

Zachowanie się wybranych czynników krzepnięcia u chorych z ostrym zespołem wieńcowym leczonych inwazyjnie plastyką balonową z użyciem stentu i ich potencjalny wpływ na przebieg kliniczny choroby wieńcowej

The expression of the selected clotting factors in the acute coronary syndrome patients treated with coronary stent implantation, and its impact on patients' outcome at long-term follow-up

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Lek. med. Agata Kaczmarzyk-Radka

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jerzy Lewczuk

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

Poznań, 2019

Podziękowania dla prof. dr. hab. n. med. Jerzego Lewczuka,
Ordynatora Oddziału Kardiologicznego,
za pomoc, wyrozumiałość i motywowanie do pracy.

Podziękowania dla prof. dr. hab. n. med. Wojciecha Witkiewicza,
Dyrektora Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego,
Dyrektora Projektu WROVASC,
za pomoc, wyrozumiałość i możliwość kształcenia.



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



WOJEWÓDZKI SZPITAL SPECJALISTYCZNY
WE WROCŁAWIU
Ośrodek Badawczo-Rozwojowy

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Rozprawa doktorska jest częścią projektu “WroVasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo – Naczyniowej”, współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013 realizowanego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodku Badawczo-Rozwojowym.



Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu
Ośrodek Badawczo – Rozwojowy
51-124 Wrocław, ul. Kamińskiego 73a

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013

tel. 71 32 70 456, fax. 71 32 54 556
e-mail: wrovasc@wssk.wroc.pl
www.wrovasc.pl, www.wssk.wroc.pl

Spis treści:

Wykaz skrótów	5
1. Wstęp	8
2. Cele badania - uzasadnienie badania	27
3. Materiał i metody	28
Opis grup	28
Materiał badania	34
Opis testów immunoenzymatycznych	34
Metody statystyczne	38
4. Wyniki badań własnych	39
5. Omówienie wyników badań własnych oraz dyskusja	59
6. Wnioski	71
7. Streszczenie	72
8. Załączniki	74
Spis rycin i tabel	74
Zgoda komisji bioetycznej	76
9. Bibliografia	78

Wykaz skrótów

ACS - ostry zespół wieńcowy (ang. *acute coronary syndrome*)

ADP - difosforan adenozyiny (ang. *adenosine diphosphate*)

APTT - czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (ang. *activated partial thromboplastin time*)

AT - antytrombina (ang. *antithrombin*)

BMI - indeks masy ciała (ang. *body mass index*)

BMS - stent metalowy (ang. *bare-metal stent*)

CABG - pomostowanie aortalno-wieńcowe (ang. *coronary artery bypass grafting*)

CAD - choroba wieńcowa (ang. *coronary artery disease*)

COX - cyklooksygenaza (ang. *cyclooxygenase*)

DES - stent uwalniający lek antymitotyczny (ang. *drug eluting stent*)

ELISA - test immunoenzymatyczny lub immunoenzymosorpcyjny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EPCR - śródbłonkowy receptor dla białka C (ang. *endothelial cell protein C receptor*)

FDP - produkty degradacji fibryny i fibrynogenu (ang. *fibrin/fibrinogen degradation products*)

HRP - peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxydase*)

LMWH - heparyna drobnocząsteczkowa (ang. *low molecular weight heparin*)

MACE - duże niepożądane objawy sercowo-naczyniowe (ang. *major adverse cardiovascular events*)

NSTEMI - zawał serca bez uniesienia odcinka ST (ang. *non-ST segment elevation myocardial infarction*)

OPD - ortofenyloamina (ang. *orthophenylene diamine*)

PAI - inhibitor aktywatora plazminogenu (ang. *plasminogen activator inhibitor*)

PAI-1 - inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*)

PAI-2 - inhibitor aktywatora plazminogenu typu 2 (ang. *plasminogen activator inhibitor-2*)

PCI - przezskórna interwencja wieńcowa (ang. *percutaneous coronary intervention*)

PDGF - płytkowy czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor*)

PT - czas protrombinowy (ang. *prothrombin time*)

STEMI - zawał serca z uniesieniem odcinka ST (ang. *ST-segment elevation myocardial infarction*)

sTM - rozpuszczalna trombomodulina (ang. *soluble thrombomodulin*)

TAT - kompleks trombina-antytrombina (ang. *trypsin-antitrypsin complex*)

TAFI - inhibitor fibrynolizy aktywowany przez trombinę (ang. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*)

TF - czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*)

TFPI - inhibitor czynnika tkankowego (ang. *tissue factor pathway inhibitor*)

TIA - przemijające niedokrwienie mózgu (ang. *transient ischemic attack*)

Skala **TIMI** - skala służąca do oceny przepływu przez tętnice wieńcowe (ang. *thrombolysis in myocardial infarction*)

TM - trombomodulina (ang. *thrombomodulin*)

TMB - tetrametylobenzidyna (ang. *tetramethylbenzidine*)

t-PA - tkankowy aktywator plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator*)

UA - dławica niestabilna (ang. *unstable angina*)

UFH - heparyna niefrakcjonowana (ang. *unfractionated heparin*)

u-PA - urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. *urokinase plasminogen activator*)

u-PAR - receptor u-PA (ang. *urokinase plasminogen activator receptor*)

vWF - czynnik von Willebranda (ang. *von Willebrand factor*)

1. Wstęp

Miażdżyca tętnic

Proces miażdżycowy i jego powikłania są przyczyną większości zgonów w krajach uprzemysłowionych.

Miażdżyca jest powoli postępującą zapalną chorobą tętnic polegającą na miejscowym gromadzeniu się złogów tłuszczowych i tkanki włóknistej¹. W organizmie człowieka zmienione miażdżycowo tętnice najczęściej stwierdza się w obszarze tętnic mózgowych, wieńcowych i tętnic kończyn dolnych, co prowadzi do powikłań w postaci udarów mózgu, zawałów serca i niedokrwienia kończyn, szczególnie dolnych. Najczęściej spotykanymi zmianami związanymi z miażdżycą są ogniska stłuszczenia i blaszki włókniste. Ogniska stłuszczenia charakteryzują się podśródbłonkowym gromadzeniem dużych komórek obciążonych substancjami lipidowymi o wyglądzie piankowatym - stąd nazwa „komórki piankowate”. Zmiany w ich strukturze prowadzą do rozwoju blaszek włóknisto-lipidowych stanowiących główną przyczynę objawów klinicznych miażdżycy. Większość zmian dotyczy błony wewnętrznej, gdzie gromadzą się monocyty, makrofagi, limfocyty, komórki piankowate i tkanka łączna. Blaszkę miażdżycową może uwypuklać się do światła tętnicy i może zmniejszać przepływ przez tętnicę.

W blaszce włóknistej większość komórek piankowatych pochodzi z mięśni gładkich. Zmiany te nie są w układzie tętniczym równomiernie rozmieszczone. Najczęściej zlokalizowane w tętnicach wieńcowych, mózgowych i w aorcie brzusznej. Blaszkę włóknistą ograniczają przepływ krwi w tętnicach lub uszkadzają ciągłość tej ściany np. śródbłonna. Gdy w obrębie blaszki powstanie szczelina lub owrzodzenie dochodzi w tym miejscu do nawarstwienia materiału zakrzepowego, który może zamykać światło tętnicy prowadząc do zawału serca, udaru mózgu. W dużych naczyniach, na przykład w aorcie, zmiany zakrzepowe mogą odrywać się i prowadzić do embolizacji naczynia. Mikro-krwawienia do blaszki miażdżycowej powodują także zwiększenie jej objętości i tym samym prowadzą do zmniejszenia światła naczynia.

W wielu krajach, szczególnie w Stanach Zjednoczonych i w krajach Europy, prowadzone są badania epidemiologiczne, w których zidentyfikowano główne potencjalne czynniki ryzyka miażdżycy jak: palenie papierosów, hiperlipidemię, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, otyłość, siedzący tryb życia i stres.² Czynniki ryzyka nie podlegającymi modyfikacji są: płeć

męska, podeszły wiek, dane z wywiadu rodzinnego o chorobach sercowo-naczyniowych w młodym wieku.

Komórkami biorącymi udział w procesie miażdżycowym są uszkodzone komórki śródbłonna tętnic, pobudzone monocyty, makrofagi, płytki krwi oraz komórki mięśni gładkich, które migrują z błony środkowej tętnicy pod wpływem bodźców mitogennych i chemotaktycznych. Obecna teoria wiąże początek miażdżycy z uszkodzeniem śródbłonna i odczynem zapalnym tętnic i jest nazywana „hipotezą odpowiedzi na uszkodzenie” R. Rossa 1999³.

Choroba niedokrwienna serca

Choroba niedokrwienna serca, zwana również chorobą wieńcową, polega na braku równowagi między zapotrzebowaniem mięśnia sercowego na tlen a jego podażą, prowadząc do niedokrwienia komórek mięśnia sercowego. Choroba niedokrwienna serca jest bardzo szerokim pojęciem i obejmuje różne stany niedokrwienia mięśnia sercowego, a jej postaci klinicznie są różnorodne⁴.

Wyróżniamy stabilne zespoły wieńcowe i ostre zespoły wieńcowe.

Stabilne zespoły wieńcowe - czyli choroba wieńcowa przewlekła:

- dławica stabilna jest przewlekłą postacią przemijającej dławicy piersiowej wywołanej aktywnością fizyczną lub pobudzeniem emocjonalnym, a które to objawy usuwa kilkuminutowy odpoczynek. Epizody te mają nieraz związek z przemijającymi zmianami odcinka ST w EKG, nie powodują jednak trwałego uszkodzenia mięśnia sercowego;
- dławica mikronaczyniowa - dawniej zwana sercowym zespołem X - choroba dotyczy dysfunkcji mikrokrążenia;
- dławica piersiowa związana z mostkami mięśniowymi nad tętnicami wieńcowymi;
- dławica odmienna (Prinzmetal) - typowe objawy dławicowe zwykle w spoczynku będące raczej następstwem skurczu tętnicy wieńcowej niż wzrostu zapotrzebowania mięśnia sercowego na tlen. Epizody te mogą mieć odzwierciedlenie w zapisie EKG jako uniesienie odcinka ST. Wg wytycznych ESC jest uznawana za postać dławicy piersiowej stabilnej, a wg wytycznych ACC i AHA - za postać ostrego zespołu wieńcowego.

Wśród ostrych zespołów wieńcowych rozróżniamy:

- dławicę piersiową niestabilną,
- zawał serca z uniesieniem odcinka ST w zapisie EKG - STEMI,
- zawał serca bez uniesienia odcinka ST w zapisie EKG - NSTEMI,
- zawał serca nieokreślony,
- nagły zgon sercowy^{5, 6}.

Dławica piersiowa niestabilna jest to postać dławicy piersiowej o zwiększonej częstotliwości bólów w klatce piersiowej występujących w spoczynku lub przy niewielkim wysiłku, bez leczenia może przejść w zawał serca. Aby wywołać znaczące upośledzenie przepływu wieńcowego przewężenie musi zmniejszać średnicę tętnicy wieńcowej o 50-80%, a pole przekroju o 75-90%.

Patogeneza dławicy piersiowej niestabilnej jest wieloczynnikowa i może obejmować:

- przemijające okresy skurczu tętnic w miejscu zmian organicznych,
- agregację płytek i tworzenie się skrzepu w miejscu miażdżycowego przewężenia lub
- pęknięcie blaszki miażdżycowej połączone z krwotokiem do jej wnętrza ze zwężeniem światła naczynia, a w końcu do jego niedrożności⁵.

Według czwartej uniwersalnej definicji zawału z 2018 r. „kliniczna definicja zawału serca oznacza obecność ostrego uszkodzenia mięśnia sercowego wykrytego na podstawie nieprawidłowego stężenia biomarkerów w sytuacji klinicznej, w której stwierdza się cechy ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego”⁶. Zgodnie ze wspomnianą definicją zawał typu 1 spowodowany jest przez miażdżycowo-zakrzepową chorobę wieńcową i zwykle jest wywołany przez uszkodzenie - pęknięcie lub erozję - blaszki miażdżycowej. W zależności od obrazu EKG rozróżniamy:

- zawał serca z uniesieniem odcinka ST w zapisie EKG -STEMI,
- zawał serca bez uniesienia odcinka ST w zapisie EKG- NSTEMI.

Zawał typu 2 to uszkodzenie mięśnia sercowego jako wynik nierównowagi między podażą tlenu a zapotrzebowaniem mięśnia sercowego.

Zawał typu 3 to zawał wykryty sekcyjnie lub zgon sercowy z objawami sugerującymi niedokrwienie mięśnia sercowego w połączeniu z przypuszczalnie nowymi zmianami niedokrwieniami w zapisie EKG lub migotaniem komór, bez oceny biomarkerów sercowych.

Zawał serca typu 4a to zawał po procedurze angioplastyki wieńcowej w czasie do <48 godzin od procedury.

Zawał serca typu 4b to zawał spowodowany zakrzepicą w stencie/stencie wchłanialnym udokumentowaną w trakcie koronarografii lub badania sekcyjnego - kryteria definicji są takie same jak w zawale typu 1.

Zawał serca typu 4c to zawał gdzie jedynym wytłumaczeniem wystąpienia zawału jest restenoza w stencie po angioplastyce balonowej w tętnicy zaopatrującej obszar zawału, ponieważ nie stwierdza się innej zmiany odpowiedzialnej za zawał ani skrzepliny.

Zawał serca typu 5 to zawał związany z pomostowaniem naczyń wieńcowych w czasie <48 godzin od zabiegu.

Dorzut zawału to nowy incydent zawału, który wystąpił do 28 dni od pierwszego incydentu.

Ponowny zawał to zawał, który wystąpił po 28 dniach od pierwszego zawału ⁶.

Poważne powikłania ostrych zespołów wieńcowych takie jak zawał serca, konieczność powtórnej interwencji wieńcowej, udar mózgu czy zgon nazwano sumarycznie „*major adverse cardiovascular events*” **MACE**⁷.

Komórki śródbłonkowe

Założenia teorii R. Rossa, według której proces miażdżycowy jest odpowiedzią tętnicy, a głównie śródbłonka na uszkodzenie, potwierdzają udział komórek śródbłonkowych i płytek krwi w patogenezie miażdżycy tętnic, a także w powikłaniach choroby niedokrwiennej serca. Komórki śródbłonka wyściełające wewnątrz tętnic spełniają również wiele bardzo istotnych funkcji: tworzą barierę utrzymującą krew w świetle naczynia, mają działanie przeciwzakrzepowe przez wydzielanie i utrzymywanie na powierzchni cząsteczek związków takich jak siarczan heparanu i uwalnianie substancji przeciwzakrzepowych jak prostacyklina.

W komórkach śródbłonna znajduje się także czynnik rozszerzający naczynia - tlenek azotu. Z uszkodzonych komórek uwalniają się różne czynniki pro- i przeciwzakrzepowe, płytkowy czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor*, PDGF) wpływający na komórki mięśni gładkich w patogenezie miażdżycy.

Płytki krwi uczestniczą w wielu powikłaniach powodowanych przez blaszki miażdżycowe np. w zamknięciu światła naczynia i zakrzepicy. Zawierają liczne ziarnistości, w skład których wchodzi związek biologicznie czynny aktywujący płytki, czynniki chemotaktyczne i mitogenne powodujące proliferację komórek gładkich oraz uwalnianie substancji takich jak difosforan adenozyne (ang. *adenosine diphosphate*, ADP), norepinefrynę, które mogą uszkadzać naczynie wskutek skurczu i wzrostu sił działających na naczynie.

Hemostaza jest kompleksem procesów utrzymujących płynność krwi, a po uszkodzeniu ściany naczynia tamujących krwawienie i zapobiegających zamykaniu światła naczynia przez skrzeplinę oraz uczestniczącym w naprawie uszkodzenia. Polega zatem na współdziałaniu składników ściany naczynia i otaczających tkanek z płytkami i innymi elementami morfotycznymi krwi oraz składnikami osocza. Umownie określa się je jako procesy hemostazy naczyniowej, płytkowej i osoczowej⁸.

Proces krzepnięcia

Istotą procesu krzepnięcia jest przejście fibrynogenu czyli rozpuszczalnego białka osocza w przestrzenną sieć fibryny. W procesie tym bierze udział kilkanaście różnych czynników, a wśród nich 13 białek osocza, białko integralne błon komórkowych, fosfolipidy błon komórkowych i jony wapnia.

Oprócz ponumerowanych od I-XIII osoczowych czynników krzepnięcia krwi nieponumerowane są prekalikreina i wielkocząsteczkowy kininogen, które oprócz udziału w procesie krzepnięcia są składnikami układu kininotwórczego osocza i układu renina-angiotensyna⁹.

Czynniki krzepnięcia o charakterze białek osocza to:

- czynniki zespołu protrombiny - II, VII, IX, X,
- czynniki wrażliwe na trombinę - I, V, VIII, XIII,

- czynniki kontaktu - XI, XII, prekalkreina i wielkocząsteczkowy kininogen.

Czynniki zespołu protrombiny są syntetyzowane w wątrobie przy udziale witaminy K, która jest potrzebna w ostatnim etapie ich biosyntezy jako kofaktor translacyjnej karboksylacji kwasu glutaminowego w cząsteczce białek prekursorowych. W wyniku reakcji dochodzi do zmiany kilkunastu reszt kwasu γ -karboksylglutaminowego, co w N-końcowym fragmencie tego aminokwasu determinuje zdolność protrombiny i pozostałych czynników zespołu protrombiny do przyłączania jonów wapnia. Wiązanie jonów wapnia jest potrzebne do tworzenia kompleksów tych czynników z fosfolipidami, aktywatorem i kofaktorem. Fosfolipidy błon komórkowych i płytek krwi są niezbędne w procesie krzepnięcia podobnie jak czynnik von Willebranda (ang. *von Willebrand factor*, VWF), który syntetyzowany jest w komórkach śródbłonna i megakariocytach. Czynniki von Willebranda występują w osoczu w postaci multimerów - mniejsze to dimery (2 podjednostki) - o masie cząsteczkowej 500 kD. Największe składają się z 40 dimerów - o masie 20 000 kD. Czynniki vWF z jednej strony ułatwiają adhezję płytek do podśródbłonkowej tkanki łącznej, a z drugiej strony chroni czynnik VIII przed proteolityczną degradacją¹⁰.

Czynnik VIII i IX są wytwarzane pod kontrolą genów zlokalizowanych na chromosomie X, a pozostałe czynniki krzepnięcia pod kontrolą genów autosomalnych⁹.

Protrombina, czynniki VII, IX, X, XI, XII i prekalkreina występują w osoczu w postaci zymogenów proteaz serynowych, które są substratami w procesach wieloenzymatycznych, z których powstają aktywne enzymy na każdym etapie dochodzi do zwielokrotnienia liczby aktywnych cząsteczek substratu - dlatego też proces krzepnięcia ma charakter reakcji kaskadowej.

W aktywacji krzepnięcia mamy dwa szlaki: szlak wewnątrzpochodny i zewnątrzpochodny.

W układzie wewnątrzpochodnym początek to aktywacja czynnika XII w kontakcie z inną obcą powierzchnią np. kolagenem.

Kluczową jednak rolę odgrywa szlak zewnątrzpochodny, gdzie pierwszą reakcją po uszkodzeniu naczynia jest związanie się czynnika tkankowego (ang. *tissue factor*, TF) z czynnikiem VII lub VIIa przy udziale fosfolipidów błony komórkowej i jonów wapnia. Połączenie TF z czynnikiem VIIa powoduje zmianę konformacyjną i odsłonięcie ich centrum aktywnego. Zymogen czynnika VII po połączeniu z TF jest szybko aktywowany,

prawdopodobnie również pod wpływem czynnika VIIa związanego już z TF, później również przez sam czynnik Xa¹¹.

Zadaniem kompleksu TF-VIIa związanego z powierzchnią komórek jest konwersja czynnika X do czynnika Xa, który na powierzchni komórek zawierających TF i fosfolipidy tworzy kompleks ze swoim kofaktorem, czynnikiem Va, co powoduje zmianę protrombiny w trombinę i inicjuje krzepnięcie. Ilość tak powstałej trombiny jest zbyt mała aby utworzyć stabilną fibrynę, ale wystarcza do aktywacji płytek krwi, oddzielenia czynnika VIII od czynnika von Willebranda i aktywacji czynników V, VIII i XI. Jest to tzw. „faza amplifikacji” krzepnięcia, w której małe ilości trombiny uruchamiają generację dużych ilości, co zapewnia sprawną hemostazę.

Po utworzeniu trombiny, kompleks Xa-VIIa-TF jest dość szybko inaktywowany przez inhibitor zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia (ang. *tissue factor pathway inhibitor*, TFPI).

Czynnik IXa, powstały dzięki kompleksowi TF-VIIa, po dotarciu na powierzchnię aktywowanych płytek tworzy kompleks tzw. tenazę z fosfolipidami oraz czynnikami VIII i X, w którym aktywowany jest czynnik X. Następnie czynniki Xa, Va tworzą na powierzchni płytkowych fosfolipidów kompleks z protrombiną - protrombinazę. W kompleksie tym powstaje trombina w dużym stężeniu - co pozwala na powstanie w zakrzepie fibryny stabilnej dzięki czynnikowi XIII.

Fizjologicznym aktywatorem czynnika XI jest trombina utworzona na drodze szlaku zewnątrzpochodnego krzepnięcia, a nie wewnątrzpochodnego za pośrednictwem czynnika XIIa.

Aktywacja krzepnięcia zachodzi na powierzchni komórek. W obecności wapnia tworzą się kompleksy złożone z białkowego kofaktora, proteazy serynowej i białkowego substratu.

Proces krzepnięcia to proces tworzenia czterech kompleksów enzymatycznych:

- tenazy zewnątrzpochodnej: TF-VIIa-X,
- kompleksu aktywacyjnego czynnika IX: TF-VIIa-IX,
- tenazy wewnątrzpochodnej: VIIIa-IX-X,
- protrombinazy: Va-Xa-II.

Mechanizmem aktywacji wszystkich czynników krzepnięcia jest proteoliza - rozerwanie nielicznych wiązań peptydowych, co powoduje odszczepienie peptydów aktywacyjnych i również rozerwanie łańcucha na dwie części połączone wiązaniem dwusiarczkowym.

Ostatnia faza krzepnięcia to przejście fibrynogenu w fibrynę. Fibrynogen zbudowany jest z dwóch symetrycznych podjednostek połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi. Trombina odszczepia od fibryny pary drobnych peptydów - fibrynopeptydy A i B, a pozostały monomer fibryny polimeryzuje w sieć fibryny. Katalizatorem tej reakcji jest czynnik XIII, który w obecności trombiny i jonów wapnia nabiera właściwości transglutaminazy i wprowadza kowalencyjne wiązania krzyżowe pomiędzy monomery fibryny.

W utrzymaniu płynności krwi biorą udział naturalne inhibitory krzepnięcia, a wśród nich: inhibitor zewnątrzpo pochodnego szlaku krzepnięcia - TFPI, antytrombina (ang. *antithrombin*, AT), układ inhibitorowy białka C.

TFPI to białko, które jest przede wszystkim związane z lipoproteinami w ludzkim osoczu. Podanie heparyny powoduje uwolnienie TFPI z puli związanej z glikozaminoglikanami na powierzchni śródbłónka.

TFPI w obecności czynnika Xa wiąże i inaktywuje kompleks TF-VIIa¹¹.

Antytrombina (ang. *antithrombin*, AT) należy do serpin - białek inaktywujących proteazy serynowe. AT łączy się z trombiną w stechiometryczny kompleks i unieczynnia trombinę, a także aktywowane czynniki IX, X, XI, XII oraz czynnik VIIa związany z TF. Heparyna, która jest kofaktorem AT zwiększa jej działanie 1000 razy. W AT znajdują się dwa aktywne miejsca - jedno na wiązanie się z heparyną, drugie na wiązanie się z trombiną. Heparyna powoduje zmianę konformacji przestrzennej antytrombiny dzięki czemu antytrombina łatwiej łączy się z trombiną.

Inhibitorami trombiny poza tym są jeszcze: kofaktor heparyny II, α 2-makroglobulina, α 1-antytrypsyna i inhibitor C1-esterazy.

Trombina (czynnik II) we krwi uruchamia układ antykoagulacyjny białka C, w skład którego wchodzi trombomodulina (ang. *thrombomodulin*, TM), białko S i śródbłónkowy receptor dla białka C.

Trombomodulina (TM) to białko receptorowe śródbłónka naczyniowego dla trombiny. Reakcja rozpoczyna się od połączenia się na powierzchni śródbłónka trombomoduliny

z trombiną i wtedy trombina traci zdolność wykrzepiania fibrynogenu, aktywacji innych czynników i płytek, a dochodzi do aktywacji białka C w proteazę serynową. Śródbłonkowy receptor dla białka C (ang. *endothelial cell protein C receptor*, EPCR) występuje przede wszystkim w śródbłonku dużych naczyń. Do wiązania się białka C z EPCR dochodzi niezależnie od obecności trombomoduliny. Kompleks C-EPCR jest szybciej aktywowany przez trombinę związaną z trombomoduliną niż przez samo białko C. Aktywne białko C inaktywuje czynniki Va i VIIIa poprzez ich częściową proteolizę, hamując proces krzepnięcia¹².

Wśród naturalnych inhibitorów krzepnięcia jest też inhibitor proteaz zależny od białka Z, który w obecności białka Z inaktywuje czynnik Xa związany z fosfolipidami⁹.

Proces fibrynolizy

Rozpuszczanie zakrzepu zachodzi pod wpływem enzymów proteolitycznych osocza i komórek. Plazmina (enzym osocza) powstaje z proenzymu - plazminogenu, który ulega przekształceniu przy udziale tkankowego aktywatora plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator*, t-PA) lub aktywatora typu urokinazy (ang. *urokinase plasminogen activator*, u-PA).

Aktywator u-PA wiąże się ze swoistym receptorem u-PAR na powierzchni komórek aktywując w ten sposób związany z nim plazminogen.

Oba aktywatory są syntetyzowane jako jednołańcuchowe prekursorzy t-PA szczególnie w komórkach śródbłonka naczyń, a u-PA - w różnych komórkach i narządach, również w nerkach.

Powyższe aktywatory przekształcane są do formy dwułańcuchowej poprzez ograniczoną proteolizę dzięki kalikreinie lub plazminie.

Szybkość aktywacji plazminogenu zwiększa się 200-400 razy, gdy plazminogen i t-PA są przyłączone do fibryny. Poza tym również kalikreina i czynnik XIIa mają zdolności aktywacyjne plazminogenu. Zewnętrzne aktywatory plazminogenu, streptokinaza i stafylokinaza, tworzą z plazminogenem kompleksy o właściwościach aktywatorów plazminogenu.

Aktywacja plazminogenu pod wpływem t-PA ma znaczenie w rozpuszczaniu fibryny w zakrzepie, czyli utrzymaniu drożności naczyń.

Plazmina po połączeniu się z u-PA doprowadza do przekształcania się nieczynnych metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w aktywne metaloproteinazy, które degradują składniki macierzy. Stąd u-PA odgrywa tak dużą rolę w migracji komórek i przebudowie tkanek.

Głównymi inhibitorami aktywatorów plazminogenu są inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (ang. *plasminogen activator inhibitor -1*, PAI-1) i inhibitor aktywatora plazminogenu typu 2 (ang. *plasminogen activator inhibitor -2*, PAI-2) oraz α 2- antyplazmina.

PAI-1 jest wytwarzany w komórkach śródbłonna wątroby i megakariocytach. Po uwolnieniu do śródbłonna jeśli napotyka t-PA lub u-PA - unieczynnia je. PAI-1 nie łączy się z jednołańcuchową postacią u-PA.

PAI-2 występuje w łożysku, monocytach, makrofagach i w innych komórkach. PAI-2 wykazuje większe powinowactwo do u-PA niż do t-PA.

α 2-antyplazmina (α 2-AP) bardzo szybko tworzy z plazminą kompleks stechiometryczny, a po wyczerpaniu się inhibitora pojawiająca się plazmina we krwi zobojętniana jest przez α 2-makroglobulinę.

Inhibitor fibrynolizy aktywowany przez trombinę (ang. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*, TAFI) hamuje fibrynolizę przez odszczepienie C-końcowych reszt lizyny i argininy z fibryny, które są niezbędne do wiązania plazminogenu i t-PA.

W trakcie rozpadu fibryny i fibrynogenu powstają produkty degradacji (ang. *fibrin/fibrinogen degradation products*, FDP) oznakowane jako fragmenty X, Y, D i E. W sytuacji trawienia fibryny stabilizowanej produktem rozpadu nie są fragmenty D, ale D-dimery, dwie cząsteczki połączone wiązaniami krzyżowymi.

W warunkach fizjologicznych proces krzepnięcia krwi jak i proces fibrynolizy zachodzą na powierzchni komórek. W fazie płynnej osocza dochodzi do fibrynolizy tylko w stanach patologicznych lub w czasie leczenia fibrynolitycznego⁹.

Leczenie ostrych zespołów wieńcowych:

Aktualnie obok farmakoterapii podstawą leczenia ostrych zespołów wieńcowych jest przezskórna angioplastyka wieńcowa (ang. *percutaneous coronary intervention*, PCI)¹³.

Farmakoterapia to przede wszystkim leczenie przeciwplatek i przeciwkrzepliwe.

PCI jest leczeniem z wyboru w ostrych zespołach wieńcowych (ang. *acute coronary syndrome*, ACS), zmniejszając ryzyko wystąpienia istotnych powikłań sercowo-naczyniowych (ang. *major adverse cardiovascular events*, MACE).

Dotychczas nie stworzono standardowej definicji MACE. Jako definicję uważa się złożony z klinicznych sytuacji punkt końcowy odzwierciedlający bezpieczeństwo i efektywność zdarzeń sercowo-naczyniowych w czasie zastosowanego leczenia. Za MACE uznano: zawał serca, powtórna PCI z powodu nawrotu ACS, udar mózgu i zgon⁷.

Stosowana początkowo jedynie angioplastyka balonowa wiązała się z istotnym ryzykiem nawrotu zwężenia, czyli restenozy, którego częstość występowania znacznie zmniejszyła się po wprowadzeniu stentów¹⁴.

Restenoza jest wynikiem uszkodzenia ściany naczynia i nadmiernym procesem gojenia oraz zmianą geometrii naczynia. Nadmierny przerost błony wewnętrznej (neointymy) doprowadza do restenozy^{15, 16}.

Już w badaniach prowadzonych przez Fischmana i wsp. (1994) u chorych, którym wszczepiono stent vs leczonych angioplastyką balonową w ciągu półrocznej obserwacji zauważono przede wszystkim istotne zmniejszenie występowania restenozy z 42,1% vs 31,6%, $p=0,046$ i tylko nieistotne zmiany innych składowych MACE¹⁷.

Wszczepienie stentu również uszkadza śródbłonek naczynia powodując uaktywnienie procesów prozakrzepowych, a co za tym idzie może prowokować zakrzepicę.

W 2007 r. opublikowano ujednoliconą definicję zakrzepicy w stencie. W zależności od upływu czasu od procedury PCI z założeniem stentu rozróżniamy zakrzepicę ostrą (do 24 godzin), podostrą (do 30 dni), późną (do roku) i bardzo późną (ponad rok). Natomiast biorąc pod uwagę przebieg kliniczny wyróżnia się zakrzepicę w stencie: pewną, prawdopodobną lub możliwą.

Rozpoznanie „pewnej” zakrzepicy to potwierdzenie zakrzepicy anatomopatologicznie lub po analizie zaaspirowanego materiału w trakcie przezskórnej interwencji lub spełnienie dwóch warunków:

- potwierdzone angiograficznie zamknięcie - przepływ TIMI 0 w stencie lub w segmencie 5 mm dystalnie lub proksymalnie od stentu z obecnością skrzepliny, lub przepływ w skali TIMI (skala do oceny przepływu przez tętnice wieńcowe - ang. *thrombolysis in myocardial infarction*) 1,2 lub 3mm od stentu lub w segmencie proksymalnym, lub dystalnym 5mm od stentu z obecnością skrzepliny;
- przynajmniej jedna z dwóch zmian: typowy ból wieńcowy trwający dłużej niż 20 min, zmiany w zapisie EKG świadczące o niedokrwieniu, podwyższone stężenia markerów niedokrwienia mięśnia sercowego.

„Prawdopodobna” zakrzepica w stencie to niewyjaśniony zgon do 30 dni od implantacji stentu lub zawał serca w strefie unaczynienia tętnicy, w której implantowano stent bez angiograficznego potwierdzenia zakrzepicy i po wykluczeniu innych przyczyn.

„Możliwa” zakrzepica w stencie rozważana jest w sytuacji niewyjaśnionego zgonu po 30 dniach od zabiegu implantacji stentu¹⁸.

Zastosowanie nowej generacji stentów uwalniających leki antymitotyczne wiązało się z dalszym zmniejszeniem występowania częstości restenozy, jak udowodnił Moses w 2003 r.¹⁹, jednak bez wyraźnego zmniejszenia incydentów sercowo-naczyniowych zależnych od zakrzepicy - w porównaniu do stentów metalowych²⁰.

Mauri i wsp. nie stwierdzali istotnych różnic w ilości występowania zakrzepicy w stencie pomiędzy chorymi z implantowanymi stentami uwalniającymi syrolimus, paclitaxel czy stentami metalowymi w obserwacji 4-letniej²¹.

Natomiast w 2005 r. Moses udowodnił bezpieczeństwo stosowania stentów powlekanych paclitaxelem i znaczną redukcję występowania MACE w ciągu roku od PCI u chorych z dławicą piersiową²².

W 2007 r. analiza materiału 26 466 chorych z zawałem serca typu bez uniesienia odcinka ST wykazała 6,2% śmiertelność i 12,1% występowanie zawału serca w ciągu pierwszych 6 miesięcy obserwacji. W tej metaanalizie stwierdzano, że incydenty MACE związane są też ze sposobem leczenia chorych²⁰.

W leczeniu ostrych zespołów wieńcowych w ostrej fazie oprócz interwencji na naczyniach wieńcowych zaleca się leczenie przeciwplatek i przeciwkrzepliwe. I tak wg wytycznych z 2017 r. w leczeniu zawału serca STEMI w leczeniu przeciwplatekowym zaleca się podwójną terapię przeciwplatekową (ang. *dual antiplatelet therapy* DAPT) aspiryną i inhibitorami P2Y₁₂, do których należą: prasugrel, ticagrelol, kłopidogrel. W ostrej fazie pacjent powinien otrzymać dawki wysycające leków, a następnie podwójne leczenie przeciwplatekowe powinno być kontynuowane do roku. Kłopidogrel jest dzisiaj lekiem z wyboru w sytuacji braku lub przy przeciwwskazaniach do prasugrelu i ticagrelolu²³.

Wcześniej przez długi czas kłopidogrel był jedynym dostępnym inhibitorem P2Y₁₂ dla polskich pacjentów.

Takie postępowanie lecznicze zmniejsza występowanie MACE, jednak wyniki nie są w pełni zadowalające, co zwykle wiąże się z opornością płytek na aspirynę bądź na kłopidogrel, stosunkowo często spotykaną u pacjentów z otyłością, hiperlipidemią czy z cukrzycą²⁴.

I tak w badaniu Guma i wsp. (2003) w czasie średnio 670-dniowej obserwacji chorzy z opornością na aspirynę, którzy stanowili 5,7% badanych chorych, mieli blisko trzykrotnie większe ryzyko wystąpienia zawału serca, udaru mózgu i zgonu²⁵. Podobnie zwiększone ryzyko nawrotu incydentów sercowo-naczyniowych stwierdzano u tych stentowanych chorych z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST, u których wykazano oporność na kłopidogrel w badaniu już wcześniej cytowanym Matetzky'ego i wsp.²⁴ Oporność na aspirynę często współistnieje z opornością na kłopidogrel i jak opisał Bobescu i wsp. w swoim badaniu (2018) może towarzyszyć cukrzycy, chorobie nadciśnieniowej, otyłości oraz dotyczy głównie mężczyzn, koreluje z ilością płytek, stężeniem czynnika von Willebranda²⁶.

Przemawiałoby to za możliwością uwzględnienia w leczeniu tych chorych oprócz leczenia przeciwplatekowego także terapii przeciwkrzepliwej.

W badaniu jeszcze w 1998 roku Leon i wsp. porównywali leczenie samą aspiryną, aspiryną z tiklopidyną i aspiryną z warfaryną u chorych po PCI. Najwięcej korzyści odnosili chorzy na podwójnej terapii przeciwplatekowej²⁷. Zhao i wsp. w 2011 r. stwierdzali korzyści z „potrójnej terapii” u chorych przewlekłe wymagających leczenia antykoagulacyjnego i podwójnej terapii przeciwplatekowej po PCI, jednak z ryzykiem dużego krwawienia²⁸.

Wiele badań porównuje efekty stosowania kłopidogrelu do ticagrelolu i prasugrelu ukazując różne oblicza leków i ich skutki uboczne np. u osób po 70 roku życia²⁹ wykazując przewagę ticagrelolu i prasugrelu nad kłopidogrelem mimo zwiększonego ryzyka krwawienia^{30, 31}.

Miejsce aspiryny w leczeniu choroby wieńcowej jest niepodważalne²³.

Nie tylko leki, ale i czas stosowania podwójnej terapii przeciwplatekowej ma znaczenie. I tak Grines i wsp. udowodniali korzyści z 12-miesięcznej terapii aspiryną i tienopirydyną w 2007 r. Ryzyko zakrzepicy w stencie, zawału i śmierci wzrastało istotnie u pacjentów, którzy wcześniej odstawili leczenie³².

Ostatecznie, jak ustalono w metaanalizie 30 badań obejmującej 221 066 pacjentów opublikowanej w 2013 r., czynnikami ryzyka ewentualnej zakrzepicy mogą być: odstawienie leków przeciwplatekowych, zakres choroby wieńcowej, oraz rodzaj, w tym rozmiar, stentu³³.

Opis badanych czynników hemostazy

Czynnik tkankowy (TF)

Czynnik tkankowy jest białkiem o masie cząsteczkowej 47 kDa. Synonimy historyczne TF to tromboplastyna tkankowa i III czynnik krzepnięcia krwi. Czynnik tkankowy został po raz pierwszy oczyszczony z ludzkiego mózgowia przez Broze'a i wsp. Tkanki bogate w TF to wspomniane mózgowie, płuco, łożysko, płyn owodniowy oraz niektóre tkanki nowotworowe, zwłaszcza rak piersi i czerniak.

Gen kodujący TF zlokalizowany jest na chromosomie 1 i zawiera 6 eksonów. TF jest eksponowany w komórkach śródbłonna i podśródbłonkowych mięśni gładkich, co umożliwia szybką inicjację procesu krzepnięcia w przypadku uszkodzenia naczyń.

W fizjologicznych warunkach komórki śródbłonna i monocyty nie prezentują TF, dzięki czemu nie dochodzi do kontaktu komórkowego TF z krwią krążącą. Jednak w niektórych warunkach dochodzi do ekspresji i aktywacji TF w odpowiedzi na niektóre bodźce, szczególnie na uszkodzenie ściany naczynia. Monocyty i makrofagi w warunkach stanu zapalnego rozpoczynają ekspresję TF na swojej powierzchni. Proces ten jest uaktywniany pod wpływem czynników towarzyszących zapaleniom np. przez reaktywne białko C.

TF jest białkiem transbłonowym i składa się z trzech części:

- podbłonowej (wewnątrzkomórkowej), składającej się z 21 aminokwasów,
- przezbłonowej, składającej się z 23 aminokwasów,
- nadbłonowej, najdłuższej – składającej się z 219 aminokwasów. W tej części występuje fragment łańcucha, który jest zbudowany z dwóch domen fibronektyny połączonych koniec do końca. Część nadbłonowa może oddzielać się od komórki i uwalniać się do krwi i płynów ustrojowych.

W cząsteczce TF występują dwa mostki siarczkowe: w pozycji 49-57 i 186-209^{34, 35}.

TF bierze udział w procesach związanych z proliferacją i migracją komórek śródbłonka i mięśni gładkich naczyń, jak i w stanach zapalnych. TF jest również odpowiedzialny za procesy neowaskularyzacji nowotworów i powstawanie przerzutów. Komórki nowotworowe w sposób ciągły i niekontrolowany wytwarzają duże ilości TF - co wiąże się z częstym występowaniem powikłań zakrzepowo-zatorowych³⁶.

Wszystkie czynniki ryzyka powstawania miażdżycy mogą powodować wzrost stężenia TF we krwi (choroba nadciśnieniowa, palenie papierosów, hiperlipidemia, cukrzyca)^{37, 38}. W warunkach fizjologicznych stężenie TF w krwioobiegu jest śladowe. Jego uwolnienie do krwi powoduje powstanie kompleksu TF/VIIa początkującego kaskadę krzepnięcia krwi poprzez aktywację czynników X i IX. W dalszym etapie dochodzi do wzmocnienia procesu krzepnięcia i przekształcania protrombiny w trombinę.

Inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (TFPI)

Inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia jest specyficznym i głównym fizjologicznym inhibitorem układu krzepnięcia.

TFPI jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 34-40 kD a jego masa zależy od rodzaju połączonych z nim lipoprotein. TFPI związany z LDL składa się z 276 aminokwasów. TFPI należy do białkowych inhibitorów typu Kunitza. Pierwszy raz został wyizolowany z komórek nowotworowych hepatocytów³⁹.

W rekombinowanym TFPI wyróżniamy 3 domeny:

- k-1 - która hamuje VIIa, tworząc kompleks TF/VII/TFPI zależnie od obecności wapnia,
- k-2 - która hamuje Xa, tworząc kompleks Xa/TFPI niezależnie od obecności wapnia,
- k-3 - która bierze udział w wiązaniu TFPI z lipoproteinami osocza.⁴⁰

TFPI w 50-80% występuje w śródbłonku naczyń - tzw. pula naczyńniowa. Ok. 10% występuje w płytkach krwi, które uwalniają TFPI po aktywacji trombiną. Od 10% do 50% TFPI jest związane z lipoproteinami osocza⁴¹.

TFPI może być syntetyzowany również przez pobudzone fibroblasty, monocyty i megakariocyty. TFPI połączony z czynnikiem Xa łączy się i dezaktywuje kompleks TF/VIIa.

TFPI uważany jest za naturalny inhibitor trombogenezy⁴². Jego niedobór może zwiększać ryzyko zakrzepu, może także przyspieszać powstawanie zmian miażdżycowych. TFPI uważany jest za naturalny inhibitor trombogenezy³⁴.

Czynnik von Willebranda (vWF)

Czynnik von Willebranda to niezbędny składnik krwi biorący udział w procesie krzepnięcia. Gen kodujący czynnik kodowany jest na chromosomie 12. Czynnik syntetyzowany jest w komórkach śródbłonka i megakariocytach. Jest to duża glikoproteina zbudowana z kilku podjednostek - multimerów. Multimery mogą mieć wielkość od 500 do 20.000 kDa. Każdy monomer ma powinowactwo do kolagenu i do płytkowej glikoproteiny Ib (GPIb) oraz integryliny $\alpha IIb\beta 3$. Czynnik von Willebranda zbudowany jest z 3 domen: A1, A2 i A3 a każda z nich jest zbudowana z około 200 aminokwasów. Domena A1 łączy się z receptorem GPIb płytek, co limituje domena A2, a domena A3 ma powinowactwo do kolagenu. Rola czynnika jest podwójna: z jednej strony ułatwia adhezję płytek do podśródbłonkowej tkanki łącznej, z drugiej strony łącząc się z czynnikiem VIII w stosunku 50-100:1 chroni czynnik VIII przed proteolityczną degradacją^{9,10}.

Tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA)

To znajdująca się we krwi w warunkach fizjologicznych proteaza o masie cząsteczkowej ok. 70kDa, syntetyzowana i wydzielana przez komórki śródbłonka naczyniowego jako jednołańcuchowy polipeptyd, który pod wpływem plazminy przybiera postać dwułańcuchową.

Aktywator t-PA syntetyzowany i wydzielany jest przez komórki śródbłonka w sposób ciągły w dwóch postaciach: formie aktywnej i nieaktywnej. Forma aktywna jest wolna i wysoce specyficzna do plazminogenu. Forma nieaktywna jest związana z PAI-1 w kompleksie t-PA/PAI-1.

Okres półtrwania wolnego t-PA wynosi do 5 min. Zwiększone wydzielanie t-PA może towarzyszyć wysiłkowi fizycznemu, stresowi psychicznemu oraz przyjmowaniu niektórych leków⁴³.

Inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1)

PAI-1 to jeden z głównych inhibitorów aktywatorów plazminogenu - glikoproteina zbudowana z 379 aminokwasów o masie cząsteczkowej 52 kDa, wytwarzana w komórkach wątroby, śródbłonka mięśni gładkich, adipocytach i megakariocytach. PAI-1 uwalniany jest ze śródbłonka w formie aktywnej i po napotkaniu t-PA lub u-PA wiąże się z nimi inaktywując je. W osoczu PAI-1 jest więcej niż t-PA, dlatego też t-PA w większości znajduje się w kompleksie. W obecności heparyny PAI-1 ma zdolność hamowania trombiny. Większość PAI-1 w krwioobiegu jest pochodzenia płytkowego, ale jego aktywność jest słabsza niż jego osoczewego odpowiednika. Duże stężenie PAI-1 stanowi czynnik ryzyka zakrzepowego, zwiększa się z wiekiem, występuje w otyłości i jest wyższe u mężczyzn niż u kobiet⁴⁴.

Trombomodulina (TM)

Trombomodulina jako receptor trombiny na powierzchni śródbłonka o silnym powinowactwie i podstawowy kofaktor dla białka C odgrywa istotną rolę w regulacji hemostazy krwi. Została odkryta w 1980 r.⁴⁵

Działa jako antykoagulant hamujący właściwości trombiny jako aktywatora różnych czynników hemostazy.

Trombomodulina jest integralnym białkiem błonowym, którego ekspresja występuje głównie na powierzchni śródbłonna naczyniowego. Trombomodulina występuje na śródbłonku tętnic, żył, naczyń włosowatych, limfatycznych, ale i w ludzkich syncytiotrofoblastach łożyska, płytkach krwi, megakariocytach, neutrofilach, monocytach, makrofagach i komórkach płaskonabłonkowych płuc. Ludzkie c-DNA koduje trombomodulinę jako produkt złożony z 557 aminokwasów. W budowie cząsteczki TM rozróżnia się 5 domen: N-kończącą domenę lektynopodobną zbudowaną z 226 aminokwasów, fragment zbudowany z 236 aminokwasów z sześcioma powtarzającymi się odcinkami o budowie podobnej do czynnika wzrostu naskórka, 34-aminokwasową część bogatą w reszty serynowe i treoninowe, oraz domenę transmembranalną 23-aminokwasową i domenę wewnątrzkomórkową 38-aminokwasową^{46, 47}.

Utworzenie kompleksu TM-trombina powoduje aktywację białka C, które w obecności białka S powoduje wybiórczą proteolizę czynników Va, VIIa i PAI - działanie antykoagulacyjne. Trombina połączona z trombomoduliną traci zdolność do aktywacji fibrynogenu. Związanie trombiny z TM przyspiesza około 1000 krotnie aktywację inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną TAFI, biorącego udział w proteolizie fibryny, obniżając w ten sposób jej aktywność jako kofaktora plazminogenu - obniżenie aktywności fibrynolitycznej.

Poza funkcją regulacji układu krzepnięcia trombomodulina bierze udział w modulowaniu reakcji zapalnej - przekazywaniu sygnałów w szlakach regulacji zapalnej dzięki lektynopodobnej domenie⁴⁸.

Rozpuszczalna forma TM (ang. *soluble TM*, sTM) stanowi produkt degradacji zewnątrz błonowej części formy transmembranowej i jest markerem uszkodzenia komórek śródbłonna.

Zaobserwowano polimorfizm genowy TM oraz związek niektórych genów TM z występowaniem choroby wieńcowej⁴⁹.

Trombina-antytrombina (TAT)

Trombina bierze udział w aktywacji fibrynogenu do fibryny, aktywacji czynników V, VIII, XI, XIII oraz w agregacji płytek krwi. Aktywna cząsteczka ludzkiej α -trombiny ma masę

38kDa i jest zbudowana z dwóch łańcuchów polipeptydowych A i B. Łańcuch A zbudowany jest z 36 aminokwasów, a łańcuch B z 259 aminokwasów. Łańcuchy połączone są mostkiem disiarczkowym. Aktywne centrum tej proteazy serynowej znajduje się na C-końcu i utworzone jest przez triadę katalityczną składającą się z reszt aminokwasowych His 57, Asp102 i Ser 195⁵⁰.

Trombina produkowana jest z nieaktywnego zymogenu - protrombiny - w obecności aktywowanego czynnika Xa, Va, jonów wapnia i fosfolipidów błonowych płytek krwi w odpowiedzi na uwolniony czynnik tkankowy TF z miejsca uszkodzenia tkanki lub w wyniku kontaktu z ujemnie naładowaną powierzchnią np. kolagenu. Proces ten jest kontrolowany przez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego.

W warunkach fizjologicznych kontrola stężenia trombiny we krwi odbywa się dzięki oddziaływaniu inhibitorów, a wśród nich najważniejsza jest osoczowa serpina - antytrombina regulująca powstanie, jak i aktywność trombiny⁵¹.

Antytrombina (AT), dawniej zwana antytombiną III, jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 58kDa, syntezowaną w wątrobie, komórkach śródbłonna naczyń i megakariocytach. Występuje w dwóch formach:

- forma α (w 90%), glikozylowana we wszystkich pozycjach,
- forma β (10%), nieglikozylowana w pozycji Asn 135.

Podobnie jak inne serpiny, AT zbudowana jest z 9 helis alfa i 3 harmonijek beta.

W warunkach fizjologicznych AT może inaktywować czynniki krzepnięcia XIa, IXa, VIIa, Xa i przede wszystkim trombinę poprzez tworzenie kompleksu pomiędzy seryną miejsca aktywnego enzymu a argininą swojego centrum katalitycznego w stosunku 1:1. Wydajność tej reakcji wzrasta 1000-krotnie pod wpływem heparyny, która jest jej kofaktorem. Powstały kompleks trombina-antytrombina (TAT) ma masę cząsteczkową 88 kDa i okres półtrwania wynoszący około 15 minut. Jest on nieaktywny biologicznie i powoduje zahamowanie właściwości proteolitycznych trombiny. Kompleksy TAT są usuwane z krwi przez makrofagi. Ze względu na miejscowe powiązanie ze stężeniem trombiny jest to bardzo czuły wskaźnik nadkrzepliwości⁵².

2. Cel pracy - uzasadnienie badania

Istotą ostrego zespołu wieńcowego jest zakrzep tętniczy rozwijający się na blaszce miażdżycowej. W patogenezie zakrzepu tętniczego najważniejszą rolę odgrywają płytki krwi, jednak rozwija się on czasami po PCI pomimo długotrwałego podwójnego leczenia przeciwplatekowego. Skutkuje to występowaniem w tym okresie MACE. Przedstawione we wstępie wyniki niektórych prac przedklinicznych i pojedynczych prac klinicznych sugerują, że poza płytkami krwi istotną rolę w tworzeniu zakrzepu tętniczego skutkującymi występowaniem MACE po incydencie ACS leczonym PCI mogą pełnić zaburzenia układu krzepnięcia. Dlatego w prezentowanym badaniu przedstawiono następujące cele:

1. Ocena stężeń 7 parametrów hemostazy: czynnika tkankowego (TF), jego inhibitora (TFPI), czynnika von Willebranda (vWF), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1), trombomoduliny (TM) i kompleksów trombina-antytrombiny (TAT) u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w porównaniu do dwóch grup referencyjnych: osób bez incydentu wieńcowego i chorych ze stabilną chorobą wieńcową .
2. Ustalenie czy poszczególne postacie ostrego zespołu wieńcowego takie jak: zawał serca z uniesieniem odcinka ST , zawał bez uniesienia odcinka ST i z dławicą piersiową niestabilną różnią się stężeniami badanych parametrów hemostazy.
3. Ocena czy czynniki ryzyka u osób z ostrym zespołem wieńcowym jak: płeć, wiek, nikotynizm, hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, otyłość mają wpływ na stężenia badanych parametrów hemostazy.
4. Ocena czy wartość stężenia badanych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym może mieć wpływ na przewidywanie przebiegu choroby i ustalenie postępowania leczniczego.
5. Ocena czy przeprowadzanie kosztownych i uciążliwych badań układu hemostazy jest konieczne do właściwego postępowania u chorych z ostrymi incydentami wieńcowymi leczonych PCI.

3. Materiał i metody

Wszyscy chorzy byli pacjentami Oddziału Kardiologicznego z Pododdziałem Intensywnego Nadzoru Kardiologicznego Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu przy ul. Kamińskiego 73a. Badanie prowadzono w latach 2009-2014.

Opis grup

Badaniem objęto łącznie 189 pacjentów.

Zasadniczą badaną grupą było 98 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (ang. *acute coronary syndrome*, ACS). Grupami referencyjnymi były dwie grupy: 64 osób z chorobą wieńcową stabilną (ang. *Coronary Artery Disease*, CAD) - przebyłym w przeszłości ostrym zespołem wieńcowym oraz grupa 27 osób bez przeszłości wieńcowej w wywiadzie chorobowym - kontrolna (ang. *control*, C).

U wszystkich chorych oceniono: płeć, wiek oraz przeprowadzono wywiad osobniczy w kierunku chorób sercowo-naczyniowych u krewnych pierwszego stopnia (zawał serca, choroba wieńcowa, udar mózgu), wywiad w kierunku nikotynizmu, dyslipidemii, zachorowania i leczenia choroby nadciśnieniowej i cukrzycy, oceniono także wartość BMI; BMI >25 kg/m² świadczące o nadwadze i otyłości.

W grupie badanej 98 pacjentów z rozpoznaniem ostrym zespołem wieńcowym (ACS) było 73 mężczyzn w wieku 55-70 lat i 25 kobiet w wieku 43-86 lat.

W grupie tej byli chorzy:

- z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST (ang. *ST segment elevation myocardial infarction*, STEMI) - 54 chorych (55,10 %),
- z zawałem serca bez uniesienia odcinka ST (ang. *non-ST segment elevation myocardial infarction*, NSTEMI) - 22 chorych (22,45%),
- z dławicą piersiową niestabilną (ang. *unstable angina*, UA) - 22 chorych (22,45%).

Rozpoznanie ostrego zespołu wieńcowego postawiono na podstawie obrazu klinicznego (ból w klatce piersiowej), wywiadu chorobowego, obrazu zapisu EKG, ocenie wartości troponiny I, zaburzeń kurczliwości lewej komory w obrazie echokardiograficznym.

Wszyscy włączeni do badania pacjenci z ostrym zespołem wieńcowym po pobraniu krwi na układ hemostazy byli leczeni inwazyjnie - angioplastyką wieńcową balonową z założeniem stentów (PCI). W koronarografii oceniano naczynia wieńcowe przed angioplastyką i po wykonanej angioplastyce wykorzystując skalę TIMI. Skala TIMI (ang. *Thrombolysis In Myocardial Infarction*) to skala służąca do oceny przepływu krwi przez tętnice wieńcowe, polegająca na wzrokowej ocenie przepływu w trakcie wykonywania koronarografii.

Pacjentom wykonywano również rutynowo badania takie jak: elektrokardiogramy, badania laboratoryjne (morfologia, kreatynina, sód, potas, troponina I), badania echokardiograficzne.

W grupie pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym oceniano jednorazowo, wyjściowe stężenia w osoczu 7 parametrów hemostazy: czynnika tkankowego (TF), inhibitora czynnika tkankowego (TFPI), czynnika von Willebranda (vWF), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1), trombomoduliny (TM), kompleksu trombina -antytrombina (TAT) i oceniano u nich dalszy przebieg choroby wieńcowej pod kątem występowania MACE (istotnych powikłań sercowo-naczyniowych takich) jak: zawał serca, powtórna angioplastyka wieńcowa z powodu nawrotu ostrego zespołu wieńcowego, udar mózgu i zgon.

Obserwacja kliniczna pacjentów trwała łącznie 3 lata.

Postępowanie przy włączeniu do badania grupy z ACS

Kryteria włączenia:

- chorzy z ACS (STEMI, NSTEMI, UA),
- brak przeciwwskazań do leczenia interwencyjnego - koronarografii i koronaro-plastyki.
- Zgoda na udział w badaniu.

Kryteria wyłączenia:

- przewlekła antykoagulacja,
- przebyte pomostowanie naczyń wieńcowych,
- ciężka niewydolność krążenia NYHA III i IV,
- udokumentowane przeciwwskazania do koronarografii.

Tabela nr 1

Charakterystyka badanej grupy z ostrym zespołem wieńcowym (ACS)

Grupa badana	n	%
ACS	98	100
Mężczyźni	73 (w wieku: 55-70 lat)	74,5
Kobiety	25 (w wieku: 43-86 lat)	25,5
Obciążenie wywiadem rodzinnym w kierunku chorób sercowo - naczyniowymi	59	60,2
Nikotynizm	63	64,2
Hiperlipidemia	63	64,2
Nadciśnienie tętnicze	55	56,1
Cukrzyca	11	11,2
Otyłość, nadwaga	34	34,6

W grupie badanych chorych było 73 mężczyzn w wieku 55-70 lat i 25 kobiet w wieku 43-86 lat.

Wśród badanych pacjentów u 59 w wywiadzie rodzinnym występowały choroby sercowo-naczyniowe, 63 pacjentów było aktywnymi palaczami tytoniu, u 63 stwierdzano zaburzenia gospodarki lipidowej, u 55 chorych była już wcześniej lub w trakcie hospitalizacji rozpoznana choroba nadciśnieniowa, u 11 stwierdzano cukrzycę, a u 34 chorych stwierdzano nadwagę lub otyłość BMI>25 kg/m².

Wśród badanych chorych $\frac{3}{4}$ stanowili mężczyźni z czynnikami ryzyka, przede wszystkim z dodatnim wywiadem rodzinnym, nikotynizmem, hiperlipidemią i nadciśnieniem tętniczym.

Terapia

Każdy chory w okresie od rozpoznania (przed pobraniem krwi na badanie układu hemostazy, przed wykonaniem angioplastyki z założeniem stentu) otrzymał jednorazowo kwas acetylosalicylowy w dawce 150-300 mg, kłopidogrel w dawce 300-600 mg oraz jednorazowo heparynę niefrakcjonowaną (ang. *unfractionated heparin* UFH) w dawce 75-100U/kg, sporadycznie heparynę drobnocząsteczkową (ang. *low molecular weight heparin*, LMWH). W okresie hospitalizacji wszyscy pacjenci badanej grupy leczeni byli aspiryną w dawce 75 mg oraz kłopidogrelem 75 mg lub 150 mg przyjmowanymi raz dziennie. Standardowo po angioplastyce chorzy otrzymywali UFH we wlewie ciągłym przez 12 godzin pod kontrolą APTT - czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (ang. *activated partial thromboplastin time*, APTT). Natomiast 29 pacjentów otrzymało w trakcie angioplastyki abciximab. Bolus w dawce - 0,25 µg/kg masy ciała podawano podczas zabiegu PCI, a kontynuowano lek we wlewie ciągłym po zabiegu - 10 µg/min przez 12 h.

W trakcie angioplastyki naczyń wieńcowych implantowano stenty:

- u 75 (76,53%) chorych - stenty metalowe BMS (ang. *bare-metal stent*) ,
- u 22 (22,44%) chorych - stenty uwalniające lek antymitotyczny - DES (ang. *drug eluting stent*),
- u 1 (1%) chorego wszczepiono dwa stenty: zarówno BMS jak i DES.

W trakcie hospitalizacji oraz w okresie poszpitalnym obserwowano pacjentów pod kątem występowania MACE.

W okresie obserwacji poszpitalnej wszyscy chorzy z grupy badanej otrzymywali leczenie kłopidogrelem w dawce dziennej 75 mg i aspiryny w dawce 75 mg do 12 miesięcy od angioplastyki. Pacjenci zażywali również leki z grupy b-blokerów, ACE-I, statyn oraz leki na schorzenia towarzyszące.

Obserwacja kliniczna trwała łącznie 3 lata. Po roku od angioplastyki pacjenci odstawiali kłopidogrel i z leków przeciwplatekowych przyjmowali już tylko aspirynę w dawce 75 mg dziennie.

Materiał porównawczy stanowiły dwie grupy referencyjne:

- Grupa bez udokumentowanej choroby wieńcowej to 64 osób (w tym 62 mężczyzn i 2 kobiety) - grupa C (ang. *control*).
- Grupa pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową (ang. *Coronary Artery Disease, CAD*), którzy w przeszłości przebyli incydent ostrego zespołu wieńcowego to grupa 27 osób (26 mężczyzn, 1 kobieta).

Tabela nr 2

Charakterystyka grupy bez udokumentowanej choroby wieńcowej - grupa C:

C	n	%
Liczba osób	64	100
Wiek- lata	69 ± 5,7	
Mężczyzn	62	96,9
Kobiet	2	3,1
Nikotynizm	7	10,9
Hiperlipidemia	3	4,6
Nadciśnienie tętnicze	29	45,3
Cukrzyca	7	10,9
BMI>25	15	23,4

Grupa referencyjna bez przebytego incydentu wieńcowego w przeszłości (grupa C) liczyła 64 osoby, w tym tylko 2 kobiety, w wieku 69±5,7 lata. W tej grupie: 7 osób było aktywnymi palaczami nikotyny, u 3 osób stwierdzano zaburzenia gospodarki lipidowej, 29 miało rozpoznaną chorobę nadciśnieniową, u 7 osób stwierdzano cukrzycę, a 17 osób miało stwierdzaną otyłość lub nadwagę BMI>25. Pacjenci z grupy referencyjnej bez incydentu wieńcowego w przeszłości - (grupa C) nie przyjmowali leków przeciwkrzepliwych.

Tabela nr 3

Charakterystyka osób ze stabilną chorobą wieńcową (po przebytych w przeszłości incydencie ostrego zespołu wieńcowego - CAD):

CAD	n	%
Liczba osób	27	100
Wiek - lata	71± 6,5 lat	
Mężczyzn	26	96,3
Kobiet	1	3,7
Nikotynizm	8	29,6
Hiperlipidemia	2	7,4
Nadciśnienie tętnicze	25	92,5
Cukrzyca	7	25,9
BMI>25	5	18,5

W grupie z rozpoznaną chorobą wieńcową stabilną (CAD) - było 27 osób w tym 1 kobieta, w wieku 71±6,5 lat. Wśród tych pacjentów: 8 osób przyznawało się do palenia papierosów w przeszłości, u 2 osób stwierdzano zaburzenia gospodarki lipidowej, u 25 była rozpoznawaną choroba nadciśnieniowa, 7 osób miało stwierdzoną cukrzycę i 5 osób miało BMI>25.

Pacjenci z grupy referencyjnej z przewlekłą stabilną chorobą wieńcową (grupa CAD) przyjmowali przewlekle między innymi aspirynę w dawce 75 mg dziennie.

Material badania

Materiałem do badań było osocze krwi obwodowej pobieranej jednorazowo z żyły odłokciowej do probówek z cytrynianem sodu (S-Monovette 2,9 ml, Sarstedt) przed leczeniem inwazyjnym.

Oceny laboratoryjnej dokonywano w Laboratorium WROVASC Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego .

Próbki krwi wirowano 15 minut przy 2500 rpm, następnie uzyskane w ten sposób osocze porcjowano i przechowywano w temp. -80°C do czasu przeprowadzania oznaczeń. U wszystkich osób włączonych do grupy badanej i obu grup referencyjnych badano parametry hemostazy metodą immunoenzymatyczną z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych testów.

Oceniono stężenia:

- czynnika tkankowego (TF),
- inhibitora czynnika tkankowego (TFPI),
- czynnika Willebranda (vWF),
- tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA),
- inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1),
- trombomoduliny (TM),
- kompleksów trombina -antytrombina (TAT).

Opis testów immunoenzymatycznych

Oznaczanie stężenia czynnika tkankowego (TF) w osoczu

Stężenie TF oznaczano w osoczu z zastosowaniem testu IMUBIND Tissue Factor ELISA Kit (American Diagnostics, Stanford, USA), wykorzystującego przeciwciała monoklonalne rozpoznające domeny cząsteczki TF. Próbki inkubowane są w mikrodołkach opłaszczonych wychwytyjącym przeciwciałem. Drugim sprzężonym przeciwciałem specyficznym dla oznaczanej cząsteczki jest peroksydaza chrzanowa (HRP) rozpoznająca związaną TF i tworząca kompletną „kanapkę” przeciwciało-antygen-przeciwciało. Dodanie substratu 3,3',5,5'-tetra-metylobenzydyny (TMB) i jego późniejsza reakcja z HRP skutkuje

zabarwieniem roztworu na niebiesko. Czułość metody jest wzmacniana poprzez dodanie stopującego roztworu kwasu siarkowego zmieniającego kolor roztworu na żółty. Stężenie TF jest określone poprzez pomiar absorbancji przy $\lambda=450$ nm i porównywanie otrzymanych wartości do tych uzyskanych na krzywej standardowej. Oznaczenie wykonano zgodnie z instrukcją producenta z wykorzystaniem czytnika płytek SPECTROstar Nano firmy BMG.

Oznaczenie stężenia inhibitora czynnika tkankowego (TFPI) w osoczu

Stężenie TFPI oznaczano w osoczu z zastosowaniem testu IMUBIND TFPI ELISA Kit (American Diagnostics, Stanford, USA), wykorzystującego królicze przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu TFPI. Specyficzność wychwytywania przeciwciała przez natywną, skompleksowaną i skróconą formę TFPI została potwierdzona poprzez analizy Western Blot. Próbki inkubowane są w mikrodołkach opłaszczonych wychwytyjącym przeciwciałem poliklonalnym. Detekcja następuje z wykorzystaniem biotynylowanego przeciwciała monoklonalnego specyficznego dla domeny I typu Kunitz TFPI.

Z kolei dodanie substratu 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyny (TMB) i jego późniejsza reakcja z HRP skutkuje zabarwieniem roztworu na niebiesko. Czułość metody jest wzmacniana poprzez dodanie stopującego roztworu kwasu siarkowego zmieniającego kolor roztworu na żółty. Kolor, który się pojawia, jest proporcjonalny do ilości związanego TFPI.

Oznaczenie stężenia czynnika von Willebranda (vWF) w osoczu

Stężenie vWF oznaczano w osoczu z zastosowaniem testu IMUBIND vWF ELISA nr kat. 828 (American Diagnostica, Stamford, USA), wykorzystującego kozie przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu vWF. Próbki inkubowano w mikrodołkach opłaszczonych wychwytyjącym przeciwciałem. Następnie dodawano przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase*, HRP), tworzące kompletną „kanapkę” przeciwciało-antygen-przeciwciało. Dodanie substratu TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna) i jego późniejsza reakcja z peroksydazą skutkuje zabarwieniem roztworu na kolor niebieski. Czułość metody jest wzmacniana poprzez dodanie stopującego roztworu 0,5 M kwasu siarkowego zmieniającego kolor roztworu na żółty. Stężenie vWF

określano poprzez pomiar absorbancji przy $\lambda=450$ nm i porównywanie otrzymanych wartości do tych uzyskanych na krzywej standardowej. Oznaczenie wykonano zgodnie z instrukcją producenta z wykorzystaniem czytnika płytek SPECTROstar Nano firmy BMG.

Oznaczanie stężenia tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) w osoczu

Stężenie tPA oznaczano w osoczu z zastosowaniem testu IMUBIND tPA ELISA (American Diagnostica, Stamford, USA), wykorzystującego przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu tPA. Próbki inkubowano w mikrodołkach opłaszczonych wychwytyjącym przeciwciałem. Następnie dodawano przeciwciało sprzężone z peroksydazą, tworzące kompletną „kanapkę” przeciwciało-antygen-przeciwciało. Dodanie substratu ortofenylo-diaminy (OPD) i jego późniejsza reakcja z peroksydazą skutkuje zabarwieniem roztworu na kolor żółty. Czułość metody jest wzmacniana poprzez dodanie stopującego roztworu kwasu siarkowego zmieniającego kolor roztworu na pomarańczowy. Stężenie tPA określano poprzez pomiar absorbancji przy $\lambda=450$ nm i porównywanie otrzymanych wartości do tych uzyskanych na krzywej standardowej. Oznaczenie wykonano zgodnie z instrukcją producenta z wykorzystaniem czytnika płytek SPECTROstar Nano firmy BMG.

Oznaczanie stężenia inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) w osoczu

Ilościowe oznaczenie PAI-1 przeprowadzono wykorzystując test IMUBIND Plasma PAI-1 ELISA (American Diagnostica, Stamford, USA). Płytkę testu pokryta jest mysim monoklonalnym przeciwciałem specyficznym dla ludzkiego PAI-1. Standardy i próbki nałożono do studzienek z immobilizowanym w nich przeciwciałem, które wychwyciło wszystkie cząsteczki PAI-1. Płytkę reakcyjną płukano, usuwając wszystkie niezwiązane substancje, a do studzienek dodawano przeciwciało sprzężone z peroksydazą. Intensywność zabarwienia pojawiającego się po dodaniu substratu ortofenylo-diaminy (OPD) jest proporcjonalna do ilości PAI-1 związanego w początkowym etapie. Stężenie PAI-1 określano poprzez pomiar absorbancji przy $\lambda=490$ nm i porównywanie otrzymanych wartości do tych uzyskanych na krzywej standardowej. Oznaczenie wykonano zgodnie z instrukcją producenta z wykorzystaniem czytnika płytek SPECTROstar Nano firmy BMG.

Oznaczanie stężenia trombomobuliny (TM) w osoczu

Stężenie TM oznaczano w osoczu z zastosowaniem testu IMUBIND Thrombomodulin ELISA Kit (American Diagnostics, Stanford, USA), wykorzystującego przeciwciała monoklonalne rozpoznające domeny cząsteczki TM takie jak: EGF₁-EGF₂. Specyficzność wychwytywania przeciwciała przez TM natywną, skompleksowaną lub skróconą została potwierdzona poprzez analizy Western Blot. Próbkę inkubowaną są w mikrodołkach opłaszczonych wychytującym przeciwciałem. Drugim sprzężonym przeciwciałem specyficznym dla EGF₅.EGF₆ jest peroksydaza chrzanowa (HRP) rozpoznająca związaną TM i tworząca kompletną „kanapkę” przeciwciało-antygen-przeciwciało. Dodanie substratu 3,3',5,5'-tetra-metylobenzydyny (TMB) i jego późniejsza reakcja z HRP skutkuje zabarwieniem roztworu na niebiesko. Czułość metody jest wzmacniana poprzez dodanie stopującego roztworu kwasu siarkowego zmieniającego kolor roztworu na żółty. Stężenie TM jest określone poprzez pomiar absorbancji przy $\lambda=450$ nm i porównywanie otrzymanych wartości do tych uzyskanych na krzywej standardowej. Oznaczenie wykonano zgodnie z instrukcją producenta z wykorzystaniem czytnika płytek SPECTROstar Nano firmy BMG.

Oznaczanie stężenia kompleksu trombiny-antytrombiny (TAT) w osoczu

Oznaczenie TAT przeprowadzono za pomocą zestawu Enzygost[®] micro TAT (Siemens), określającego ilość kompleksu ludzkiej trombiny-antytrombiny III in vitro. Podczas pierwszej inkubacji obecny w próbce TAT wiąże się do przeciwciała skierowanego przeciwko trombinie, związanego na powierzchni mikrodołków. Niezwiązane cząsteczki są usuwane poprzez płukanie. W drugim etapie reakcji sprzężone z peroksydazą ludzkie przeciwciało ATIII wiąże się do wolnych ATIII. Nadmiar przeciwciał sprzężonych z enzymem jest usuwany podczas płukania, następnie określa się aktywność związanych enzymów. Reakcja enzymatyczna pomiędzy peroksydazą wodorową a chromogenem jest zatrzymywana poprzez dodanie rozcieńzonego kwasu siarkowego. Końcowa intensywność koloru, proporcjonalna do stężenia TAT, jest określana spektrofotometrycznie. Oznaczenie wykonano zgodnie z instrukcją producenta z wykorzystaniem czytnika płytek SPECTROstar Nano firmy BMG.

Metody statystyczne

Do analizy statystycznej danych przedstawionych w pracy wykorzystano pakiet statystyczny Statistica wersja 12. (StatSoft, OK, Tulsa, USA)

Dla danych liczbowych normalność rozkładu została sprawdzona testem W Shapiro–Wilka.

Dane o rozkładzie normalnym przedstawiono jako średnie, odchylenia standardowe oraz wartości minimalne i maksymalne.

Dla danych z rozkładem normalnym przy porównywaniu dwóch grup niezwiązanych użyto testu T-studenta. Wykorzystano też współczynnik korelacji Spearmana.

Przy porównywaniu trzech i więcej grup użyto testu ANOVA. W przypadku odrzucenia hipotezy zerowej mówiącej o równości grup, do dalszej weryfikacji stosowano test *post-hoc* Bonferroniego.

Dla danych nieparametrycznych przy porównaniu dwóch grup niezwiązanych użyto testu U Manna-Whitney'a.

W stosowanych analizach założono poziom istotności $p \leq 0,05$.

4. Wyniki badań własnych

Porównano stężenia badanych czynników hemostazy w grupie badanej z ostrym zespołem wieńcowym i grupach referencyjnych: grupą osób bez rozpoznanej choroby wieńcowej i grupą ze stabilną chorobą wieńcową.

Tabela nr 4

Stężenia badanych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w porównaniu z grupą referencyjną pacjentów bez incydentu wieńcowego w przeszłości

Parametr	ACS n=98 średnia ±SD zakres	C n=64 średnia ±SD zakres	p
TF (pg/ml)	240±90,64 78-597	252,04±65,24 118-408	0,35
TFPI (ng/ml)	73±40,82 24,5-198	51,34±8,28 32,5-69,8	<0,00
vWF (mU/ml)	2049±842,68 283-4723	1704±708,28 403-3530	<0,00
tPA (ng/ml)	8,66±4,48 0,5-23,8	7,22±2,87 3,2-17,5	0,02
PAI-1 (ng/ml)	41,20±19 5,8-102,9	21,72±9,07 4,8-44,8	<0,00
TM (ng/ml)	2,43±0,77 1,3-6,6	2,74±0,71 1,5-5,9	0,01
TAT (µg/l)	6,89±13,17 0,7-103	3,36±3,73 0,7-21,1	0,03

Grupa ACS- pacjenci z ostrym zespołem wieńcowym - 98 osób. Grupa C - pacjenci bez choroby wieńcowej w przeszłości - 64 osoby.

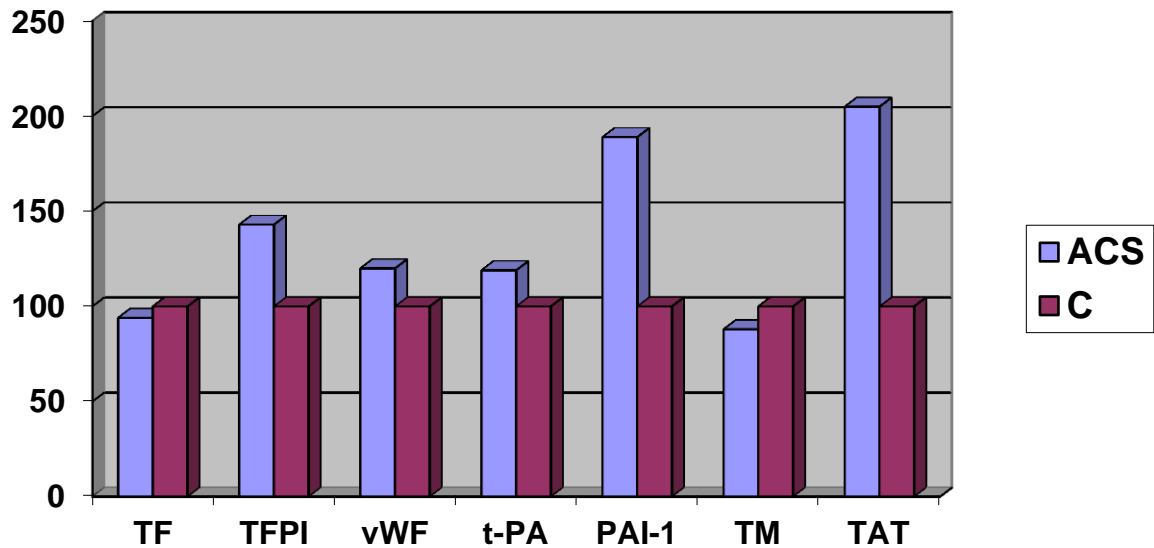
Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy, TFPI - inhibitor czynnika tkankowego, vWF - czynnik von Willebranda, tPA - tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu, TM - trombomodulina, TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej.

Pogrubioną czcionką zaznaczono wartości $p < 0,05$ istotne statystycznie.

Rycina 1a



Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (ACS) z grupą referencyjną (C).

Jako punkt odniesienia (100%) przyjęto wszystkie średnie wartości stężeń grupy C .

ACS - grupa chorych z ostrym zespołem wieńcowym; C - grupa referencyjna, pacjenci bez choroby wieńcowej w przeszłości; TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrombina

W wyniku analizy statystycznej wykazano, iż w grupie pacjentów z ACS stężenia TFPI, tPA, TAT, vWF oraz PAI-1 w osoczu były statystycznie istotnie wyższe niż w grupie chorych bez choroby wieńcowej. Z kolei stężenie TM było statystycznie istotnie niższe w grupie ACS niż w grupie C, a stężenia TF były podobne.

Tabela nr 5

Stężenia badanych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w porównaniu z grupą referencyjną ze stabilną chorobą wieńcową.

Parametr	ACS n=98 średnia±SD zakres	CAD n=27 osób średnia±SD zakres	p
TF (pg/ml)	240±90,64 78-597	272±78,24 117-452	0,09
TFPI (ng/ml)	73±40,82 24,5-198	47,53±9,72 30,7-68,7	<0,00
vWF (mU/ml)	2049±842,68 283-4723	1609±671,53 526-3564	0,01
tPA (ng/ml)	8,66±4,48 0,5-23,8	7,33±1,71 3,3-10,5	0,13
PAI-1 (ng/ml)	41,20±19 5,80-102,90	21,73±9,31 8,30-43,80	<0,00
TM (ng/ml)	2,43±0,76 1,3-6,6	3,40±4,18 1,5-24	0,03
TAT (µg/l)	6,89±13,17 0,7-103	3,96±4,17 0,80-18,2	0,25

Grupa badana ACS - pacjenci z ostrym zespołem wieńcowym - 98 osób.

Grupa CAD - grupa pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową - 27 osób.

Oznaczane parametry: TF - czynnik tkankowy, TFPI - inhibitor czynnika tkankowego, vWF - czynnik von Willebranda, tPA - tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu, TM - trombomodulina, TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej.

Pogrubioną czcionką zaznaczono wartości $p < 0,05$ istotne statystycznie.

Po przeprowadzeniu analizy statystycznej wykazano, iż stężenia TFPI, vWF oraz PAI-1 były statystycznie istotnie wyższe w grupie pacjentów z ACS niż w grupie chorych z CAD. Z kolei stężenie TM było u pacjentów z ACS statystycznie istotnie niższe niż w grupie z CAD, natomiast kompleksy TAT prawie dwukrotnie wyższe, mimo braku statystycznej istotności.

Tabela nr 6

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy pomiędzy grupami referencyjnymi: grupą ze stabilną chorobą wieńcową (CAD) a grupą bez rozpoznanej choroby wieńcowej (C).

Parametr	CAD n=27 średnia±SD zakres	C n=64 osoby średnia±SD zakres	p
TF (pg/ml)	272±78,24 117-452	252,94±65,24 118-408	0,20
TFPI (ng/ml)	47,53±9,72 30,7-68,7	51,34±8,28 32,5-69,8	0,06
vWF (mU/ml)	1609,57±671,53 526-3564,2	1704,07±708,28 403-3530	0,55
tPA (ng/ml)	7,33±1,71 3,3-10,5	7,22±2,87 3,2-17,5	0,85
PAI-1 (ng/ml)	21,73±9,31 8,3-43,8	21,72±9,07 4,80-44,80	0,99
TM (ng/ml)	3,40±4,18 1,5-24	2,74±0,71 1,50-5,9	0,22
TAT (μg/l)	3,96±4,17 0,8-18,2	3,36±3,73 0,7-21,1	0,50

Grupa referencyjna CAD - grupa ze stabilną chorobą wieńcową, z przebyłym w przeszłości incydem ostrego zespołu wieńcowego - 27 osób.

Grupa referencyjna C - grupa bez incydemu wieńcowego w przeszłości - 64 osoby.

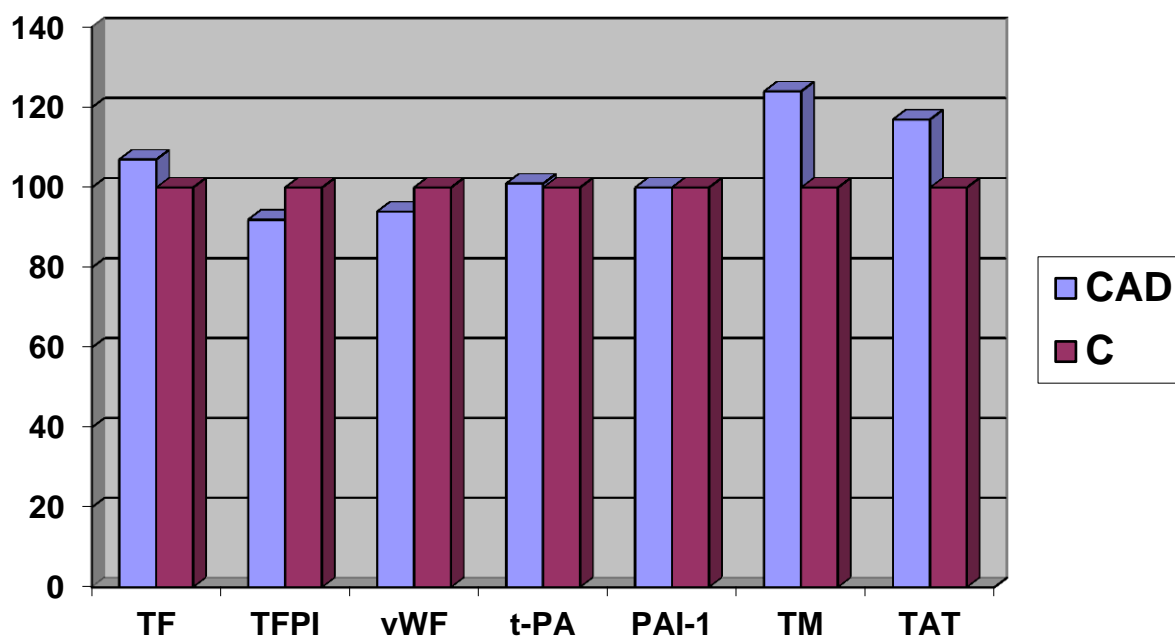
Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrrombina.

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ocenianych parametrach pomiędzy grupami referencyjnymi, które służyły do porównania wyników badanych parametrów hemostazy w grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym.

Rycina 2a



Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową (CAD) z grupą referencyjną (C).

Jako punkt odniesienia (100%) przyjęto wszystkie średnie wartości stężeń grupy referencyjnej .

CAD - grupa referencyjna pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową; C - grupa referencyjna, pacjenci bez choroby wieńcowej w przeszłości; TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrombina

Ocena badanych czynników hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym

Tabela nr 7

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym z podziałem na chorych z chorobą wieńcową niestabilną, zawałem serca bez uniesienia odcinka ST i zawałem serca z uniesieniem odcinka ST

Parametr	UA n=22 średnia±SD zakres	NSTEMI n=22 średnia±SD zakres	STEMI n=54 średnia±SD zakres
TF (pg/ml)	235,68±92,69 78-439	232,18±69,41 164-482	244,94±98,23 103-597
TFPI (ng/ml)	90,53±49,97 37,3-193	65,71±33,66 28,9-169,4	69,74±38,11 24,5-198
vWF (mU/ml)	2028±711 998-3421	1923±855 510-3471	2109±893 283-4723
tPA (ng/ml)	7,63±4,32 0,5-17,5	8,94±4,82 3,4-19,6	8,97±4,43 2,4-23,8
PAI-1 (ng/ml)	34,55±13,66 14,8-73,1	38,63±19,27 5,8-69,6	44,96±20,12 11,5-102,9
TM (ng/ml)	2,18±0,48 1,5-3,5	2,46±0,71 1,4-3,8	2,52±0,87 1,3-6,6
TAT (μg/l)	3,85±3,28 0,7-15,7	8,2±15,39 0,9-75	7,61±14,64 1,4-103

Grupa UA - pacjenci z dławicą piersiową niestabilną - 22 osoby.

Grupa STEMI - pacjenci z rozpoznany zawałem typu STEMI - 54 osoby .

Grupa NSTEMI - pacjenci z rozpoznany zawałem typu NSTEMI - 22 osoby.

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic stężeń badanych czynników hemostazy pomiędzy podgrupami chorych: z dławicą niestabilną, zawałem serca NSTEMI i zawałem serca STEMI. Zwraca uwagę duży zakres wartości (kilka do kilkudziesięciu razy).

Tabela nr 8

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy pomiędzy mężczyznami a kobietami w grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym .

ACS	Mężczyźni n=73 średnia ±SD zakres	Kobiety n=25 średnia ±SD zakres	p
TF (pg/ml)	231±77,18 101- 482	265±120,19 78 - 597	0,10
TFPI(ng/ml)	72,62±40,94 26,1-193	76,1±41,23 24,5 -198	0,71
vWF(mU/ml)	2080,49±853,71 283 - 4723	1958±819,74 510-3318	0,53
tPA (ng/ml)	8,52±4,22 1,1-23,8	9,08±5,24 0,5-19,6	0,59
PAI-1(ng/ml)	40,49±19,55 5,8-102,9	43,29±17,54 18,8-79	0,52
TM (ng/ml)	2,43±0,79 1,4 - 6,6	2,43±0,72 1,3-3,80	0,99
TAT (µg/l)	6,54±14,42 0,7 - 103	7,94±8,72 1,8-37,5	0,65

ACS - grupa badanych chorych z ostrym zespołem wieńcowym, mężczyźni vs. kobiety.

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej.

Porównując grupę mężczyzn i kobiet z ostrym zespołem wieńcowym nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy nimi w stężeniach badanych czynników hemostazy.

Tabela nr 9

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym poniżej i powyżej 65 roku życia.

ACS	<65 r.ż. n=68 średnia ±SD zakres	>65 r.ż. n=30 średnia ±SD zakres	p
TF (pg/ml)	249,34 ±97,47 101-597	218,83±69,73 78-359	0,12
TFPI (ng/ml)	75,70±40,65 24,5-198	68,53±41,49 26,1-190	0,42
vWF (mU/ml)	2003±824 510-4723	2153±886 283-3471	0,41
tPA (ng/ml)	8,39±4,22 0,5-20,5	9,27±5,05 1,1-23,8	0,37
PAI-1 (ng/ml)	39,28±19,60 5,80-102,9	45,56±17,11 15,20-74,70	0,13
TM (ng/ml)	2,37±0,78 1,3-6,6	2,57±0,73 1,5-3,9	0,22
TAT (µg/l)	7,70±15,41 1,1-103	5,09±5,15 0,7-29,9	0,36

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrambina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej.

W badanej grupie chorych z ACS poniżej i powyżej 65 roku życia nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych w stężeniach badanych czynników hemostazy.

Tabela nr 10

Ocena korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym a stężeniami badanych czynników hemostazy.

ACS n=98	r	p
TF	-0,0092	< 0,05
TFPI	-0,0800	< 0,05
vWF	0,1967	< 0,05
t-PA	0,1396	< 0,05
PAI-1	0,1006	< 0,05
TM	0,1480	< 0,05
TAT	-0,0514	< 0,05

ACS - grupa badanych chorych z ostrym zespołem wieńcowym.

r - korelacja metodą Spearmana

p - istotność statystyczna

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I -inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina- antytrombina

Nie stwierdzono istotnych korelacji badanych czynników hemostazy z wiekiem pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym.

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od współistnienia czynników prozakrzepowych takich jak: nikotynizm, hiperlipidemia, choroba nadciśnieniowa, cukrzyca i otyłości.

Tabela nr 11

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od nikotynizmu.

Parametr	Chorzy ACS <u>niepalacy</u> n=50	Chorzy ACS <u>palacy</u> n=48	<i>p</i>
	średnia±SD zakres	średnia±SD zakres	
TF (pg/ml)	277,96±98,20 78-597	252,54±81,15 101-482	0,18
TFPI (ng/ml)	75,83±45,78 24,5-198	71,07±35,25 28,9-185	0,56
vWF (mU/ml)	2095±854 283-3904	2001±836 845-4723	0,58
t-PA (ng/ml)	8,17±4,20 0,5-19,6	9,17±4,74 1,1-23,80	0,27
PAI-1 (ng/ml)	39,62±17,42 5,8-79	42,84±20,58 11,5-102,9	0,40
TM (ng/ml)	2,40±0,69 1,3-3,9	2,46±0,84 1,4-6,6	0,68
TAT (µg/l)	9,06±18,00 0,7-103	4,64±3,17 1,4-16,9	0,09

Badani chorzy z ostrym zespołem wieńcowym (ACS):

- 50 chorych niepalących,
- 48 chorych palących.

Oznaczane parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I -inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina- antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach badanych parametrów hemostazy pomiędzy chorymi palącymi a niepalącymi tytoń, zwraca jednak uwagę prawie dwukrotnie niższe stężenie kompleksów TAT u chorych palących z ACS.

Tabela nr 12

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od występowania hiperlipidemii.

Parametr	Chorzy ACS z hiperlipidemią n=63 średnia±SD zakres	Chorzy ACS bez hiperlipidemii n=35 średnia±SD zakres	<i>p</i>
TF (pg/ml)	233,306±89,69 78-597	252,22±92,35 133-570	0,32
TFPI (ng/l)	71,17±35,68 28,9-198	77,68±49,04 24,5-193	0,45
vWF (mU/ml)	19993,9±815,69 283-3740	2149,17±892,54 739-4723	0,38
t-PA (ng/ml)	8,99±4,95 1,1-23,8	8,06±3,46 0,5-14,2	0,32
PAI-1 (ng/ml)	42,11±19,82 5,8-102,9	39,55±17,59 15,1-75,6	0,52
TM (ng/ml)	2,41±0,82 1,3-6,6	2,46±0,66 1,5-3,9	0,74
TAT (µg/l)	6,17±12,73 0,9-103	8,19±14,01 0,7-75	0,47

Badani chorzy z ostrym zespołem wieńcowym: 63 chorych z rozpozną hiperlipidemią, 35 chorych bez hiperlipidemii

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrombina
Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej.

Nie stwierdzono istotnych statycznie różnic w stężeniach badanych czynników hemostazy pomiędzy chorymi ze stwierdzaną hiperlipidemią a chorymi bez rozpoznanej hiperlipidemii.

Tabela nr 13

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od występowania choroby nadciśnieniowej.

Parametr	Chorzy ACS <u>bez choroby nadciśnieniowej</u> n=43 średnia±SD zakres	Chorzy ACS <u>z chorobą nadciśnieniową</u> n=55 średnia±SD zakres	<i>p</i>
TF (pg/ml)	231,65±65,44 103-439	246,52±106,43 78-597	0,42
TFPI (ng/ml)	75,54±42,20 24,5-193	71,90±40,03 26,1-198	0,66
vWF (mU/ml)	1925±831 510-4723	2146±846 283-3904	0,19
t-PA (ng/ml)	7,81±4,04 0,5-19	9,32±4,72 1,1-23,8	0,09
PAI-1 (ng/ml)	38,42±20,77 5,8-102,9	43,37±17,39 12,3-87,2	0,20
TM (ng/ml)	2,30±0,57 1,4-3,80	2,53±0,88 1,3-6,6	0,14
TAT (μg/l)	6,00±11,2 0,7-75	7,59±14,58 1,4-103	0,55

Badani chorzy z ostrym zespołem wieńcowym (ACS):

- 43 chorzy bez rozpoznanej choroby nadciśnieniowej
- 55 chorych z rozpoznaną chorobą wieńcową

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy, TFPI - inhibitor czynnika tkankowego, vWF - czynnik von Willebranda, tPA - tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-I -inhibitor aktywatora plazminogenu, TM - trombomodulina, TAT - kompleks trombina-antytrambina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach badanych czynników krzepnięcia pomiędzy chorymi z chorobą nadciśnieniową, a chorymi bez choroby nadciśnieniowej.

Tabela nr 14

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie osób z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od występowania cukrzycy.

Parametr	Chorzy ACS <u>bez cukrzycy</u> n=81 średnia±SD zakres	Chorzy ACS <u>z cukrzycą</u> n=17 średnia±SD zakres	<i>p</i>
TF (pg/ml)	240,43±85,63 101-570	237,94±114,61 78-597	0,91
TFPI (ng/ml)	71,69±37,93 24,5-193	82,12±53,06 39,7-198	0,34
vWF (mU/ml)	2062±863 283-4723	1987±757 1087-3318	0,73
t-PA (ng/ml)	8,56±4,19 0,5-20,5	9,14±5,77 2,40-23,80	0,63
PAI-1 (ng/ml)	40,53±18,84 5,8-102,9	44,40±20,02 18,8-79	0,44
TM (ng/ml)	2,49±0,79 1,4-6,6	2,12±0,58 1,3-3,6	0,07
TAT (μg/l)	7,06±14,15 0,9-103	6,12±7,00 0,7-29,9	0,79

Badani chorzy z ostrym zespołem wieńcowym (ACS): 81 chorych bez rozpoznanej cukrzycy i 17 chorych z rozpoznaną cukrzycą.

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru

p - poziom istotności statystycznej

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach badanych parametrów hemostazy pomiędzy chorymi z rozpoznaną cukrzycą, a chorymi bez cukrzycy.

Tabela nr 15

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie osób z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od wartości BMI:

Parametr	Chorzy ASC <u>z BMI>25</u> n=37 średnia±SD zakres	Chorzy ASC <u>z BMI<25</u> n=61 średnia±SD zakres	<i>p</i>
TF (pg/ml)	240,43±106,17 102-597	239,73±80,73 78-570	0,97
TFPI (ng/ml)	71,18±32,11 28,9-169,4	74,90±45,50 24,5-198	0,66
vWF (mU/ml)	2049±791 283-3421	2049±878 510-4723	0,99
t-PA (ng/ml)	9,73±4,80 2,4-23,8	8,01±4,18 0,5-20,5	0,06
PAI-1 (ng/ml)	48,25±18,17 12,3-102,9	36,92±18,02 5,8-75,6	<0,00
TM (ng/ml)	2,39±0,57 1,4-3,6	2,49±0,86 1,3-6,6	0,30
TAT (µg/l)	4,43±4,48 0,9-29,9	8,39±16,13 0,70-103	0,15

Badani chorzy z ostrym zespołem wieńcowym (ACS): 37 chorych z BMI>25 i 61 chorych z BMI<25.

Oznaczane parametry: TF - czynnik tkankowy, TFPI - inhibitor czynnika tkankowego, vWF - czynnik von Willebranda, tPA - tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu, TM - trombomodulina, TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru.

p - poziom istotności statystycznej

Pogrubioną czcionką zaznaczono wartość $p < 0,05$ istotne statystycznie.

W badanej grupie chorych z ACS, biorąc pod uwagę wymienione powyżej czynniki hemostazy, jedynie wśród pacjentów z BMI>25, obserwowano istotnie statystycznie wyższe stężenie PAI-1 i nieistotnie statystycznie, ale prawie dwukrotnie niższe stężenie kompleksów TAT.

Ocena stężeń badanych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym przed leczeniem inwazyjnym w zależności od założonych stentów i leczenia abciximabem

Tabela nr 16

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym przed leczeniem inwazyjnym w podziale na podgrupy w zależności od dalszego leczenia: z założonymi stentami metalowymi (BMS) do chorych z założonymi stentami powlekanymi lekiem (DES)

Parametr	Pacjenci ACS ze stentami BMS n=75 średnia±SD zakres	Pacjenci ACS ze stentami DES n=22 średnia±SD zakres	<i>p</i>
TF (pg/ml)	243,62±95,60 78-597	225,27±73,06 133-439	0,40
TFPI (ng/ml)	73,50±41,05 24,5-198	74,27±41,80 26,1-190	0,93
vWF (mU/ml)	2067±853 283-4723	2042±803 845-3471	0,90
t-PA (ng/ml)	8,88±4,46 0,5-23,8	8,00±4,64 2,4-20,5	0,42
PAI-1 (ng/ml)	41,38±19,05 5,8-102,9	41,02±19,63 11,5-75,6	0,93
TM (ng/ml)	2,45±0,80 1,3-6,6	2,32±0,64 1,5-3,9	0,49
TAT (µg/l)	7,82±14,92 0,9-103	3,76±1,79 0,7-6,7	0,20

Badani chorzy z ostrym zespołem wieńcowym: 75 chorych z wszczepionym BMS v. 22 chorych z DES (jeden chory miał wszczepiony BMS i DES).

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru

p - poziom istotności statystycznej

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ocenie stężeń badanych czynników hemostazy we krwi pacjentów z ACS pobranej przed leczeniem inwazyjnym, pomiędzy

chorymi leczonymi dalej wszczepionymi stentami BMS, a chorymi z wszczepionymi stentami DES.

Tabela nr 17

Porównanie oznaczonych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od podania abciximabu

Parametr	Chorzy ACS bez abciximabu n=70 średnia±SD zakres	Chorzy ACS z abciximabem n=28 średnia±SD zakres	<i>p</i>
TF (pg/ml)	230,55±79,18 78-482	263,60±112,61 103-597	0,10
TFPI (ng/ml)	73,14±42,33 24,5-193	74,40±37,50 40,9-198	0,89
vWF (mU/ml)	1969±763 510-3904	2249±1001 283-4723	0,13
tPA (ng/ml)	8,31±4,37 0,5-23,8	9,54±4,71 2,4-20,5	0,22
PAI-1 (ng/ml)	39,72±17,36 5,8-75,6	44,90±22,53 11,5-102,9	0,22
TM (ng/ml)	2,42±0,63 1,4-3,9	2,46±1,05 1,3-6,6	0,81
TAT (µg/l)	6,62±14,98 0,7-103	7,57±6,97 1,80-37,5	0,75

Badani chorzy z ostrym zespołem wieńcowym (ACS): 28 pacjentom podano abciximab; a 70 pacjentom nie podawano leku.

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru

p - poziom istotności statystycznej

Nie stwierdzano również istotnych różnic statystycznych pomiędzy grupą chorych leczonych abciximabem, a grupą chorych, którym nie podano abciximabu.

Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym we krwi pobranej przed leczeniem inwazyjnym, u których MACE wystąpiły i u których MACE nie wystąpiły w okresie obserwacji.

Tabela nr 18

Porównanie stężeń badanych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym we krwi pobranej przed leczeniem inwazyjnym bez epizodu MACE i chorych z MACE po rocznej obserwacji:

Parametr	BEZ MACE n=89 średnia±SD zakres	Z MACE n=7 średnia±SD zakres	<i>p</i>
TF (pg/ml)	236±91,79 78-597	252±74,62 158-356	0,66
TFPI (ng/ml)	75±42,40 24,5-198	56±13,14 43,4-79,6	0,26
vWF (mU/ml)	1979±791,39 283-3904	2641±1209 786-4723	0,04
tPA (ng/ml)	8,59±4,49 0,5-23,8	9,10±5,15 3,4-19,6	0,77
PAI-1 (ng/ml)	41±19,12 11,5-102,9	33±18,15 5,8-55,2	0,26
TM (ng/ml)	2,44±0,78 1,30-6,60	2,20±0,54 1,4-3,1	0,42
TAT (µg/l)	6,78±13,71 0,7-103	9,24±5,97 4,5-18,7	0,64

Obserwacja roczna grupy badanej z ACS:

- 89 chorych bez incydentu MACE
- 7 chorych z incydentem MACE.

Oznaczone parametry: TF - czynnik tkankowy, TFPI - inhibitor czynnika tkankowego, vWF - czynnik von Willebranda, tPA - tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu, TM - trombomodulina, TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru

p - poziom istotności statystycznej

Pogrubioną czcionką zaznaczono wartości $p < 0,05$ istotne statystycznie

Tabela nr 19

Porównanie stężeń badanych parametrów hemostazy we krwi pobranej przed leczeniem inwazyjnym u chorych z ostrym zespołem wieńcowym bez epizodu MACE i z MACE po 3 latach obserwacji

Parametr	BEZ MACE n=76 średnia±SD zakres	Z MACE n=21 średnia±SD zakres	<i>p</i>
TF (pg/ml)	237±94,83 78-597	245±73,17 101-395	0,72
TFPI (ng/ml)	74±42,52 24,5-198	69±35,71 36,1-190	0,60
vWF (mU/ml)	2008±786,05 283-3904	2150±1029 786-4723	0,49
tPA (ng/ml)	8,46±4,63 0,5-23,8	9,37±4,00 3,4-19,6	0,41
PAI-1 (ng/ml)	41±19,16 11,5-102,9	40±19,25 5,8-74,7	0,83
TM (ng/ml)	2,38±0,65 1,3-3,9	2,58±1,09 1,4-6,6	0,28
TAT (μg/l)	5,88±9,70 0,9-75	10,73±21,64 0,7-103	0,13

Obserwacja grupy badanej z ACS przez trzy lata:

- 76 chorych bez incydentu MACE
- 21 chorych z incydentem MACE.

Oznaczane parametry: TF - czynnik tkankowy; TFPI - inhibitor czynnika tkankowego; vWF - czynnik von Willebranda; tPA - tkankowy aktywator plazminogenu; PAI-I - inhibitor aktywatora plazminogenu; TM - trombomodulina; TAT - kompleks trombina-antytrombina

Jednostka miary wpisana obok skrótu mierzonego parametru

p - poziom istotności statystycznej

Biorąc pod uwagę występowanie epizodów MACE do roku od ACS obserwowano statystycznie istotne wyższe wyjściowe stężenie vWF u pacjentów, u których MACE wystąpiło.

W obserwacji 3-letniej (łącznie z pierwszym rokiem) nie stwierdzano istotnych różnic pomiędzy stężeniami badanych wyjściowo czynników hemostazy chorymi z MACE, a bez MACE.

Poza tym, podobnie jak po roku u pacjentów z ACS z MACE kompleksy TAT były prawie dwukrotnie wyższe, niż u pacjentów bez MACE, chociaż bez istotności statystycznej.

Przebieg kliniczny i występowanie dużych niepożądanych objawów sercowo-naczyniowych (MACE) u chorych z ostrym zespołem wieńcowym poddanych przezskórnej interwencji wieńcowej.

W okresie 1 roku od incydentu hospitalizacji z powodu ACS w obserwowanej grupie chorych (98 pacjentów) stwierdzono 7 incydentów MACE, w tym:

- 1 zgon (w siódmej dobie po incydencie ACS - zgon nastąpił w domu pacjenta i według relacji pogotowia był to zgon sercowy),
- 1 zawał,
- 5 epizodów nawrotu dławicy piersiowej, w tym jeden zakończony operacją pomostowania naczyń wieńcowych.

Wśród chorych, u których wystąpiły epizody MACE- 5 chorych miało implantowane stenty BMS, a 2 chorych - DES.

Po 3 latach od incydentu ACS w grupie obserwowanych chorych miało miejsce 21 MACE - licząc również chorych z MACE w pierwszym roku obserwacji.

Obserwowano łącznie:

- 2 zgony,
- 2 zawały,
- 1 udar – TIA,
- 16 epizodów nawrotu dławicy piersiowej - w tym 2 epizody zakończone zabiegiem CABG.

Epizody MACE wystąpiły u 17 chorych z BMS i u 4 chorych z DES.

Tabela nr 20

Wyniki obserwacji klinicznej badanych pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym n=98 :

	po 1 roku	po 3 latach
Liczba badanych	97 (98.9%)	96 (97,9%)
Liczba zgonów	1 (1%)	2 (2%)
Liczba zawałów	1 (1%)	2 (2%)
Liczba udarów	0 (0%)	1 (1%)
Nawrót dławicy piersiowej	5 (5,1%)	16 (16,3%)
MACE u pacjentów z wszczepionym BMS	5 (5,1%)	17 (17,3%)
MACE u pacjentów z wszczepionym DES	2 (2%)	4 (4%)

5. Omówienie wyników badań własnych oraz dyskusja

Według rejestru ACS-PL, opublikowanym w 2007 r. roczne występowanie ACS w Polsce wynosi 140000 osób, w tym u 50000 (35,6%) pacjentów rozpoznaje się zawał serca z uniesieniem odcinka ST, u 30000 (21,2%) zawał serca bez uniesienia odcinka ST, a u 60000 (42,8%) chorych rozpoznaje się dławicę piersiową niestabilną⁵³.

W niniejszym zadaniu zasadniczą grupą badaną stanowiło 98 chorych z ostrym zespołem wieńcowym, ze wspomnianymi trzema postaciami ostrego zespołu wieńcowego, ale w innych proporcjach. Największy odsetek stanowili chorzy ze STEMI - 54 osoby (55,2%), grupa chorych z NSTEMI liczyła 22 osoby (22,4%), a grupa chorych z UA obejmowała 22 osoby (22,4%), co wynikało z losowego doboru kolejno rekrutowanych chorych.

Porównanie wyników badanych parametrów hemostazy w osoczu krwi pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (ACS) z osobami grupy referencyjnej bez incydentów wieńcowych (C) wykazało statystycznie wyższe stężenia TFPI, vWF, t-PA, PAI-1, TM i TAT w grupie chorych z ACS. Natomiast w porównaniu z osobami grupy referencyjnej z przewlekłą chorobą wieńcową (CAD) wykazało statystycznie wyższe stężenia u chorych z ACS parametrów: TFPI, vWF, PAI-1 i TM. Tym samym potwierdzono u chorych z ACS zwiększoną szczególnie trombinogenezę (zmianę kompleksów TAT i TM) oraz zahamowanie fibrynolizy (wzrost PAI-1), prowadzące do zakrzepu w tętnicy wieńcowej, co może świadczyć o tzw. „pogotowiu zakrzepowym”.

Z danych z piśmiennictwa wynika, że stężenie TF w osoczu krwi w chorobie niedokrwiennej serca jest zwykle podwyższone. TF obecny w dużym stężeniu w lipidowym jądrze blaszki miażdżycowej przy jej uszkodzeniu zapoczątkowuje kaskadę krzepnięcia tworząc kompleks z czynnikiem VII i aktywując czynnik X^{54, 55}.

W przedstawionej pracy oceniono jednorazowo, jeszcze przed podjęciem leczenia inwazyjnego, stężenie czynnika tkankowego (TF), które było w ACS podwyższone w porównaniu do stężenia u osób zdrowych, ale podobne jak w obu grupach referencyjnych i wynosiło 240±91pg/ml grupie osób chorych wobec 252±65 i 272±78pg/ml w grupach referencyjnych.

W badaniu Falcianiego i wsp. opisanym w 1998 r. stężenie TF u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca wynosiło średnio 215,4 pg/ml i było znacząco wyższe niż w grupie

kontrolnej pacjentów zdrowych, w której stężenie TF wynosiło 142,5 pg/ml, $p < 0,001$. W badaniu tym stwierdzono, że najwyższe wartości stężeń były u pacjentów z ACS, średnio 255 pg/ml, natomiast w grupie chorych z CAD - 182,0 pg/ml⁵⁶. W niniejszym badaniu, odwrotnie niż w cytowanym powyżej, stężenie TF było w grupie z ACS nieistotnie nieco niższe, średnio 240 pg/ml, w porównaniu do grupy referencyjnej osób bez choroby wieńcowej (C), gdzie stężenie wyniosło średnio 252 pg/ml, jak również niższe niż w grupie referencyjnej chorych ze stabilną chorobą wieńcową - 272 pg/ml, $p = 0,09$. Wydaje się, że stężenie TF u chorych z ACS mogło być spowodowane obligatoryjnym podaniem pacjentom heparyny UFH (rzadziej LMWH) przez zespół pogotowia ratunkowego. Należy dodać, że stężenie TF u chorych z chorobą wieńcową, zarówno w stanie ostrym jak i w stabilnej chorobie wieńcowej, może odzwierciedlać także wpływ schorzeń towarzyszących i ich terapii. Podwyższone stężenie TF występuje także w nadciśnieniu tętniczym, hiperlipidemii, cukrzycy i nikotynizmie⁵⁷. Może je obniżać natomiast leczenie hipotensyjne, przeciwplatekcyjne oraz statyny^{58, 59}.

Tworzeniu się ostrego zakrzepu i rozplemowi intymy po angioplastyce w wyniku uszkodzenia śródbłonna może zapobiegać tkankowy inhibitor zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia - tkankowy inhibitor szlaku zależnego od czynnika tkankowego - TFPI⁶⁰.

W niniejszym badaniu stężenia TFPI w grupie chorych z ACS były istotnie wyższe, średnio - 73 ng/ml, wobec grupy referencyjnej C - 51,3 ng/ml, ($p = 0,00003$) i wobec grupy referencyjnej CAD - 47,53 ng/ml, ($p = 0,001$). Niniejsze wyniki potwierdzają obserwacje innych badaczy, np. Radziwona i wsp.⁶¹ i wspomnianego Falcianiego i wsp.⁵⁶ Podwyższony poziom TFPI jest wyrazem hiperplazji zainicjowanej przez TF i hamowania trombogenezy^{60, 62}. Badanie Caplice i wsp. z 1998 r. zwraca uwagę na zwiększone występowanie stężenia TFPI w blaszkach miażdżycowych ze zmniejszoną aktywnością TF⁶². Być może podobne zjawisko zachodzi we krwi. Jak wykazali Soejima i wsp. w 1999 r. zastosowanie heparyny w *angina pectoris* zwiększa stężenie zarówno TFPI jak i TF⁶³. W niniejszym badaniu pacjenci z ACS otrzymywali heparynę przed dotarciem do szpitala. Osoby bez incydentu wieńcowego (grupy C), jak i ze stabilną chorobą wieńcową (grupa CAD) heparyny nie otrzymywali. W badaniach *in vitro* Radziwon i wsp. wykazali, że rekombinowany TFPI hamował zarówno czas protrombinowy (PT) jak i czas kaolinowo-kefalinowy (APTT) oraz generację trombiny w osoczu⁶¹.

Czynnik von Willebranda (vWF) bierze udział zarówno w agregacji płytek krwi i w procesie hemostazy będąc nośnikiem i stabilizatorem białkowym dla czynnika VIII. W przeprowadzonym badaniu u pacjentów z ACS stwierdzano podwyższone stężenie vWF, pomimo heparynizacji i podania kłopidogrelu, średnio 2049 mU/ml vs grupa referencyjna C ($p=0,007$), i vs grupa CAD ($p=0,013$). Badania te potwierdzają wyniki badania z 2004 r. Hepera i wsp., którzy stwierdzali między innymi podwyższone stężenia vWF u pacjentów w ACS, wykazując również brak wpływu leczenia przeciwplatekowego na stężenie vWF⁶⁴. Również w badaniu Eikelbooma i wsp. z 2002 r., w zawałe NSTEMI podwyższony przy przyjęciu poziom vWF nie ulegał zmniejszeniu po długotrwałym leczeniu aspiryną i kłopidogrelem⁶⁵. Natomiast Xiang i wsp. w 2016 r. stwierdzali, że przy wyższym stężeniu vWF zwiększa się ryzyko wystąpienia zawału serca czy udaru⁶⁶.

Tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) i jego inhibitor (PAI-1) są parametrami pozwalającymi na ocenę aktywacji plazminogenu do plazminy, głównego enzymu fibrynolitycznego, będącego fizjologicznym mechanizmem rozpuszczania zakrzepów, dzięki temu utrzymującym drożność naczyń krwionośnych. Proces fibrynolizy jest kolejnym etapem hemostazy. W warunkach fizjologicznych aktywatory i inhibitory plazminogenu pozostają w równowadze, a jej zaburzenie odgrywa rolę zarówno w rozwoju, jak i w progresji blaszki miażdżycowej i często spotykane jest w chorobie niedokrwiennej serca.

W niniejszym badaniu stężenie t-PA u osób w grupie z ACS wynosiło $8,66 \pm 4,48$ ng/ml w porównaniu do grupy referencyjnej osób bez incydentów wieńcowych $7,22 \pm 2,87$ ng/ml ($p=0,023$) i u pacjentów z przewlekłą chorobą wieńcową $7,33 \pm 1,71$ ng/ml ($p=0,132$) - bez istotności statystycznej. Średnie stężenie t-PA we wszystkich badanych grupach mieściło się w granicach 10 ng/ml uznanych za normę, a około dwukrotny wzrost t-PA u niektórych osób z grupy ACS do 23,8 ng/ml, a także z grupy C do 17,5 ng/ml może wskazywać na niewielki udział tego czynnika w procesie hemostazy, jednak zgodny z poglądami innych badaczy, np. w 1995 r. Lupu i wsp. opisywali wyższe wartości tPA przy uszkodzeniach blaszek miażdżycowych⁶⁷. Podobnie w 1998 r. Thogerson i wsp. wykazali, że wysokie stężenia t-PA i PAI-1, obok vWF, przewidywały wystąpienie pierwszego zawału serca⁶⁸.

Ważne znaczenie u chorych z ostrym zespołem wieńcowym ma pomiar inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1). W niniejszym badaniu wynosił on średnio $41,20 \pm 19$ ng/ml i był około dwukrotnie wyższy od obu grup referencyjnych, w grupie C wynosił $21,72 \pm 9,07$ ng/ml, w grupie CAD $21,73 \pm 9,31$ ng/ml ($p=0,000001$). Efekt ten potwierdza znany od

kilkudziesięciu lat fakt o wysokim stężeniu PAI-1 w zawale serca i o konieczności zwiększonego hamowania t-PA. Thogerson i wsp. uważali, że wysokie stężenia PAI-1 mogły wskazywać na możliwość występowania wcześniej pierwszego zawału serca.

W badaniu Oloffsona i wsp. stwierdzono także wyższe stężenia t-PA i PAI-1 u osób z dławicą piersiową i zmniejszeniem światła dużego naczynia wieńcowego o 50% w porównaniu do zdrowych równolatków⁶⁹. W innym badaniu, Marcucci i wsp. w 2006 r. uznali PAI-1 obok t-PA za niezależne czynniki ryzyka, przewidujące wystąpienie ponownego zawału serca⁷⁰. Podobnie Hamsten i wsp. w 1987 r. uznawali PAI-1 za czynnik ryzyka zawału serca⁷¹.

Trombomodulina (TM) jest powierzchniowym receptorem dla trombiny głównie na powierzchni śródbłonna naczyniowego. Jest zatem markerem uszkodzenia śródbłonna i naturalnym antykoagulantem hamującym funkcje trombiny. W niniejszym badaniu stężenia TM w ostrym zespole wieńcowym było niewysokie i wynosiło $2,43 \pm 0,77$ ng/ml więc było istotnie niższe wobec stężenia u osób bez incydentu wieńcowego (C) - $2,74 \pm 0,71$ ng/ml ($p=0,01$) i u chorych z przewlekłą chorobą wieńcową (CAD) - $3,40 \pm 4,18$ ng/ml ($p=0,03$). Rozpuszczalna forma TM odgrywa ważną rolę w procesie regulacji hemostazy. W prowadzonym w 1998 r. badaniu Mihary i wsp. nie stwierdzano istotnej różnicy między osoczymi stężeniami TM w ostrym zespole wieńcowym (ACS) a grupą pacjentów z chorobą wieńcową i osobami zdrowymi⁷². Boffa i wsp. stwierdzali istotnie podwyższone stężenia TM u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w porównaniu do grupy osób zdrowych¹². Także wyższe poziomy TM obserwowano w grupie pacjentów z przewlekłą chorobą wieńcową (CAD), co wskazywałoby na uwalnianie ze śródbłonna TM do osocza w sposób raczej przewlekły. TM bierze także udział w aktywacji plazminogenu w procesach zapalnych. Natomiast Mihara i wsp. w 1997 r. nie stwierdzali istotnych różnic w stężeniach TM pomiędzy chorymi z chorobą wieńcową a osobami zdrowymi⁷².

Kompleks trombina-antytrombina (TAT) jest czułym wskaźnikiem nadkrzepliwości krwi i uznanym parametrem trombinogenezy. Kompleks TAT ma masę cząsteczkową 88 kDa i okres półtrwania 15 min., jest nieaktywny biologicznie a antytrombina powoduje zahamowanie właściwości proteolitycznych trombiny. W niniejszych badaniach średnie wartości kompleksów TAT u chorych z ostrym zespołem wieńcowym ACS wynosiły $6,89 \pm 13,17$ μ g/l i u niektórych pacjentów sięgały aż do 103 μ g/l w porównaniu do grup referencyjnych - bez dolegliwości wieńcowych $3,36 \pm 3,73$ μ g/l ($p=0,038$) i chorych z przewlekłą chorobą wieńcową $3,96 \pm 4,17$ μ g/l. Były zatem w ACS istotnie prawie

dwukrotnie wyższe. Podwyższone stężenie kompleksów TAT w ostrym zespole wieńcowym odzwierciedla zwiększoną trombinogenezę w tej chorobie. Wydajność tej reakcji wzrasta około 1000 krotnie pod wpływem heparyny. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu potwierdzają spostrzeżenia Merliniego i wsp., którzy w 1994 r. stwierdzili, że u chorych z ACS dochodzi do znacznego wzrostu aktywności generacji trombiny, która nie normalizuje się po podaniu heparyny. Porównanie średnich wyników stężenia kompleksów TAT w ACS w uzyskanych w niniejszym badaniu w porównaniu z grupami referencyjnymi wykazuje, że podwyższone stężenie kompleksów TAT w ostrym zespole wieńcowym świadczy o podwyższonej generacji trombiny *in vivo*, co przemawia za nadkrzepliwością krwi i jej udziałem w patogenezie ACS.

Innymi markerami aktywacji protrombiny i aktywności trombiny są fragmenty protrombiny F1+2 i fibrynopeptydu A. Wyniki podwyższonego stężenia kompleksów TAT w ACS uzyskane w niniejszym badaniu potwierdzają także wyniki badania prowadzonego w 1994 r. przez Merliniego i wsp. metodą oznaczania fragmentów protrombiny F1+2, których stężenia w dławicy piersiowej niestabilnej i zawale serca z uniesieniem odcinka ST były wyższe niż u pacjentów zdrowych i ze stabilną chorobą wieńcową⁷³.

W 1997 r. Musiał i wsp. badali stężenia między innymi TAT w populacji polskiej szukając korelacji z innymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych⁷⁴. W niniejszym badaniu podobnie stwierdzono podwyższone wartości TAT, średnio 6,89 µg/l, istotnie statystycznie wyższe niż w grupie osób bez choroby wieńcowej (C) $p=0,03$, ale nie w grupie CAD ze stabilną chorobą wieńcową $p=0,25$.

Oprócz TF, którego stężenie w grupie pacjentów z ACS nie różniło się od osób bez choroby wieńcowej, stężenia innych badanych czynników : TFPI, vWF, tPA, PAI-1, TM, TAT były statystycznie wyższe co świadczy o „pogotowiu zakrzepowym” u tych chorych. Podobne wyższe stężenia badanych czynników hemostazy w stanach ostrego zespołu wieńcowego w porównaniu do osób zdrowych czy ze stabilną chorobą wieńcową stwierdzali inni badacze: Misuni i wsp.⁷⁵, Butenas i wsp.⁷⁶ i Brumme-Ziedins i wsp.⁷⁷

W niniejszym badaniu porównując grupę chorych z ACS do pacjentów ze CAD obserwowano statystycznie wyższe stężenia TFPI, vWF, PAI-1 i TM w grupie z ACS nie stwierdzając statystycznych różnic w stężeniach badanych czynników hemostazy porównując obie grupy referencyjne.

Stężenia badanych czynników hemostazy w różnych postaciach ostrego zespołu wieńcowego

W kolejnym etapie badania porównano stężenia badanych czynników hemostazy u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od typu ostrego zespołu wieńcowego: dławicy piersiowej niestabilnej (22,4%), zawałem serca bez uniesienia odcinka ST (22,4%) i zawałem serca z uniesieniem odcinka ST (55,2%). Kierując się parametrem istotności p nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic badanych czynników hemostazy w ACS pomiędzy podgrupami. Jednak blisko osiągnięcia istotności statystycznej ($p=0,08$) są najwyższe stężenia czynnika tkankowego (TF) $244,99\pm 98,23$ pg/ml w grupie STEMI w porównaniu do grup NSTEMI ($232,18\pm 69,41$ pg/ml) i UA ($235,68\pm 92,69$ pg/ml). Podobnie najwyższe w grupie ze STEMI było stężenie PAI-1 ($p<0,07$; $44,96\pm 20,12$ ng/ml). Inaczej w niniejszym badaniu zachowywało się stężenie TFPI, które było najwyższe ($p=0,07$) w grupie chorych z UA. Nieoczekiwanie w grupach pacjentów ze STEMI i NSTEMI stężenia kompleksów TAT były około dwukrotnie wyższe od analogicznych wartości u chorych z UA, świadczące o uszkodzeniu komórek śródbłonna.

Niektórzy badacze stwierdzali niewielkie różnice w stężeniach czynników hemostazy pomiędzy różnymi postaciami ostrego zespołu wieńcowego np. Merlini i wsp.⁷³

Stężenia czynników hemostazy a różne czynniki ryzyka choroby wieńcowej

W dalszych badaniach czynników hemostazy w ostrym zespołem wieńcowym uwzględniono istniejące u chorych czynniki ryzyka i ich wpływ na stężenia parametrów hemostazy. Wśród czynników ryzyka u chorych z ACS uwzględniono: płeć, wiek (poniżej i powyżej 65 roku życia), nikotynizm, hiperlipidemię, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę i otyłość.

Porównując grupę mężczyzn (74,5%) z grupą kobiet (25,5%) pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym w niniejszym badaniu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy nimi w stężeniach badanych czynników hemostazy. Stwierdzono jednak u kobiet znacznie wyższe stężenia TF wynoszące $265\pm 120,0$ pg/ml w porównaniu do chorych mężczyzn $231\pm 77,0$ pg/ml ($p=0,10$). Nie wykazano również istotnych statystycznie różnic w stężeniach badanych czynników krzepnięcia pomiędzy chorymi poniżej i powyżej 65 roku życia. Należy

jednak zwrócić uwagę na nieco wyższe stężenia TF i kompleksów TAT u młodszych pacjentów z ACS w wieku <65 r.ż. W metaanalizie z 2016 r. Vasiljevic-Pokrajcic i wsp. porównywali grupę mężczyzn z grupą kobiet z ostrym zespołem wieńcowym, biorąc pod uwagę wiek powyżej i poniżej 65 roku życia. Większą śmiertelność obserwowano w grupie młodszych kobiet⁷⁸. W 2009 r. Scully ocenił poziom TF u pacjentów z chorobą wieńcową i nie stwierdził różnic w ekspresji TF na monocytach pomiędzy kobietami a mężczyznami, nie stwierdził też korelacji z wiekiem pacjentów⁷⁹.

Kolejnym zadaniem w niniejszej pracy było ustalenie czy badane parametry hemostazy w badanej grupie z ACS, są istotnie wyższe u pacjentów obciążonych chorobami współistniejącymi. Wiadomo, że u chorych palących papierosy, z chorobą nadciśnieniową, cukrzycą, otyłością nasilone są procesy zakrzepowe.

W niniejszym badaniu porównano stężenie parametrów hemostazy u chorych z ACS palących (48,97%) i niepalących papierosy (51,02%). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach badanych czynników pomiędzy grupami. Zwraca uwagę jednak prawie dwukrotnie niższe stężenie kompleksów TAT u chorych palących z ACS ($4,64 \pm 3,17 \mu\text{g/l}$) od chorych niepalących ($9,06 \pm 18,00 \mu\text{g/l}$) przy braku istotności statystycznej ($p=0,096$). U niektórych osób niepalących stężenie TAT dochodziły nawet do $103 \mu\text{g/l}$. Nikotynizm jest istotnym czynnikiem prognostycznym w chorobach sercowo-naczyniowych, co udowodnił też w swoich obserwacjach Eyben i wsp. w 2001 r.⁸⁰ Ich spostrzeżenia dotyczyły wprawdzie znacznie młodszych chorych z zawałem serca przed 41 r.ż. Tapson w 2005 r. także opisywał wzmożoną aktywność czynników hemostazy u pacjentów palących tytoń, ale w innej chorobie - obturacyjnej chorobie płuc⁸¹. Wpływ nikotynizmu na proces hemostazy wymaga jeszcze dalszych badań.

Podobnie jak w przypadku nikotynizmu, w moim badaniu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach badanych czynników hemostazy pomiędzy chorymi z ACS ze stwierdzoną hiperlipidemią (64,28%) a chorymi bez rozpoznanej hiperlipidemii (35,71%). Hiperlipidemia to kolejny niekorzystny czynnik prognostyczny dla chorób sercowo-naczyniowych. W pracy polskiej z 2001 r. Wiśniewska i wsp. stwierdzali statystycznie wyższe wartości trombomoduliny u pacjentów z wysokim cholesterolem⁸², co można by tłumaczyć większym uszkodzeniem śródbłonna naczyń przez cholesterol i uwalnianiem TM do osocza. W 2006 r. Undas i wsp. badali wpływ statyn na stężenia poszczególnych czynników hemostazy tłumacząc patofizjologię zmniejszenia ryzyka zawału serca i udaru⁸³.

W niniejszym badaniu porównując chorych z ACS z chorobą nadciśnieniową (56,12%) do chorych z ACS bez choroby nadciśnieniowej (43,87%) nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach badanych czynników hemostazy. Nieco wyższe, ale nieistotnie, były stężenia kompleksów TAT u chorych z ACS i nadciśnieniem tętniczym ($7,59 \pm 14,58 \mu\text{g/l}$) wobec osób bez nadciśnienia tętniczego ($6,00 \pm 11,2 \mu\text{g/l}$). Podwyższone wartości stężeń czynników hemostazy i ich związek z chorobą nadciśnieniową stwierdzali w badaniach *in vitro* i na zwierzętach Derhaschnig i wsp.⁸⁴.

Przebadano również wpływ cukrzycy na stężenia parametrów hemostazy u chorych z ACS. Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy pacjentami z ACS bez cukrzycy (82,65%) a pacjentami z ACS z cukrzycą (17,34%). Jedynie różnice stężenia TM - niższe u pacjentów z cukrzycą ($2,12 \pm 0,58 \text{ ng/ml}$) wobec chorych bez cukrzycy ($2,49 \pm 0,79 \text{ ng/ml}$) są bliskie istotności statystycznej ($p=0,07$). W cukrzycy stwierdza się wyższe stężenia niektórych parametrów hemostazy. W badaniu Kaye i wsp. w 2012 r. par bliźniaczych z cukrzycą i otyłością potwierdzają wyższą aktywność hemostazy u osób z cukrzycą⁸⁵. W innej pracy Leurs i wsp. wykazywali wyższe wartości TFPI i TM u chorych z cukrzycą⁸⁶. Natomiast w 2001 r. Carr udowodnił niekorzystny wpływ cukrzycy na przebieg różnych chorób sercowo-naczyniowych, jako choroby z wyższą aktywnością czynników hemostazy⁸⁷.

Ostatnim badanym czynnikiem ryzyka mogącym mieć wpływ na stężenie parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym była nadwaga i otyłość określane współczynnikiem BMI >25. Porównano pacjentów z ACS z BMI >25 (37,75%) z pacjentami z BMI <25 (62,24%). Jedynie u pacjentów z BMI >25 stwierdzano istotnie statystycznie wyższe stężenie PAI-1 ($48,25 \pm 18,17 \text{ ng/ml}$) wobec chorych z BMI <25 ($36,92 \pm 18,12 \text{ ng/ml}$) ($p=0,0037$). W grupie z BMI >25 stwierdzono też prawie dwukrotnie niższe, ale nieistotne statystycznie, stężenie kompleksów TAT ($4,43 \pm 4,48 \mu\text{g/l}$) wobec pacjentów z BMI <25 ($8,39 \pm 16,13 \mu\text{g/l}$). W cytowanym już wcześniej badaniu Kaye stwierdzano wyższą aktywność hemostazy u osób otyłych⁸⁵.

Niniejsze badanie nie wykazało wpływu płci i wieku na parametry hemostazy u chorych z ACS w przeciwieństwie do badania Vasiljevic-Pokrajcic⁷⁸. W niniejszym badaniu brak istotnych różnic w stężeniach parametrów hemostazy we krwi chorych z ACS i z chorobami towarzyszącymi (nikotynizmem, hiperlipidemią, chorobą nadciśnieniową, cukrzycą). Jedynie otyli pacjenci wyróżniali się wyższym stężeniem PAI-1. Podobne do powyższych wnioski wysunęli w 1997 r. Musiał i wsp. badając parametry generacji trombiny w materiale populacji

południowej Polski, gdzie również nie znaleziono korelacji między nimi a hiperlipidemią, nadciśnieniem tętniczym, paleniem papierosów, cukrzycą i BMI⁷⁴. W badaniu Mihary i wsp. także nie stwierdzano korelacji poziomu TAT a poziomem cukru, lipidów, BMI i tylko słabą korelację z nadciśnieniem i paleniem papierosów⁷². W badaniu z 2004 r. Lim i wsp. stwierdzali brak korelacji pomiędzy stężeniem vWF a zespołem metabolicznym⁸⁸.

Stężenia badanych czynników hemostazy a leczenie pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym i występowanie MACE

Badając czynniki hemostazy u pacjentów z ACS przed podjęciem leczenia zastanawiano się jaki mają one wpływ na dalszy przebieg leczenia.

W badanej grupie pacjentów z ACS wszyscy byli leczeni inwazyjnie angioplastyką balonową z założeniem stentu. W trakcie koronarografii hemodynamista decydował o typie implantowanego stentu. Wśród badanych chorych 75 pacjentów (76,5%) otrzymało stenty metalowe BMS, 22 pacjentów (22,4%) stenty powlekane lekiem DES a jeden chory miał implantowany zarówno stent DES, jak i BMS.

W badaniu porównano zatem stężenia parametrów hemostazy pacjentów z ACS, którym wszczepiono stenty BMS do pacjentów z wszczepionym stentami DES i nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy nimi. Nie można jednak pominąć znaczenia niższych stężeń kompleksów TAT ($3,76 \pm 1,79 \mu\text{g/l}$) u chorych z DES w porównaniu do pacjentów ze wszczepionymi stentami BMS ($7,82 \pm 14,92 \mu\text{g/l}$) ($p=0,20$). Brak istotności może być spowodowany ponad trzykrotnie większą liczbą pacjentów z BMS. Ponadto z powodów losowych do grupy z DES zostali skierowani pacjenci z najmniej wyrażoną trombinogenezą, czyli niskimi stężeniami kompleksów TAT. Wpływ leczniczy stentów uwalniających lek nie wchodzi w rachubę, bo krew została pobrana przed implantacją stentów, a kolejny raz po zabiegu nie była pobierana.

Ponadto 28 pacjentów z ACS otrzymało w trakcie dalszego leczenia okołoproceduralnie abciximab. Abciximab jest lekiem przeciwplatekcyjnym, wiążącym się z receptorem GPIIb/IIIa płytek i hamuje agregację przez uniemożliwianie wiązania fibrynogenu i vWF oraz innych cząsteczek adhezyjnych.

Porównując stężenia badanych czynników hemostazy we krwi pobranej przy przyjęciu w grupach pacjentów z ACS, którzy otrzymali abciximab do znacznie większej grupy pacjentów, którzy leku nie otrzymali stwierdzono, że rozkład stężeń analizowanych w niniejszym badaniu parametrów hemostazy w obu porównanych grupach nie różnił się istotnie statystycznie, chociaż u pacjentów którzy otrzymywali lek zaobserwowano tendencję do nadkrzepliwości.

Tak więc przeprowadzone powyżej obserwacje wskazywały, że grupy chorych z ACS, które różnie leczono - nie różniły się istotnie statystycznie między sobą pod względem stężeń badanych czynników hemostazy.

Ostatecznie w przeprowadzonym badaniu podjęto się oceny problemu występowania groźnych powikłań sercowo naczyniowych MACE w ciągu 3 lat obserwacji od wystąpienia incydentu ACS.

Po roku od zachorowania na ostry zespół wieńcowy w obserwowanej grupie pierwotnie 98 chorych stwierdzono jeden zgon (1,02%) prawdopodobnie z przyczyn sercowych w 7 dobie od zawału serca, jeden ponowny zawał serca (1,02%) a u pięciu chorych nawrót dławicy piersiowej (5,1%).

Po trzech latach obserwacji stwierdzono (łącznie z pierwszym rokiem obserwacji) dwa zgony (2,04%), dwa zawały (2,04%), jeden udar (1,02%) i nawrót dławicy u 16 pacjentów (16,32%).

Porównując stężenia analizowanych w niniejszym badaniu czynników hemostazy ocenianych przy przyjęciu u chorych z ACS, u których nie doszło do MACE w ciągu roku od zachorowania, z chorymi, u których doszło do incydentu MACE, obserwowano statystycznie istotnie wyższe stężenie vWF w grupie z MACE. Po 3 latach porównując wyjściowe stężenia badanych czynników krzepnięcia w grupie bez MACE i z MACE nie stwierdzano istotnych statystycznie różnic. Nie udało się wyodrębnić wśród badanych czynników hemostazy żadnego, który prognozowałby MACE.

Niektórzy autorzy oceniali przydatność rokowniczą u chorych z chorobą wieńcową pojedynczych czynników hemostazy. Thompson i wsp. wykazali, że czynnik von Willebranda, fibrynogen i t-PA mogą prognozować wystąpienie ACS w ciągu dwóch lat obserwacji⁸⁹. Czynnik von Willebranda okazał się też wskaźnikiem wystąpienia MACE w ciągu 1 miesiąca po incydencie dławicy piersiowej w badaniu Montalescota i wsp.⁹⁰ Podobnie Marcucci i wsp. udowodnili, obserwując dużą grupę chorych skutecznie

stentowanych, że wysokie stężenie PAI-1 jest wskaźnikiem wystąpienia MACE w ciągu 22 miesięcy od zawału serca⁷⁰.

Również obniżona przed leczeniem do 65% aktywność antytrombiny była przyczyną oporności na leczenie heparyną w przypadku opisanym przez Kaku i wsp.⁹¹ W czasie rocznej obserwacji chorych po ACS z niższym stężeniem antytrombiny, ale mieszczącym się jeszcze w granicach normy, Pelkonen i wsp. stwierdzał wyższe narażenie na wystąpienie poważnych incydentów sercowo-naczyniowych⁹². Podobne wyniki uzyskano podczas 9-letniej obserwacji Thompsona i wsp. chorych z dławicą piersiową, w czasie której 25% chorych zmarło lub przeżyło zawał, a wystąpienie tych końcowych punktów obserwacji negatywnie korelowało z aktywnością antytrombiny, a pozytywnie z wyjściowym stężeniem fibrynogenu⁹³.

W niniejszym badaniu, podobnie jak powszechnie stwierdza się w badaniach obserwacyjnych u chorych po incydencie ACS, liczba pacjentów z MACE zależała od czasu obserwacji i rodzaju implantowanego stentu. Epizody MACE wystąpiły u 17 chorych z ACS z wszczepionymi stentami BMS (80,8%), a tylko u 4 chorych z DES. Zastosowanie stentów metalowych wiązało się z blisko 30% zmniejszeniem występowania restenozy w porównaniu do leczenia tylko plastyką balonową, ale była ona i tak znaczna jak wykazał Brophy i wsp. w swojej metaanalizie w 2003 r.⁹⁴ Użycie natomiast stentów pokrytych antyproliferacyjnymi lekami zmniejszyło występowanie restenozy o ponad połowę w stosunku do stentów metalowych, przesuwając jednak zjawisko restenozy na okres późniejszy⁹⁵.

W pierwszym roku obserwacji powikłania MACE występowały rzadko, zwiększając się najprawdopodobniej po odstawieniu kłopidogrelu. Rutynowe dłuższe niż 12 miesięcy stosowanie podwójnej terapii przeciwplatekowej nie jest rekomendowane. Abo-Salem w swojej metaanalizie porównywał czas stosowania podwójnej terapii przeciwplatekowej szczególnie dla stentów drugiej generacji, zwracając uwagę, że przedłużona podwójna terapia przeciwplatekowa zwiększa znacznie ryzyko krwawienia⁹⁶, natomiast Tulitio i wsp. w swojej metaanalizie obserwowali jednak korzyści ze stosowania przedłużonej terapii dwoma lekami przeciwplatekowymi u chorych z implantowanymi stentami uwalniającymi lek⁹⁷.

Na większą liczbę chorych z MACE mogło też wpłynąć podawanie chorym kłopidogrelu a nie leków przeciwplatekowych nowej generacji, które w okresie niniejszego badania były dla pacjentów jeszcze nieosiągalne. W badaniu TRITON TIMI 38 prasugrel zmniejszał istotnie w stosunku do kłopidogrelu występowanie MACE, w tym zakrzepicy w stencie (9,9% vs 12,1%)⁹⁸. Podobne korzyści wykazano w badaniu PLATO, w którym stosowano tikagrelor⁹⁹.

W obu badaniach nowe leki redukowały złożony punkt końcowy niestety kosztem poważnych krwawień.

Można rozważać, czy dodanie leku przeciwkrzepliwego zmniejszyłoby liczbę chorych z MACE, jak udowodniał Stachom i wsp. badając chorych z ACS leczonych oprócz aspiryny i kłopidogrelu małą dawkę apixabanu lub rivaroxabanu¹⁰⁰. Podobnie dodanie małej dawki rivaroxabanu w badaniu Gibsona i wsp. zmniejszyło częstość zakrzepicy w stencie¹⁰¹. Podobne wyniki obserwowano w badaniu COMPASS gdzie połączenie rivaroxabanu z aspiryną zapewniało skuteczniejszą ochronę przed MACE lub dużymi amputacjami kończyn u chorych z chorobą wieńcową czy z objawową chorobą tętnic obwodowych, obciążonych wysokim ryzykiem zdarzeń niedokrwiennych¹⁰².

Podsumowując wyniki pracy należy też wspomnieć o ich ograniczeniach. Co prawda grupa z ACS porównywana była do dwóch grup referencyjnych, jednak jej liczebność była stosunkowo nieduża. Nie badano też wszystkich znanych czynników hemostazy. Pomiary czynników hemostazy wykonano tylko na początku obserwacji i nie wiadomo, jak kształtowały się ich poziomy po terapii szpitalnej, po rocznej i 3-letniej obserwacji. Jednak wykonanie u wszystkich badanych pomiarów czynników hemostazy na wstępie przyniosło spodziewane efekty mogące mieć istotne znaczenie dla praktyki klinicznej. Okazało się bowiem, że pomimo wcześniejszego podania kwasu acetylosalicylowego oraz heparyny chorzy z ACS mieli zwiększoną krzepliwość krwi przemawiającą za zwiększoną trombinogenezą i zahamowaniem fibrynolizy. Przemawia to za potrzebą brania tego zjawiska pod uwagę we wdrażaniu leczenia u tych chorych. Natomiast wyniki pracy nie wskazują na możliwość wyodrębnienia szczególnych grup chorych z ACS, które mogłyby najbardziej skorzystać z takiego leczenia. Toteż wydaje się, że obecnie nie ma potrzeby rutynowego badania czynników układu krzepnięcia u chorych z rozpoznany ACS.

6. Wnioski

1. U chorych z ostrym zespołem wieńcowym (ACS) w porównaniu do osób bez incydentu wieńcowego stwierdzono statystycznie istotnie wyższe stężenia 5 parametrów hemostazy: inhibitora tkankowego czynnika (TFPI), czynnika von Willebranda (vWF), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) i kompleksów trombina- antytrombina (TAT). Natomiast stężenie tkankowego aktywatora (TF) było podobne, a trombomoduliny (TM) nieco niższe. Zatem u chorych z ACS stwierdzono przede wszystkim zwiększoną trombinogenezę i zahamowanie fibrynolizy składające się na nadkrzepliwość krwi.
2. Stężenia badanych parametrów hemostazy w poszczególnych postaciach ostrego zespołu wieńcowego tj. w zawale serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI), bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI) i w dławicy niestabilnej (UA) były podobne bez istotnych statystycznie różnic.
3. Czynniki ryzyka istniejące u chorych z ostrym zespołem wieńcowym (ACS) jak płeć, wiek, nikotynizm, hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze czy cukrzyca nie miały istotnego wpływu na stężenia badanych parametrów hemostazy poza otyłością, która zwiększała prawie dwukrotnie stężenie inhibitora aktywatora plazminogenu.
4. U pacjentów, u których w trzyletniej obserwacji wystąpiły MACE stwierdzano pierwotnie wyższe stężenia kompleksów trombina-antytrombina, bez istotności statystycznej, wskazujące na zwiększoną trombinogenezę, ale ostatecznie żaden z badanych parametrów hemostazy nie korelował z MACE.
5. Wyniki własnego badania wykazujące zaburzenia hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym wskazują na celowość stosowania u nich leczenia przeciwzakrzepowego i sugerują , że nie ma potrzeby rozszerzonego dokładnego badania procesu hemostazy w tym schorzeniu.

7. Streszczenie

Wstęp: Przeszkórna plastyka balonowa (PCI) z implantacją stentu jest złotym standardem w leczeniu ostrych zespołów wieńcowych (ACS). Ponieważ główną przyczyną ostrego niedokrwienia serca jest zakrzep tętnicy, dlatego wnikliwe zrozumienie zależności pomiędzy czynnikami krzepnięcia jest niezbędne do zrozumienia patofizjologii ostrego zespołu wieńcowego.

Cel: Celem badania była ocena stężenia czynników krzepnięcia u pacjentów z ACS leczonych PCI i oszacowanie ich wpływu na przebieg choroby w obserwacji długoterminowej.

Metody: Stężenia czynnika tkankowego (TF), inhibitora tkankowego czynnika (TFPI), czynnika von Willebranda (vWF), tkankowego aktywatora plazminogenu¹⁰³, inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1), trombomoduliny (TM) i kompleksów trombina-antytrombina (TAT) były ocenione u 98 chorych z ACS przed wykonaniem PCI. 54 pacjentów miało zawał STEMI, 22 pacjentów miało zawał NSTEMI i 22 chorych cierpiało na dławicę piersiową niestabilną. Stężenia TFPI ($73 \pm 40,82$ vs $51,34 \pm 8,28$ ng/ml, $p=0,00003$), vWF ($2049 \pm 842,68$ vs $1704 \pm 708,28$ Um/ml, $p=0,007$), t-PA ($8,66 \pm 4,48$ vs $7,22 \pm 2,87$ ng/ml, $p=0,023$), PAI-1 ($41,20 \pm 19$ vs $21,72 \pm 9,07$ ng/ml, $p=0,0001$) i TAT ($6,89 \pm 13,17$ vs $3,36 \pm 3,73$ µg/l, $p=0,038$) były wyższe u pacjentów z ACS w porównaniu do grupy kontrolnej stworzonej dla celów badania, stężenie TM ($2,43 \pm 0,77$ vs $2,74 \pm 0,71$ ng/ml, $p=0,010$) natomiast było niższe. Nie było różnicy w stężeniach TF ($240 \pm 90,64$ vs $252,04 \pm 65,24$ pg/ml, $p=0,359$) w obu grupach.

Stwierdzono 7 epizodów MACE w pierwszym roku obserwacji i u tych pacjentów stwierdzano wyjściowo wyższe stężenie vWF w porównaniu do grupy bez MACE (2641 ± 1209 vs 1979 ± 791 Um/ml, $p=0,0436$).

W trakcie trzech lat obserwacji MACE wystąpiły łącznie u 21 chorych po ACS. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic porównując wyjściowe stężenia badanych czynników hemostazy grupie z i bez MACE w trakcie trzyletniej obserwacji.

Wnioski: Stężenia TFPI, vWF, t-PA, PAI-1, TAT wzrastają u pacjentów z ACS. Wyższe stężenie cz. vWF obserwowano u pacjentów z MACE w pierwszym roku obserwacji od czasu

ACS. Jednak badane stężenia czynników krzepnięcia nie przyniosły żadnych wartości prognostycznych w długotrwałej obserwacji chorych po PCI.

Abstract:

Backgrounds: Percutaneous coronary intervention (PCI) with stent implantation is the gold standard of acute coronary syndrome (ACS) treatment. Since the artery thrombosis is the main cause of acute myocardial ischemia, the profound understating of clotting factors interplay is essential to describe the pathophysiology responsible for ACS.

Aim: The aim of the study was to assess the blood concertation of hemostasis factors in ACS patients treated with a PCI, and to assess their impact on patients' outcome at long-term follow-up.

Methods: The blood concentration of tissue factor (TF), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), von Willebrand (vWF), tissue plasminogen activator ¹⁰³, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), thrombomodulin (TM) and thrombin-antithrombin complexes (TAT) was assessed in 98 ACS patients before PCI. 54 patients had STEMI, 22 had NSTEMI and 22 suffered from unstable angina. TFPI (73.00±40.82 vs 51.34±8.28 ng/ml, p=0,00003), vWF (2049±842.68 vs 1704±708.28 Um/ml, p =0,007), t-PA (8.66±4.48 vs. 7.22±2,87 ng/ml, p=0,023) , PAI-1 (41.20±19 vs. 21.72±9.07 ng/ml, p=0,0001) and TAT(6.89±13.17 vs. 3.36±3.73 µg/l, p=0,038) were higher in ACS patients, as compared to control group at the index procedure, and TM(2.43±0.77 vs 2.74±0.71 ng/ml, p=0,01) was lower. There was no difference in TF (240±90.64 vs 252.04±65 pg/ml, p=0,359) concertation in both groups. There were seven MACE recorded during the first-year follow-up and vWF blood concentration was higher in those with MACE as compared to those without (2641±1209 vs 1979±791 Um/ml, p=0,0436). During the three-year follow-up twenty-one MACE were recorded in all ACS patients. However, there were no differences in hemostatic factors concertation between patients with or without MACE in 3-year follow-up.

Conclusion: The concertation of TFPI, vWF, TPA, PAI-1, TAT increased during the ACS. Higher concertation of vWF was observed in patients, who had MACE in first year after PCI. Nevertheless, the assessment of the hemostatic factors does not carry any prognostic value at long term follow-up of ACS patients after PCI.

8. Załączniki

Spis rycin i tabel

Rycina 1a - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (ASC) z grupą referencyjną (C).

Rycina 2a - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową z grupą referencyjną (C).

Tabela nr 1 - Charakterystyka badanej grupy z ostrym zespołem wieńcowym .

Tabela nr 2 - Charakterystyka grupy bez udokumentowanej choroby wieńcowej - grupa C.

Tabela nr 3 - Charakterystyka osób ze stabilną chorobą wieńcową (po przebytych w przeszłości incydencie ostrego zespołu wieńcowego - CAD).

Tabela nr 4 - Stężenia badanych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w porównaniu z grupą referencyjną pacjentów bez incydentu wieńcowego w przeszłości (C).

Tabela nr 5 - Stężenia badanych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w porównaniu z grupą referencyjną ze stabilną chorobą wieńcową .

Tabela nr 6 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy pomiędzy grupami referencyjnymi: grupą ze stabilną chorobą wieńcową a grupą bez rozpoznanej choroby wieńcowej .

Tabela nr 7 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym z podziałem na chorych z chorobą wieńcową niestabilną (UA), zawałem serca bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI) i zawałem serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI).

Tabela nr 8 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy pomiędzy mężczyznami a kobietami w grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym.

Tabela nr 9 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym poniżej i powyżej 65 roku życia.

Tabela nr 10 - Ocena korelacji pomiędzy wiekiem pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym a stężeniami badanych czynników hemostazy.

Tabela nr 11 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od nikotynizmu.

Tabela nr 12 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od występowania hiperlipidemii.

Tabela nr 13 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od występowania choroby nadcisnieniowej.

Tabela nr 14 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie osób z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od występowania cukrzycy.

Tabela nr 15 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy w grupie osób z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od wartości BMI.

Tabela nr 16 - Porównanie stężeń badanych czynników hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym przed leczeniem inwazyjnym w podziale na podgrupy w zależności od dalszego leczenia: z założonymi stentami metalowymi (BMS) do chorych z założonymi stentami powlekanymi lekiem (DES).

Tabela nr 17 - Porównanie oznaczonych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym w zależności od podania abciximabu.

Tabela nr 18 - Porównanie stężeń badanych parametrów hemostazy u chorych z ostrym zespołem wieńcowym we krwi pobranej przed leczeniem inwazyjnym - bez epizodu MACE i chorych z MACE po rocznej obserwacji.

Tabela nr 19 - Porównanie stężeń badanych parametrów hemostazy we krwi pobranej przed leczeniem inwazyjnym u chorych z ostrym zespołem wieńcowym bez epizodu MACE i z MACE po 3 latach obserwacji.

Tabela nr 20 - Wyniki obserwacji klinicznej badanych pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym n=98.

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ
 przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu
 Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
 51-124 Wrocław ul. Kamieńskiego 73A tel. (071) 32 70 125

KB/ nr/ rok 1/2010

Działając na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 wraz ze zm.), Zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1990 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i funkcjonowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz. 480) oraz zgodnie z zasadami zawartymi w GCP (Good Clinical Practice) oraz Deklaracji Helsińskiej.

Komisja Bioetyczna przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu Ośrodek Badawczo-Rozwojowy na posiedzeniu w dniu 23.02.2010 r. przeanalizowała wniosek, który złożyła: **Lek. med. Agata Kaczmarzyk-Radka** w sprawie badania: „Ocena wybranych czynników krzepnięcia ze szczególnym uwzględnieniem czynnika tkankowego i inhibitora czynnika tkankowego a występowanie poważnych incydentów sercowo-naczyniowych (major adverse coronary event – MACE) u chorych z ostrym zespołem wieńcowym (OZW) leczonych inwazyjnie plastyką balonową z użyciem stentu”.

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz tajnego głosowania Komisja Bioetyczna podjęła uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku.

W oparciu o zasady prowadzenia badań zawarte w GCP Komisja Bioetyczna przypomina o zamieszczeniu w formularzu informacji dla pacjenta danych osobowych głównego badacza (Imię i Nazwisko) oraz członka zespołu badawczego, który uzyskał zgodę pacjenta na udział w badaniu. Podpis badacza winien być umieszczony obok podpisu pacjenta z datą uzyskania zgody. Dane osobowe członka zespołu badawczego i jego podpis powinny być również zawarte na każdym formularzu świadomej zgody badanego na poszczególne procedury związane z wykonywaniem badań. Ponadto w informacji dla pacjenta należy podać sposób kontaktowania się z badaczem i ośrodkiem po okresie pobytu w Klinice.

Od niniejszej uchwały można się odwołać do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu Ośrodek Badawczo-Rozwojowy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej opinii.

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Prof. dr hab. Roman Jąworski

Otrzymują:

1. Wnioskodawca projektu
2. Kierownik jednostki organizacyjnej, w której projekt będzie realizowany

01.12.2014

Dotyczy Komisji Bioetycznej

Proponowany tytuł doktoratu pani Agaty Kaczmarzyk-Radka „Zachowanie się wybranych czynników krzepnięcia u chorych z ostrym zespołem wieńcowym leczonych inwazyjnie plastyką balonową z użyciem stentu i ich potencjalny wpływ na przebieg kliniczny choroby wieńcowej” jest ściśle i jedynie związany z pracami, które doktorantka wykonała jako główny badacz zad. 23 w ramach projektu WROVASC o tytule „Ocena wybranych czynników krzepnięcia ze szczególnym uwzględnieniem czynnika tkankowego i inhibitora czynnika tkankowego a występowanie poważnych incydentów sercowo naczyniowych (major adverse coronary event - MACE) u chorych z ostrym zespołem wieńcowym (OZW) leczonych inwazyjnie plastyką balonową z użyciem stentu”.

Wszystkie prace badawcze wykonano w ramach wspomnianego zadania 23 .

Z poważaniem,

Jerzy Lewczuk

9. Bibliografia

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
2. Gziut AI and Gąsior M. Epidemiologia ostrych zespołów wieńcowych. In: R. J. Gil and D. Dudek, eds. *Ostre zespoły wieńcowe- możliwości diagnostyczne i terapeutyczne* Poznań: Termedia; 2015(2): 23-39.
3. L.S. L. Miażdżycza *Patofizjologia chorób serca* Wrocław: Urban and Partner; 1996: 88-101.
4. Budaj A, Undas A, Pasiński T, Wysocki H, et al. Choroba niedokrwienności serca In: A. Szczekliki and M. Tendera, eds. *Kardiologia* Kraków: Medycyna Praktyczna; 2009(I): 329-399.
5. Budaj A, Beręsewicz A, Undas A, Pasiński T, et al. Choroba niedokrwienności serca *Interna Szczekliki* Kraków: Medycyna Praktyczna; 2016(I): 168-223.
6. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, et al. [Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)]. *Kardiologia Pol.* 2018;76:1383-1415.
7. Kip KE, Hollabaugh K, Marroquin OC and Williams DO. The problem with composite end points in cardiovascular studies: the story of major adverse cardiac events and percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:701-7.
8. Lippi G, Plebani M and Favalaro EJ. Quality in hemostasis and thrombosis, part II. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:229-32.
9. Łopaciuk S and Zawilska K. Fizjologia Hemostazy. In: A. Dmoszyńska and T. Robak, eds. *Podstawy Hematologii* Lublin: Czelej; 2008: 95-112.
10. Butera D, Passam F, Ju L, Cook KM, et al. Autoregulation of von Willebrand factor function by a disulfide bond switch. *Sci Adv.* 2018;4:eaq1477.
11. Winckers K, ten Cate H and Hackeng TM. The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis. *Blood Rev.* 2013;27:119-32.
12. Boffa MC and Karmochkine M. Thrombomodulin: an overview and potential implications in vascular disorders. *Lupus.* 1998;7 Suppl 2:S120-5.
13. Siudak Z, Ochala A, Lesiak M, Witkowski A, et al. Temporal trends and patterns in percutaneous treatment of coronary artery disease in Poland in the years 2005-2011. *Kardiologia Pol.* 2015;73:485-92.
14. Bauters C and Isner JM. The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;40:107-16.

15. Faxon DP, Coats W and Currier J. Remodeling of the coronary artery after vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;40:129-40.
16. Pawlak A and Gil KE. Patofizjologia ostrych zespołów wieńcowych. In: R. J. Gil and D. Dudek, eds. *Ostres zespoły wieńcowe* Poznań: Termedia; 2015: 41-67.
17. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1994;331:496-501.
18. Cutlip DE, Windecker S, Mehran R, Boam A, et al. Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions. *Circulation.* 2007;115:2344-51.
19. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003;349:1315-23.
20. Mehta RH, Greenbaum AB, Lokhnygina Y, Newby LK, et al. Timing of death and myocardial infarction in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes: insights from randomized clinical trials. *J Interv Cardiol.* 2007;20:299-306.
21. Mauri L, Hsieh WH, Massaro JM, Ho KK, et al. Stent thrombosis in randomized clinical trials of drug-eluting stents. *N Engl J Med.* 2007;356:1020-9.
22. Moses JW, Mehran R, Nikolsky E, Lasala JM, et al. Outcomes with the paclitaxel-eluting stent in patients with acute coronary syndromes: analysis from the TAXUS-IV trial. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1165-71.
23. Van Camp G, De Backer T, Beauloye C, Desmet W, et al. Summary of 2017 ESC guidelines on valvular heart disease, peripheral artery disease, STEMI and on dual antiplatelet therapy. *Acta Cardiol.* 2017:1-7.
24. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004;109:3171-5.
25. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:961-5.
26. Bobescu E, Covaciu A, Rus H, Radoi M, et al. Correlation of Cardiovascular Risk Factors and Biomarkers With Platelet Reactivity in Coronary Artery Disease. *Am J Ther.* 2018.

27. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, et al. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;339:1665-71.
28. Zhao HJ, Zheng ZT, Wang ZH, Li SH, et al. "Triple therapy" rather than "triple threat": a meta-analysis of the two antithrombotic regimens after stent implantation in patients receiving long-term oral anticoagulant treatment. *Chest*. 2011;139:260-270.
29. Qaderdan K, Ishak M, Heestermans AA, de Vrey E, et al. Ticagrelor or prasugrel versus clopidogrel in elderly patients with an acute coronary syndrome: Optimization of antiplatelet treatment in patients 70 years and older--rationale and design of the POPular AGE study. *Am Heart J*. 2015;170:981-985 e1.
30. Lalor N, Rodriguez L, Elissamburu P, Filipini E, et al. [Clopidogrel versus prasugrel in acute coronary syndrome treated with coronary angioplasty]. *Medicina (B Aires)*. 2015;75:207-12.
31. Velders MA, Abtan J, Angiolillo DJ, Ardissino D, et al. Safety and efficacy of ticagrelor and clopidogrel in primary percutaneous coronary intervention. *Heart*. 2016;102:617-25.
32. Grines CL, Bonow RO, Casey DE, Jr., Gardner TJ, et al. Prevention of premature discontinuation of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery stents: a science advisory from the American Heart Association, American College of Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, American College of Surgeons, and American Dental Association, with representation from the American College of Physicians. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2007;69:334-40.
33. D'Ascenzo F, Bollati M, Clementi F, Castagno D, et al. Incidence and predictors of coronary stent thrombosis: evidence from an international collaborative meta-analysis including 30 studies, 221,066 patients, and 4276 thromboses. *Int J Cardiol*. 2013;167:575-84.
34. Kotschy M, Kotschy D and Witkiewicz W. [The role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in blood coagulation and in thrombotic complications]. *Kardiol Pol*. 2010;68:1158-62.
35. Muller YA, Ultsch MH, Kelley RF and de Vos AM. Structure of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site. *Biochemistry*. 1994;33:10864-70.
36. Gouin-Thibault I, Achkar A and Samama MM. The thrombophilic state in cancer patients. *Acta Haematol*. 2001;106:33-42.

37. Felmeden DC, Spencer CG, Chung NA, Belgore FM, et al. Relation of thrombogenesis in systemic hypertension to angiogenesis and endothelial damage/dysfunction (a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial [ASCOT]). *Am J Cardiol.* 2003;92:400-5.
38. Lim HS, Blann AD and Lip GY. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin, interleukin-6, and tissue factor in diabetes mellitus: relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *Circulation.* 2004;109:2524-8.
39. Broze GJ, Jr. and Miletich JP. Isolation of the tissue factor inhibitor produced by HepG2 hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:1886-90.
40. Wun TC, Kretzmer KK, Girard TJ, Miletich JP, et al. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J Biol Chem.* 1988;263:6001-4.
41. Witt I. [Tissue factor pathway inhibitor: biochemistry, molecular biology, physiology and physiopathology]. *Hamostaseologie.* 2002;22:30-5.
42. Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA and Bajaj SP. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 2001;86:959-72.
43. Zawilska K. Środki trombolityczne. In: J. Windyga, T. Pasiński and A. Torbicki, eds. *Zakrzepy i zatory* Warszawa: PZWL; 2014(I): 233-245.
44. Windyga J and Undas A. Hemostaza fizjologiczna. In: J. Windyga, T. Pasiński and A. Torbicki, eds. *Zakrzepy i zatory* Warszawa: PZWL; 2014(1): 1-36.
45. Loghmani H and Conway EM. Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood.* 2018;132:148-158.
46. Suzuki K, Kusumoto H, Deyashiki Y, Nishioka J, et al. Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. *EMBO J.* 1987;6:1891-7.
47. Ogawa H, Yonezawa S, Maruyama I, Matsushita Y, et al. Expression of thrombomodulin in squamous cell carcinoma of the lung: its relationship to lymph node metastasis and prognosis of the patients. *Cancer Lett.* 2000;149:95-103.
48. Li YH, Kuo CH, Shi GY and Wu HL. The role of thrombomodulin lectin-like domain in inflammation. *J Biomed Sci.* 2012;19:34.
49. Wu KK and Matijevic-Aleksic N. Thrombomodulin: a linker of coagulation and fibrinolysis and predictor of risk of arterial thrombosis. *Ann Med.* 2000;32 Suppl 1:73-7.
50. Davie EW and Kulman JD. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32 Suppl 1:3-15.

51. Goldsack NR, Chambers RC, Dabbagh K and Laurent GJ. Thrombin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30:641-6.
52. Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, et al. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:386-9.
53. Polonski L, Gasior M, Gierlotka M, Kalarus Z, et al. Polish Registry of Acute Coronary Syndromes (PL-ACS). Characteristics, treatments and outcomes of patients with acute coronary syndromes in Poland. *Kardiol Pol.* 2007;65:861-72; discussion 873-4.
54. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1997;95:594-9.
55. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood.* 1988;71:1-8.
56. Falciani M, Gori AM, Fedi S, Chiarugi L, et al. Elevated tissue factor and tissue factor pathway inhibitor circulating levels in ischaemic heart disease patients. *Thromb Haemost.* 1998;79:495-9.
57. Steffel J, Luscher TF and Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation.* 2006;113:722-31.
58. Molero L, Lopez-Farre A, Mateos-Caceres PJ, Fernandez-Sanchez R, et al. Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery. *Br J Pharmacol.* 2005;146:419-24.
59. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, et al. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation.* 2002;105:1756-9.
60. Roque M, Reis ED, Fuster V, Padurean A, et al. Inhibition of tissue factor reduces thrombus formation and intimal hyperplasia after porcine coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:2303-10.
61. Radziwion P, Bielawiec M, Kłoczko J and Giedroń J. Tissue pathway inhibitor (TFPI) in patients with occlusive arterial diseases in consideration with risk factors and conservative treatment of the disease. *Acta Angiologica.* 2001;7:43-54.
62. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS and Simari RD. Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation.* 1998;98:1051-7.
63. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Nishiyama K, et al. Plasma tissue factor pathway inhibitor and tissue factor antigen levels after administration of heparin in patients with angina pectoris. *Thromb Res.* 1999;93:17-25.

64. Heper G, Murat SN, Durmaz T and Kalkan F. Prospective evaluation of von Willebrand factor release after multiple and single stenting. *Angiology*. 2004;55:177-86.
65. Eikelboom JW, Weitz JI, Budaj A, Zhao F, et al. Clopidogrel does not suppress blood markers of coagulation activation in aspirin-treated patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2002;23:1771-9.
66. Xiang Y and Hwa J. Regulation of VWF expression, and secretion in health and disease. *Curr Opin Hematol*. 2016;23:288-93.
67. Lupu F, Heim DA, Bachmann F, Hurni M, et al. Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1444-55.
68. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation*. 1998;98:2241-7.
69. Olofsson BO, Dahlen G and Nilsson TK. Evidence for increased levels of plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator in plasma of patients with angiographically verified coronary artery disease. *Eur Heart J*. 1989;10:77-82.
70. Marcucci R, Brogi D, Sofi F, Giglioli C, et al. PAI-1 and homocysteine, but not lipoprotein (a) and thrombophilic polymorphisms, are independently associated with the occurrence of major adverse cardiac events after successful coronary stenting. *Heart*. 2006;92:377-81.
71. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, Dahlen G, et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet*. 1987;2:3-9.
72. Mihara H, Murai A, Handa K, Saku K, et al. Thrombomodulin levels in patients with coronary artery disease. *Artery*. 1997;22:293-308.
73. Merlini PA, Bauer KA, Oltrona L, Ardissino D, et al. Persistent activation of coagulation mechanism in unstable angina and myocardial infarction. *Circulation*. 1994;90:61-8.
74. Musial J, Pajak A, Undas A, Kawalec E, et al. Thrombin generation markers and coronary heart disease risk factors in a Polish population sample. *Thromb Haemost*. 1997;77:697-700.
75. Misumi K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, et al. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 1998;81:22-6.
76. Butenas S, Undas A, Gissel MT, Szuldrzynski K, et al. Factor XIa and tissue factor activity in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2008;99:142-9.

77. Brummel-Ziedins K, Undas A, Orfeo T, Gissel M, et al. Thrombin generation in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease: dependence on plasma factor composition. *J Thromb Haemost.* 2008;6:104-10.
78. Vasiljevic-Pokrajcic Z, Mickovski N, Davidovic G, Asanin M, et al. Sex and age differences and outcomes in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol.* 2016;217 Suppl:S27-31.
79. Scully P, Tighe P, Gilmore GA, Wallace JM, et al. The relationship between gender and age with monocyte tissue factor expression. *J Thromb Thrombolysis.* 2009;28:156-65.
80. von Eyben FE and von Eyben R. Smoking and other major coronary risk factors and acute myocardial infarction before 41 years of age: two Danish case-control studies. *Scand Cardiovasc J.* 2001;35:25-9.
81. Tapson VF. The role of smoking in coagulation and thromboembolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2:71-7.
82. Wisniewska E, Wodynska T, Kulwas A, Kotschy M, et al. Thrombomodulin--endothelial thrombin receptor in blood of patients with unstable angina pectoris. *Med Sci Monit.* 2001;7:256-9.
83. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Potaczek DP, Stobierska-Dzierzek B, et al. Atorvastatin and quinapril inhibit blood coagulation in patients with coronary artery disease following 28 days of therapy. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2397-404.
84. Derhaschnig U, Testori C, Riedmueller E, Aschauer S, et al. Hypertensive emergencies are associated with elevated markers of inflammation, coagulation, platelet activation and fibrinolysis. *J Hum Hypertens.* 2013;27:368-73.
85. Kaye SM, Pietilainen KH, Kotronen A, Joutsu-Korhonen L, et al. Obesity-related derangements of coagulation and fibrinolysis: a study of obesity-discordant monozygotic twin pairs. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20:88-94.
86. Leurs PB, van Oerle R, Wolffenbuttel BH and Hamulyak K. Increased tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and coagulation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost.* 1997;77:472-6.
87. Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications.* 2001;15:44-54.
88. Lim HS, Lip GY and Blann AD. Plasma von Willebrand factor and the development of the metabolic syndrome in patients with hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5377-81.

89. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, et al. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med.* 1995;332:635-41.
90. Montalescot G, Collet JP, Lison L, Choussat R, et al. Effects of various anticoagulant treatments on von Willebrand factor release in unstable angina. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:110-4.
91. Kaku B, Katsuda S, Taguchi T, Nitta Y, et al. A case of acute myocardial infarction with repetitive stent thrombosis during emergent percutaneous coronary intervention. Transient decrease in antithrombin III activity and heparin resistance. *Int Heart J.* 2009;50:111-9.
92. Pelkonen KM, Wartiovaara-Kautto U, Nieminen MS, Ahonen K, et al. Low normal level of protein C or of antithrombin increases risk for recurrent cardiovascular events. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005;16:275-80.
93. Thompson SG, Fechtrop C, Squire E, Heyse U, et al. Antithrombin III and fibrinogen as predictors of cardiac events in patients with angina pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:357-62.
94. Brophy JM, Belisle P and Joseph L. Evidence for use of coronary stents. A hierarchical bayesian meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2003;138:777-86.
95. De Luca G, Dirksen MT, Spaulding C, Kelbaek H, et al. Drug-eluting vs bare-metal stents in primary angioplasty: a pooled patient-level meta-analysis of randomized trials. *Arch Intern Med.* 2012;172:611-21; discussion 621-2.
96. Abo-Salem E, Alsidawi S, Jamali H, Effat M, et al. Optimal Duration of Dual Antiplatelet Therapy after Drug-Eluting Stents: Meta-Analysis of Randomized Trials. *Cardiovasc Ther.* 2015;33:253-63.
97. Palmerini T, Benedetto U, Bacchi-Reggiani L, Della Riva D, et al. Mortality in patients treated with extended duration dual antiplatelet therapy after drug-eluting stent implantation: a pairwise and Bayesian network meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2015;385:2371-82.
98. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007;357:2001-15.
99. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361:1045-57.

100. Stachon P, Ahrens I, Bode C and Zirlik A. Dual pathway therapy in acute coronary syndrome. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;42:254-60.
101. Gibson CM, Chakrabarti AK, Mega J, Bode C, et al. Reduction of stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with rivaroxaban in ATLAS-ACS 2 TIMI 51. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:286-90.
102. Bhagirath VC, Eikelboom JW and Anand SS. Low-dose rivaroxaban plus aspirin for the prevention of cardiovascular events: an evaluation of COMPASS. *Future Cardiol*. 2018;14:443-453.
103. Kirchhof P, Breithardt G, Aliot E, Al Khatib S, et al. Personalized management of atrial fibrillation: Proceedings from the fourth Atrial Fibrillation competence NETwork/European Heart Rhythm Association consensus conference. *Europace*. 2013;15:1540-56.