniego kalibru jaką jest tętnica wieńcowa jest bodźcem zwiększającym gotowość prozakrzepową nawet w małych naczyniach obwodowych, czego wyrazem jest ponad dwukrotne przyśpieszenie generacji trombiny i sekrecji białek płytkowych. Inne obserwowane nieprawidłowości hemostatyczne w zawale serca, niewystępujące w stabilnej chorobie wieńcowej obejmują: uwolnienie rozpuszczalnego aktywnego czynnika tkankowego – głównie w STEMI – oraz częstszą obecność większych ilości aktywnego czynnika XI. Pojawienie się czynnika XIa wiązało się ze znamiennie bardziej nasiloną generacją trombiny. Uwagę zwraca także korelacja między parametrami opisującymi generację trombiny a stężeniem IL-6. Dodatkowo udało się wykazać, że wcześniejsze stosowanie statyny wiązało się z zahamowaniem generacji trombiny u chorych na zawał serca oraz u osób ze stabilną chorobą wieńcową. Całość pierwszej analizy ilościowej i jakościowej układu krzepnięcia w ostrym zawale serca zawartej w tej pracy wskazuje, że zakrzep w tętnicy powoduje systemową aktywację krzepnięcia znacznie przyspieszającą procesy hemostatycznej odpowiedzi na uszkodzenie naczynia, które różnią się od tej stwierdzanej w próbkach pobranych z żyły obwodowej. Te obserwacje podkreślają znaczenie komórek ściany naczynia w przebiegu efektywnej hemostazy oraz zalety modeli krzepnięcia uwzględniających obecność ściany naczynia i elementów morfotycznych krwi.

6.1 Czynnik tkankowy

6.1.1 Aktywny czynnik tkankowy

Na przestrzeni ostatnich lat trwa ożywiona dyskusja na temat występowania wolnej, rozpuszczalnej postaci aktywnego TF w krwi. Wyniki prac niektórych zespołów wskazują na obecność aktywnego TF w osoczu u chorych bez ostrych zespołów wieńcowych (40,41,149-152). W badaniu przeprowadzonym przez So i współpracowników stwierdzono obecność aktywnego TF w osoczu zdrowych osób należących do grupy kontrolnej w średnim stężeniu wynoszącym 37 pM , zaś u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów nawet 49 pM (153). Aktywny TF wykrywano w krwi w postaci wolnej oraz na powierzchni błon komórkowych i mikrocząstek (149-153). Jednak badania zespołu K. G. Manna przeprowadzone *in vitro* wskazują, że w osoczu zdrowych ludzi aktywny TF może występować w stężeniu nie przekraczającym 16 fM, ponieważ większe stężenia natychmiast aktywują generację trombiny (53). Rozbieżności rezultatów dotychczasowych badań można wyjaśnić przede wszystkim odmiennościami metodologii. W większości badań stosowano testy ELISA o małej czułości i swoistości względem TF (154). Testy te nie pozwalają odróżnić aktywnego TF od postaci nieaktywnych. Dodatkowo zakładają masę cząsteczkową TF na poziomie 32,7 kDa, co jest prawdziwe tylko w odniesieniu do niektórych rodzajów TF. Najczęściej stosowany zestaw ELISA (IMUBIND, American Diagnostica, Greenwich, CT, USA), wbrew deklaracjom producenta, charakteryzuje się czułością pozwalającą na wykrywanie TF w stężeniach ≥4 pM przy zastosowaniu kalibratorów IMUBIND a w przypadku bardziej czułych kalibratorów ≥ 1,5 pM (154). Aby ocenić aktywność TF stosuje się badania czynnościowe oceniające wpływ aktywnego TF na powstawanie czynnika Xa (53). Jednak w testach tych powszechnie stosuje się bardzo duże stężenia czynnika VIIa, przekraczające o 2 rzędy wielkości stężenia

stwierdzane *in vivo* (53). W takich warunkach nawet bardzo mało aktywne postaci rozpuszczalnego TF wykazują zauważalny wpływ na generację czynnika Xa.

Aktualnie najdokładniejszą metodą oceny rzeczywistych poziomów aktywnego TF są testy koagulometryczne. Metody te, z których jedną zastosowano w niniejszym badaniu, wykorzystują aktywność TF w badanym osoczu do inicjowania krzepnięcia sztucznej mieszaniny składników krzepnięcia pozbawionej TF. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że aktywny TF może występować u chorych na zawał serca, znacznie częściej u osób ze STEMI, ale był nieobecny u osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca. Występowanie TF w aktywnej postaci w krwi chorych na zawał świadczy o dużej aktywności krzepnięcia przebiegającego szlakiem zależnym od TF, a także o uszkodzeniu blaszki miażdżycowej i uwalnianiu aktywnego TF do krążenia. Rezultaty te pozostają w zgodzie z obserwacjami K.G. Manna i wsp. (53).

6.1.2 Immunoreaktywny czynnik tkankowy

Immunoreaktywny TF obejmuje wszystkie postaci TF wykrywane przez przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko TF. Znaczna część immunoreaktywnego TF najpewniej nie jest aktywna w procesach krzepnięcia (154,155). W niniejszym badaniu immunoreaktywny czynnik tkankowy był wykrywalny zarówno w krwi chorych na zawał serca jak i osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca. Stwierdziliśmy także, że stężenie immunoreaktywnego czynnika tkankowego było znamiennie większe w grupie chorych na zawał w porównaniu z osobami cierpiącymi na stabilną postać choroby niedokrwiennej serca. Możliwość wykrycia immunoreaktywnego czynnika tkankowego zarówno u chorych z zawałem jak i w grupie CAD wskazuje, że jest to najprawdopodobniej ta frakcja TF, którą opisywano w doniesieniach licznych badaczy jako rozpuszczalny czynnik tkankowy („blood borne TF" bądź „soluble TF"). Część rozpuszczalnego TF stanowi alternatywnie przycięty TF

(alternatively spliced TF, asTF)(156,157). asTF jest pozbawiony domeny przezbłonowej, a jego rola nie została dokładnie wyjaśniona. Wiadomo jednak, że w połączeniu z fosfolipidami i FVIIa asTF wykazuje aktywność prokoagulacyjną wyrażającą się konwersją FX do FXa (156). Wyniki badań Parhami-Seren i wsp. wskazują, że stężenia asTF niezbędne do skrócenia czasu krzepnięcia z 223 do 150 sekund były około 80000 razy większe w od stężeń aktywnego TF stwierdzanych w osoczu (53). Z kolei Bogdanov i wsp. (157) stwierdzili na modelu zwierzęcym, iż aktywność asTF stanowiła około 3% aktywności pełnej wersji TF, jednak w badaniu tym przyjęto mało czułe kryteria oceny aktywności TF (skrócenie czasu krzepnięcia z 233 do 150 sekund po dodaniu TF w stężeniu 40 nM, czyli 80,000 razy większym od fizjologicznego). Na podstawie dotychczasowej wiedzy, jak i wyników niniejszego badania można więc stwierdzić, że niepoprawne jest utożsamianie wolnych postaci TF z aktywnym TF. Co więcej, stosując dostępne obecnie metody aktywny TF można wykryć w krwi tylko w stanach związanych z silną aktywacją krzepnięcia związaną z ekspresją lub uwalnianiem TF, na przykład w przebiegu zawału serca.

Interesujące wyniki przyniosła w tym kontekście analiza grupy chorych na zawał serca. Zaobserwowano zależność, iż stężenie immunoreaktywnego TF jest znamiennie większe u chorych z zawałem serca przebiegającym z uniesieniem odcinka ST w porównaniu z chorymi na zawał NSTEMI.

Analizując stężenia aktywnego i immunoreaktywnego czynnika tkankowego należy pamiętać, że najistotniejszą rolę w krzepnięciu *in vivo* odgrywa najprawdopodobniej czynnik tkankowy zlokalizowany na powierzchni błon komórkowych – monocytów, komórek śródbłonka i płytek krwi. Dlatego badanie rozpuszczalnych postaci TF w osoczu, obejmujących wolny TF oraz prawdopodobnie TF opłaszczony na mikrocząstkach, może dostarczać wiedzy o aktywacji procesów krzepnięcia zapoczątkowanych ekspresją czynnika tkankowego, jednak

nie odzwierciedla bezpośrednio aktywności TF *in vivo*. Brak korelacji z parametrami generacji trombiny sugeruje znikomy wpływ rozpuszczalnego TF na ten proces i dodatkowo podkreśla rolę puli TF w miejscu przerwania ciągłości naczynia.

Niedawno opublikowano wyniki trwającego ponad 2 lata badania AtheroGene, którym objęto 1695 osób (158). W badaniu tym nie wykryto znamiennej różnicy w stężeniu rozpuszczalnego TF pomiędzy osobami ze stabilną CAD a chorymi z ostrym zespołem wieńcowym. Nie zaobserwowano także znamiennych różnic stężenia rozpuszczalnego TF między chorymi z niestabilną dławicą piersiową, NSTEMI i STEMI. Stwierdzono natomiast, że stężenie rozpuszczalnego TF przy przyjęciu do szpitala było silnym, niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu z powodu incydentów sercowo-naczyniowych. Różnice wyników między niniejszą pracą a cytowanym badaniem można wytłumaczyć odmienną metodą oznaczania rozpuszczalnego TF, która w badaniu AtheroGene opierała się na technice ELISA z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych, która nie uwzględnia aktywności koagulacyjnej TF.

Wyniki dotyczące TF wpisują się w gorącą lecz wciąż nierozstrzygniętą dyskusję dotyczącą roli źródeł TF w krzepnięciu, a pośrednio poszukiwań optymalnych, wystandaryzowanych metod pomiaru zawartości TF w krwi.

6.2 Czynniki krzepnięcia

6.2.1 Aktywny czynnik XI

Interesującym aspektem aktywacji układu krzepnięcia w chorobie niedokrwiennej serca jest rola czynnika XI. W 1995 roku Murakami z zespołem stwierdzili (159), że stężenie czynnika XI połączonego w kompleks z α_1-antytrypsyną było znamiennie większe u osób z chorobą

niedokrwienną serca w porównaniu z osobami zdrowymi. Minnema i wsp. w swojej pracy z 2000 roku wykryli obecność aktywnego czynnika XIa w krwi co czwartego chorego na zawał serca i u 8% chorych na niestabilną dławicę piersiową, zaś u zdrowych osób FXIa występował u 4% badanych (59). W niniejszym badaniu stwierdzono obecność FXIa w krwi u większości chorych na zawał serca jak i osób ze stabilną chorobą wieńcową. Stężenie FXIa było przy tym znamiennie większe u chorych na zawał. W publikacji opartej o populację niniejszego badania poszerzoną o grupę kontrolną zdrowych ochotników dobranych odpowiednio pod względem wieku i płci stwierdzono ponadto, że FXIa nie występuje w krwi zdrowych ludzi (160). W niniejszym badaniu zastosowano odmienną od Minnema i wsp. metodę oznaczania stężenia FXIa – wykorzystano do tego celu swoiste przeciwciała przeciwko FXIa, których dodanie powodowało wydłużenie czasu krzepnięcia proporcjonalne do stężenia badanego czynnika. Minnema i wsp. stosowali mniej czułą metodę immunochemiczną, dodatkowo oznaczali wyłącznie czynnik XIa połączony w kompleks z α_1-antytrypsyną i inhibitorem C1-esterazy. Wuillemin i wsp. sugerowali, że inhibitor C1 esterazy *in vivo* jest najsilniejszym inhibitorem czynnika XI (161,162), choć wyniki starszych badań wskazywały, że tylko 8% FXIa pozostaje związane w kompleksie z inhibitorem C1 esterazy (163). Dlatego oznaczanie FXIa w kompleksie z inhibitorem umożliwia najpewniej wykrycie zaledwie małej części całkowitej aktywności FXIa. Najprawdopodobniej więc powyższe różnice w metodyce tłumaczą zaobserwowane rozbieżności w wynikach.

W dotychczas wykonanych badaniach potwierdzono, iż ostre zespoły wieńcowe nie powodują aktywacji wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia (164) jak również, że u chorych na ACS ze zwiększoną aktywnością czynnika XIa nie wykrywa się markerów aktywacji szlaku wewnątrzpochodnego (59). Skąd zatem zwiększenie stężenia czynnika FXIa powstającego klasycznie w trakcie aktywacji układu kontaktu? Wyniki licznych badań potwierdziły, iż niezależne źródło FXIa może stanowić bezpośrednia aktywacja FXI przez trombinę

(64,165,166). Aktywny czynnik XI nie wpływa jednak znacząco na ilość wytworzonej trombiny jeśli obecny jest aktywny TF (165), dodatkowo aktywacja FXI bez udziału FXII może mieć miejsce tylko pod warunkiem obecności płytek (167) oraz dostępności dużych stężeń trombiny i jest hamowana przez fibrynogen – „naturalny" substrat trombiny (166). Dokładna rola FXIa nie została ostatecznie ustalona. Sądzi się jednak, że odgrywa on istotną rolę w fazie konsolidacji krzepnięcia i chroni powstały zakrzep przed działaniem mechanizmów fibrynolitycznych (64). Z drugiej strony, niektóre doniesienia wskazują na istotne znaczenie czynnika XIa dla podtrzymania prawidłowego krzepnięcia przy niskich stężeniach TF (61,168). Obecność aktywnego FXI sugeruje, że dochodzi do sprawnej aktywacji FIX i produkcji trombiny szlakiem wewnątrzpochodnym, co przy niewielkich ilościach TF w ostrym zawale może zapewnić wydajną generację trombiny w krwi.

Uwagę zwraca zaobserwowana u chorych na zawał serca bardzo silna korelacja pomiędzy poziomem FXIa i stężeniem kompleksów TAT oraz fragmentów F1+2 protrombiny stanowiących czuły wskaźnik generacji trombiny. Wyniki te potwierdzono w innej pracy na poszerzonej populacji niniejszego badania (160). U chorych na zawał serca zaobserwowano także korelację między FXIa oraz aktywnym i immunoreaktywnym czynnikiem tkankowym, natomiast u osób ze stabilną chorobą wieńcową stężenie FXIa korelowało ze stężeniem immunoreaktywnego TF, co także może potwierdzać , że pojawienie się TF powoduje niezależną od czynnika XII aktywację FXI (61,63,64). Zjawisko to można spróbować wytłumaczyć przyjmując, że zwiększenie ekspresji TF intensyfikuje generację trombiny, która z kolei aktywuje czynnik XI.

Warto zauważyć, że niniejsze badanie jest jednym z pierwszych, w którym jednocześnie oceniano poziom FXIa i TF w osoczu chorych na zawał serca. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że aktywacja czynnika XI jest szczególnie silna w stanach związanych z uwolnieniem aktywnego TF i być może stanowi mechanizm dodatkowej amplifikacji

generacji trombiny. Powyższe wyniki zostały potwierdzone w badaniu na większej grupie pacjentów, którego rezultaty niedawno opublikowano (160).

Zaobserwowaliśmy także, że stężenie aktywnego czynnika XI u chorych na zawał było skorelowane z markerami uszkodzenia mięśnia serca – stężeniem troponiny I i aktywnością CK-MB. Obserwacja ta może świadczyć o związku aktywacji krzepnięcia, której wyrazem jest pojawienie się aktywnego FXI z nasileniem martwicy mięśnia serca. Stwierdzona zależność między aktywnym FXI i stężeniem IL-6 odzwierciedla związek między generacją trombiny a nasileniem stanu zapalnego typowym dla ACS.

6.3 Generacja trombiny

Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że stężenia F1+2 u chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi wynoszą średnio 1-2 nM i są zwykle co najmniej dwukrotnie wyższe w porównaniu z wartościami obserwowanymi u chorych na stabilną dławicę piersiową (67,169). Podobny wzrost dotyczy stężeń TAT oraz FPA, a największe wartości obserwuje się u chorych z wysokimi stężeniami sercowych troponin w krwi (67,169). Udowodniono również, że aktywacja układu krzepnięcia utrzymuje się nawet 6 miesięcy po zawale serca i wiąże się ze zwiększonym ryzykiem powikłań (170).

Rezultaty wcześniejszych prac znalazły pełne potwierdzenie w wynikach niniejszego badania. Zgodnie z oczekiwaniami zaobserwowaliśmy występowanie istotnych korelacji między markerami generacji trombiny a maksymalnym stężeniem troponiny I i CK-MB. Można na tej podstawie domniemywać o istnieniu zależności pomiędzy nasileniem generacji trombiny a zasięgiem zawału oraz prawdopodobnie średnicą zamkniętego naczynia wieńcowego. Nie

stwierdziliśmy jednak związku między rodzajem niedrożnego naczynia a nasileniem generacji trombiny w krwi żylnej ani stężeniem troponiny I lub aktywnością CK-MB.

6.3.1 Ocena generacji trombiny w modelu uszkodzenia mikrokrążenia

W niniejszym badaniu u chorych z ostrym zespołem wieńcowym po raz pierwszy analizowano jednocześnie stężenia TF w postaci aktywnej i nieaktywnej, stężenia czynników krzepnięcia i inhibitorów oraz generację trombiny w modelu uszkodzenia mikrokrążenia. Badanie aktywacji układu krzepnięcia na podstawie parametrów generacji trombiny ocenianych w krwi żylnej, czyli stężenia TAT i F1+2 , umożliwiają bardzo ograniczoną analizę kinetyki procesów krzepnięcia inicjowanych przez uszkodzenie naczynia, podstawowy fizjologiczny bodziec układu krzepnięcia. Ocena generacji trombiny w modelu uszkodzenia drobnych naczyń ukazuje nie tylko ilościowo nasilenie procesu trombinogenezy, ale również prędkości poszczególnych faz tego procesu. W 1988 roku Weiss i Lages udowodnili, że krzepnięcie w tym modelu jest zależne od TF (171), co potwierdzono w późniejszych badaniach (172). Należy jednak mieć na względzie, iż model ten nie opisuje procesów zachodzących w naczyniu wieńcowym, ale wpływ ogólnoustrojowej aktywacji układu krzepnięcia na kinetykę powstawania trombiny w miejscu uszkodzenia drobnych naczyń skóry. Choć mechanizmy krzepnięcia uważane są za uniwersalne, z zasady niezależne od kalibru naczynia, nie ma pewności, czy kinetyka reakcji w tętnicy wieńcowej jest identyczna do tej opisanej w drobnych naczyniach skóry, jednak siła z jaką zakrzep wieńcowy modyfikuje krzepnięcie na obwodzie poprzez systemową aktywację krzepnięcia jest zaskakująca.

Porównanie stężeń TAT w poszczególnych minutach, łącznej ilości TAT opisanej polem pod krzywą stężeń oraz początkowej i maksymalnej prędkości generacji TAT wykazało znaczne

różnice między badanymi grupami. Generacja trombiny u chorych na zawał postępowała dwukrotnie szybciej i doprowadziła do powstania dwu-, trzykrotnie większych stężeń TAT.

Interesujące wyniki przyniosła analiza korelacji w grupie chorych na zawał. Związek maksymalnego stężenia TAT i średniego całkowitego stężenia TAT z poziomem czynnika XIa może potwierdzać rolę FXIa w amplifikacji trombinogenezy. Dodatkowo parametry opisujące generację trombiny w modelu uszkodzenia mikrokrążenia wykazywały dodatnią korelację ze stężeniami TAT i F1+2 w krwi żylnej, co potwierdza wiarygodność zastosowanego modelu w ocenie ogólnoustrojowej aktywacji krzepnięcia.

Parametry generacji trombiny w modelu uszkodzenia mikrokrążenia były skorelowane z wszystkimi markerami aktywacji płytek: stężeniem sCD40L, selektyny P i β-tromboglobuliny, co wskazuje na związek między aktywacją płytek a generacją trombiny

Co ciekawe, nie zaobserwowano związku między stężeniem aktywnego ani immunoreaktywnego TF a parametrami generacji trombiny. Wyniki te wskazują, że pojawienie się TF jest niezbędne jedynie do zainicjowania procesu krzepnięcia, którego dynamika w dalszym przebiegu nie zależy od TF krążącego w krwi. Ponadto obserwacje te podkreślają, że lokalne krzepnięcie jest odmienne niż to pokazują markery mierzone w żylnej krwi krążącej.

6.4 Aktywacja płytek krwi

Aktywacja płytek jest jednym z najważniejszych elementów patomechanizmu ostrych zespołów wieńcowych (173-175). Pęknięcie blaszki miażdżycowej i odsłonięcie jej silnie trombogennego wnętrza nie tylko aktywuje krzepnięcie osoczowe poprzez ekspozycję czynnika tkankowego ale prowadzi również do aktywacji płytek. U chorych na zawał serca w porównaniu z osobami ze stabilną chorobą wieńcową stwierdziliśmy bardziej nasiloną

aktywację płytek i znamienne zwiększenie stężeń wszystkich markerów aktywacji płytek oznaczanych w krwi żylnej: selektyny P, β-tromboglobuliny oraz sCD40L.

W przeprowadzonych dotychczas badaniach potwierdzono występowanie zwiększonych stężeń sCD40L w krwi żylnej u chorych z niestabilną dławicą piersiową i zawałem serca w porównaniu z osobami ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (176,177). Co ciekawe, podobnie jak w niniejszym badaniu, nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniami selektyny P i sCD40L (95). Wcześniejsze doniesienia potwierdzają także naszą obserwację dotyczącą silnej korelacji między stężeniami sCD40L i IL-6 oraz sCD40L i TF (95).

6.4.1 Ocena aktywacji płytek w modelu uszkodzenia mikrokrążenia

W modelu uszkodzenia mikrokrążenia wykazano znamiennie większe stężenia sCD40L w krwi wypływającej z nacięć skóry u chorych na zawał serca. Dotychczas przeprowadzono kilka badań, w których analizowano aktywność płytek w modelu uszkodzenia mikrokrążenia. W pionierskim badaniu z 1987 roku Kyrle wraz z zespołem oceniali stężenia β-tromboglobuliny w krwi wypływającej z nacięć skóry u 7 zdrowych ochotników (178). Podobnie w późniejszych badaniach Undas i wsp. oceniali stężenia β-tromboglobuliny (179) i sCD40L (180) w krwi wypływającej z nacięć skóry u chorych obarczonych hipercholesterolemią i dużym ryzykiem choroby niedokrwiennej serca. Wyniki drugiego z wymienionych badań dobrze korelują z rezultatami niniejszej pracy. Undas i wsp. określali stężenia sCD40L na początku badania oraz po 3 i 28 dniach stosowania simwastatyny. Stężenia sCD40L przed zastosowaniem statyny były bardzo podobne do uzyskanych w niniejszym badaniu u chorych ze stabilną CAD nie otrzymujących statyn. Stężenia u chorych ze stabilną chorobą wieńcową otrzymujących statyny mieściły się pomiędzy wartościami uzyskanymi w 3 i 28 dniu stosowania simwastatyny (180).

Wyniki niedawno opublikowanego badania naszego zespołu przeprowadzonego na poszerzonej populacji opisanej w niniejszej pracy potwierdziły obserwacje dotyczące uwalniania sCD40L z płytek krwi w miejscu uszkodzenia mikrokrążenia u chorych ze stabilną CAD i ACS (181).

6.5 Markery stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w zawale serca

Wyniki niniejszego badania potwierdziły wcześniejsze odkrycia dotyczące zwiększenia stężenia markerów stanu zapalnego (IL-6 i CRP) w przebiegu zawału serca (182). U chorych na zawał serca w porównaniu z grupą AMI stężenie CRP było większe niemal czterokrotnie a IL-6 o 75%. Stężenie IL-6 było średnio o 2/3 większe u chorych na zawał z uniesieniem odcinka ST w porównaniu z zawałem NSTEMI. Co ciekawe, o ile stężenie IL-6 było silnie skorelowane z parametrami generacji trombiny i aktywacji płytek, o tyle nie zaobserwowano takiej zależności w przypadku CRP. Dwa ostatnie spostrzeżenia mogą świadczyć o odmiennym charakterze obu markerów. IL-6 powstaje przede wszystkim w blaszce miażdżycowej i zmiany jej stężenia mogą bardzo szybko reagować na pęknięcie blaszki. Z kolei CRP krążące w krwi jest syntetyzowane głównie w wątrobie w odpowiedzi na pojawienie się innych markerów, a w szczególności IL-6 (183). Stąd zapewne brak silnych korelacji między CRP a parametrami aktywacji płytek i generacji trombiny. Znaczne zwiększenie stężenia CRP w grupie AMI w porównaniu z grupą CAD może natomiast być spowodowane nie samym ostrym zespołem wieńcowym lecz niestabilnością blaszki miażdżycowej w okresie bezpośrednio poprzedzającym jej pęknięcie. Nasze obserwacje pozostają w zgodzie z wynikami wcześniejszych badań. Maier i wsp. (184) badając chorych na zawał serca stwierdzili wzrost stężenia IL-6 i spadek CRP w okolicy pękniętej blaszki w porównaniu ze stężeniem w aorcie, wyniki te tłumaczyli lokalną produkcją IL-6 i zużyciem CRP przez komórki stanu zapalnego wewnątrz i w okolicy pękniętej blaszki miażdżycowej.

Cusack i wsp stwierdzili zwiększenie stężenia IL-6 w zatoce wieńcowej u chorych na niestabilną dławicę piersiową, co również może świadczyć o lokalnej produkcji tej cytokiny (185). Może to potwierdzać, że obserwowany w pierwszych godzinach zawału poziom CRP jest bardziej wyrazem wcześniejszej aktywności zapalnej wewnątrz niestabilnej blaszki niż reakcją na sam zawał serca.

Zaobserwowana korelacja między stężeniami IL-6 i parametrami generacji trombiny znajduje uzasadnienie w wynikach pracy Li i wsp. (186), którzy wykazali, że trombina silnie indukuje uwalnianie IL-6 z monocytów za pośrednictwem receptorów aktywowanych przez proteazy (PAR). Dotychczasowe prace przynosiły jednak sprzeczne wnioski dotyczące związku między IL-6 a parametrami generacji trombiny. Song i wsp. nie zaobserwowali korelacji między stężeniami IL-6 i TAT u chorych ze świeżym udarem niedokrwiennym (187), natomiast Marucci z zespołem wykryli taką zależność u chorych z przewlekłą niewydolnością serca (188).

6.6 Wpływ wcześniejszego stosowania statyn na aktywację układu krzepnięcia

W grupie osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca zaobserwowaliśmy, że wcześniejsze stosowanie statyn miało znamienny wpływ na stężenie cholesterolu całkowitego i frakcji LDL. Natomiast w grupie chorych na zawał serca nie stwierdzono wpływu statyn na stężenia lipidów. Stosowanie statyn nie miało również wpływu na markery stanu zapalnego ani stresu oksygenacyjnego w żadnej z badanych grup. W dotychczasowych badaniach potwierdzono hamujący wpływ statyn na stężenie markerów stanu zapalnego, jednak nie analizowano chorych z ostrym zespołem wieńcowym (179,189).

Liczne doniesienia wskazywały na wpływ statyn na układ krzepnięcia. Działania te obejmują hamowanie ekspresji TF wykrywane w badaniach *in vitro* (190-194) i w modelach

zwierzęcych (195-198). W badaniu z 2001 roku stwierdzono, że stosowanie simwastatyny nie tylko opóźnia tworzenie łańcucha ciężkiego i lekkiego czynnika Va o 30—60 sekund ale także zmniejsza ich powstawanie odpowiednio o 30% i 19%. Efekt ten był niezależny od wpływu simwastatyny na stężenia lipidów (172).

Wyniki naszego badania nie wykazały wpływu statyn na stężenia TF, czynników krzepnięcia i inhibitorów. Zaobserwowaliśmy jednak znamienny, hamujący wpływ statyn na generację trombiny, zarówno w grupie chorych na AMI jak i osób ze stabilną CAD.

Wyniki dotyczące osób ze stabilną CAD są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (172). Podobne wyniki przyniosło także badanie przeprowadzone u osób z zaawansowaną chorobą niedokrwienną serca (199).

Nieliczne dotychczas doniesienia dotyczące wpływu leczenia statynami na generację trombiny u chorych po przebyciu ostrego zespołu wieńcowego przyniosły sprzeczne wyniki. Olivotti z zespołem nie zaobserwowali zmniejszenia stężenia fragmentów F1+2 protrombiny w surowicy ani zahamowania tworzenia trombiny w powstających *in vitro* skrzepach u chorych na zawał leczonych przez 16 tygodni atorwastatyną w dużych dawkach (200). Podobnie wyniki badań Dupuis i wsp. (201) nie wykazały znamiennych różnic pod względem generacji trombiny pomiędzy chorymi na zawał osobami z hipercholesterolemią leczonymi prawastatyną w dawce 40 mg i pacjentami otrzymującymi placebo, choć jednocześnie stwierdzono poprawę parametrów określających czynność śródbłonka. Z kolei w badaniu Sanguigni i wsp. (202) stwierdzono istotny wpływ atorwastatyny na stężenie F1+2 w krwi już po 3 dniach leczenia.

W naszym badaniu po raz pierwszy analizowaliśmy wpływ wcześniejszego przyjmowania statyn na generację trombiny w pierwszych godzinach ACS. Wnioski z dotychczasowych badań przeprowadzanych kilka tygodni po zawale serca mogły wskazywać, że aktywacja układu krzepnięcia we wczesnym okresie zawału będzie zbyt nasilona, aby udało się

zaobserwować hamujący wpływ statyn. Rzeczywiście, wyniki naszego badania nie wykazały wpływu wcześniejszego przyjmowania statyn na parametry generacji trombiny określane w krwi żylnej. Dopiero zastosowanie modelu uszkodzenia mikrokrążenia pozwoliło na zaobserwowanie znamiennego, hamującego wpływu statyn na generację trombiny w świeżym zawale serca. Stężenia kompleksów TAT w krwi wypływającej z nacięć skóry w poszczególnych minutach u chorych na zawał leczonych statynami znajdowały się mniej więcej w połowie drogi między wartościami stwierdzanymi u chorych na zawał nie otrzymujących statyny i osobami należącymi do grupy kontrolnej. Wyniki niniejszego badania po raz pierwszy wskazują na hamujący wpływ statyn stosowanych przed wystąpieniem niedokrwienia na generację trombiny.

W niniejszym badaniu nie stwierdziliśmy wpływu stosowania statyn na markery aktywacji płytek obecne w krwi żylnej zarówno u chorych na zawał jak i u osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca. W modelu uszkodzenia mikrokrążenia efekt wcześniejszego przyjmowania statyn w grupie chorych na zawał był niewielki – jedyną znamienną różnicę stanowiło mniejsze stężenie sCD40L w 5 minucie. W grupie CAD hamujący efekt statyn na uwalnianie sCD40L był silniej zaznaczony – zaobserwowano znamiennie różnice wszystkich ocenianych parametrów.

Wyniki dotychczasowych badań sugerowały istnienie hamującego wpływu statyn na płytki krwi (202-208). Większość z tych działań ma charakter plejotropowy, jednak część zapewne zależy od działania hipolipemizującego statyn skoro udowodniono wpływ zwiększonego stężenia cholesterolu na aktywność płytek (205). Do tej pory nie badano jednak działania statyn na aktywację płytek krwi u chorych na zawał serca. Sanguigni i wsp. (202) zaobserwowali znamienne zmniejszenie stężenia rozpuszczalnego ligandu CD40L oraz CD40L na płytkach krwi u chorych z hipercholesterolemią już po 3 dniach leczenia atorwastatyną w dawce 10 mg dziennie, a efekt ten był niezależny od wpływu na stężenie

lipidów. Podobne wyniki, potwierdzające hamujący wpływ statyn na stężenie sCD40L u chorych z hiperlipidemią przedstawiono w innych doniesieniach (206-208). Stwierdzono także, iż zmniejszenie ryzyka związane ze stosowaniem atorwastatyny było zależne od zmniejszenia stężenia sCD40L w krwi obwodowej (209). Również wyniki badań *in vitro* wskazują na niezależny od lipidów, hamujący wpływ statyn na ekspresję CD40L przez aktywowane płytki pobrane od osób z hipercholesterolemią (202). Nieliczne prace wykazały brak wpływu statyn na ekspresję CD40L na powierzchni płytek (92,206) lub na stężenie sCD40L w krwi (189).

6.7 Wpływ heparyny na aktywację układu krzepnięcia w zawale serca

Heparynę stosuje się w leczeniu ostrych zespołów wieńcowych od połowy lat ’50 ubiegłego stulecia. Wyniki bardzo licznych badań dowodzą, że ciągły dożylny wlew heparyny prowadzi do zmniejszenia stężenia markerów generacji trombiny w krwi żylnej u chorych na niestabilną dławicę piersiową i zawał serca (210-212) a po zakończeniu wlewu heparyny występuje ponowny wzrost tych parametrów (210). W niniejszym badaniu również stwierdziliśmy silny hamujący wpływ heparyny niefrakcjonowanej na aktywację krzepnięcia osoczowego u chorych na zawał serca.

Znamienne zahamowanie generacji trombiny zaobserwowaliśmy również w modelu uszkodzenia mikrokrążenia, jednak w zawale serca stwierdzono jedynie wartości zbliżone do grupy CAD.

Wyniki te można odnieść do wcześniejszych doniesień zespołu Kyrlego (213-217), który analizował wpływ heparyny na parametry generacji trombiny w modelu uszkodzenia drobnych naczyń. W badaniach, w których wzięli udział zdrowi ochotnicy, zaobserwowano znamienne zmniejszenie stężenia TAT, F1+2 i FPA w krwi wypływającej z nacięć skóry po

zastosowaniu heparyny niefrakcjonowanej lub drobnocząsteczkowej. Podobne wyniki uzyskano w badaniu innym badaniu z tego samego ośrodka, w którym po zastosowaniu heparyny niefrakcjonowanej u chorych poddawanych planowym zabiegom przezskórnej angioplastyki tętnic wieńcowych stwierdzono zmniejszenie o 90% w stosunku do wartości wyjściowych stężenia F1+2 w krwi wypływającej z nacięć skóry (217).

W modelu uszkodzenia mikrokrążenia stwierdziliśmy również znamienny wpływ heparyny na aktywację płytek. Analiza uwalniania sCD40L w krwi wypływającej z nacięć skóry wykazała istotne zahamowanie aktywacji płytek u chorych na zawał otrzymujących heparynę. Z wyjątkiem stężenia sCD40L w pierwszej minucie, wszystkie pozostałe zmierzone parametry były znamiennie mniejsze nie tylko w porównaniu z pozostałymi chorymi na zawał ale także z grupą CAD. W jednym z wymienionych powyżej badań zespołu Kyrlego (218), w którym poza parametrami generacji trombiny oceniano również stężenia β-tromboglobuliny w krwi wypływającej z nacięć skóry, stwierdzono zahamowanie aktywacji płytek u zdrowych ochotników po zastosowaniu heparyny niefrakcjonowanej lub drobnocząsteczkowej. Podobne wyniki przyniosło badanie tego samego zespołu przeprowadzone u chorych poddawanych planowym zabiegom przezskórnej angioplastyki tętnic wieńcowych, w którym stwierdzono zmniejszenie o 65% w stosunku do wartości wyjściowych stężenia β-tromboglobuliny w krwi wypływającej z nacięć po zastosowaniu heparyny niefrakcjonowanej (217).

Nowe obserwacje pokazują, że wpływ heparyny niefrakcjonowanej jest stosunkowo niewielki i sugerują, że heparyny drobnocząsteczkowo i inhibitory trombiny mogą prowadzić do silniejszego zahamowania generacji trombiny niż ta obserwowana w stabilnej CAD.

6.8 Ograniczenia badania

Zdecydowanie najważniejszym ograniczeniem tego badania była mała liczebność badanej populacji. Zwiększenie liczebności pozwoliłoby uzyskać lepszą dyskryminację między grupami oraz, być może, odnaleźć nowe korelacje między ocenianymi parametrami. Szczególnie istotne może być przebadanie większej grupy chorych leczonych wcześniej statynami, gdyż obecne liczebności – po 5 osób w każdej grupie – uniemożliwiły uzyskanie znamiennych statystycznie różnic w zakresie wielu ocenianych parametrów. Spośród ocenianych leczonych statyną niemal wszyscy otrzymywali simwastatynę w dawce 20 mg dziennie. Nie wiadomo zatem, czy inne statyny wywierają podobne działanie. Analiza korelacji przy takiej liczebności jest obarczona dużym błędem typu II. Jednak liczebność badanych grup była wystarczająca, aby stwierdzić wyraźne różnice między chorymi w grupie AMI a CAD pod względem generacji trombiny i aktywacji płytek, co potwierdza, że różnice między grupami są niewątpliwie duże.

Przystępując do badania nie planowano dalszej obserwacji chorych i oceny klinicznych punktów końcowych w przebiegu wewnątrzszpitalnym i obserwacji odległej. Wydłużenie obserwacji mogłoby przynieść interesujące wnioski dotyczące zależności między nasileniem aktywacji układu krzepnięcia w pierwszych godzinach ostrego zespołu wieńcowego a dalszym przebiegiem klinicznym i odległym rokowaniem. Jednak szansa stwierdzenia wystarczającej liczby incydentów klinicznych przy takiej liczebności grup jest znikoma. Dopiero duża grupa pozwoli ocenić wpływ badanych parametrów krzepnięcia na istotne punkty końcowe w AMI.

6.9 Podsumowanie

Wyniki niniejszego badania rzucają nowe światło na wpływ całkowitego lub prawie całkowitego zamknięcia naczynia wieńcowego na przebieg reakcji krzepnięcia w odpowiedzi na uszkodzenia naczynia na obwodzie. Jest to pierwsze badanie, w którym jednocześnie analizowano aktywność TF, poziom licznych czynników krzepnięcia oraz nasilenie generacji trombiny i aktywację płytek zarówno w krwi żylnej jak i w modelu uszkodzenia drobnych naczyń. Udało się zaobserwować interesujące zależności między stężeniami TF i FXIa oraz między TF i FXIa a parametrami opisującymi generację trombiny. Ocena aktywacji układu krzepnięcia w modelu uszkodzenia mikrokrążenia dostarczyła dodatkowych informacji na temat kinetyki generacji trombiny i aktywacji płytek w ostrej zakrzepicy tętniczej.

Wyniki niniejszego badania przyniosły pewne wnioski o znaczeniu klinicznym: aktywacja krzepnięcia w ostrych zespołach wieńcowych jest związana z uwalnianiem aktywnego TF a generacja trombiny ulega amplifikacji poprzez aktywację dodatkowego szlaku czynnika XIa. Wyniki te, choć uzyskane w niewielkiej grupie badanych wskazują, iż stosowanie statyn, oprócz udowodnionego znaczenia w prewencji ostrych zespołów wieńcowych mogą mieć również wpływ na krzepnięcie pomimo jego silnej aktywacji, co dodatkowo potwierdza ogromne znaczenie tych leków w leczeniu ACS.

Poznanie mechanizmów krzepnięcia pozwoli opracować optymalne leki przeciwzakrzepowe które będą mieć mniejsze niż aktualne ryzyko krwawienia. Nowe kierunki wskazują m. in. B. Furie i B.C. Furie (218). Ich zdaniem idealny lek powinien zapobiegać zakrzepicy ale nie hamować prawidłowej hemostazy, stąd kluczowe znaczenie ma poznanie mechanizmów hemostazy aktywnych w czasie zakrzepicy tętniczej manifestującej się jako ACS.

7. Wnioski

1. Ostry zespół wieńcowy prowadzi do wyraźnej systemowej aktywacji krzepnięcia, czego wyrazem jest ponad 2-krotny wzrost szybkości generacji trombiny po uszkodzeniu naczynia wraz z 2 razy szybszym uwalnianiem białek z płytek krwi w porównaniu ze stabilną chorobą wieńcową.

2. Ostry zespół wieńcowy, zwłaszcza zawał STEMI, w porównaniu ze stabilną chorobą wieńcową wiąże się z częstszym występowaniem w krwi krążącej aktywnego czynnika tkankowego i aktywnego czynnika XI, a ich stężenie jest związane z nasileniem generacji trombiny.

3. W przebiegu świeżego zawału serca generacja trombiny w odpowiedzi na uszkodzenie naczynia koreluje ze stężeniem interleukiny-6, ale nie ze stężeniem białka C-reaktywnego.

4. Wcześniejsze stosowanie statyn u chorych na świeży zawał serca powoduje upośledzenie generacji trombiny po uszkodzeniu naczynia ale nie wpływa na aktywację płytek krwi.

8. Streszczenie

Pęknięcie blaszki miażdżycowej i powstanie na jej powierzchni zakrzepu jest najczęstszą przyczyną ostrych zespołów wieńcowych (OZW). Czynnikiem inicjującym aktywację krzepnięcia jest ekspresja czynnika tkankowego (TF) obecnego we wnętrzu uszkodzonej blaszki. Szczegóły kinetyki reakcji krzepnięcia i czynniki modyfikujące ich przebieg u chorych na OZW, w tym rola czynnika XI (FXI), nie zostały w pełni poznane. Nie badano także w jaki sposób systemowa aktywacja krzepnięcia w OZW wpływa na generację trombiny i aktywację płytek po uszkodzeniu naczynia.

Inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoeznymu A (statyny) wykazują wiele działań przeciwmiażdżycowych poza obniżeniem stężenia cholesterolu. Obejmują one m.in. hamowanie aktywacji krzepnięcia związane ze zmniejszoną ekspresją TF. Nie badano jednak, czy przeciwzakrzepowe działanie statyn można wykryć w czasie OZW.

Celem pracy była ocena aktywacji układu krzepnięcia w odpowiedzi na uszkodzenie naczyń i w krwi krążącej u osób z OZW, w porównaniu z chorymi ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (ChNS). Dodatkowo oceniano stężenie aktywnego i immunoreaktywnego TF oraz aktywnego FXI w OZW a także zbadano wpływ tych czynników na lokalne reakcje krzepnięcia. Podjęto także próbę odpowiedzi na pytanie, czy stosowanie statyn przed wystąpieniem objawów niedokrwienia serca zmienia aktywację krzepnięcia u chorych z OZW.

W badaniu kliniczno-kontrolnym wzięło udział 53 pacjentów (42 mężczyzn) w wieku od 46 do 76 lat, w tym 28 chorych z zawałem serca (OZW), a wśród nich 16 z zawałem z uniesieniem odcinków ST (STEMI) i 12 z zawałem bez uniesienia ST (NSTEMI) oraz 25 osób ze stabilną ChNS. W ciągu pierwszych 20 minut od przyjęcia badano parametry aktywacji układu krzepnięcia w krwi żylnej oraz w modelu uszkodzenia drobnych naczyń skóry. W osoczu oznaczano stężenie fibrynogenu, β-tromboglobuliny, aktywnego FXI

(FXIa), aktywnego i immunoreaktywnego czynnika tkankowego (TF), selektyny P (P-sel), rozpuszczalnego ligandu CD40 (sCD40L), czynników krzepnięcia II, V, VII, VIII, IX, X, α_2-makroglobuliny, kompleksów trombina-antytrombina (TAT), fragmentów F1+2 protrombiny, aktywność antytrombiny (AT), inhibitora zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia (TFPI) i α_1-antytrypsyny. W surowicy krwi oznaczano stężenie białka C-reaktywnego (CRP), interleukiny 6 (IL-6), 8-izo-prostaglandyny $F_{2\alpha}$ (8-izo$PGF_{2\alpha}$). W krwi wypływającej z nacięć skóry przedramienia oznaczano stężenie sCD40L i TAT przedstawione jako jako funkcja czasu krwawienia.

Chorzy z OZW i stabilną ChNS nie różnili się od siebie pod względem wskaźników demograficznych, czynników ryzyka miażdżycy i przyjmowanych leków. W krwi żylnej chorych z OZW w porównaniu z pacjentami z ChNS stwierdzono czterokrotnie większe stężenia CRP (p=0,013) i o 76% większe stężenie IL-6 (p< 0,0001). Stężenie IL-6 było o 66% większe w grupie chorych STEMI w porównaniu z chorymi NSTEMI (p=0,0006). U chorych z OZW, w porównaniu z osobami z ChNS, zaobserwowano większe poziomy wskaźników aktywacji płytek: sCD40L o 360% (p<0,0001), selektyny P o 53% (p<0,0001) oraz β-tromboglobuliny o 19% (p=0,0009). U chorych STEMI stężenie sCD40L w krwi żylnej było o 85% większe w porównaniu z chorymi NSTEMI (p=0,0003). Aktywny TF wykryto u 9 z 24 (26,7%) badanych w grupie OZW, w tym u 7 chorych na zawał STEMI (50%) i 2 chorych na zawał NSTEMI (20%, p<0,0001) i u ani jednego chorego w grupie ChNS (p<0,0001). W grupie OZW w porównaniu z grupą ChNS stwierdzono trzykrotnie większy poziom czynnika XIa (p=0,02) oraz większe stężenie fragmentów F1+2 protrombiny i kompleksów TAT w krwi żylnej (p<0,0001), które były dodatkowo znamiennie większe u osób ze STEMI w porównaniu z NSTEMI (odpowiednio p=0,02 oraz p=0,04). Stężenie TAT w krwi żylnej u chorych na zawał wykazywało korelację z poziomem czynnika XIa (r=0,77; p<0,0001), TF immunoreaktywnego i aktywnego (odpowiednio r=0,51; p=0,01 i r=0,52; p=0,01) oraz z IL-6

(r=0,67; p<0,0001). W grupie ChNS stężenie TAT w krwi żylnej korelowało ze stężeniem IL-6 (r=0,69; p=0,0001).

W modelu uszkodzenia drobnych naczyń w grupie OZW w porównaniu z ChNS stwierdzono znacznie bardziej nasiloną generację trombiny wyrażoną większymi wartościami parametrów generacji TAT, takich jak: prędkość początkowa reakcji, prędkość maksymalna, stężenie maksymalne, średniej produkcji (wszystkie p<0,0001) oraz stężenia TAT w kolejnych minutach. W grupie OZW zaobserwowano korelacje między parametrami generacji trombiny a FXIa (r od 0,43 do 0,5; p≤0,03) i IL-6 (r od 0,42 do 0,51; p≤0,04), które nie występowały w grupie ChNS. Również dynamika uwalniania sCD40L z płytek w modelu uszkodzenia drobnych naczyń była znacznie większa u chorych z OZW (wszystkie oceniane parametry, p<0,0001). Aktywacja płytek nie zależała od nasilenia reakcji zapalnej w OZW. U chorych z OZW stężenie TAT w krwi żylnej pozostawało w korelacji z maksymalnym stężeniem TAT (r=0,46; p=0,03), początkową prędkością generacji TAT (r=0,49; p=0,01), średnią produkcją TAT (r=0,53; p=0,007) i średnią produkcją sCD40L (r=0,52, p=0,01) w modelu uszkodzenia mikrokrążenia, natomiast stężenie sCD40L w krwi żylnej było skorelowane z średnią maksymalną prędkością uwalniania sCD40L (r=0,49; p=0,02), maksymalnym stężeniem TAT (r=0,55; p=0,005), prędkością początkową generacji TAT (r=0,68; p=0,0002) i średnią maksymalną produkcją TAT (r=0,62; p=0,001). W grupie ChNS stężenie TAT w krwi żylnej było skorelowane tylko z maksymalną prędkością generacji TAT (r=0,44; p=0,03), nie zaobserwowano natomiast korelacji stężenia sCD40L w krwi żylnej z parametrami generacji trombiny i aktywacji płytek w modelu uszkodzenia mikrokrążenia. Nasilenie stresu oksydacyjnego, stężenie TF ani FXIa nie korelowały z generacją TAT ani uwalnianiem sCD40L mierzonymi po uszkodzeniu naczyń.

Wcześniejsze stosowanie statyn u chorych na zawał nie wpływało na parametry krzepnięcia i aktywacji płytek krwi oraz stanu zapalnego w krwi żylnej. W modelu uszkodzenia

mikrokrążenia przyjmowanie statyny przed OZW wiązało się ze zmniejszeniem prędkości początkowej generacji TAT ($p<0,0001$), maksymalnego stężenia TAT ($p=0,009$) i średniej produkcji TAT ($p=0,0007$). Wcześniejsze stosowanie statyn nie miało wpływu na lokalne uwalnianie sCD40L w grupie OZW z wyjątkiem istotnej różnicy stężenia sCD40L w 5 minucie krwawienia. Stwierdzono natomiast znamienny wpływ statyn na wszystkie wskaźniki uwalniania sCD40L w krwi wypływającej z nacięć skóry w grupie ChNS ($p<0,05$).

Podsumowując, przedstawione wyniki wskazują na silną aktywację osoczowego układu krzepnięcia i płytek krwi u chorych na OZW, a szczególnie osób ze STEMI. Uwagę zwracał zwiększony poziom aktywnego TF jak również aktywnego FXI w krwi krążącej, który korelował z nasileniem generacji trombiny. Wykazano, że ogólnoustrojowa aktywacja układu krzepnięcia i stanu zapalnego w OZW nasila generację trombiny i aktywację płytek w miejscu uszkodzenia drobnych naczyń. Udowodniono, że dynamika generacji trombiny w odpowiedzi na nacięcie skóry u chorych z OZW zależy od poziomu aktywnego czynnika XI. Ponadto zaobserwowano, że wcześniejsze stosowanie statyn u chorych na zawał serca powoduje istotne upośledzenie generacji trombiny po uszkodzeniu naczynia ale nie wpływa na aktywację płytek krwi. Przedstawione wyniki poszerzają naszą wiedzę na temat reakcji krzepnięcia zachodzących u pacjentów z OZW, wskazując jak potężny i złożony jest wpływ zakrzepu w tętnicy wieńcowej i niedokrwienia serca na hemostazę.

9. Summary

Rupture of an atherosclerotic plaque with subsequent formation of thrombus on its surface is the most common cause of acute coronary syndromes (ACS). Exposure of tissue factor (TF) present within the ruptured plaque is the trigger of the coagulation activation. Detailed kinetics of coagulation reactions and modifying factors in patients with ACS, particularly a role of factor XI (FXI), have not been fully understood yet. Neither has been investigated the impact of systemic activation of coagulation in ACS on local thrombin generation and platelet activation after vascular injury.

Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A (statins) exert a number of antiatherogenic actions besides cholesterol lowering. These include inhibition of coagulation activation by reduced TF expression. However, it has not been yet investigated if the effect of statins can be detected during the ACS.

The aim of this study was to assess activation of coagulation system in response to microvascular injury and in circulating blood in ACS patients compared to patients with stable coronary artery disease (CAD). In addition, levels of active and immunoreactive TF and active FXI were determined and the influence of both factors on local coagulant reactions was investigated. Moreover, an attempt was made to answer the question if the use of statins prior to myocardial ischemia alters the activation of coagulation in ACS patients.

The case-control study involved 53 subjects (42 male), aged 46 to 76, including 28 patients with ACS: STEMI (n=16) and NSTEMI (n=12) and 25 with stable CAD. The parameters of activation of coagulation in venous blood and in the model of small skin vessels injury were measured within 20 minutes of hospital admission. The levels of fibrinogen, β-thromboglobulin, active FXI (FXIa), active and immunoreactive TF, P selectin (P-sel), soluble ligand CD40 (sCD40L), coagulation factors II, V, VII, VIII, IX, X, α_2-macroglobulin, thrombin-antithrombin complexes (TAT), prothrombin fragments F1+2, antithrombin activity

(AT), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), and α_1-antitripsin were measured in plasma. The levels of C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6), 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-isoPGF$_{2\alpha}$) were measured in serum. The levels of sCD40L and TAT were measured as a function of time in blood oozing from bleeding time wounds on a forearm.

The ACS and CAD patients did not differ significantly in terms of demographic parameters, cardiovascular risk factors and medications. In venous blood of ACS patients compared to CAD there were 4 times higher levels of CRP ($p=0.013$) and 76% higher levels of IL-6 ($p< 0.0001$). The IL-6 concentration was 66% higher in STEMI group compared to NSTEMI patients ($p=0.0006$). In ACS patients compared to CAD group higher levels of platelet activation markers were noted: sCD40L by 360% ($p<0.0001$), P selectin by 53% ($p<0.0001$) and β-thromboglobulin by 19% ($p=0.0009$). In STEMI subjects sCD40L concentrations in venous blood were 85% higher than in NSTEMI patients ($p=0.0003$). Active TF was detected in 9 out of 24 (26.7%) patients in ACS group, including 7 STEMI (50%), 2 NSTEMI patients (20%, $p<0.0001$) and none in CAD group ($p<0.0001$). In ACS group compared to CAD group 3 times higher levels of FXIa ($p=0.02$), higher levels of F1+2 prothrombin fragments and TAT complexes in venous blood were observed ($p<0.0001$), and the two latter were significantly higher in STEMI group compared to NSTEMI ($p=0.02$ and $p=0.04$ respectively). Levels of TAT in venous blood of ACS patients correlated with FXIa ($r=0.77$; $p<0.0001$), immunoreactive and reactive TF ($r=0.51$; $p=0.01$ and $r=0.52$; $p=0.01$ respectively) and with IL-6 levels ($r=0.67$; $p<0.0001$). In CAD group venous TAT correlated only with IL-6 concentrations ($r=0.69$; $p=0.0001$). In a model of microvascular injury there was significantly enhanced thrombin generation expressed by increased parameters such as TAT production in ACS group compared with CAD: initial velocity of TAT generation, maximal velocity, peak TAT concentration, mean TAT production (all of above $p<0.0001$) and TAT concentrations in all consecutive minutes. In ACS group there were correlations between thrombin generation

and FXIa (r from 0.43 to 0.5; p≤0.03) and IL-6 (r from 0.42 to 0.51; p≤0.04), which were absent in CAD group. Also the dynamics of sCD40L release from platelets in vascular injury model was significantly enhanced in ACS patients (all parameters, p<0.0001). In ACS patients platelet activation did not depend on the degree of inflammatory activation. In CAD group TAT concentrations in venous blood correlated with peak TAT concentration (r=0.46; p=0.03), initial velocity of TAT generation (r=0.49; p=0.01), mean TAT production (r=0.53; p=0.007) and mean sCD40L release (r=0.52, p=0.01) in our model; whereas sCD40L concentration in venous blood correlated with maximal mean sCD40L release (r=0.49; p=0.02), peak TAT concentration (r=0.55; p=0.005), initial velocity of TAT generation (r=0.68; p=0.0002) and maximal mean TAT production (r=0.62; p=0.001). In CAD group venous TAT concentration correlated only with maximal velocity of TAT generation (r=0.44; p=0.03). No correlations of venous sCD40L with parameters of thrombin generation and platelet activation in the vascular injury model were observed. Markers of TAT generation and sCD40L release in the model of microvascular injury did not correlate with the degree of oxidative stress nor the levels of TF and FXIa.

Prior use of statins in ACS subjects did not affect the markers of coagulation, platelet activation and inflammation measured in venous blood. In a model of microvascular injury use of statins prior to ACS was associated with a significant decrease of initial velocity of TAT generation (p<0.0001), peak TAT concentration (p=0.009) and mean TAT production (p=0.0007). Prior use of statins did not alter local release of sCD40L in ACS group with exception of significant difference of sCD40L concentration in the 5th minute of bleeding. Statins did significantly diminish all parameters of local sCD40L release in CAD patients.

In summary, the data confirm strong activation of coagulation and platelets in patients with ACS, particularly in subjects with STEMI, with increased levels of active TF and active FXI in circulating blood which correlated with degree of thrombin generation. We proved that

systemic activation of coagulation and inflammation in ACS enhances thrombin generation and platelet activation at the site of vascular injury. Moreover, these results demonstrated that dynamics of thrombin generation in response to skin incision in patients with ACS depend on levels of active factor XI. Use of statins prior to ACS significantly impairs thrombin generation but does not alter the activation of platelets after vascular injury. These results expand our knowledge about the coagulation in ACS patients indicating potent and complex impact of coronary artery thrombosis and myocardial ischemia on hemostasis.

10. Piśmiennictwo

1. Fuster V., Moreno P., Fayad Z., Corti R., Badimon J. Atherothrombosis and high-risk plaque. Part I: Evolving concepts. *Journal of American College of Cardiology*, 2005; 46:937-954,
2. Hansson G. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352:1685-1695
3. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction as marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2003;23:168-175.
4. Ignarro LJ, Napoli C. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis *Current Atherosclerosis Reports* 2004;6:281-287
5. Voetsch B, Jin RC, Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis *Histochemistry and Cell Biology* 2004;122:353-367.
6. Ravensbergen J., Ravensbergen JV, Krijger J., Hillen B., Hoogstraten H. Localizing role of hemodynamics in atherosclerosis in several human vertebrobasilar junction geometries *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1998;18:708-716
7. Malek A., Alper S., Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis *Journal of American Medical Association* 1999;282:2035-2042
8. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature *Circulation Research* 1999;85:753-766.
9. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseasesthe role of oxidant stress. *Circulation Research* 2000;87:840-844.
10. Heineke J. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*. 1998; 141: 1–5
11. Rader D. Inflammatory markers of coronary risk. *New England Journal of Medicine*. 2000; 343: 1179–1182.
12. Khalil M, Wagner W, Goldberg I. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004;24:2211-2218
13. Berliner J, Leitinger N, Watson A, Huber J, Fogelman A, Navab M. Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 78: 195–199.
14. Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* 2003;108:661-663
15. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation Research* 2004;95:764-772
16. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2002;22: 1547-59
17. Miller Y, Chang M, Binder ., Shaw P, Witzum J. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors *Current Opinion in Lipidology* 2003; 14: 437-445

18. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 2002;105:2107-2111
19. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis *Arteriosclerosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21:1876-1890
20. Bjorkbacka H, Kunjathoor V, Moore K. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nature Medicine*. 2004;10: 416-421
21. Rosenfeld ME. Leukocyte recruitment into developing atherosclerotic lesionsthe complex interaction between multiple molecules keeps getting more complex. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2002;22:361-363
22. Frostegard J, Ulfgren A, Nyberg P. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of proinflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145: 33-43
23. Lee W., Jain M., Arkonac B. Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines *Circulation Research* 1998;82:845-851
24. van der Wal A, Becker A, van der Loos C, Das P. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36-44.
25. Moreno P, Falk E, Palacios I, Newell J, Fuster V, Fallon J. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-778.
26. Amento E, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1991;11:1223-1230.
27. Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997;96:396-399.
28. Shah PK, Galis ZS. Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture players keep piling up but questions remain. *Circulation* 2001;104:1878-1880.
29. Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004;24:1359-1366.
30. Agewall S. Acute and stable coronary heart disease: different risk factors. *European Heart Journal* 2008; 29:1927-9.
31. Lutgens E, van Suylen R, Faber B, Gijbels M, Eurlings P, Bijnens A, Cleutjens K, Heeneman S, Daemen M. Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2003; 23: 2123 - 2130.
32. Fuster V., Moreno P., Fayad Z., Corti R., Badimon J. Atherothrombosis and high-risk plaque. Part I: Evolving concepts. *Journal of American College of Cardiology*, 2005; 46:937-954,
33. Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndromes: Unstable Angina and non-Q-wave myocardial infarction. Circulation 1998; 97:1195-1206

34. Mackman N. Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004;24:1015-1022
35. Ardissino D, Merlini P, Bauer K, Bramucci E, Ferrario M, Coppola R, Fetiveau R, Lucreziotti S, Rosenberg R, Mannuccio Mannucci P. Thrombogenic potential of human coronary atherosclerotic plaques. *Blood* 2001; 98: 2726 - 2729
36. Wilcox J., Smith K., Schwartz S., Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 2839-2843
37. Ahamed J., Versteeg H., Kerver M., Chen V., Mueller B., Hogg P., Ruf W. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 13932-7
38. Monroe D, Key N. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007; 5: 1097
39. Moreno P, Bernardi V, Lopez-Cuellar J, Murcia A, Palacios I, Gold H, Mehran R, Sharma S, Nemerson Y, Fuster V, Fallon J. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina: implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996; 94: 3090 – 3097
40. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JWA, Radder JK. Elevated numbers of tissue factor-exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002;106: 2442-2447
41. Balasubramanian V, Grabowski E, Bini A, Nemerson Y. Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images of thrombus formation and propagation under defined flow conditions. *Blood* 2002;100: 2787-2792
42. Bach R. Tissue factor encryption. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2006;26: 456-461
43. Drake T, Ruf W., Morrissey J., Edgington T. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lypopolisaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *Journal of Cell Biology* 1989; 109: 389-95
44. Le D., Rapaport S., Rao L. Relations between factor VIIa binding and expression of factor VIIa/tissue factor catalytic activity on cell surfaces. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 15447-54
45. Butenas S, Bouchard B, Brummel-Ziedins K, Parhami-Seren B, Mann K. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 2005; 105: 2764 - 2770
46. Bach R., Moldov C. Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells. *Blood* 1997;89: 3270-6
47. Ott I., Fischer E., Miyagi Y., Mueller B., Fuf W. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *Journal of Cell Biology* 1998; 140:1241-1253
48. Zioncheck T., Roy S., Vehar G. The cytoplasmic domain of tissue factor is phosphorylated by a protein kinase C-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:3561-4
49. Carson S., Bromberg M. Tissue factor encryption/de-encryption is not altered in the absence of the cytoplasmic domain. *Thrombosis and Haemostasis* 2000;84: 657-663
50. Schecter A., Giesen P., Taby O., Rosenfield CL., Rossikhina M., Fyfe B., Kohtz D., Fallon J., Nemerson Y., Taubman M. Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100:2276-2285

51. Camerer E., Trejo A. Cryptic messages: Is noncoagulant tissue factor reserved for cell signaling? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103;14259-14260
52. Bogdanov V, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nature Medicine* 2003; 4:458-462
53. Butenas S, Bouchard B, Brummel-Ziedins K, Parhami-Seren B, Mann K. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 2005; 105: 2764 - 2770
54. Rao L, Williams T., Rapaport S. Studies of the activation of factor VII bound to tissue factor *Blood* 1996; 87: 3738-3748
55. Rao L, Rapaport S, Bajaj S Activation of human factor VII in the initiation of tissue factor-dependent coagulation. *Blood* 1986;68:685
56. . Ovanesov M, Ananeyva N, Panteleev M, Atullakhanov F, Saenko E. Initiation and propagation of coagulation from tissue factor-bearing cell monolayers to plasma: initiator cells do not regulate spatial growth rate. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3:321-331
57. Neuenschwander PF, Jesty J. Thrombin-activated and factor Xa-activated human factor VIII: differences in cofactor activity and decay rate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1992;296:426–434.
58. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and true receptor. *Thrombosis and Haemostasis* 2002; 86: 66–74.
59. Minnema M., Peters R., de Winter R., Lubbers Y., Barzegar S., Bauer K., Rosenberg R., Hack C., ten Cate H. Activation of clotting factors XI and IX in patients with acute myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2000;20: 2489-2493
60. von dem Borne P., Bajzar L., Meijers J., Nesheim M., Bouma B. Thrombin-mediated activation of factor XI results in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *Journal of Clinical Investigation* 1997;10:2323-2327
61. Wielders S, Béguin S, Hemker H, Lindhout T. Factor XI–Dependent Reciprocal Thrombin Generation Consolidates Blood Coagulation when Tissue Factor Is Not Available *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004;24;1138-1142
62. von dem Borne P, Cox L, Bouma B. Factor XI enhances fibrin generation and inhibits fibrinolysis in a coagulation model initiated by surface-coated tissue factor. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2006; 17: 251–257
63. Gailani D., Broze G., Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991;253: 909-912
64. Seligsohn U. Factor XI in haemostasis and thrombosis: Past, present and future. *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 98: 84–89
65. Gulba D, Barthels M, Westhoff-Bleck M, Jost S, Rafflenbeul W, Daniel W, Hecker H, Iichten P. Increased thrombin levels during thrombolytic therapy in acute myocardial infarction: Relevance for the success of therapy. *Circulation* 1991;83: 937-944
66. Vila V, Martinez-Salez V, Reganon E. Effects of unfractionated and low molecular weight heparins on plasma levels of hemostatic factors in patients with acute coronary syndromes. *Haematologica* 2001;86:729-734

67. Hoffmeister H., Ehlers R., Buttcher E. Relationship between minor myocardial damage and inflammatory acute-phase reaction in acute coronary syndromes. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2003;15:33-39
68. Andrews R., Gardiner E., Shen Y., Whisstock J.,Berndt M. Molecules in focus: Glycoprotein Ib-IX-V. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2003; 35:1170-1174
69. Kamath S, Blann A, Lipp G. Platelet activation: assessment and quantification. *European Heart Journal* (2001) 22, 1561–1571
70. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri Z. Mechanisms of platelet aggregation. *Current Opinion in Hematology* 2001; 8:270-276
71. Eidt J., Allisson P, Nobel S. Thrombin is an important mediator of platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries with endothelial injury. *Journal of Clinical Investigation* 1989; 84: 18-27
72. Hansen S., Harker L.A. Interruption of acute platelet-dependent thrombosis by synthetic antithrombin PPACK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85:3184-3188
73. Kahn M. Zheng Y., Huang W, Bigornia V., Zeng D., Moff S., Farese J. Tam C., Coughlin S. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 1998; 394:690-694
74. Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczek RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001;98:1047-1054
75. Lee Y, Lee WH, Lee SC, et al. CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome. *Cardiology* 1999;92:11-16
76. Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, Leong GY, Phillips DR, Gold HK. Cardiopulmonary bypass induces release of soluble CD40 ligand. *Circulation* 2002;105:2849-2854.
77. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:4-43.
78. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-594.
79. Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human Bcells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 1986;83:4494-4498.
80. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*. 1992;357:80-82.
81. Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, et al. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thrombosis and Haemostasis* 1998;80:1008–1014.
82. Zhou L, Stordeur P, de Lavareille A, et al. CD40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent procoagulant activity. *Thrombosis and Haemostasis* 1998;79:1025–1028.
83. Deschanet J, Grosset C, Taupin JL, et al. CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *Journal of Immunology* 1997;159:5640–5647.
84. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman J. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2005;25;2428-2434
85. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998;394:200-203.

86. Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, et al. Requirement for CD 154 in the progression of atherosclerosis. *Nature Medicine* 1999;5:1313-1316.
87. Schönbeck U, Libby P. CD40 Signaling and Plaque Instability *Circulation Research* 2001;89;1092-1103
88. Lutgens E, Cleutjens K, Heeneman S, Koteliansky V, Burkly L, Daemen M. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97;7464-7469
89. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997;96:396-399
90. Kotowicz K, Dixon G, Klein N, Peters M, Callard R. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology* 2000;100:441-448
91. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4342-4346.
92. Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation* 2002;106:399-402.
93. Aukrust P, Müller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum N, Forfang K, Frøland S, Gullestad L. Enhanced Levels of Soluble and Membrane-Bound CD40 Ligand in Patients With Unstable Angina : Possible Reflection of T Lymphocyte and Platelet Involvement in the Pathogenesis of Acute Coronary Syndromes *Circulation* 1999;100;614-620
94. Varo N, Lemos J, Libby P, Morrow D, Murphy S, Nuzzo R, Gibson M, Cannon C, Braunwald E, Schönbeck U. Soluble CD40: Risk Prediction After Acute Coronary Syndromes *Circulation.* 2003;108:1049
95. Lim H, Blann A, Lip G. Soluble CD40 Ligand, Soluble P-Selectin, Interleukin-6, and Tissue Factor in Diabetes Mellitus: Relationships to Cardiovascular Disease and Risk Factor Intervention *Circulation* 2004;109;2524-2528
96. Hoong Sern Lim, Andrew D. Blann and Gregory Y.H. Lip Soluble CD40 Ligand, Soluble P-Selectin, Interleukin-6, and Tissue Factor in Diabetes Mellitus: Relationships to Cardiovascular Disease and Risk Factor Intervention *Circulation* 2004;109;2524-2528
97. Bermudez EA, Rifai N, Buring J, et al. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vasculoar Biology*. 2002;22:1668–1673.
98. Nobes C, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell
1. movement. *Journal of Cell Biology* 1999;144:1235–44.
99. Ridley AJ. Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Current Opinion in Genetical Development* 1995;5:24–30.

100. Datta S., Brunet A., Greenberg M. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Development* 1999 13:2905–2927
101. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Medicine* 2000;6:1004–1010
102. Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. VA statins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1997; 17: 265–272.
103. Hilgendorff A, Muth H, Parviz B, Stauitz A, Haberbosch W, Tillman H, Holschermann H. Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003; 41: 397–401.
104. 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
105. Cortellaro M, Cofrancesco E, Arbustini E, Rossi F, Negri A, Tremoli E, Gabrielli L, Camera M. Atorvastatin and thrombogenicity of the carotid atherosclerotic plaque: the ATROCAP study. *Thrombosis and Haemostasis* 2002; 88: 41–47
106. Morishita E, Minami S, Ishino C, Kanno M, Uotani C, Asakura H, Matsuda T, Nakao S. Atorvastatin reduces plasma levels of factor VII activity and factor VII antigen in patients with hyperlipidemia. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2002; 9: 72–77
107. Porreca E, Di Febbo C, Amore C, Di Castelnuovo A, Baccante G, Donati MB, Cuccurullo F, Iacoviello L. Effect of lipid-lowering treatment on factor VII profile in hyperlipidemic patients. *Thrombosis and Haemostasis* 2000; 84: 789–793.
108. Sbarouni E, Melissari E, Kyriakides ZS, Kremastinos DT. Effecs 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. *American Journal of Cardiology* 2000; 86: 80–83.
109. Undas A, Celinska-Löwenhoff M, Kaczor M, Musial J. New nonlipid effects of statins and their clinical relevance in cardiovascular disease. *Thrombosis and Haemostasis* 2004; 91: 1065–1077
110. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins. Implications for cardiovascular event reduction. *JAMA.* 1998; 279: 1643–1650.
111. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001; 21: 1712–1719.
112. Szczeklik A, Musial J, Undas A, Gajewski P, Gora P, Swadzba J, Jankowski M. Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. *Journal of American College of Cardiology* 1999; 33: 1286–1293.
113. Musial J, Undas A, Undas R, Brozek J, Szczeklik A. Treatment with simvastatin and low dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline high cholesterol levels. *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 85: 221–225.

114. 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
115. Olivotti L, Ghigliotti G, Spallarossa P, Leslie S, Rossettin P, Barsotti A, Brunelli C. High doses of atorvastatin do not affect activity of prothrombinase in patients with acute coronary syndromes. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 2002; 13: 315–322.
116. Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (Reduction of Cholesterol in Ischaemia and Function of the Endothelium) trial. *Circulation* 1999; 99: 3227–3233.
117. 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
118. Esmon CT The protein C pathway. *Chest* 2003; 124 (3 suppl): 26S–32S.
119. Ambrosi P, Aillaud MF, Habib G, Kreitmann B, Metras D, Luccioni R, Bouvenot G, Juhan-Vague I. Fluvastatin decreases soluble thrombomodulin in cardiac transplant recipients. *Thrombosis and Haemostasis* 2000; 83: 46–48
120. Masamura K, Oida K, Kanehara H, Suzuki J, Horie S, Ishii H, Miyamori I. Pitavastatin-induced thrombomodulin expression by endothelial cells acts via inhibition small G proteins of the Rho family. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2003; 23: 512–516
121. Shi J, Wang J, Zheng H, Ling W, Joseph J, Li D, Mehta JL, Ponnappan U, Lin P, Fink LM, Hauer-Jensen M. 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 Coagulation and Fibrinolysis.* 2003; 14: 575–585.
122. Morishita E, Asakura H, Saito M, Yamazaki M, Ontachi Y, Mizuta K, Kato M, Matsuda T, Nakao S. Elevated plasma levels of free-form of TFPI antigen in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.* 2001; 154: 203–212.
123. Hansen JB, Huseby KR, Huseby NE, Sandset PM, Hanssen TA, Nordoy A. Effect of cholesterol lowering on intravascular pools of TFPI and its anticoagulant potential in type II hyperlipidemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1995; 15: 879–885.
124. Lorena M, Perolini S, Casazza F, Milani M, Cimminiello C. Fluvastatin and tissue factor pathway inhibitor in type IIA and IIB hyperlipidemia and in acute myocardial infarction. *Thrombosis Research* 1997; 87: 397–403
125. Zawadzki C, Susen S, Richard F, Haulon S, Corseaux D, Jeanpierre E, Vincentelli A, Lucas C, Torpier G, Martin A, Van Belle E, Staels B, Jude B. Dyslipidemia shifts the tissue factor/tissue factor pathway inhibitor balance toward increased thrombogenicity in atherosclerotic plaques: evidence for a corrective effect of statins. *Atherosclerosis* 2007; 195:117-25
126. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group: Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-1389

127. Sacks F, Pfeffer M, Moye L, Rouleau J, Ruthrford J, Cole T, Brown L, Warnica J, Arnold J, Wun C, Davis B, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels: Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators. *The New England Journal of Medicine* 1996; 335:1001-1009
128. The Lipid Study Group Long-term effectiveness and safety of pravastatin in 9014 patients with coronary heart disease and average cholesterol concentrations: the LIPID trial follow-up. *Lancet,* 2002; 359: 1379-1387
129. Shepherd J, Cobbe S, Ford I, Isles C, Ross Lorimer A, Macfarlane P, McKillop J, Packard C. for The West of Scotland Coronary Prevention Study Group Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *The New England Journal of Medicine* 1995; 333:1301-1308
130. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease J.C. LaRosa, S.M. Grundy, D.D. Waters, C. Shear, P. Barter, J.-C. Fruchart, A.M. Gotto, H. Greten, J.J. Kastelein, J. Shepherd, N.K. Wenger, for the Treating to New Targets (TNT) Investigators *The New England Journal of Medicine,* 2005; 352: 1425-1435
131. Thavendiranathan P, Bagai A, Brookhart M, Choudhry N. Primary prevention of cardiovascular diseases with statin therapy - a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of Internal Medicine,* 2006; 166: 2307-2313
132. O'Regan C, Wu P, Arora P, Perri D, Mills E. Statin therapy in stroke prevention: a meta-analysis involving 121 000 patients**.** *The American Journal of Medicine,* 2008; 121: 24-33
133. Heeschen C., Hamm C.W, Laufs U. i wsp., Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Investigators: Withdrawal of statins increases event rates in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 105: 1446-1452
134. PURSUIT Aronow H.D., Topol E.J., Roe M.T. i wsp.: Effect of lipid-lowering therapy on early mortality after acute coronary syndromes: an observational study. *Lancet* 2001; 357: 1063-1068
135. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T; Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled study. *Journal of American Medical Association* 2001;285:1711–1718
136. Cannon C, Braunwald E, McCabe C, Rader D, Rouleau J, Belder R, Joyal S, Hill K, Pfeffer M, Skene A, for the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy - Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators *The New England Journal of Medicine,* 2004; 350: 1495-1504
137. de Lemos J.A., Blazing M.A., Wiviott S.D. i wsp.: Early intensive vs a delayed conservative simvastatin strategy in patients with acute coronary syndromes: phase 2 of the A to Z trial. *Journal of American Medical Association* 2004; 292: 1307-1316
138. S43. Patti G, Pasceri V, Colonna G, Miglionico M, Fischetti D, Sardella G, Montinaro A, Di Sciascio G. Atorvastatin pretreatment improves outcomes in patients with acute coronary syndromes undergoing early percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA-ACS randomized trial. *Journal of American College of Cardiology* 2007; 49:1272-8.

139. Antman et al., Management of Patients With STEMI: Executive Summary. *Journal of American College of Cardiology* 2004;44:671-719
140. Allain CC, Poon LC, Chan SC, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry* 1974; 20:470-475.
141. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglicerydes by use of enzymes. *Clinical Chemistry* 1973; 19:476-482.
142. Friedewald WT, Levy RI, Friedrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; 18:499-504
143. Cawthern KM, van 't Veer C, Lock JB, DiLorenzo ME, Branda RF, Mann KG. Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C. *Blood* 1998;91:4581-4592
144. Higgins DL, Mann KG. The interaction of bovine factor V and factor V-derived peptides with phospholipid vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 1983;258:6503-6508
145. Parhami-Seren B, Butenas S, Krudysz-Amblo J, Mann KG. Immunologic quantitation of tissue factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006;4:1747-1755
146. Brummel-Ziedins K, Pouliot R, Mann K. Thrombin generation: phenotypic quantitation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003; 2:281-288
147. Brummel-Ziedins K, Vossen C, Rosendaal R, Umezaki K, Mann K. The plasma hemostatic proteome: thrombin generation in healthy individuals. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3:1472-1481
148. Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thrombosis and Haemostasis* 1984; 52:210
149. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis and Rheumatology* 2002;46: 2857-2866.
150. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002;13: 247-253.
151. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 2311-2315.
152. Takahashi H, Satoh N, Wada K, Takakuwa E, Seki Y, Shibata A. Tissue factor in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Hematology* 1994;46: 333-337
153. So AK, Varisco P-A, Kemkes-Matthes B, et al. Arthritis is linked to local and systemic activation of coagulation and fibrinolysis pathways. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003;1: 2510-2515.
154. Parhami-Seren B., Butenas S., Krudysz-Amblo J., Mann K. Immunologic quantitation of tissue factors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006;4: 1747-1755
155. Butenas S, Orfeo T, Mann K. Tissue factor activity and function in blood coagulation. *Thrombosis Research* 2008; 122 Suppl. 1:42–46
156. Bogdanov V, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nature Medicine* 2003; 4:458-462
157. Bogdanov V, Kirk R, Miller C, Hathcock J, Vele S, Gazdoiu M, Nemerson Y, Taubman M. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4:158-167

158. Morange P, Blankenberg S, Alessi M, Bickel C, Rupprecht H, Schnabel R, Lubos E, Munzel T, Peetz D, Nicaud V, Juhan-Vague I, Tire L. Prognostic value of plasma tissue factor and tissue factor pathway inhibitor for cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007; 5:475-482
159. Murakami T., Komiyama Y., Masuda M., Karakawa M., Iwasaka T., Takahashi H. Evaluation of factor XIa-a1-antitrypsin in plasma, a contact phase-activated coagulation factor-inhibitor complex, in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1995;15:1107-1113
160. Butenas S, Undas A, Gissel M, Szuldrzynski K, Zmudka K, Mann K. Factor XIa and tissue factor activity in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and Haemostasis* 2008 99 1: 142-149.
161. Wuillemin W., Minnema M., Meijers J., Roem D., Ehrenberg A., Nuijens J., ten Cate H. Hack C. Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring factor XIa-protease complexes: major role of C1-inhibitor. *Blood* 1995;85: 1517-1526
162. Wuillemin W., Hack C., Bleeker W., Biemond B., Levi M., ten Cate H. Inactivation of factor XIa in vivo: studies in chimpanzees and humans. *Thrombosis and Haemostasis* 1996;76: 549-555
163. Scott C., Schapira M., James H., Cohen A., Colman R. Inactivation of factor XIa by plasma protease inhibitors: predominant role of alpha 1-protease inhibitor and protective effect of high molecular weig kininogen. *Journal of Clinical Investigation* 1982;69: 844-852
164. Altieri P., Devoto E., Spallarosa P., Rossetin P., Garibaldi S., Bertero G., Balbi M., Barsotti A., Brunelli C., Ghigliotti G. Acute coronary syndromes do not promote prolonged in vivo FXII-dependent prothrombotic activity. *Thrombosis Research* 2005;115: 65-72
165. Butenas S., Dee J., Mann K. The function of factor XI in tissue factor-initiated thrombin generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003;1:2103-2111
166. Oliver J., Monroe D., Roberts H., Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19: 170-177
167. Baird T, Walsh P. The interaction of factor XIa with activated platelets but not endothelial cells promotes the activation of factor IX in the consolidation phase of blood coagulation. The *Journal of Biological Chemistry* 2002;277: 38462-38467
168. He R., Xiong S., He X., Liu F, Han J., Li J., He S. The role of factor XI in a dilute thromboplastin assay of extrinsic coagulation pathway. *Thrombosis and Haemostasis* 2001;85: 1055-1059
169. Merlini P, Bauer K, Oltrona L. Persistent activation of coagulation mechanism in unstable angina and myocardial infarction. *Circulation* 1994;90:61-68
170. Merlini P, Bauer K, Oltrona L, Ardissino D, Cattaneo M, Belli C, Mannucci P, Rosenberg R. Persistent activation of coagulation mechanism in unstable angina and myocardial infarction. *Circulation* 1994; 90: 61 - 68
171. Weiss H, Lages B. Evidence for tissue factor-dependent activation of the classic extrinsic coagulation mechanism in blood obtained from bleeding time wounds. *Blood* 1988; 71:629-635.
172. Undas A., Brummel K., Musiał J., Mann K., Szczeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor V, and factor XIII and by enhancing factor Va inactivation. *Circulation* 2001;203: 2248-2253

173. Fuchs I, Frossard M, Spiel A, Riedmuller E, Laggner AN, Jilma B. Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4: 2547–2552.
174. Van de Werf F, Ardissino D, Betriu A, Cokkinos D, Falk E, Fox K, Julian D, Lengyel M, Neumann F, Ruzyllo W, Thygesen C, Underwood S, Vahanian A, Verheugt F, Wijns W. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 2003; 24: 28–66.
175. Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KA, Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 105: 2166–71.
176. André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad S, Phillips D. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106;896-899
177. Garlichs C, Eskafi S, Raaz D i wsp. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001;86:649–655.
178. Kyrle P, Westwick J, Scully M, Kakkar V, Lewis G. Investigation of the interaction of blood platelets with the coagulation system at the site of plug formation in vivo in man – effect of low-dose aspirin. *Thrombosis and Haemostasis* 1987;57:62-66
179. Undas A., Celińska-Lowenhoff M., Domagała TB, Iwaniec T., Dropiński J., Lowenhoff T., Szczeklik A. Early antithrombotic and antiinflammatory effects of simvastatin versus fenofibrate in patients with hypercholesterolemia *Thrombosis and Haemostasis* 2005; 94:193-199
180. Undas A., Celińska-Lowenhoff M., Stępień E., Niżankowski R., Tracz W., Szczeklik A. Effects of simvastatin on angiogenic growth factors released at the site of microvascular injury *Thrombosis and Haemostasis* 2006; 95:1045-1047
181. Undas A, Szuldrzynski K, Brummel-Ziedins K, Tracz W, Zmudka K, Mann K. Systemic blood coagulation activation in acute coronary syndromes. *Blood* 2008; doi:10.1182/blood-2008-07-167411
182. Gabriel A, Ahnve S, Wretlind B, Martinsson A. IL-6 and IL-1 receptor antagonist in stable angina pectoris and relation of IL-6 to clinical findings in acute myocardial infarction. *Journal of Internal Medicine* 2000; 248: 61-66
183. De Servi S, Mariani M, Mariani G, Mazzone A. C-reactive protein increase in unstable coronary disease: Cause or effect? *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 46:1496 –502
184. Maier W, Altwegg L, Corti R, Gay S, Hersberger M, Maly F, Sütsch G, Roffi M, Neidhart M, Eberli F, Tanner F, Gobbi S, von Eckardstein A, Lüscher T. Inflammatory Markers at the Site of Ruptured Plaque in Acute Myocardial Infarction: Locally Increased Interleukin-6 and Serum Amyloid A but Decreased C-Reactive Protein. *Circulation* 2005; 111: 1355 - 1361.
185. Cusack M, Marber M, Lambiase P, Buknall C, Redwood S. Systemic inflammation in unstable angina is the result of myocardial necrosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;39:1917–1923
186. Li T., Wang H., He S. Induction of interleukin-6 release from monocytes by serine proteinases and its potential mechanisms. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2006;64:10-16
187. Song J., Song K., Choi J., Kim S., Rhee J-H. Plasma level of IL-6 and its relationship to procoagulant and fibrinolytic markers in acute ischemic stroke. *Yonsei Medical Journal.* 2006; 47:201-206

188. Marucci R., Gori A.M., Gianotti F., Baldi M., Verediani V., Del Pace S., Nozzoli C., Abbate R. Markers of hypercoagulability and inflammation predict mortality in patients with heart failure *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2006;4: 1017–1022.
189. Steiner S, Speidl W, Pleiner J, Seidinger D, Zorn G, Kaun C, Wojta J, Huber K, Minar E, Wolzt M, Kopp C. Simvastatin Blunts Endotoxin-Induced Tissue Factor In Vivo. *Circulation* 2005; 111: 1841-1846.
190. Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. VA statins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 1997; 17: 265–272.
191. Hilgendorff A, Muth H, Parviz B, Stauitz A, Haberbosch W, Tillman H, Holschermann H. Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes. *International Journal of Clinical Pharmacolgical Therapy.* 2003; 41: 397–401.
192. Ferro D, Basili S, Alessandri C, Cara D, Violi F. Inhibition of tissue-factor-mediated thrombin generation by simvastatin. *Atherosclerosis.* 2000; 149: 111–116.
193. 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.
194. Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T, Ohkawara H, Shindo J, Yokoya K, Sugimoto K, Sakarada S, Takuwa Y, Nakamura S, Teramoto T, Maruyama Y. Rho/Rho-kinase is involved in the synthesis of tissue factor in human monocytes. *Atherosclerosis.* 2002; 163: 39–47.
195. Sukhova GK, Williams JK, Libby P. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 2002; 22: 1452–1458.
196. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furuka M, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. An HMG-CoA inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation.* 2001; 103: 276–283
197. Bea F, Blessing E, Shelley MI, Shultz JM, Rosenfeld ME. Simvastatin inhibits expression of tissue factor in advanced atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice independently of lipid lowering. *Atherosclerosis.* 2003; 167: 187–194.
198. Baetta R, Camera M, Comparato C, Altana C, Ezekowitz MD, Tremoli E. Fluvastatin reduces tissue factor expression and macrophage accumulation in carotid lesions of cholesterol-fed rabbits in absence of lipid lowering. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 2002; 22: 692–698.
199. Undas A, Brummel-Ziedins K, Potaczek D, Stobiecka-Dzierżek B, Bryniarski L, Szczeklik A, Mann K. Atorvastatin and quinalapril inhibit blond coagulation In patients with coronary artery disease following 28 days of therapy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 4:2397-2404
200. Olivotti L, Ghigliotti G, Spallarossa P, Leslie S, Rossettin P, Barsotti A, Brunelli C. High doses of atorvastatin do not affect activity of prothrombinase in patients with acute coronary syndromes. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 2002; 13: 315–322
201. Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (Reduction of Cholesterol in Ischaemia and Function of the Endothelium) trial. *Circulation.* 1999; 99: 3227–3233

202. Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, Tesauro M, Sorge R, Lauro R, Violi F. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 2005; 111:412-419

203. Masao Takemoto; James K. Liao Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2001;21:1712.

204. Huhle G, Abletshauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thrombosis Research.* 1999; 95: 229–234.

205. Ferroni P, Basili S, Santilli F, Davi G. Low-density likpoprotein-lowering medication and platelet function. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35:346-354

206. Garlichs CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M, Goppelt-Struebe M, Schmieder R, Daniel WG. Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation.* 2001; 104: 2395–2400

207. Schönbeck U, Gerdes N, Varo N, Reynolds RS, Horton DB, Bavendiek U, Robbie L, Ganz P, Kinlay S, Libby P. Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation.* 2002; 106: 2888–2893

208. Semb AG, Van Wissen S, Ueland T, Smilde T, Waehre T, Tripp MD, Froland SS, Kastelein JJ, Gullestad L, Pedersen TR, Aukrust P, Stalenhoef AF. Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: downregulatory effect of statin therapy. *Journal of American College of Cardiology.* 2003; 41: 275–279

209. Kinlay S, Schwartz G, Olsson A, Rifai N, Sasiela W, Szarek M, Ganz P, Libby P for the Myocardial Ischaemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering Study Investigators. Effect of atorvastatin on risk of recurrent cardiovascular events after an acute coronary syndrome associated with high soluble CD40 ligand in the myocardial ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering (MIRACL) study. *Circulation* 2004; 110:386-391

210. Flather M, Weitz J, Yusuf S, Pogue J, Sussex B, Campeau J, Gill J, Schuld R, Joyner C, Morris A, Lai C, Theroux P, Marquis J-F, Chan Y, Venkatesh G, Jessel A. OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischaemic Syndromes) Pilot Studies Investigators. Reactivation of coagulation after stopping infusions of recombinant hirudin and unfractionated heparin in unstable angina and myocardial infarction without ST elevation: results of a randomized trial. *European Heart Journal.* 2000; 21:1473-1481

211. Mombelli G, Marchetti O, Haeberli A, Straub P. Effect of intravenous heparin infusion on thrombin-antithrombin complex and fibrinopeptide A in unstable angina. *American Heart Journal* 1998; 136:1106-1113

212. Rapold H, de Bono D, Arnold A, Arnout J, De Cock F, Collen D, Verstraete M. Plasma fibrinopeptide A levels in patients with acute myocardial infarction treated with alteplase. Correlation with concomitant heparin, coronary artery patency, and recurrent ischemia. The European Cooperative Study Group. *Circulation* 1992; 85: 928 – 934

213. Eichinger S., Woltz M., Nieszpauer-Los M., Schneider B., Lechner K., Eichler HG., Kyrle PA. Effects of a low molecular weight heparin (Fragmin®) and of unfractionated heparin on coagulation activation at the site of plug formation in vivo. *Thrombosis and Haemostasis.* 1994;72: 831-835
214. Woltz M., Weltermanm A., Nieszpauer-Los M., Schneider B., Fassolt A., Lechner K., Eichler HG, Kyrle P. Studies on neutralizing effects of protamine on unfractionated and low molecular weight heparin (Fragmin®) at the site of activation of coagulation system in man. *Thrombosis and Haemostasis.* 1995; 73: 439-443
215. Hoke M., Kyrle P., Philipp K., Pabinger I., Kaider A., Schonauer V., Quehenberger P., Eichinger S. Prospective evaluation of coagulation activation in pregnant women receiving low-molecular weight heparin. *Thrombosis and Haemostasis.* 2004; 91: 935-940
216. Eichinger S. Woltz M., Schneider B., Nieszpauer-Los M., Heinrichs H., Lechner K., Eichler HG, Kyrle PA Effects of recombinant hirudin (r-Hirudin, HBW 023) on coagulation and platelet activation in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 1995; 15:886-892
217. Weltermann A., Fritsch P., Kyrle P., Schoenauer V., Heinze G., Wojta J., Christ G., Huber K. Effects of pretreatment with clopidogrel on platelet and coagulation activation in patients undergoing elective coronary stenting. *Thrombosis Research* 2003; 112: 19-24
218. Furie B, Furie BC. Mechanisms of Thrombus Formation. *The New England Journal of Medicine* 2008; 359:938-949