

**lek. Olga Dzikowska-Diduch**

**Ocena funkcji śródbłonna u pacjentów  
z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową**



Praca na stopień doktora nauk medycznych

**Promotor pracy: dr hab. med. Maciej Kostrubiec**

**Klinika Chorób Wewnętrznych i Kardiologii z Centrum Diagnostyki**

**i Leczenia Żylnej Choroby Zakrzepowo-Zatorowej**

**Wydział Lekarsko-Dentystyczny**

**Warszawski Uniwersytet Medyczny**

**Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą II Wydziału Lekarskiego**

**Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Warszawa 2017**

**Składam serdeczne podziękowania**

**prof. dr hab. n. med. Piotrowi Pruszczykowi**

**za wszelką pomoc, życzliwość i okazane mi zaufanie**

**Moim Rodzicom pracę tę poświęcam**

## Spis treści

Wykaz najczęściej używanych skrótów: .....	7
Spis tabel: .....	9
Spis rycin: .....	10
Streszczenie: .....	11
Abstract .....	13
Wprowadzenie .....	14
I. WSTĘP .....	15
1.1 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa - definicja, podział .....	15
1.2 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa - epidemiologia .....	15
1.3 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa – patofizjologia .....	15
1.4 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa - czynniki ryzyka .....	16
1.5 Niesprowokowana żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa .....	17
1.6 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa – przebieg naturalny .....	17
1.7 Wpływ przebytej żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej na czas przeżycia .....	18
1.8 Ryzyko nawrotu żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej .....	18
1.9 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa – wczesne i późne nawroty .....	18
1.10 Przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne .....	19
1.11 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa a miażdżycy i choroba wieńcowa .....	21
1.12 Śródbłonek – funkcja .....	21
1.13 Dysfunkcja śródbłonka .....	22
1.14 Dysfunkcja śródbłonka a czynniki ryzyka miażdżycy .....	23
1.15 Dysfunkcja śródbłonka a miażdżycy .....	23
1.16 Dysfunkcja śródbłonka a żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa .....	24
1.17 Ocena funkcji śródbłonka .....	24
1.17.1 Inwazyjna ocena funkcji śródbłonka .....	25
1.17.2 Ultrasonograficzna ocena śródbłonka .....	25

1.17.3 Biomarkery funkcji śródbłonna - ADMA.....	26
1.17.4 Biomarkery funkcji śródbłonna - cząsteczki adhezyjne ICAM-1 i VCAM-1 .....	27
1.17.5 Biomarkery funkcji śródbłonna - selektyna E.....	27
1.17.6 Tonometria tętnic obwodowych w warunkach reaktywnego przekrwienia.....	28
II. HIPOTEZY I CELE NAUKOWE PRACY .....	29
III. METODYKA BADAŃ.....	30
3.1 Grupa badana .....	30
3.2 Protokół badania .....	32
3.3 Badanie przedmiotowe i podmiotowe .....	33
3.4 Badania laboratoryjne .....	33
3.4.1 Oznaczanie asymetrycznej dimetyloargininy .....	33
3.4.2 Oznaczanie sVCAM-1 i sICAM-1.....	33
3.4.3 Oznaczanie rozpuszczalnej selektyny E (CD62E).....	34
3.5 Protokół badania elektrokardiograficznego .....	34
3.6 Protokół przezklatkowego badania echokardiograficznego .....	34
3.7 Protokół oceny wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej zwiększonym przepływem oraz po podaniu nitrogliceryny .....	35
3.8 Obserwacja po badaniu czynności śródbłonna .....	36
IV. ANALIZA STATYSTYCZNA:.....	38
V. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ.....	39
VI. WYNIKI.....	40
6.1 Charakterystyka pacjentów.....	40
6.2 Ocena czynników ryzyka dysfunkcji śródbłonna .....	40
6.3 Ocena biochemiczna .....	41
6.4 Wyniki badania elektrokardiograficznego.....	42
6.5 Wyniki badania echokardiograficznego .....	42
6.6 Biomarkery dysfunkcji śródbłonna: .....	43

6.7 Ultrasonograficzna ocena rozszerzalności tętnicy ramiennej pod wpływem zwiększonego przepływu i po podaniu nitrogliceryny .....	46
6.8 Korelacje wyników badania ultrasonograficznego śródbłonka .....	47
6.9 Leczenie stosowane w czasie oceny śródbłonka .....	48
6.10 Wyniki oceny w kierunku trombofilii .....	49
6.11 Porównanie wyników pacjentów po epizodzie sprowokowanej i niesprowokowanej ostrej zatorowości płucnej .....	49
6.12 Nawroty żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej w obserwacji odległej .....	51
6.13 Leczenie w czasie obserwacji po ocenie śródbłonka .....	51
6.14 Wskaźniki czynności śródbłonka a częstość nawrotu .....	51
6.15 Analiza jednoczynnikowa wskaźników ryzyka nawrotu .....	53
6.16 Analiza wieloczynnikowa wskaźników ryzyka nawrotu .....	53
6.17 Czynniki ryzyka nawrotu w ocenie rokowania .....	54
6.18 Łączna analiza nawrotów i antykoagulacji w obserwacji odległej .....	56
VII. OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników .....	58
7.1 Dysfunkcja śródbłonka u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową .....	58
7.1.1 Czynniki ryzyka dysfunkcji śródbłonka u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową .....	58
7.1.2 Ultrasonograficzna ocena funkcji śródbłonka u pacjentów po przebytej ostrej zatorowości płucnej .....	59
7.1.3 Biochemiczna ocena funkcji śródbłonka u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową .....	61
7.1.4 Podsumowanie oceny funkcji śródbłonka u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową .....	63
7.2 Dysfunkcja śródbłonka w ocenie ryzyka nawrotu żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej .....	64
7.3 Funkcja śródbłonka i przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne .....	65
7.4 Dysfunkcja śródbłonka – prawdopodobny, wspólny patomechanizm rozwoju żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej i miażdżycy .....	66

7.5. Ograniczenia pracy .....	67
VIII. WNIOSKI.....	68
IX. PIŚMIENNICTWO.....	69

## Wykaz najczęściej używanych skrótów:

- ADMA - (ang. Asymmetric DiMethylArginine) asymetryczna dimetyloarginina
- AUC - (ang. Area Under the Curve) pole pod krzywą
- BMI - (ang. Body Mass Index), wskaźnik masy ciała
- CI - (ang. Confidence Interval) przedział ufności
- CD62E - (ang. Cluster of Differentiation 62 E) selektyna E
- CRP - (ang. C-Reactive Protein) białko ostrej fazy
- eGFR - (ang. estimated Glomerular Filtration Rate) szacunkowy współczynnik przesączania kłębuszkowego
- EKG - elektrokardiogram
- EF - (ang. Ejection Fraction) frakcja wyrzutowa
- ELISA - (ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) test immunoenzymosorpcyjny
- ESC - (ang. European Society of Cardiology) Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne
- FMD - (ang. Flow-Mediated Dilatation) wazodylatacja indukowana przepływem
- GB - grupa badana
- GK - grupa kontrolna
- NMD - (ang. Nitroglycerin-Mediated Dilatation) wazodylatacja indukowana nitrogliceryną
- NO - (ang. Nitric Oxide) tlenek azotu
- NOS - (ang. Nitric Oxide Synthase) syntaza tlenku azotu
- NPV - (ang. Negative Predictive Value) negatywna wartość predykcyjna
- NT-proBNP - (ang. N-terminal fragment of pro-Brain Natriuretic Peptide) N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B

- NTG - nitrogliceryna
- OR - (ang. Odds Ratio) iloraz szans
- OZP - ostra zatorowość płucna
- PPV - (ang. Positive Predictive Value) negatywna wartość predykcyjna
- PZZNP - przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne
- ROC - (ang. Receiver Operating Characteristic) ocena jakości klasyfikatora
- SD - (ang. Standard Deviation) odchylenie standardowe
- sICAM-1 (ang. soluble InterCellular Adhesion Molecule 1) międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna
- sVCAM-1 (ang. soluble Vascular Cell Adhesion Molecule1) naczyniowa cząsteczka adhezyjna
- TAPSE - (ang. Tricuspid Annular Peak Systolic Excursion) maksymalne skurczowe wychylenie pierścienia trójdzielnego
- TK - tomografia komputerowa
- TRPG - (ang. Tricuspid Regurgitation Peak Gradient) maksymalny gradient trójdzielny
- ZŻG - zakrzepica żył głębokich
- ŻChZZ - żylna choroba zakrzepowo - zatorowa



## Spis tabel:

	strona
Tabela 1. Czynniki prowokujące żylną chorobę zakrzepowo-zatorową w badanej grupie ....	40
Tabela 2. Charakterystyka ogólna grupy badanej i grupy kontrolnej.....	41
Tabela 3. Porównanie wyników biochemicznych osób z grupy badanej i kontrolnej.....	41
Tabela 4. Porównanie wybranych parametrów echokardiograficznych osób z grupy badanej i kontrolnej.....	42
Tabela 5. Porównanie wyników oceny funkcji śródbłonna między grupą badaną, a grupą kontrolną.....	48
Tabela 6. Leczenie hipotensyjne u osób poddanych ocenie śródbłonna.....	49
Tabela 7. Charakterystyka pacjentów po sprowokowanej i niesprowokowanej ostrej zatorowości płucnej.....	50
Tabela 8. Analiza regresji jednoczynnikowej Cox'a w przewidywaniu oceny ryzyka nawrotu żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej.....	53
Tabela 9. Porównanie pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową wymagających antykoagulacji na koniec obserwacji i pacjentów pozostających bez leczenia przeciwkrzepliwego.....	57
Tabela 10. Porównanie charakterystyki i wyników osób włączonych do omawianego badania i analizy Migliacciego i wsp.....	60

## Spis rycin:

strona

Rycina 1. Porównanie stężenia sICAM-1 u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.....	44
Rycina 2. Porównanie stężenia sVAM-1 u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.....	44
Rycina 3. Porównanie stężenia ADMA u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.....	45
Rycina 4. Porównanie stężenia selektyny E u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.....	45
Rycina 5. Dysfunkcja śródbłonna definiowana jak FMD < 4,5% u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i w grupie kontrolnej.....	46
Rycina 6. Porównanie wyników ultrasonograficznej oceny rozszerzalności tętnicy ramiennej [FMD i NMD, mediana (min-max)] u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.....	47
Rycina 7. Krzywa Kaplana-Meiera dla selektyny E w przewidywaniu nawrotu żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych.....	54
Rycina 8. Krzywa Kaplana-Meiera dla sICAM-1 w przewidywaniu nawrotu żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych.....	54
Rycina 9. Krzywe Kaplan-Meier przeżycia bez nawrotu żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych w zależności od stężenia selektyny E i sICAM-1 .....	55
Rycina 10. Wartość predykcyjna selektyny E i sICAM-1 w przewidywaniu nawrotu żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych.....	56

## **Streszczenie:**

**Założenia:** Dysfunkcja śródbłonna odgrywa kluczową rolę w zapoczątkowaniu i progresji miażdżycy. Ostatnie badania sugerują, że miażdżycy może być czynnikiem ryzyka żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ), a ponadto u pacjentów po przebytej ŻChZZ częściej dochodzi do nagłych tętniczych zdarzeń sercowo-naczyniowych. Palenie papierosów, otyłość, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca to wspólne czynniki ryzyka miażdżycy i ŻChZZ. Wszystkie te czynniki prowadzą do dysfunkcji śródbłonna.

**Hipoteza badawcza:** W niniejszej pracy postawiono hipotezę, że upośledzenie funkcji śródbłonna częściej występuje u pacjentów z ŻChZZ i może predysponować do nawrotu ŻChZZ.

**Metoda:** Do badania włączono chorych poniżej 50 roku życia, po przebytej, co najmniej 6 miesięcy wcześniej ostrej zatorowości płucnej (OZP), bez istotnych chorób współwystępujących i ochotników dobranych pod względem wieku i płci. Funkcję śródbłonna oceniano za pomocą ultrasonograficznej analizy rozszerzalności tętnicy ramiennej pod wpływem zwiększonego przepływu (FMD), a następnie obserwowano poszerzenie tętnicy indukowane nitrogliceryną podawaną podjęzykowo (NMD). W dniu badania pobierano także krew do oznaczenia stężenia ADMA (Xpress ELISA, producent Immunodiagnostik AG), sVCAM-1 (Human sVCAM-1, ELISA Kit, producent Biovendor), sICAM-1 (Human sICAM-1, ELISA Kit, producent Biovendor) i selektyny E (Human CD62E - E Selectin, ELISA Kit, producent Diaclone). Następnie pacjenci byli obserwowani pod kątem nawrotu ŻChZZ w ramach Poradni Przyklinicznej.

**Wyniki:** Do pracy włączono 82 pacjentów (38 K, średni wiek  $38 \pm 11$  lat) po przebytej (średnio  $1,1 \pm 0,7$  roku) OZP, oraz 30 ochotników (15 K, średni wiek  $38 \pm 12$  lat). U pacjentów po przebytej OZP stwierdzono mniejsze FMD tętnicy ramiennej w porównaniu z grupą kontrolną [5,3 % (0,8 - 20,3) vs. 13,8 % (4,1 - 24,3);  $p < 0,0001$ ]. U chorych po przebytej OZP stwierdzono istotnie wyższe stężenie: sVCAM-1 [631 ng/ml (105 - 2382) vs. 495 ng/ml (348 - 934);  $p = 0,04$ ] i sICAM-1 [679 ng/ml (279 - 1006) vs. 600 ng/ml (394 - 766);  $p = 0,002$ ]. W czasie obserwacji (min. 12, maks. 72 miesiące, mediana 36 miesięcy) po ocenie śródbłonna rozpoznano 19 nawrotów ŻChZZ: 15 (79%) epizodów wystąpiło w grupie

z niesprowokowaną OZP w wywiadzie, a 4 zdarzenia u osób, które miały wcześniej rozpoznaną OZP związaną z określonym czynnikiem ryzyka. Na podstawie krzywej ROC wyznaczono punkty odcięcia dla biomarkerów wskazujące na wysokie ryzyko nawrotu. W grupie pacjentów z pierwotnie rozpoznaną niesprowokowaną OZP, u 17 z 43 stwierdzono stężenie selektyny E  $< 39$  ng/ml i sICAM-1  $> 655$  ng/ml, warto podkreślić, że u 11 z nich (65 %) rozpoznano nawrót ŻChZZ. Natomiast stężenie  $\geq 39$  ng/ml dla selektyny E i  $\leq 655$  ng/ml dla sICAM-1 wskazywały osoby, u których nawrót ŻChZZ nie wystąpił.

**Wnioski:** Pacjentów po przebytej OZP cechuje upośledzona funkcja śródbłonna oceniona za pomocą FMD oraz stężenia biomarkerów: sVCAM-1 i sICAM-1. Ocena śródbłonna u pacjentów z ŻChZZ może być pomocna w przewidywaniu nawrotu ŻChZZ. Niskie stężenia selektyny-E i wysokie stężenie sICAM-1 są związane z wysokim ryzykiem nawrotu choroby, szczególnie u pacjentów po przebytej niesprowokowanej OZP.

## **Abstract**

**Background:** Dysfunction of the vascular endothelium is a hallmark of most conditions associated with atherosclerosis. Recent data indicate that endothelial dysfunction is common link of both atherosclerosis and venous thromboembolism. Risk factors for atherosclerosis and venous thromboembolism overlap and are mostly associated with endothelial dysfunction. We hypothesized that endothelial dysfunction is present in patients after the first episode of acute pulmonary embolism (APE) and predicts the risk of venous thromboembolism recurrence.

**Design and Methods:** Patients, at least 6 months after the first episode of symptomatic, confirmed APE were included in this case-control study. The exclusion criteria were risk factors for cardiovascular diseases and other conditions associated with endothelial dysfunction. Eighty two patients (38 F; aged  $38 \pm 11$  yrs) were enrolled in the study, 39 after provoked APE, 43 after unprovoked APE, and 30 controls (C) (15F; aged  $38 \pm 12$  yrs). In order to evaluate the endothelial function in patients with a history of APE, flow-mediated dilation (FMD), nitroglycerin-mediated dilation (NMD) of the brachial artery and biomarkers of endothelial dysfunction (sVCAM-1, sICAM-1, ADMA, E-selectin) were measured. Subsequently all patients were followed up in an outpatient clinic for venous thromboembolism recurrence.

**Results:** FMD was more often impaired in APE patients than in controls [5,3 % (0,8 -20,3) vs. 13,8 % (4,1 - 24,3);  $p < 0,0001$ ]. Biomarker levels differed between APE and C groups: sVCAM-1 [631 ng/ml (105 - 2382) vs. 495 ng/ml (348 - 934);  $p = 0,04$ ] and sICAM-1 [679 ng/ml (279 - 1006) vs. 600 ng/ml (394 - 766);  $p = 0,002$ ]. There were 19 recurrences of venous thromboembolism during the at least 12-month follow-up (15 with a history of unprovoked-APE and 4 after provoked-APE). E-selectin  $\geq 39$  ng/ml and sICAM-1  $\leq 655$  ng/ml indicated the group without recurrence of venous thromboembolism. In a group of 43 unprovoked APE patients both E-selectin  $< 39$  ng/ml and sICAM-1  $> 655$  ng/ml were found in 17 subjects. Eleven of them (65 %) were diagnosed with recurrent venous thromboembolism.

**Conclusions:** Endothelial function is impaired in patients after an episode of APE as indicated by FMD assessment and biomarker levels. Low concentrations of E-selectin and high levels of sICAM-1 are associated with a high risk of recurrent thromboembolism.

## Wprowadzenie

W patogenezie żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ) biorą udział czynniki, które można podzielić zgodnie z triadą Virchowa. Do powstania zakrzepu prowadzi zwolnienie przepływu w żyłach, przewaga czynników prozakrzepowych nad inhibitorami krzepnięcia i czynnikami fibrynolitycznymi oraz uszkodzenie ściany naczynia. Czynniki predysponujące do ŻChZZ są związane z wyżej wymienionymi mechanizmami. Ostra zatorowość płucna (OZP), czy zakrzepica żył głębokich (ZZG) może również wystąpić przy braku jakiegokolwiek znanego czynnika ryzyka<sup>1</sup>. Idiopatyczną zatorowość płucną stwierdza się u około 20% chorych<sup>1</sup>.

W badaniach układu sercowo-naczyniowego uznano rolę śródbłonka za podstawową w regulacji funkcji naczyń krwionośnych<sup>2</sup>. Komórki śródbłonka wytwarzają i metabolizują liczne przekaźniki śródbłonkowe uwalniane w odpowiedzi na bodźce chemiczne i mechaniczne, biorą udział w wywoływaniu rozkurczu naczyń krwionośnych i hamowaniu proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń, tym samym utrzymują prawidłową funkcję naczyń. Dysfunkcja śródbłonka odgrywa kluczową rolę w zapoczątkowaniu i progresji miażdżycy<sup>3</sup>. Wspólną cechą palenia papierosów, otyłości, hipercholesterolemii, nadciśnienia tętniczego czy cukrzycy jest dysfunkcja śródbłonka, jednocześnie wszystkie wyżej wymienione są czynnikami ryzyka choroby wieńcowej jak również ŻChZZ<sup>4</sup>. W niniejszej pracy założono, że nieprawidłowa funkcja śródbłonka jest mechanizmem związanym z ŻChZZ.

## **I. WSTĘP**

### **1.1 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa - definicja, podział**

ŻChZZ obejmuje zakrzepicę żył głębokich (ZŻG) i zatorowość płucną. Ostra zatorowość płucna (OZP) to najpoważniejsza manifestacja kliniczna ŻChZZ potencjalnie zagrażająca nagłym zgonem pacjenta<sup>1</sup>. Jednakże OZP jest często traktowana, jako konsekwencja ZŻG, dlatego też istniejące dane dotyczące epidemiologii, czynników ryzyka i historii naturalnej najczęściej pochodzą z badań, które analizowały ZŻG i OZP łącznie<sup>4</sup>. Z tego także powodu w ocenie rokowania u pacjentów po przebytych epizodzie OZP bierze się pod uwagę nawroty OZP lub ZŻG traktując je, jako dwie postaci tej samej ŻChZZ.

### **1.2 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa - epidemiologia**

Choroby serca i naczyń są główną przyczyną zgonów oraz inwalidztwa w Europie<sup>5</sup>. Natomiast sama ŻChZZ jest jednym z najczęstszych schorzeń układu krążenia, a OZP stanowi jedną z głównych przyczyn śmiertelności, zachorowalności i hospitalizacji w Europie<sup>5</sup>. Mimo to jej epidemiologia jest trudna do określenia, ponieważ ZŻG, czy zatorowość płucna mogą przebiegać bez objawów klinicznych i w takim przypadku ich rozpoznanie może być postawione tylko przypadkowo<sup>6</sup>. Ponadto pierwszą kliniczną manifestacją OZP może być nagły zgon sercowy<sup>7</sup>. ŻChZZ jest trzecim, po chorobie wieńcowej i udarach mózgu, najczęstszym schorzeniem układu krążenia<sup>8</sup>, o całkowitej rocznej częstości 100–200 na 100 000 mieszkańców<sup>4,6</sup>. Zapadalność na ŻChZZ rośnie wykładniczo wraz z wiekiem i jest nieco większa wśród mężczyzn (114/100000) niż wśród kobiet (105/100000)<sup>8</sup>. Opierając się na danych światowych można przypuszczać, że w Polsce rocznie około 55 tys. osób choruje ZŻG, a 35 tys. na OZP<sup>9</sup>.

### **1.3 Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa – patofizjologia**

Rozwój zakrzepicy żyłnej jest wypadkową współdziałania czynników opisywanych triadą Virchowa. Do powstania zakrzepu prowadzi zwolnienie przepływu w żyłach, przewaga czynników prozakrzepowych nad inhibitorami krzepnięcia i czynnikami fibrynolitycznymi oraz uszkodzenie ściany naczynia<sup>10</sup>. Pierwszym elementem predysponującym do ŻChZZ jest zastój lub nielaminarny przepływ krwi w naczyniu. Drugą grupą czynników sprzyjających powstawaniu zakrzepu są zaburzenia reologiczne krwi skutkujące nadkrzepliwością, takie jak trombofilia<sup>10</sup>. Jednak najważniejszą rolę odgrywa prawdopodobnie uszkodzenie śródbłonna. Skutkuje ono odsłonięciem podśródbłonkowych włókien kolagenowych oraz uwolnieniem

białek cytoplazmatycznych<sup>11</sup>. Dochodzi wówczas do ekspresji czynnika tkankowego, który w kontakcie z krążącym w osoczu VIII czynnikiem krzepnięcia, powoduje jego aktywację i inicjację zewnątrzpochodnego toru kaskady krzepnięcia<sup>11</sup>. Ostatnim etapem jest polimeryzacja włókien fibryny w stabilną sieć, w której lokują się erytrocyty<sup>11</sup>. W czasie powstawania skrzepu komórki, uczestniczące w tym procesie, uwalniają liczne substancje bioaktywne<sup>11</sup>. Następnie dochodzi do chemotaksji komórek zapalnych i zwiększenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych<sup>11</sup>. Konsekwencją tych zjawisk jest migracja leukocytów przez ścianę naczynia, narastanie jej uszkodzenia i powiększenie skrzepliny<sup>9</sup>. Leukocyty tworzą we wczesnej fazie naciek zapalny, następnie są zastępowane przez monocyty, makrofagi i limfocyty<sup>9</sup>.

#### **1.4 Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa - czynniki ryzyka**

Lista środowiskowych i genetycznych czynników predysponujących do zakrzepicy jest długa<sup>4</sup>. ŻChZZ jest konsekwencją interakcji między czynnikami ryzyka związanymi z pacjentem oraz zewnętrznymi czynnikami ryzyka<sup>4</sup>. Uważa się, że ŻChZZ może być „sprowokowana” w obecności znanego czynnika ryzyka lub „niesprowokowana” w przypadku braku powyższych czynników<sup>4</sup>. Wiele czynników ryzyka ma charakter czasowy i/lub odwracalny np. zabieg chirurgiczny, uraz, unieruchomienie, ciąża, doustna antykoncepcja lub hormonalna terapia zastępcza w ciągu ostatnich 6 tygodni do 3 miesięcy przed diagnozą<sup>12</sup>. Z kolei do nieprzemijających czynników ryzyka ŻChZZ należą trombofilia, czy niedowład kończyn<sup>4</sup>. Czynniki ryzyka dzieli się także w zależności od stopnia, w jakim sprzyjają wystąpieniu ŻChZZ. Silnymi czynnikami, zwiększającymi ryzyko wystąpienia ŻChZZ co najmniej dziesięciokrotnie, są rozległy uraz, operacja, złamania kończyn dolnych, operacje wymiany stawów biodrowych i kolanowych oraz uszkodzenie rdzenia kręgowego<sup>12</sup>. Ryzyko ŻChZZ jest największe w ciągu pierwszych 2 tygodni po operacji, ale pozostaje podwyższone przez 2–3 miesiące<sup>1</sup>. Profilaktyka przeciwzakrzepowa istotnie zmniejsza ryzyko ŻChZZ w okresie okołoperacyjnym<sup>1</sup>. Do silnych czynników należą także hospitalizacja z powodu niewydolności serca lub migotania przedsionków oraz zawał serca w czasie poprzedzających 3 miesięcy<sup>13,14</sup>. Umiarkowane czynniki predysponujące do ŻChZZ to między innymi infekcje, choroby autoimmunologiczne, transfuzje krwi, trombofilie, czy nowotwory<sup>4</sup>. U kobiet do zakrzepicy i zatorowości w umiarkowanym stopniu predysponuje stosowanie doustnej antykoncepcji, hormonalnej terapii zastępczej, a także ciąża i połóg<sup>15</sup>. Wykazano również, że zapłodnienie metodą in vitro związane jest częstszym występowaniem ŻChZZ<sup>16</sup>. Powszechne czynniki ryzyka rozwoju i progresji miażdżycy, takie jak palenie



tytoniu, otyłość, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze i cukrzyca, są również czynnikami predysponującymi do ŻChZZ<sup>4</sup>. Palenie tytoniu można rozważać, jako czynnik predysponujący do ŻChZZ bezpośrednio<sup>17</sup>, jak również, przynajmniej częściowo pośrednio, przez wywoływanie choroby wieńcowej, czy choroby nowotworowej<sup>18</sup>. Cukrzyca, nadciśnienie tętnicze oraz otyłość są wymieniane wśród słabych czynników predysponujących do ŻChZZ<sup>4</sup>. Chociaż związek między czynnikami ryzyka, a rozwojem ŻChZZ jest dość dobrze udokumentowany, to patomechanizm nie jest dokładnie poznany. Wydaje się, że dysfunkcja śródbłonna, która jest związana z cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym, hiperlipidemią, otyłością i paleniem tytoniu, może być wspólnym mianownikiem tych czynników ryzyka i tłumaczyć współwystępowanie miażdżycy i ŻChZZ<sup>19</sup>.

### **1.5 Niesprowokowana żylna choroba zakrzepowo-zatorowa**

Długa lista czynników ryzyka zakrzepicy żyłnej, nie pozwala na wskazanie przyczyny wystąpienia ŻChZZ u około 20-30% pacjentów<sup>1</sup>. Zakrzepica może wystąpić przy braku jakiegokolwiek znanego czynnika predysponującego. Wydaje się, że przynajmniej w części przypadków, w których nie można zidentyfikować czynnika prowokującego, u podstaw ŻChZZ może leżeć dysfunkcja śródbłonna, wynikająca nie tylko z uszkodzenia mechanicznego, procesu zapalnego, ale także indywidualnych skłonności warunkowanych genetycznie. Dotychczasowe doniesienia wskazują, że dysfunkcja śródbłonna, oceniana na podstawie rozszerzalności tętnicy ramiennej, występuje częściej u pacjentów z idiopatyczną zatorowością płucną w porównaniu z chorymi po przebytej ŻChZZ związanej z przejściowymi czynnikami ryzyka<sup>20</sup>.

### **1.6 Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa – przebieg naturalny**

Zakrzepica ograniczona do żył podudzia pozostaje często niema klinicznie. Proces zakrzepowy szerząc się na żyły proksymalne u większości pacjentów wywołuje objawy zakrzepicy żył głębokich<sup>9</sup>. U blisko połowy pacjentów z zakrzepicą żył proksymalnych stwierdza się zaburzenia perfuzji w scyntygrafii płuc odpowiadające zatorowości płucnej. Podczas leczenia przeciwkrzepliwego zmiany zakrzepowe ustępują, ale resztkowe skrzepliny stwierdza się w badaniu ultrasonograficznym żył u połowy pacjentów po epizodzie ŻChZZ<sup>21</sup>, a ubytki perfuzji w scyntygrafii perfuzyjnej płuc u około 30% osób po przebytej OZP<sup>22</sup>. W związku z tym, za naturalne kontinuum ŻChZZ można uznać zespół pozakrzepowy i przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne(PZZNP)<sup>21,23</sup>. Po roku obserwacji cechy zespołu pozakrzepowego stwierdza się u około 17% pacjentów, którzy przebyli objawową zakrzepicę żył kończyn dolnych, a po 5 latach u około 30%, a według niektórych źródeł

nawet u 50% pacjentów<sup>24</sup>. Z każdym nawrotem ZŻG zwiększa się ryzyko wystąpienia zespołu pozakrzepowego. Patofizjologia zespołu pozakrzepowego pozostaje nie do końca wyjaśniona. Prawdopodobnie odczyn zapalny, do którego dochodzi w następstwie zakrzepicy, wraz z utrudnieniem przepływu powodują uszkodzenie zastawek żylnych, co z kolei skutkuje ich niewydolnością, refluksiem i nadciśnieniem żylnym<sup>21</sup>.

### **1.7 Wpływ przebytej żylniej choroby zakrzepowo-zatorowej na czas przeżycia**

Przeżycie po epizodzie ŻChZZ jest zdecydowanie krótsze niż oczekiwane względem wieku i płci. Warto podkreślić, że jest również istotnie gorsze po OZP, niż po ZŻG<sup>25</sup>. Zestawienia wypisów ze szpitala niewyselekcjonowanych pacjentów z OZP lub/i ZŻG wykazują 9–11% całkowitą śmiertelność 30-dniową, a 8,6–17% śmiertelność 3-miesięczną<sup>26,27</sup>. Ryzyko zgonu było 5,42 razy większe u pacjentów z niemasywną OZP, w porównaniu do chorych jedynie z ZŻG ( $p < 0,001$ ) i aż 17,5 razy wyższe, gdy porównywano masywną i niemasywną OZP. W analizie wieloczynnikowej wiek, unieruchomienie z powodów neurologicznych i choroba nowotworowa zwiększały śmiertelność w OZP<sup>27</sup>.

### **1.8 Ryzyko nawrotu żylniej choroby zakrzepowo-zatorowej**

Czynniki ryzyka nawrotu ŻChZZ są słabo poznane, szczególnie u chorych z jej niesprowokowaną postacią<sup>28</sup>. Iorio i wsp. podsumowując swoje badania, stwierdzili, że najmniejsze ryzyko nawrotu ŻChZZ istnieje w przypadku incydentu związanego z zabiegiem chirurgicznym, nieco większe, jeśli wystąpił inny, niechirurgiczny czynnik predysponujący, a największe po epizodzie idiopatycznym<sup>29</sup>. Odsetek nawrotów, po zaprzestaniu terapii, wynosił w skali roku około 2,5% w przypadku OZP związanej z odwracalnymi czynnikami ryzyka, w porównaniu z 4,5% po idiopatycznym epizodzie OZP<sup>30</sup>. W identyfikacji pacjentów należących do grupy podwyższonego ryzyka nawrotu po epizodzie idiopatycznym pomocne może być stwierdzenie zespołu antyfosfolipidowego, trombofilii wrodzonej, przetrwałej zakrzepicy żył proksymalnych<sup>31</sup> lub utrzymująca się w ocenie echokardiograficznej dysfunkcja prawej komory przy wypisie ze szpitala<sup>32</sup>. Idiopatyczna ŻChZZ może być też pierwszą manifestacją choroby nowotworowej<sup>4</sup>. Wśród pacjentów, u których po OZP rozpoznano nowotwór, około 70% przeżyło idiopatyczny epizod ŻChZZ<sup>4</sup>.

### **1.9 Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa – wczesne i późne nawroty**

ŻChZZ jest chorobą przewlekłą z 30% odsetkiem nawrotów w ciągu 10 lat<sup>28,31</sup>. Oceniony na podstawie historycznych danych odsetek pacjentów z wczesnym nawrotem, mimo terapii przeciwkrzepliwej, wynosił 2,0% po 2 tygodniach, 6,4% po 3 miesiącach i 8% w ciągu 6

miesiący<sup>33</sup>. Skumulowany odsetek pacjentów z późnym nawrotem ŻChZZ, po 6 miesiącach (w większości przypadków po odstawieniu leków przeciwkrzepliwych) szacuje się na 13% po 1 roku, 23% po 5 latach i 30% po 10 latach<sup>31</sup>. Sprzeczne są dane na temat związku między ryzykiem nawrotu ŻChZZ, a naturą pierwszego epizodu. Badanie śledzące losy chorych po pierwszym epizodzie OZP wykazało, że odsetek nawrotów po zaprzestaniu terapii wynosił ok. 2,5% rocznie w przypadku OZP związanego z odwracalnymi czynnikami ryzyka, w porównaniu z 4,5% w skali roku po idiopatycznym epizodzie OZP<sup>30</sup>. Podobne obserwacje poczyniono w innych prospektywnych badaniach klinicznych obejmujących chorych z ŻŻG<sup>34</sup>. Częstość nawrotów może być wyższa, nawet do 10%, w pierwszym roku po odstawieniu leków przeciwkrzepliwych. We wczesnym okresie aktywny nowotwór i brak szybkiego osiągnięcia terapeutycznego poziomu antykoagulacji wydają się niezależnie przewidywać zwiększone ryzyko nawrotu<sup>31,35</sup>. Randomizowane badania dotyczące nowych leków przeciwkrzepliwych, niebędących antagonistami witaminy K, wskazują, że częstość nawrotów w ostatnim czasie znacznie spadła<sup>4</sup>. Nawroty występują zwykle w ciągu pierwszych 2 tygodni, a następnie ich częstość się zmniejsza<sup>4</sup>. Po zaprzestaniu terapii przeciwkrzepliwej po 3 miesiącach ryzyko nawrotu, jest zbliżone do tego po zaprzestaniu leczenia po 6–12 miesiącach<sup>4</sup>. Przewlekłe leczenie przeciwzakrzepowe zmniejsza ryzyko nawrotu ŻChZZ o ok. 90%, ale jest związane z ok. 1% rocznym wzrostem ryzyka poważnych powikłań krwotocznych<sup>34,36,37</sup>. Wydaje się, że częstość nawrotów nie zależy od obrazu klinicznego pierwszego zdarzenia (ŻŻG czy OZP), choć występuje nieco częściej u pacjentów, którzy przebyli OZP lub zakrzepicę żył proksymalnych w porównaniu z zakrzepicą żył dystalnych. Nawroty są częstsze po wielu epizodach ŻChZZ, w przeciwieństwie do pojedynczego zdarzenia, a także po idiopatycznej zakrzepicy w przeciwieństwie do pojedynczego incydentu w obecności przemijających czynników ryzyka<sup>29</sup>. Także podwyższone stężenia d-dimeru, w trakcie lub po zakończeniu leczenia przeciwkrzepliwego, wskazują na zwiększone ryzyko nawrotu ŻChZZ<sup>38,39</sup>. Natomiast rodzinne występowanie zakrzepicy, zwiększony wskaźnik masy ciała<sup>28</sup>, wiek, płeć męska to czynniki, w przypadku, których nie potwierdzono jednoznacznie niezależnego związku z późnym nawrotem ŻChZZ<sup>40,41</sup>.

### **1.10 Przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne**

Rekanalizacja tętnic płucnych po epizodzie OZP jest często niepełna, o czym świadczą ubytki perfuzji płuc. W scyntygrafii perfuzyjnej płuc nieprawidłowości stwierdza się u około 30% pacjentów po przebytej OZP<sup>22</sup>. Przewlekłe ograniczenie łożyska płucnego przez

zorganizowane skrzepliny prowadzi do podwyższonego ciśnienia w tętnicy płucnej. PZZNP stwierdza się u około 0,1–9,1% osób, w ciągu pierwszych 2 lat, po objawowym incydencie OZP<sup>42,43</sup>. Szeroki zakres, podawanej częstości, jest prawdopodobnie spowodowany różnym trybem kierowania chorych po OZP na badania w kierunku PZZNP, brakiem wczesnych objawów i trudnością w różnicowaniu OZP z epizodem nałożonym na wcześniej istniejące już PZZNP. Ponadto, wywiad ŻChZZ odnotowano u około 80% pacjentów z PZZNP, co znaczy, że część przypadków PZZNP rozwija się bez wcześniejszego ostrego incydentu ŻChZZ<sup>43</sup>. PZZNP jest spowodowane głównie zakrzepową zatorowością płucną. Jeśli skrzepliny nie są rozpuszczane to mogą ulegać przebudowie i zastępowaniu przez zorganizowaną tkankę łączną, co prowadzi do powstawania zwężeń i niedrożności tętnic płucnych<sup>43</sup>. Wtórnie dochodzi do redystrybucji przepływu i przebudowy również w obszarach zwiększonego przepływu<sup>43</sup>. Oprócz istotnej niedrożności naczyń płucnych patofizjologia PZZNP jest związana także z zaburzeniami mikrokrążenia płucnego<sup>44</sup>. Proces przebudowy naczyń płucnych może być modyfikowany przez stan zapalny, zwłaszcza, jeśli towarzyszy mu intensywna produkcja cytokin prozapalnych takich jak: IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ <sup>44</sup>. Istnieją doniesienia, że w tym procesie mogą brać także udział krążące i związane ze ścianą naczynia komórki progenitorowe<sup>45</sup>. Istotny wpływ na przebudowę naczyń płucnych mogą mieć również suplementacja hormonów tarczycy i nowotwory złośliwe<sup>46</sup>. W związku z tym, że śródbłonek odgrywa istotną rolę w procesie homeostazy, jego dysfunkcja może także wpływać na przebudowę naczyń płucnych<sup>47</sup>. Nieodpowiednie leczenie przeciwkrzepliwe, duża liczba skrzeplin, nawracający charakter zakrzepicy sprzyjają rozwojowi PZZNP<sup>4</sup>. Do czynników ryzyka rozwoju nadciśnienia płucnego należą również trombofilie: obecność antykoagulantu toczniowego lub przeciwciał antyfosfolipidowych oraz podwyższone stężenie czynnika VIII układu krzepnięcia i inne stany nadkrzepliwości<sup>48</sup>. Wycięcie śledziony, przetoka komorowo-przedsionkowa przy leczeniu wodogłowa, choroba zapalna jelit, przewlekłe zapalenia kości i szpiku mogą przyczynić się do powstania PZZNP<sup>4</sup>. Kłok i wsp. stwierdzili, że idiopatyczny epizod ŻChZZ, podostry przebieg OZP, przeciążenie prawej komory i leczenie substytucyjne niedoczynności tarczycy są czynnikami ryzyka rozwoju nadciśnienia płucnego po epizodzie OZP<sup>49</sup>. Leczeniem z wyboru PZZNP jest endarterektomia płucna. Pacjenci, którzy nie są poddawani operacji lub ciśnienie płucne pozostaje u nich podwyższone po zabiegu, charakteryzują się złym rokowaniem. Jeśli średnie ciśnienie w tętnicy płucnej wynosi powyżej 30 mmHg w chwili rozpoznania to śmiertelność, w grupie leczonej wyłącznie objawowo, sięga 50%<sup>50</sup>. W ostatnich latach nastąpił postęp w płucnej angioplastyce balonowej, która może stanowić alternatywę, dla wybranych pacjentów, z

nieoperacyjną postacią PZZNP lub z przetrwałym po endarterektomii nadciśnieniem płucnym<sup>51</sup>.

### **1.11 Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa a miażdżyca i choroba wieńcowa**

Dobrze znane czynniki ryzyka chorób tętnic, zwłaszcza miażdżycy, takie jak palenie tytoniu, otyłość, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze i cukrzyca są również czynnikami ryzyka ŻChZZ<sup>4</sup>. W dotychczas publikowanych pracach wykazano częstsze występowanie bezobjawowych blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych u pacjentów z idiopatyczną ŻChZZ (47,1%), niż u chorych z ŻChZZ związaną z przemijającymi czynnikami ryzyka (27,4%) i w dopasowanej pod względem wieku i płci grupie kontrolnej (32,0%)<sup>52</sup>. Becattini i współpracownicy zwrócili uwagę, że u pacjentów z idiopatyczną zatorowością płucną częściej dochodzi do zdarzeń sercowo-naczyniowych w porównaniu z chorymi z zatorowością płucną związaną z przemijającymi czynnikami ryzyka<sup>53</sup>. Z kolei Sorensen i wsp. stwierdzili większe roczne ryzyko zawału i udaru u pacjentów po przebytej ZZG. Co ciekawe, rozpoznanie choroby serca powoduje wzrost krótkoterminowego ryzyka wystąpienia OZP, niezwiązanej z zakrzepicą żył<sup>14</sup>. Hospitalizacja z powodu niewydolności serca, migotania przedsionków lub zawał serca w ciągu w ostatnich 3 miesięcy są silnymi czynnikami (iloraz szans > 10) predysponującymi do wystąpienia ŻChZZ<sup>4</sup>. Obserwacje te sugerują wspólną etiologię chorób naczyń tętnicznych i żylnych, a ŻChZZ można postrzegać, jako kontinuum chorób układu krążenia.

### **1.12 Śródbłonek – funkcja**

Śródbłonek to wyścielający naczynia krwionośne i jamy serca płaski nabłonek jednowarstwowy. Komórki śródbłonka zebrane razem utworzyłyby organ o masie około 1 kilograma, zbudowany z  $1-6 \times 10^{13}$  komórek, dlatego określa się go największym narządem wewnątrzwydzielniczym człowieka<sup>55</sup>. Komórki śródbłonka utrzymują prawidłową funkcję naczyń poprzez wytwarzanie i metabolizowanie licznych przekazników uwalnianych w odpowiedzi na bodźce chemiczne i mechaniczne, a także regulację napięcia ściany naczyń krwionośnych i hamowaniu proliferacji komórek mięśni gładkich<sup>2</sup>. Do funkcji śródbłonka należą: regulacja średnicy naczyń przez odpowiedni udział w syntezie substancji o działaniu naczyniorozkurczowym (tlenek azotu, prostacyklina, bradykinina)<sup>56</sup> i naczynioskurczowym (endotelina 1, czy angiotensyna II), a także utrzymywanie równowagi między procesami krzepnięcia (czynnik tkankowy, czynnik von Willebranda) i fibrynolizy: (tkankowy aktywator plazminogenu, inhibitor aktywatora plazminogenu). Śródbłonek wpływa na procesy zapalne i

odpornościowe, reguluje wzrost komórek, bierze udział w utlenianiu lipoprotein o małej gęstości.

Kluczowe znaczenie dla niniejszej pracy ma, wydzielany przez śródbłonek tlenek azotu (NO), substancja działająca wazodylatacyjnie, odkryta w 1980 roku przez Furchgotta i Zawadzkiego jako śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczynia (EDRF, endothelium-derived relaxing factor)<sup>57,58</sup>. Tlenek azotu jest wytwarzany w komórkach śródbłonka z L-argininy przez śródbłonkową izoformę syntazy NO, aktywowaną przez hipoksję, acetylocholiny, bradykininę, serotoninę<sup>59</sup>, a przede wszystkim przez siły ścinające działające na wewnętrzną ścianę naczynia i związane z tarciem przepływającej krwi o śródbłonek<sup>60</sup>. Tlenek azotu nie tylko rozszerza naczynie przez bezpośredni wpływ na mięśnie gładkie ściany naczynia, ale także hamuje ekspresję prozapalnych cytokin, chemokin oraz substancji adhezyjnych. Ogranicza on również adhezję i agregację płytek krwi, hamuje proliferację mięśni gładkich oraz syntezę czynnika tkankowego, a także większość procesów zaangażowanych w rozwój blaszki miażdżycowej i jej destabilizację tj. migrację leukocytów do światła naczynia. Związek ten dyfunduje do komórek mięśni gładkich i aktywuje cyklazę guanylową, a następnie powstawanie cGMP. Z kolei cGMP aktywuje kinazę białkową zależną od cGMP oraz zmniejsza stężenie jonów wapnia w komórce, w efekcie czego, następuje rozkurcz mięśni gładkich i poszerzenie naczynia. Zmniejszenie biodostępności NO może wynikać ze zmniejszonej syntezy lub nasilonej inaktywacji, w czym zasadniczą rolę odgrywają wolne rodniki, których nadmierna produkcja jest obserwowana przy obecności sercowo-naczyniowych czynników ryzyka<sup>61</sup>. Zaburzenia wytwarzania NO, jego inaktywacja lub podawanie antagonistów wpływają niekorzystnie na proces wazodylatacji<sup>62</sup>, co znajduje odzwierciedlenie w zaburzeniach regulacji układu fibrynolizy i krzepnięcia, aktywności procesu zapalnego oraz proliferacji komórek mięśniówki naczyń i prowadzi do kaskady zdarzeń w ścianie naczynia odpowiedzialnych za rozwój blaszki miażdżycowej<sup>2</sup>.

### **1.13 Dysfunkcja śródbłonka**

Koncepcja dysfunkcji śródbłonka wywodzi się z badań układu sercowo-naczyniowego prowadzonych przez ostatnie 25 lat, które pozwoliły rozpoznać znaczenie śródbłonka w regulacji funkcji naczyń zarówno u osób zdrowych jak i w różnych stanach chorobowych<sup>3</sup>. Obecnie uważa się, że dysfunkcja śródbłonka odgrywa kluczową rolę w zapoczątkowaniu i progresji miażdżycy. Różne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego, takie jak: otyłość<sup>63</sup>, palenie papierosów<sup>64,65</sup>, cukrzyca<sup>66</sup>, nadciśnienie tętnicze<sup>67</sup> i hiperhomocysteinemia<sup>68</sup> są związane z upośledzeniem zależnej od śródbłonka rozszerzalności naczyń nawet u osób bez

objawów klinicznych. Poza tym na śródbłonkowo zależną rozszerzalność tętnic wpływają: rozmiar naczynia, wiek<sup>69,70</sup>, płeć, faza cyklu miesiączkowego, hipercholesterolemia<sup>71</sup>, zmniejszenie stężenia estrogenu u kobiet po menopauzie<sup>72</sup> oraz interwencje terapeutyczne. Wazodylatacyjną odpowiedź naczyń mogą także zmniejszać infekcje<sup>73</sup> i wzrost stężenia CRP<sup>74</sup>. W środowisku zapalnym śródbłonek zwiększa produkcję substancji o działaniu naczynioskurczowym, prozakrzepowym i prozapalnym, kosztem czynników o działaniu przeciwnym<sup>2</sup>. Taka zmiana określana jest często mianem dysfunkcji śródbłonka i stanowi zasadniczy etap rozwoju miażdżycy. Wyprzedza rozwój zmian strukturalnych w ścianie naczynia, przyczynia się do rozwoju blaszek miażdżycowych oraz powikłań związanych z ich obecnością<sup>2</sup>.

#### **1.14 Dysfunkcja śródbłonka a czynniki ryzyka miażdżycy**

Mimo dobrze udokumentowanego związku między czynnikami ryzyka, a występowaniem zdarzeń sercowo-naczyniowych, wciąż nie jest dokładnie poznany patomechanizm. Wydaje się, że ze względu na swoje położenie i funkcję, komórki śródbłonka mogą stanowić ten łączący, najważniejszy element między czynnikami ryzyka, a efektem naczyniowym. Zdecydowana większość czynników ryzyka prowadzących do rozwoju miażdżycy jest związana z dysfunkcją śródbłonka. Modyfikacja czynników ryzyka sercowo-naczyniowego powoduje poprawę funkcji śródbłonka, co znajduje odzwierciedlenie we wzroście wydzielania tlenu azotu. Większą śródbłonkową rozszerzalność naczyń obserwowano po zmniejszeniu stężenia cholesterolu<sup>75</sup>, poprawie kontroli ciśnienia tętniczego<sup>64</sup> lub cukrzycy<sup>76</sup>, zaprzestaniu palenia papierosów<sup>77</sup>. Metoda oceny rozszerzalności tętnicy ramiennej znalazła także zastosowanie do oceny wpływu leków na funkcję śródbłonka<sup>78</sup>. U pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, poprawa wazodylatacji, była obserwowana po długotrwałej terapii hipotensyjnej niezależnie od stosowanych leków i wskazuje na korzystny wpływ leczenia normalizującego ciśnienie tętnicze na funkcję śródbłonka<sup>79</sup>.

#### **1.15 Dysfunkcja śródbłonka a miażdżycyca**

W 1986r. Ludmer i współpracownicy opublikowali wyniki swoich obserwacji dotyczących funkcji śródbłonka, ocenianej przez angiograficzną analizę rozszerzalności tętnicy wieńcowej po podaniu do niej acetylocholinyl<sup>80</sup>. Acetylocholina powodowała zwiększenie średnicy badanej tętnicy wieńcowej u osób bez zmian miażdżycowych, a zwężenie lub nawet zamknięcie światła naczynia u pacjentów z blaszkami miażdżycowymi<sup>80</sup>. Badacze zaobserwowali paradoksalnie większą konstrykcję u pacjentów ze średnio nasilonymi zmianami w tętnicach wieńcowych w porównaniu do tych z zawnosowaną postacią choroby,

co świadczy o tym, że dysfunkcja śródbłónka jest obecna już w przedklinicznym stadium miażdżycy<sup>80</sup>. Celermajer wykazał wysoką korelację dysfunkcji śródbłónka ocenianej za pomocą FMD u pacjentów z czynnikami ryzyka miażdżycy, ale bez zmian w tętnicach wieńcowych, co potwierdza tezę, że zaburzona funkcja śródbłónka leży u podłoża miażdżycy i jest związana z czynnikami ryzyka<sup>70</sup>. Dysfunkcja śródbłónka jest bardziej zaznaczona u chorych z angiograficznie potwierdzoną chorobą wieńcową w porównaniu do pacjentów z podobnym nasileniem czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, ale bez zmian w naczyniach wieńcowych<sup>81</sup>. Sugeruje to, iż dysfunkcja śródbłónka związana jest nie tylko z czynnikami ryzyka, ale także z obecnością i być może nasileniem choroby wieńcowej, lub innymi do tej pory niezdefiniowanymi czynnikami. Zmniejszona śródbłónkowozależna rozszerzalność tętnic obciąża rokowanie u pacjentów z bólem w klatce piersiowej i zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań sercowych. W trakcie rocznego okresu obserwacji grupy 73 chorych, zawał serca, zabiegi przezskórnej wewnątrznaczyniowej angioplastyki wieńcowej i pomostowania tętnic wieńcowych były częstsze u pacjentów z zaburzoną śródbłónkowozależną rozszerzalnością naczyń niż u pacjentów z prawidłową rozszerzalnością tętnicy ramiennej (odpowiednio 23/46 i 4/27,  $p < 0.002$ )<sup>82</sup>. Być może, dysfunkcja śródbłónka powinna być rozważana jako czynnik ryzyka w przewidywaniu zdarzeń sercowych<sup>19</sup>.

### **1.16 Dysfunkcja śródbłónka a żylna choroba zakrzepowo-zatorowa**

Dotychczas, ukazała się jedna publikacja opisująca funkcję śródbłónka u pacjentów z ŻChZZ. Migliacci i wsp. wykazali, że dysfunkcja śródbłónka, oceniana jako rozszerzalność tętnicy ramiennej występuje częściej u pacjentów z idiopatyczną zatorowością płucną w porównaniu z chorymi po przebytej ŻChZZ związanej z przemijającymi czynnikami ryzyka<sup>20</sup>.

### **1.17 Ocena funkcji śródbłónka**

Aktualnie dysponujemy biochemicznymi i fizycznymi metodami umożliwiającymi ocenę czynności śródbłónka. Do szerokiego spektrum markerów biochemicznych należą markery aktywacji prozakrzepowej śródbłónka (np. czynnik von Willebranda), wskaźniki aktywacji odpowiedzi zapalnej śródbłónka: np. cząsteczki adhezyjne: sICAM (ang. soluble intercellular adhesion molecule), sVCAM (ang. soluble vascular cell adhesion molecule) oraz markery ogólnoustrojowego procesu zapalnego (np. białko C-reaktywne, interleukiny 6 i 18)<sup>2</sup>. Biodostępność tlenu azotu, stężenie czynnika von Willebranda lub cząstek adhezyjnych koreluje z występowaniem czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych<sup>83</sup>. Wśród metod fizycznych, uznaną metodą oceny funkcji śródbłónka jest określenie stopnia rozszerzenia tętnicy ramiennej po uprzedniej okluzji mankietem manometru tętnic przedramienia lub



proksymalnej części ramienia. Stosuje się również techniki, które mogą pośrednio świadczyć o funkcji śródbłonka jak ocena sztywności naczyń<sup>84</sup> czy grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej. Dodatkowe informacje dotyczące histologii ściany naczynia można także uzyskać wykonując wewnątrznacyniową ultrasonografię aorty (IVUS)<sup>85</sup>. Najnowsza metoda oceniająca czynność śródbłonka to tonometria tętnic obwodowych w warunkach reaktywnego przekrwienia<sup>86</sup>.

### **1.17.1 Inwazyjna ocena funkcji śródbłonka**

Angiograficzna ocena rozszerzalności tętnicy wieńcowej po podaniu acetylocholino pozostaje nadal 'złotym standardem' oceny śródbłonka<sup>80</sup>, choć jej inwazyjny charakter powoduje, że jest mało przydatna w codziennej praktyce, zwłaszcza w ocenie funkcji śródbłonka u bezobjawowych osób.

### **1.17.2 Ultrasonograficzna ocena śródbłonka**

W ostatnich latach donoszono o wielu różnych nieinwazyjnych metodach oceny funkcji śródbłonka, wśród, których do najbardziej uznanych należy ultrasonograficzna ocena rozszerzalności naczyń pod wpływem zwiększonego przepływu (FMD). Jest to metoda nieinwazyjna i powtarzalna<sup>87</sup>, która pozwala obserwować zmiany w naczyniach spowodowane procesem chorobowym, jak też leczeniem. Badanie rozszerzalności tętnicy ramiennej zależnej od śródbłonka zostało po raz pierwszy opisane przez Celermajera i wsp. na łamach czasopisma „The Lancet” w 1992 r<sup>78</sup>. Badacze wykazali wysoką korelację wyników FMD u pacjentów o podwyższonym ryzyku miażdżycy z wynikami badań inwazyjnych oceniających rozszerzalność tętnic wieńcowych, uznawanych za złoty standard w ocenie funkcji śródbłonka<sup>78</sup>. Metoda ta wykorzystuje ultrasonograficzny pomiar zmian średnicy tętnicy ramiennej w odpowiedzi na zwiększony przepływ krwi w wyniku reaktywnego przekrwienia przedramienia. Najpierw oceniana jest śródbłonkowa rozszerzalność tętnicy ramiennej po około 5-minutowym niedokrwieniu przedramienia prowokowanym przez ucisk mankietu napompowanego przynajmniej 50 mmHg powyżej skurczowego ciśnienia tętniczego<sup>88</sup>. Po zwolnieniu ucisku dochodzi do znacznego wzrostu przepływu w przedramieniu i wzrostu sił ścinających, co prowadzi do wzrostu wydzielania tlenu azotu i rozkurczu naczynia<sup>88</sup>. Stopień wazodylatacji jest wprost proporcjonalny do ilości uwolnionego przez śródbłonek tlenu azotu i dzięki temu pozwala szacować funkcję komórek endotelium. Wzrost przepływu i rozszerzalność mierzona w badaniu ultrasonograficznym jest wyrażana jako procent średnicy naczynia w warunkach

podstawowych<sup>88</sup>. Wartości FMD% zależą od badanej grupy, ale również od techniki wykonania badania np. miejsc umieszczenia mankieta. Raportowane są różne punkty odcięcia dla rozpoznania dysfunkcji śródbłonna. Neunteufl i współpracownicy sugerowali, że FMD < 10% świadczy o nieprawidłowej funkcji śródbłonna<sup>81,82</sup>, natomiast Schroeder wykazał, że 4,5% to wartość odcięcia, która sprawdza się w populacji ogólnej<sup>89</sup>. W drugiej części badania ocenia się rozszerzalność tętnicy po podaniu nitrogliceryny (NTG), egzogenego donora tlenu azotu (NO) (NTG-mediated dilation - NMD)<sup>88</sup>. Wydaje się, że ten etap badania nie zależy od komórek śródbłonna i odzwierciedla funkcję mięśni gładkich naczyń. Rozszerzalność tętnicy ramiennej po podaniu NTG, może mieć również znaczenie prognostyczne w przewidywaniu wystąpienia choroby wieńcowej i nagłych zdarzeń sercowo-naczyniowych<sup>90,91</sup>. Dokładny protokół badania został opisany w wytycznych międzynarodowej grupy roboczej<sup>88</sup> (Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery: A Report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force) z 2002 roku i jest szczegółowo przedstawiony w rozdziale dotyczącym metodyki niniejszej pracy.

### **1.17.3 Biomarkery funkcji śródbłonna - ADMA**

Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) jest endogennym, kompetencyjnym inhibitorem syntetazy tlenu azotu (NOS) i jest uznawana za jeden ze wskaźników dysfunkcji śródbłonna<sup>92</sup>. Jako pierwszy jej działanie wykazał *in vivo* i *in vitro* Vallance z zespołem<sup>93</sup>. ADMA i jej strukturalne izomery nieblokujące NOS są uwalniane w czasie przemian komórkowych białek zawierających metylowane cząsteczki argininy<sup>94</sup>. Metylacja argininy jest powszechnym procesem regulowanym przez grupę enzymów nazywanych białkowymi metylotransferazami argininy. ADMA w około 85% jest metabolizowana przez hydrolazę dimetyloarginowo-dimetyloaminiową<sup>94</sup>, której aktywność może zostać zmniejszona przez powszechnie uznane czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego takie jak hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę i hiperhomocysteinemię, co powoduje nagromadzenie ADMA, prowadzące do zaburzeń funkcji śródbłonna<sup>95</sup>. Wykazano, że ADMA pozwala na przewidywanie zdarzeń sercowo-naczyniowych i śmiertelności w badaniach prospektywnych, niezależnie od innych czynników ryzyka<sup>96</sup>. Ponadto jest niezależnym czynnikiem predykcyjnym śmiertelności u pacjentów w stanie krytycznym przebywających w oddziale intensywnej terapii<sup>97</sup>. Problemy w oznaczaniu ADMA są związane z jej niskimi stężeniami w osoczu i trudnością w chromatograficznej separacji dwóch izomerów dimetyloargininy. Obecnie najbardziej rozpowszechnioną metodą oznaczania ADMA jest płynna

chromatografia, jednak, co najmniej równoważną metodą jest ELISA<sup>98</sup>. W jedynym dotychczas opublikowanym badaniu oceniającym stężenia ADMA u chorych z ŻChZZ, nie stwierdzono różnic w stężeniu ADMA pomiędzy 39 pacjentami z ZZG, a 35 chorymi bez cech skrzeplin w badaniu ultrasonograficznym żył kończyn dolnych<sup>99</sup>. Natomiast w pracy oceniającej ADMA u chorych z pierwotnym nadciśnieniem płucnym stwierdzono, że jej wyższe stężenia towarzyszą gorszym warunkom hemodynamicznym krążenia płucnego oraz większemu ryzyku zgonu<sup>100</sup>. Jak dotychczas nie opublikowano badań oceniających ADMA u chorych po przebytej OZP.

#### **1.17.4 Biomarkery funkcji śródbłonka - cząsteczki adhezyjne ICAM-1 i VCAM-1**

Cząsteczki ICAM-1 i VCAM-1 mają budowę molekularną przypominającą immunoglobuliny. Będąc śródbłonkowymi receptorami dla integryn eksponowanych na leukocytach i płytkach krwi, uczestniczą w adhezji krążących leukocytów. Jednak znajdują się nie tylko na komórkach śródbłonka, ale także na komórkach mięśni gładkich i monocytach. Ekspresja ICAM-1 i VCAM-1 zwiększa się w odpowiedzi na cytokiny zapalne lub utlenowane LDL. Ich stężenia we krwi są niższe u dzieci w wieku 4-17 lat, jednak w późniejszym wieku pozostają na stałym poziomie<sup>101</sup>. Nie obserwowano także różnic u kobiet w zależności od fazy cyklu menstruacyjnego<sup>101</sup>. W badaniach patofizjologicznych stwierdzano obecność ICAM-1 i VCAM-1 w blaszkach miażdżycowych<sup>102</sup> i w komórkach śródbłonka myszy i królików z hipercholesterolemią<sup>103</sup>. W większości badań oznaczano także wysokie stężenia tych cząsteczek u osób z stabilną jak i niestabilną chorobą wieńcową<sup>104,105,106</sup>. Ponadto wykazywano, że stężenie sICAM-1 pozwala na przewidywanie wystąpienia zawału serca u zdrowych osób<sup>107</sup>. Najwyższe ryzyko stwierdzano w grupie, w której stężenie tej molekuly przekraczało 260 ng/ml (RR1,6; 95%CI: 1,1–2,4)<sup>107</sup>. Co ciekawe ten związek pozostawał istotny po uwzględnieniu palenia papierosów i innych czynników ryzyka<sup>107</sup>. W jedynym, dotychczas opublikowanym badaniu oceniającym stężenie sVCAM-1 u chorych z ŻChZZ, wykazano, że po ukończeniu 6-miesięcznego leczenia przeciwzakrzepowego, wyższe stężenia tego markera występują u chorych z nawrotem ZZG lub/i OZP (mediana 1115 (IQR: 1190) ng/ml (n=36) vs. 830 (IQR: 590) ng/ml (n=90), p<0.01)<sup>108</sup>. Jak dotąd cząsteczka ICAM-1 nie była badana u chorych z ŻChZZ. Zarówno sICAM-1 jak i sVCAM-1 można oznaczać w osoczu krwi metodą ELISA.

#### **1.17.5 Biomarkery funkcji śródbłonka - selektyna E**

Selektyna E jest swoiście eksponowana na powierzchni pobudzonych komórek śródbłonka<sup>109</sup> i pośredniczy w adhezji neutrofilów do aktywowanych komórek śródbłonka, przy czym

głównie odpowiada za przejście z etapu „toczenia” się do etapu ścisłej adhezji. Jest nieobecna na niestymulowanych mediatorami zapalnymi komórkach śródbłonna<sup>110</sup>. Krążąca we krwi forma rozpuszczalnej selektyny E może być uwalniana przez uszkodzenia wywołane enzymami lub może wyciekać z uszkodzonych albo aktywowanych komórek śródbłonna<sup>111</sup>. Obecnie coraz częściej wskazuje się na rolę selektyny E w chorobach sercowo-naczyniowych<sup>112</sup>. Zarówno selektyna E, jak i ICAM-1 są czułymi markerami dysfunkcji śródbłonna, a związek między ich stężeniami, a występowaniem miażdżycy był już raportowany we wcześniejszych badaniach<sup>113</sup>. Jest to zgodne z obserwacjami Hwang i współautorów<sup>114</sup>, którzy opisali istotną zależność między krążącą selektyną E, a występowaniem blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych<sup>114</sup>. Rozpuszczalna selektyna E jest specyficznym markerem śródbłonna, którego wzrost obserwowany jest przede wszystkim w chorobie wieńcowej<sup>115,116</sup> i cukrzycy<sup>117</sup>. Podwyższone poziomy tej molekuly występują także u chorych z nadciśnieniem tętniczym<sup>118</sup> i nałogowych palaczy<sup>119</sup>. Jak dotąd nie ma doniesień o znaczeniu selektyny E u pacjentów z ŻChZZ. Jedyna, opublikowana dotychczas praca wskazuje, że homozygotyczny polimorfizm pojedynczego nukleotydu Ser128Arg w genie selektyny E może być związany ze zwiększonym ryzykiem nawrotu ŻChZZ<sup>120</sup>. Rozpuszczalną selektynę E można oznaczać czułą metodą ELISA w osoczu krwi jak również w środowisku kultur komórkowych.

#### **1.17.6 Tonometria tętnic obwodowych w warunkach reaktywnego przekrwienia**

Funkcję komórek endotelium można także oceniać przez tonometrię tętnic obwodowych w warunkach reaktywnego przekrwienia (ang. Reactive Hyperemia Peripheral Arterial Tonometry, RH-PAT). Do tej pory opublikowane zostało jedno badanie, opisujące związek między ŻChZZ, a dysfunkcją śródbłonna ocenianą na podstawie RH-PAT, u pacjentów przed planowanym zabiegiem ortopedycznym. Istotnie częściej dochodziło do wystąpienia ZZG u pacjentów z obniżonym wskaźnikiem reaktywnego przekrwienia. Istotnym ograniczeniem wykorzystania tej metody jest wysoki koszt jednorazowych czujników<sup>121</sup>.

## II. HIPOTEZY I CELE NAUKOWE PRACY

W obecnej pracy wysunięto następujące hipotezy badawcze:

1. Czynność śródbłonna u chorych z ŻChZZ można oceniać wykorzystując stężenia biomarkerów funkcji śródbłonna oraz za pomocą ultrasonograficznej rozszerzalności tętnicy ramiennej indukowanej zwiększonym przepływem.
2. Dysfunkcja śródbłonna występuje częściej u pacjentów z ŻChZZ.
3. Dysfunkcja śródbłonna może być związana z częstszymi nawrotami ŻChZZ.

W celu potwierdzenia powyższych hipotez u pacjentów z ŻChZZ i w dobranej grupie kontrolnej zaplanowano i wykonano:

1. Ocenę występowania uznanych i typowych czynników ryzyka wpływających na czynność śródbłonna u chorych z ŻChZZ
2. Ocenę częstości występowania dysfunkcji śródbłonna u chorych z ŻChZZ przy zastosowaniu ultrasonograficznej oceny rozszerzalności tętnicy ramiennej pod wpływem zwiększonego przepływu
3. Ocenę stężenia biomarkerów czynności śródbłonna: ADMA, sICAM-1, sVCAM-1, selektyna E u chorych z ŻChZZ
4. Ocenę wartości predykcyjnej wskaźników funkcji śródbłonna w przewidywaniu ryzyka nawrotu ŻChZZ i konieczności przedłużonego leczenia przeciwkrzepliwego.

### **III. METODYKA BADAŃ**

#### **3.1 Grupa badana**

Do pracy włączano pacjentów po przebytej OZP oraz osoby z grupy kontrolnej dobrane pod względem parametrów demograficznych, oraz chorób współistniejących, ich zaawansowania i sposobu leczenia, w stosunku do osób z ŻChZZ.

#### **Kryteria włączenia:**

- potwierdzona OZP przebyta od 6 do 12 miesięcy przed badaniem
- świadoma zgoda chorego
- wiek  $\geq 18$  r.ż. i  $\leq 50$  r.ż.

#### **Kryteria diagnostyczne ostrej zatorowości płucnej:**

1. Zatorowość płucna rozpoznawana na podstawie spiralnej tomografii komputerowej przy uwidocznieniu skrzeplin przynajmniej w segmentalnych tętnicach płucnych.
2. Zatorowość płucna rozpoznawana na podstawie scyntygrafii perfuzyjnej przy uwidocznieniu ubytków perfuzji wysokiego prawdopodobieństwa zgodnie z kryteriami PIOPED i typowych objawów klinicznych

#### **Kryteria rozpoznania sprowokowanej ostrej zatorowości płucnej:**

Sprowokowaną OZP rozpoznawano przy współwystępowaniu takich czynników predysponujących jak: uraz, operacja, unieruchomienie ( $> 3$  dni), ciąża, połów, hormonalna terapia antykoncepcyjna lub zastępcza, trombofilia.

#### **Kryteria rozpoznania niesprowokowanej ostrej zatorowości płucnej:**

Rozpoznanie niesprowokowanej OZP stawiano wobec braku jakiegokolwiek z wyżej wymienionych czynników ryzyka.

#### **Kryteria wyłączenia:**

- nadciśnienie tętnicze II lub III stopnia wg ESC
- miażdżyca: choroba wieńcowa, miażdżyca tętnic szyjnych, miażdżyca kończyn dolnych, przebyty udar niedokrwieny
- upośledzenie czynności skurczowej lewej komory, frakcja wyrzutowa  $< 50\%$
- istotne wady zastawkowe
- migotanie przedsionków

- implantowany układ stymulujący serce
- przewlekła choroba nerek stadium  $\geq$  III; eGFR  $<$  60ml/min/1,73m<sup>2</sup>
- cukrzyca rozpoznana na podstawie wywiadu, bądź rozpoznana de novo na podstawie badań laboratoryjnych
- aktywna choroba układowa
- aktywna choroba nowotworowa
- przewlekła obturacyjna choroba płuc według kryteriów GOLD (FEV1%FVC  $<$  0,7 (70%) i FEV1  $<$ 80%)

### **Leczenie**

Chorzy byli leczeni zgodnie z obowiązującymi wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego<sup>1,4</sup> i zostali poddani ocenie śródbłonna, po co najmniej 6 miesiącach od epizodu OZP. W czasie badania większość pacjentów nie stosowała już leczenia antykoagulacyjnego. Przyjmowane leki były rejestrowane, a ich wpływ został uwzględniony w analizie statystycznej.

### **Kryteria rozpoznania chorób współistniejących:**

Cukrzyca, nieprawidłowa glikemia na czczo i nietolerancja glukozy była rozpoznawana na podstawie pomiaru stężenia glukozy we krwi na czczo i po spożyciu 75 g glukozy doustnie, zgodnie z „Zaleceniami klinicznymi dotyczącymi postępowania u chorych na cukrzycę z 2007 roku” (zalecenia w opisywanym zakresie utrzymano w „Zaleceniach klinicznych dotyczących postępowania u chorych na cukrzycę z 2011 roku”)<sup>122</sup>.

Pacjenci z wcześniej rozpoznawaną i leczoną cukrzycą lub cukrzycą świeżo rozpoznaną byli wyłączeni z badania.

Nadciśnienie tętnicze rozpoznawano na podstawie przynajmniej dwóch pomiarów w spoczynku zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. U pacjentów z wcześniej rozpoznawanym i leczonym nadciśnieniem tętniczym rozpoznanie było stawiane na podstawie wywiadu.

Wydolność nerek była oceniana na podstawie szacowanego według wzoru Cockcrofta-Gault'a współczynnika filtracji kłębuszkowej (eGFR):  $(140 - \text{wiek}) \times \text{masa ciała w kilogramach} \times 0,85$  dla kobiet /  $72 \times \text{stężenie kreatyniny w surowicy w mg/dl}$ .

Hipercholesterolemia była rozpoznawana, gdy stwierdzono stężenie cholesterolu LDL > 3,0 mmol/l (115 mg/dl) lub stężenie cholesterolu całkowitego > 5,0 mmol/l (190 mg/dl), a także wtedy, gdy stosowane były leki hipolipemizujące (statyny lub fibraty).

Za palaczy papierosów uznawano osoby, które aktywnie paliły papierosy.

Za dodatni wywiad rodzinny w kierunku choroby wieńcowej uznawano rozpoznanie choroby wieńcowej u osób I stopnia pokrewieństwa (rodzice, rodzeństwo) w stosunku do włączonych do badania.

### **Wybór grupy kontrolnej**

Pacjenci z grupy kontrolnej zostali dobrani do grupy badanej pod względem płci i wieku oraz częstości występowania czynników ryzyka miażdżycy takich jak nadciśnienie tętnicze czy wywiad palenia tytoniu.

### **3.2 Protokół badania**

U wszystkich osób z grupy badanej i grupy kontrolnej wykonano następujące badania:

- badanie podmiotowe i przedmiotowe
- badania laboratoryjne i ocena biomarkerów funkcji śródbłonna:
  - Oznaczanie stężenia ADMA
  - Oznaczanie stężenia ICAM-1
  - Oznaczanie stężenia VCAM-1
  - Oznaczanie E-selektyny
- badanie elektrokardiograficzne
- badanie echokardiograficzne
- ultrasonograficzna ocena rozszerzalności tętnicy ramiennej pod wpływem zwiększonego przepływu i po podaniu nitrogliceryny

Po ocenie śródbłonna pacjenci pozostawali pod opieką Poradni Przyklinicznej. Pacjenci po przebytej niesprowokowanej OZP zostali również skierowani do Poradni Zaburzeń Hemostazy Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie celem diagnostyki w kierunku trombofilii.

Analizowanymi punktami końcowymi był nawrót OZP lub/i ZZG i PZZNP.



### **3.3 Badanie przedmiotowe i podmiotowe**

U wszystkich osób włączonych do badania przeprowadzona została dokładna ocena kliniczna, z pomiarem wzrostu, masy ciała, częstości serca, systemowego ciśnienia tętniczego sfigmomanometrem rtęciowym oraz przeprowadzono wywiad w kierunku palenia papierosów, rodzinnego występowania choroby wieńcowej oraz współwystępowania innych chorób m.in: hiperlipidemii, nadciśnienia tętniczego, cukrzycy i niewydolności nerek.

### **3.4 Badania laboratoryjne**

W czasie wizyty pobierano krew z żyły odłokciowej w celu oznaczenia: morfologii krwi, lipidogramu, stężenia glukozy, kreatyniny, CRP oraz aktywności transaminazy alaninowej i asparaginianowej przy użyciu rutynowych metod laboratoryjnych. Ponadto oznaczano stężenie NT-proBNP (Elecsys 2010 immunoassay; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) i d-dimeru (VIDAS D-Dimer Exclusion, bioMerieux, France).

U wszystkich pacjentów zostały wykonane zgodnie z założonym harmonogramem następujące badania laboratoryjne po pobraniu na czczo krwi z żyły odłokciowej, a następnie po przechowywaniu odwirowanej surowicy w temperaturze  $-75^{\circ}\text{C}$  do momentu wykonywania oznaczeń:

- sICAM-1: Human sICAM-1 (ELISA Kit), producent Biovendor
- sVCAM-1: Human sVCAM-1(ELISA Kit), producent Biovendor
- selektyna E: Human CD62E - E Selectin(ELISA Kit), producent Diaclone
- ADMA: ADMA (Xpress ELISA), producent Immunodiagnostik AG

#### **3.4.1 Oznaczanie asymetrycznej dimetyloargininy**

Krew do oznaczeń asymetrycznej dimetyloargininy była pobierana na EDTA, wirowana, a otrzymane osocze mrożone i przechowywane w temperaturze  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń. Oznaczenie stężenia asymetrycznej dimetyloargininy było wykonywane w osoczu metodą ELISA: ADMA (Xpress ELISA), producent Immunodiagnostik AG. W populacji osób zdrowych (n=70) średnie stężenie ADMA wynosiło  $0,45 \mu\text{mol/l}$ , z odchyleniem standardowym  $0,095 \mu\text{mol/l}$ , współczynnik zmienności (coefficient of variation - CV) 5,8%, nie obserwowano interferencji i reakcji krzyżowych z licznymi badanymi czynnikami.

#### **3.4.2 Oznaczanie sVCAM-1 i sICAM-1**

Krew do oznaczeń sVCAM-1 i sICAM-1 była pobierana na EDTA, wirowana, a otrzymane osocze mrożone i przechowywane w temperaturze  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ . Stężenia były oznaczane

dostępnym komercyjnie testem ELISA: Human sICAM-1 (ELISA Kit), producent Biovendor, Human sVCAM-1(ELISA Kit), producent Biovendor. Najniższe wykrywane stężenie sICAM-1 < 0,1 ng/ml, sVCAM-1 0,6 ng/ml; nie obserwowano interferencji i reakcji krzyżowych z licznymi badanymi czynnikami.

### **3.4.3 Oznaczenie rozpuszczalnej selektyny E (CD62E)**

Krew do oznaczeń selektyn E była pobierana na skrzep, a otrzymana surowica mrożona i przechowywana w temperaturze  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ . Stężenia były oznaczane dostępnym komercyjnie testem ELISA: Human CD62E - E Selectin(ELISA Kit), producent Diaclone. Najniższe wykrywane stężenie 0,5 ng/ml; nie obserwowano interferencji i reakcji krzyżowych z licznymi badanymi czynnikami.

Wskazane powyżej badania immunoenzymatyczne wykonane zostały w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

### **3.5 Protokół badania elektrokardiograficznego**

U wszystkich osób włączonych do badania zostało wykonane spoczynkowe, 12-odprowadzeniowe badanie elektrokardiograficzne aparatem „Voyager” Del Mar Reynolds Medical Ltd. Zapis został zarejestrowany na papierze milimetrowym przy przesuwie 50 mm/s i wzmocnieniu sygnału elektrycznego 1mV/mm. Wynik badania uwzględniał m.in. częstość i rodzaj rytmu serca, ocenę osi elektrycznej, występowanie cech przebytego bądź świeżego niedokrwienia, występowanie zaburzeń rytmu.

### **3.6 Protokół przezklatkowego badania echokardiograficznego**

U wszystkich włączonych osób wykonano badanie echokardiograficzne zgodnie ze standardami Sekcji Echokardiografii Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego w Pracowni Echokardiografii Kliniki Chorób Wewnętrznych i Kardiologii z Centrum Diagnostyki i Leczenia Żylnej Choroby Zakrzepowo-Zatorowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego przy użyciu aparatu Philips iE 33 (Diagnostic Ultrasound system, Inc. Bothell, WA, USA) głowicą o częstotliwości 2,5-3,5 MHz. Wszystkie badania zostały wykonane przez doświadczonego echokardiografistę. Oceniana była całość obrazu echokardiograficznego, a na potrzeby badania analizowano: frakcję wyrzutową lewej komory [iloraz (różnicy objętości końcoworozkurczowej i końcowoskurczowej) oraz objętości końcoworozkurczowej], funkcję skurczową prawej komory przedstawianą parametrycznie za pomocą maksymalnego skurczowego wychylenia bocznej części pierścienia trójdzielnego (TAPSE ang. tricuspid

annular peak systolic excursion) oraz maksymalną prędkość fali wstecznej trójdzielnej, wyliczenie maksymalnego gradientu skurczowego pomiędzy prawą komorą, a prawym przedsionkiem (TRPG ang. tricuspid regurgitation peak gradient) na podstawie uproszczonego równania Bernoulliego ( $PG=4V^2$ ).

### **3.7 Protokół oceny wazodylatacji tętnicy ramiennej indukowanej zwiększonym przepływem oraz po podaniu nitrogliceryny**

Nieinwazyjne badanie rozszerzalności tętnicy ramiennej oceniano przy użyciu aparatu ultrasonograficznego zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Grupy Roboczej do spraw Reaktywności Tętnicy Ramiennej „Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force”<sup>88</sup>. FMD oraz NMD zostało wykonane u wszystkich pacjentów na czczo, po 12 godzinach odpoczynku oraz wstrzymaniu się od palenia papierosów i przyjęcia jakichkolwiek leków. Badanie było wykonywane w cichym pomieszczeniu o stałej temperaturze zapewniającej komfort cieplny. Osoby poddane badaniu miały założone elektrody do monitorowania EKG. Badanie składało się z dwóch części. W pierwszej części badania była oceniana rozszerzalność tętnicy ramiennej pod wpływem zwiększonego przepływu (FMD). Pomiar średnicy naczynia wykonywano w dystalnej części tętnicy, powyżej zgięcia łokciowego, w projekcji podłużnej, przy zastosowaniu liniowej głowicy o wysokiej częstotliwości 5,0 - 7,0 MHz zapewniającej odpowiednio dużą rozdzielczość aparatem ultrasonograficznym Philips HD11XE (Bothell, WA, USA). Na początku dokonywano pomiaru średnicy tętnicy ramiennej w warunkach podstawowych na szczycie załamka T w EKG. Bodźcem powodującym wzrost przepływu było niedokrwienie wywołane przez 5-minutowy ucisk mankieta założonego na przedramię 3-4 cm poniżej zgięcia łokciowego. Celem wywołania niedokrwienia, mankieta ciśnieniomierza na przedramieniu wypełniano do wartości około 200 mmHg (przynajmniej 50 mmHg wyższej od ciśnienia skurczowego). Pomiar średnicy tętnicy ramiennej wykonywano po deflacji mankieta, między 30 sekundą, a 5 minutą (po 30s, 60s, 90s, 120s, 150s, 180s, 210s, 240s, 270s, 300s), na szczycie załamka T w EKG, (každorazowo na podstawie średniej z 3 pomiarów). Wynik przedstawiano jako % przyrostu średnicy tętnicy ramiennej wg wzoru  $FMD (\%) = (\text{średnica tętnicy ramiennej po } X \text{ minut od wywołania niedokrwienia} - \text{średnica tętnicy ramiennej przed niedokrwieniem}) / (\text{średnica tętnicy ramiennej przed niedokrwieniem}) \times 100\%$ . Pomiar średnicy tętnicy ramiennej wykonywano w 1/3 jej części dystalnej (średnia z 3 pomiarów). Wartość  $FMD < 4,5 \%$  uznano za granicę rozpoznania dysfunkcji śródbłónka<sup>89</sup>.

W drugiej części badania oceniano rozszerzalność tętnicy ramiennej po zastosowaniu podjęzykowo krótko działających azotanów (NMD). Po przynajmniej 15 minutach od zakończenia przekrwienia biernego, dokonywano pomiaru średnicy tętnicy ramiennej w warunkach podstawowych na szczycie załamka T w EKG, następnie pacjent otrzymywał podjęzykowo 1 dawkę 0,4 mg nitrogliceryny (aerozol, Nitromint). Pomiar średnicy wykonywano pomiędzy 1, a 5 minutą po podaniu leku (po 60s, 90s, 120s, 150s, 180s, 210s, 240s, 270s, 300 s od podania nitrogliceryny) na szczycie załamka T w EKG. Wszystkie pomiary były wykonywane trzykrotnie, za rezultat była uznawana średnia z 3 pomiarów. Wynik przedstawiono jako % przyrostu średnicy tętnicy ramiennej wg wzoru  $NMD (\%) = (\text{średnica tętnicy ramiennej po } X \text{ minut od podania nitrogliceryny} - \text{średnica tętnicy ramiennej przed podaniem nitrogliceryny}) / (\text{średnica tętnicy ramiennej przed podaniem nitrogliceryny}) \times 100\%$ .

Ocena zmienności FMD i NMD między 3 badaczami z naszej Kliniki została przeprowadzona przed przystąpieniem do prezentowanego badania. Zmienność między badaczami wyniosła średnio 0,04 mm. Współczynniki korelacji dla FMD i NMD, w ocenie między badaczami (interobserver) i między kolejnymi badaniami wykonywanymi przez tego samego badacza (intraobserver), były w zakresie 0,92-0,97. Natomiast zmienność wyników badań u pacjentów (inpatient) przeprowadzanych w odstępie 6 miesięcy była poniżej 6,6%, mediana 1,4% (zakres 0,5-6,6%).

### **3.8 Obserwacja po badaniu czynności śródbłonka**

Wszystkie osoby włączone do badania pozostawały po ocenie śródbłonka pod opieką Poradni Przyklinicznej, w której były konsultowane przynajmniej raz na 6 miesięcy. Minimalny czas obserwacji wynosił 12 miesięcy, zaś maksymalny 72 miesiące. W czasie każdej wizyty w Poradni wykonywano badanie podmiotowe i przedmiotowe. W razie podejrzenia nawrotu ŻChZZ konsultowano pacjentów w trybie pilnym. W takich okolicznościach prowadzono diagnostykę ŻChZZ zgodnie z zaleceniami<sup>1,4</sup>. Pacjenci zostali również skierowani do Poradni Zaburzeń Hemostazy w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie celem wykonania badań w kierunku trombofilii. Pacjenci, u których stwierdzono trombofilię zostali reklasyfikowani do grupy sprowokowanej OZP.

#### **Kryteria rozpoznania nawrotu**

Nawrót ŻChZZ rozpoznawano, gdy wystąpił kolejny epizod OZP lub/i ZZG.

### **Kryteria rozpoznania nawrotu OZP**

Warunkiem rozpoznania nawrotu OZP było stwierdzenie nowego, co najmniej segmentalnego ubytku zakontrastowania w badaniu tomografii komputerowej według protokołu oceny zatorowości płucnej, lub nowego ubytku perfuzji w badaniu scyntygraficznym.

### **Kryteria rozpoznania nawrotu ZZG:**

Nawrót ZZG rozpoznawano, gdy stwierdzono skrzepliny w innej niż poprzednio kończynie, lub gdy opisywano zakrzepicę innej żyły głębokiej lub gdy stwierdzono istotne (>5cm) powiększenie się uprzednio stwierdzonej skrzepliny w kierunku proksymalnym.

### **Kryteria rozpoznania PZZNP**

Rozpoznanie PZZNP ustalano, zgodnie z obowiązującymi zaleceniami<sup>123</sup>, na podstawie obecności przedwłośniczkowego nadciśnienia płucnego (średnie ciśnienie w tętnicy płucnej  $\geq$  25 mmHg, ciśnienie zaklinowania  $\leq$  15 mmHg, opór płucny  $>$  2 j. Wooda) u chorych z licznymi, przewlekłymi, zorganizowanymi zawężającymi skrzeplinami, zatorami w sprężystych tętnicach płucnych (pień, prawa, lewa, płatowe, segmentalne, subsegmentalne) po przynajmniej trzech miesiącach leczenia przeciwkrzepliwego.

#### **IV. ANALIZA STATYSTYCZNA:**

Częstość występowania zaburzeń funkcji śródbłonka u pacjentów z ŻChZZ jest nieznana. Z tego powodu liczebność grupy badanej oszacowano analogicznie do prac dotyczących oceny funkcji śródbłonka u pacjentów z miażdżycą. Wyliczenie liczebności, np. na podstawie nomogramu Altmana czy wzoru Lehr'a, było niemożliwe, ponieważ dotychczas nie ma dostępnych publikacji dotyczących dysfunkcji śródbłonka u chorych z ŻChZZ poniżej 50 roku życia. Wielkość grupy badanej została oszacowana na podstawie średniej liczby pacjentów spełniających kryteria włączenia, którzy w ostatnim okresie byli leczeni w Klinice. Przedstawiając statystyki opisowe zostały podane: wartości średnie, odchylenia standardowe, mediany i zakresy. Dla charakterystyki badanych grup została wykonana opisowa analiza statystyczna. Wartości parametrów ciągłych, cechujących się rozkładem normalnym, oceniano testem Shapiro Wilka i przedstawiono, jako średnia arytmetyczna z jednym odchyleniem standardowym. Parametry ciągłe bez takiego rozkładu przedstawiono, jako mediana z zakresem wartości. Porównano częstości występowania czynników ryzyka pomiędzy chorymi z niesprowokowaną, a związaną z przemijającymi czynnikami ryzyka ŻChZZ oraz grupą kontrolną. Istotność różnicy średnich dwóch parametrów cechujących się rozkładem normalnym oceniona została testem t-Studenta. W przypadku cech bez takiego rozkładu do oceny wykorzystano test Wilcoxon. Do oceny różnic pomiędzy większą liczbą grup zastosowano test Kruskal-Wallisa. Analizując zmiany parametrów ilościowych w trakcie obserwacji wykorzystano test Wilcoxon dla prób powiązanych (ang. Wilcoxon Signed-Rank Test). Dokładny test Fishera lub test Chi<sup>2</sup> były używane do oceny różnic częstości występowania cech jakościowych. Analizując korelacje dla zmiennych ilościowych były używane współczynniki Spearmana. Do oceny wartości predykcyjnej wybranych parametrów użyto krzywych typu ROC. Jako miary „siły dyskryminacyjnej” przy selekcji modeli zastosowano współczynnika AIC (Akaike's Information Criterion) oraz statystyk opartych na krzywych ROC – pola pod krzywymi (AUC). Liczebność poszczególnych grup na podstawie wyznaczonych punktów odcięcia przedstawiono na diagramie. Czas do nawrotu ŻChZZ przedstawiono przy użyciu krzywych Kaplana-Meiera, natomiast ryzyko wystąpienia nawrotu wyliczono jako hazard risk (HR) w analizie jedno- i wieloczynnikowej. Analiza ilorazu szans (odds ratio) oraz wieloczynnikowa analiza regresji krokowej została zastosowana do oceny związku zarówno parametrów jakościowych, jak i ilościowych z czynnością śródbłonka u chorych z ŻChZZ. Za poziom istotny statystycznie została przyjęta wartość  $p < 0.05$ . Obliczenia wykonano przy użyciu pakietu Statistica.

## **V. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ**

Protokół badania został zaakceptowany w dniu 31 marca 2008r. i następnie 12 sierpnia 2014r. przez Komisję Bioetyczną przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w Warszawie (KB 89/2008 i 170/2014). Kopie zgód Komisji Bioetycznej umieszczono na końcu pracy.

## VI. WYNIKI

### 6.1 Charakterystyka pacjentów

Do badania włączono 82 pacjentów (38 kobiet, 44 mężczyzn) w średnim wieku  $38 \pm 11$  lat. Osoby zakwalifikowane do badania przebyły ostrą zatorowość płucną średnio  $1,1 \pm 0,7$  roku przed oceną czynności śródbłonna. U 43 pacjentów rozpoznano niesprovokowaną zatorowość płucną, podczas, gdy u 39 określono czynnik prowokujący (Tabela 1).

Tabela 1. Czynniki prowokujące ŻChZZ w badanej grupie.

Czynnik prowokujący	pacjenci po sprowokowanej OZP n=39
wyłącznie unieruchomienie	4
unieruchomienie+uraz	10
unieruchomienie+uraz+operacja	4
unieruchomienie+operacja	6
doustna antykoncepcja hormonalna	12
Połów	1
Trombofilia	7

Jako grupę kontrolną wybrano 30 osób (15 kobiet i 15 mężczyzn) dobranych pod względem wieku i płci oraz czynników ryzyka dysfunkcji śródbłonna. Średni wiek osób z grupy kontrolnej był taki jak grupy badanej:  $38 \pm 12$  lat (Tabela 2).

### 6.2 Ocena czynników ryzyka dysfunkcji śródbłonna

Pięć (17%) osób w grupie kontrolnej i 13 (16%) w grupie badanej miało rozpoznane i leczone nadciśnienie tętnicze. W obu grupach podobny był odsetek palaczy papierosów (27%(8/30) vs. 20%(16/82)) oraz osób z wywiadem rodzinnym występowania choroby wieńcowej (23% (7/30) vs. 27%( 22/82)). Pacjenci z wywiadem OZP mieli większą masę ciała (BMI 27kg/m<sup>2</sup> vs 24kg/m<sup>2</sup>, p<0.01) niż osoby z grupy badanej. Częstość występowania czynników ryzyka dysfunkcji śródbłonna w poszczególnych grupach przedstawiono w Tabeli 2.



**Tabela 2.** Charakterystyka ogólna grupy badanej i grupy kontrolnej.

parametr	grupa kontrolna n = 30	pacjenci po OZP n = 82	p
wiek [lat]	38 ± 12	38 ± 11	0,82
płeć [M/K]	15/15	44/38	0,45
aktywni palacze n %	8 (27%)	16 (20%)	0,28
nadciśnienie tętnicze n %	5 (17%)	13 (16%)	0,56
terapia hipotensyjna n %	5 (17%)	13 (16%)	0,56
skurczowe ciśnienie [mmHg]	116±15	121±13	0,46
rozkurczowe ciśnienie [mmHg]	73±7	78±9	0,13
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	24 (18-35)	27 (16-41)	<0,01

BMI body mass index – wskaźnik masy ciała

### 6.3 Ocena biochemiczna

Średnie stężenie cholesterolu całkowitego nie różniło się istotnie pomiędzy obiema grupami: grupa badana (GB) ( 199 ± 41 vs. grupa kontrolna (GK) 194 ± 37, p=0,58. Nie odnotowano także istotnych różnic we frakcjach cholesterolu, ani stężeniu CRP (GB 2,1mg/l vs. GK 1,8mg/l, p=0,11). Stężenie NT-proBNP nie było istotnie wyższe u pacjentów po OZP: GB 52 pg/ml (7-114) w porównaniu do 20 pg/ml (20-388) w grupie kontrolnej, p = 0,14. Podobnie stężenie d-dimeru nie różniło się znamienne: GB 246 ng/ml (45-3371) vs. 199 ng/ml (106-1001) w GK, p = 0,53 Tabela 3.

**Tabela 3.** Porównanie wyników biochemicznych osób z grupy badanej i kontrolnej.

parametr	grupa kontrolna n = 30	pacjenci po OZP n = 82	p
d-dimer [ng/ml]	199 (106-1001)	246 (45-3371)	0,53
kreatynina [mg/dl]	0,92±0,20	0,85±0,18	0,13
cholesterol całkowity [mg/dl]	194±37	199±41	0,58
CRP [mg/l]	1,8 (0,1-7,1)	2,1 (0,2-15,6)	0,11
NT-proBNP [pg/ml]	20 (20-388)	52 (7-114)	0,14

CRP C-reactive protein – białko ostrej fazy, NT-proBNP N-Terminal pro-brain natriuretic peptide

#### 6.4 Wyniki badania elektrokardiograficznego

Elektrokardiograficzne zapisy, zarówno pacjentów jak i grupy kontrolnej mieściły się w zakresie normy. Nie stwierdzono zaburzeń rytmu, ani zmian mogących świadczyć o niedokrwieniu mięśnia serca.

#### 6.5 Wyniki badania echokardiograficznego

Nie było różnic echokardiograficznych istotnych statystycznie pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną. Podobne były wymiary jam serca i grubość ścian lewej komory, a także parametry, mówiące o funkcji skurczowej prawej i lewej komory. Skurczowe wychylenie bocznej części pierścienia trójdzielnego w grupie badanej było takie samo ( $20 \pm 5$  mm) jak w grupie kontrolnej ( $20 \pm 8$  mm),  $p = 0,67$ . Nie stwierdzono również różnicy między wartościami maksymalnego gradientu przez zastawkę trójdzielną:  $25 \pm 4$  mmHg w grupie po OZP vs.  $25 \pm 3$  mmHg w GK,  $p = 0,93$ . Wyniki dotyczące badania echokardiograficznego przedstawiono w Tabeli 4.

**Tabela 4.** Porównanie wybranych parametrów echokardiograficznych osób z grupy badanej i kontrolnej.

parametr	grupa kontrolna n = 30	pacjenci po OZP n = 82	p
EF [%]	64±3	64±2	0,47
TRPG [mmHg]	20±5	20±8	0,67
TAPSE [mm]	25±4	25±3	0,93

EF ejection fraction – frakcja wyrzutowa, TAPSE tricuspid annular peak systolic excursion skurczowe wychylenie pierścienia trójdzielnego, TRPG tricuspid regurgitation peak gradient - maksymalny gradient niedomykalności trójdzielnej

## **6.6 Biomarkery dysfunkcji śródbłonka:**

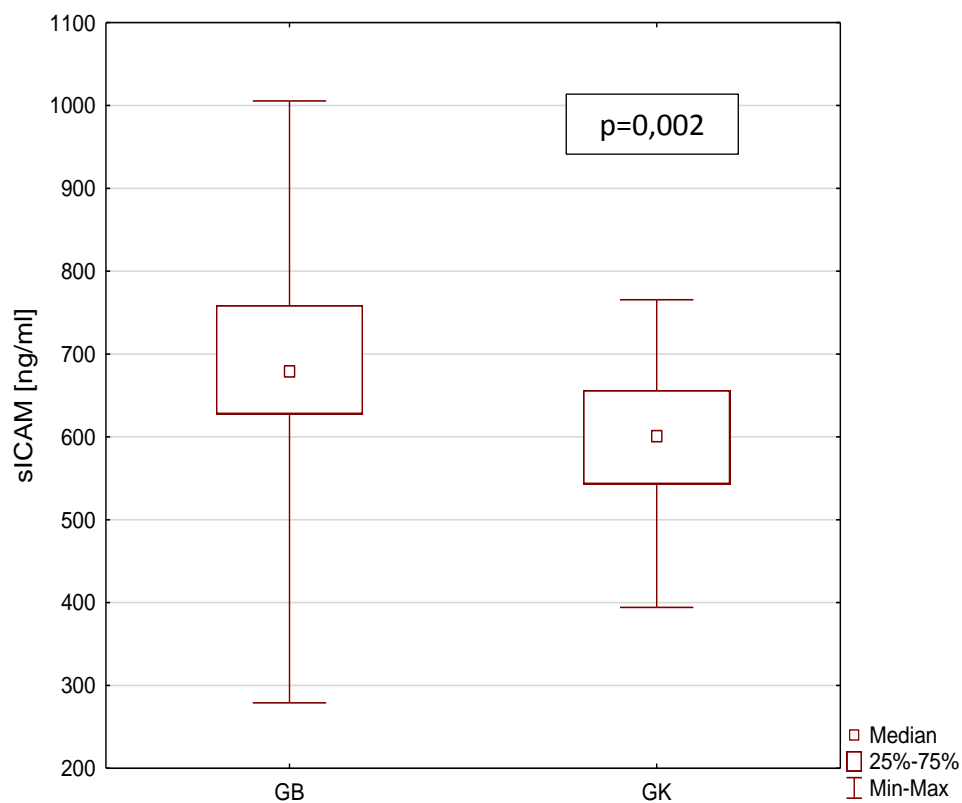
Pacjenci po OZP mieli istotnie wyższe stężenie sICAM-1 (679 ng/ml; 279 - 1006) w porównaniu do zdrowych ochotników (600 ng/ml; 394 - 766),  $p = 0,002$ , (Rycina 1).

Stężenie sVCAM-1 również było znamienne wyższe u pacjentów z wywiadem OZP (631 ng/ml; 105 - 2382) w stosunku do pacjentów z grupy kontrolnej (495 ng/ml; 104,90 – 2381,75)  $p=0,04$ , (Rycina 2).

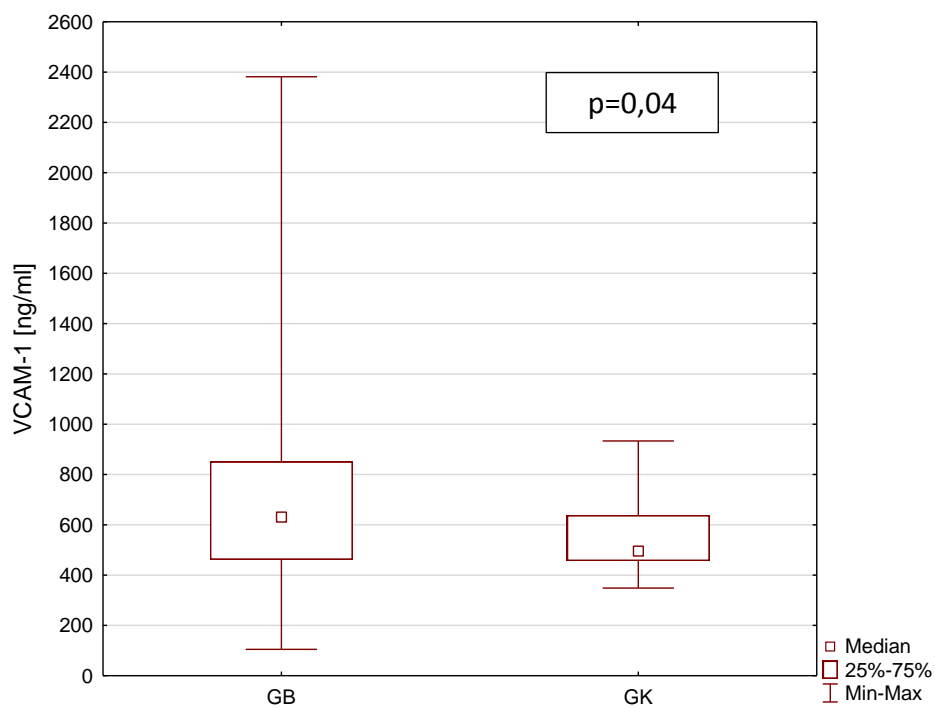
ADMA wykazywała tendencję do wyższych stężeń w grupie OZP (0,51  $\mu\text{mol/l}$ , 0,20 – 0,84), niż w grupie kontrolnej (0,38  $\mu\text{mol/l}$ , 0,12 – 0,82)  $p=0,09$ , (Rycina 3).

Natomiast stężenie E-selektyny było podobne w obu grupach: 27 ng/ml (7-111) w GK vs. 27 ng/ml (10-85) w grupie po OZP,  $p=0,78$ , (Rycina 4).

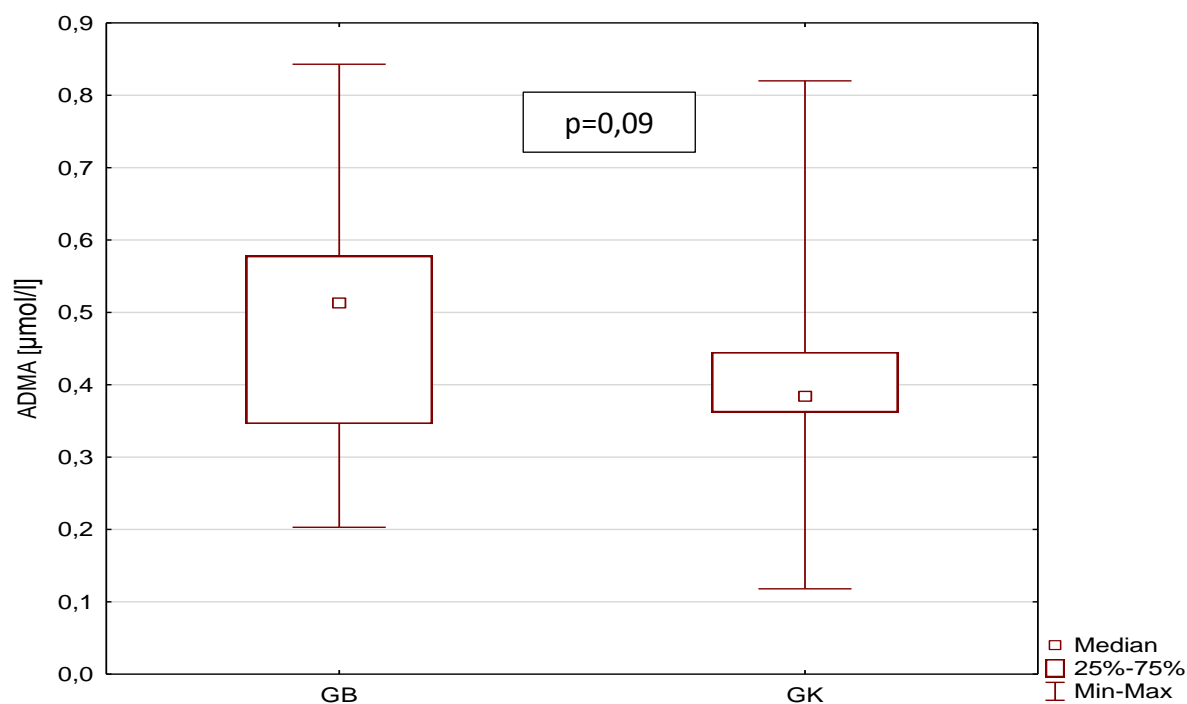
Rycina 1. Porównanie stężenia sICAM-1 u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.



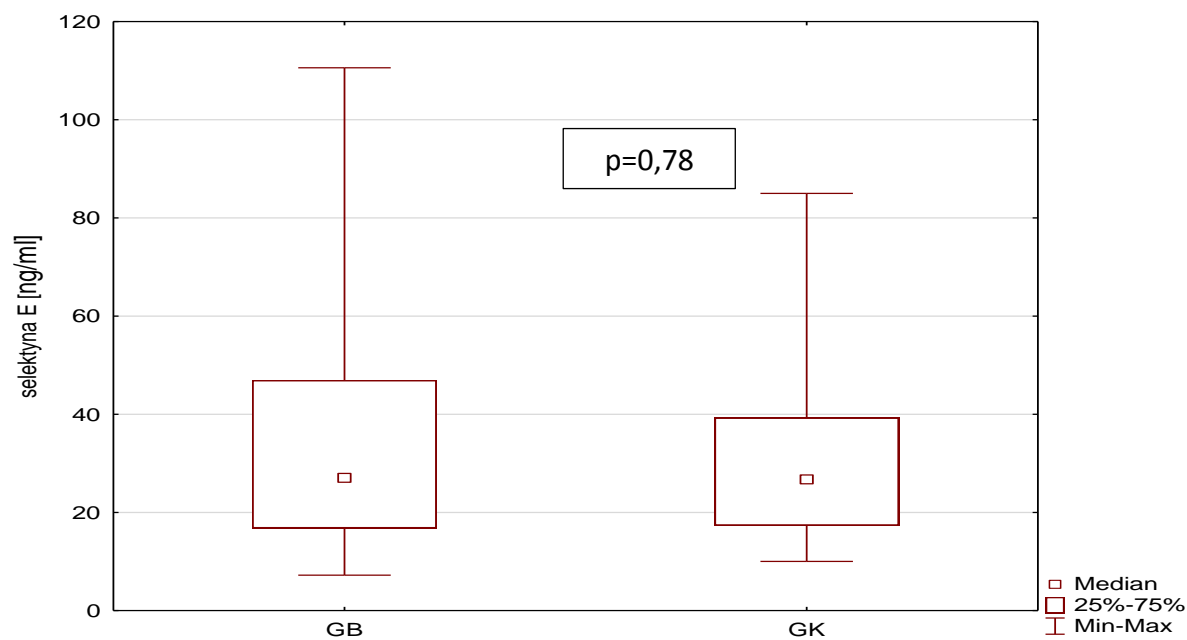
Rycina 2. Porównanie stężenia sVCAM-1 u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.



Rycina 3. Porównanie stężenia ADMA u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.

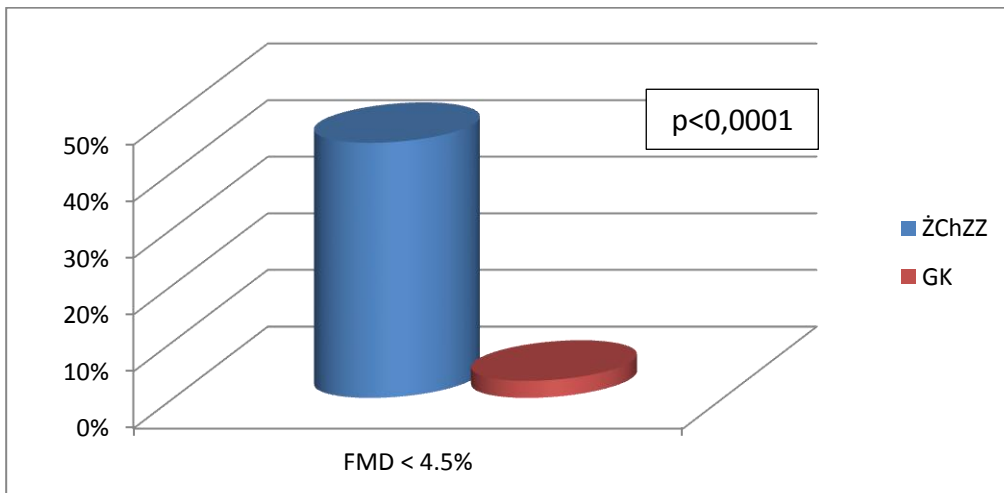


Rycina 4. Porównanie stężenia selektyny E u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.



## 6.7 Ultrasonograficzna ocena rozszerzalności tętnicy ramiennej pod wpływem zwiększonego przepływu i po podaniu nitrogliceryny

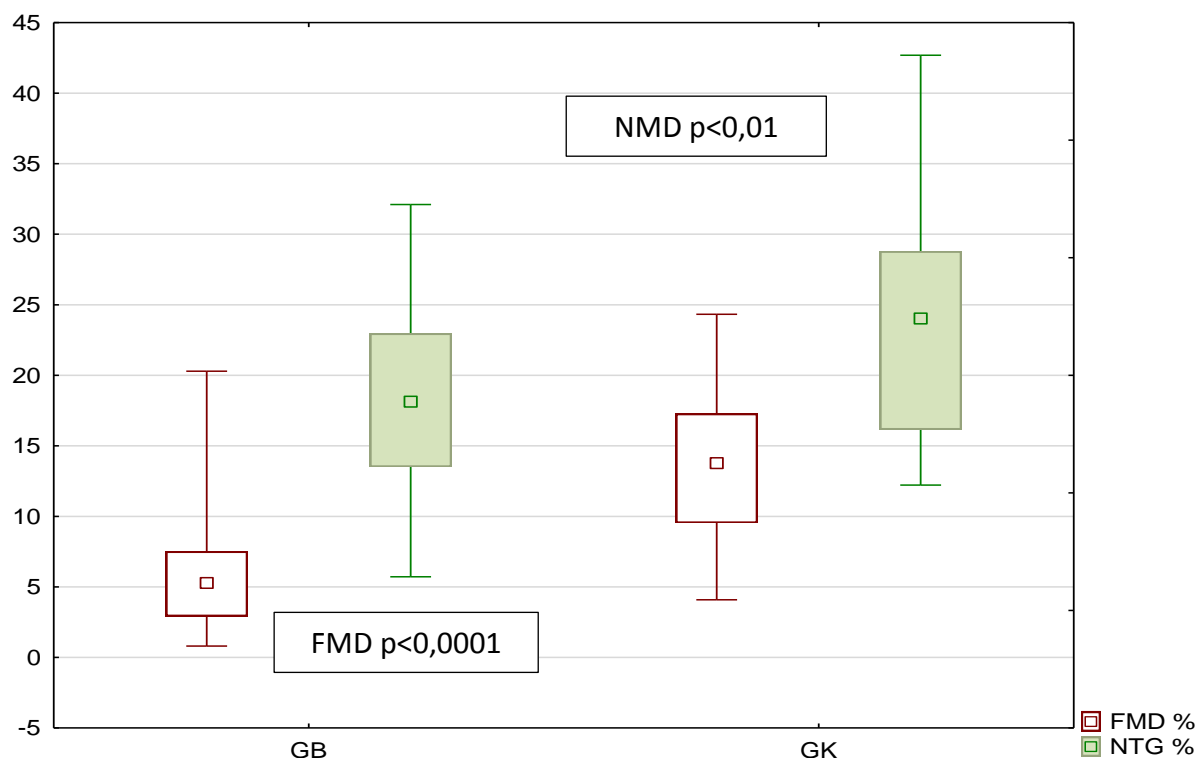
Dysfunkcja śródbłonna definiowana, jako poszerzenie tętnicy ramiennej pod wpływem zwiększonego przepływu mniejsze niż 4,5%, w stosunku do wartości wyjściowej, była stwierdzona istotnie częściej u pacjentów po OZP niż w grupie kontrolnej ( 45 % vs. 3 %,  $p < 0,0001$  ) (Rycina 5).



Rycina 5. Dysfunkcja śródbłonna definiowana, jako FMD < 4,5% u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i w grupie kontrolnej

U pacjentów po przebytej OZP stwierdzono znamienne mniejsze poszerzenie tętnicy ramiennej indukowane zwiększonym przepływem w porównaniu z grupą kontrolną [5,3 %, (0,8 – 20,3) vs. 13,8 % (4,1 – 24,3),  $p < 0,0001$ ]. Obserwowano również mniejsze poszerzenie tętnicy ramiennej indukowane nitrogliceryną u pacjentów z wywiadem OZP [18,1 % (5,7 – 32,1) vs. 24 % (12,2 - 42,7),  $p < 0,01$ ] (Rycina 6).

Rycina 6. Porównanie wyników ultrasonograficznej oceny rozszerzalności tętnicy ramiennej [FMD i NMD, mediana (min-max)] u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i osób z grupy kontrolnej.



### 6.8 Korelacje wyników badania ultrasonograficznego śródblonka

U pacjentów po OZP, FMD% i NMD% korelowało z sVCAM-1 ( $r = -0.23$ ,  $p < 0,01$  i  $r = -0.39$ ;  $p < 0,0001$ , odpowiednio). Ponadto, stwierdzono związek pomiędzy FMD%, a stężeniem sICAM-1 ( $r = -0.24$ ;  $p = 0,03$ ), płcią żeńską ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,001$ ), wzrostem ( $r = -0,35$ ;  $p = 0,001$ ), masą ciała ( $r = -0,38$ ;  $p < 0,001$ ) i BMI ( $r = 0,23$ ;  $p < 0,05$ ). NMD% korelowało odwrotnie z wywiadem palenia papierosów ( $r = -0,23$ ;  $p < 0,05$ ). Z kolei stężenia ADMA i E-selektyny korelowały ze stężeniem cholesterolu całkowitego ( $r = 0,30$ ;  $p = 0,01$  i  $r = 0,24$ ;  $p = 0,03$ , odpowiednio). Natomiast stężenie sICAM-1 korelowało z CRP ( $r = 0,29$ ;  $p = 0,01$ ). Nie obserwowano innych istotnych korelacji w grupie pacjentów po OZP.

Co ciekawe wartości FMD% były wyższe u kobiet niż u mężczyzn (8,0% (2,0-23,9) vs. 5,3% (0,8-24,3);  $p = 0,001$ ), odwrotnie niż stężenia selektyny E (26 ng/ml (7-74) vs. 30 ng/ml (10-110);  $p < 0,04$  odpowiednio).

W grupie kontrolnej nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach FMD%, NMD% czy stężeniach biomarkerów pomiędzy płciami, ani korelacji tych parametrów z masą ciała, wzrostem czy BMI.

**Tabela 5.** Porównanie wyników oceny śródbłónka pacjentów z żylną chorobą zakrzepowozatorową, a grupą kontrolną.

parametr	grupa kontrolna n = 30	pacjenci po OZP n = 82	p
wymiar tętnicy ramiennej przed FMD [cm]	0,34 (0,26-0,49)	0,39 (0,27-0,56)	0,02
maksymalny wymiar tętnicy ramiennej FMD [cm]	0,39 (0,30-0,59)	0,40 (0,28-0,58)	0,91
bezwzględne poszerzenie tętnicy ramiennej FMD [cm]	0,05 (0,01-0,10)	0,02 (0,00-0,07)	<0,0001
FMD [%]	13,8 (4,1-24,3)	5,3 (0,8-20,3)	<0,0001
wymiar tętnicy ramiennej przed NMD [cm]	0,36 (0,29-0,54)	0,38 (0,27-0,52)	0,27
maksymalny wymiar tętnicy ramiennej po NMD [cm]	0,45 (0,37-0,61)	0,45 (0,31-0,60)	0,80
bezwzględne poszerzenie tętnicy ramiennej NMD [cm]	0,08 (0,05-0,55)	0,07 (0,02-0,13)	<0,01
NMD %	24,0 (12,2-42,7)	18,1 (5,7-32,1)	<0,01
sVCAM-1(ng/ml)	495 (348-934)	631 (105-2382)	0,04
ADMA (μmol/l)	0,38 (0,12-0,82)	0,51 (0,20-0,84)	0,09
E-selektyna (ng/ml)	27 (10-85)	27 (7-111)	0,78
sICAM-1 (ng/ml)	600 (394-766)	679 (279-1006)	0,002

ADMA asymmetric dimethylarginine – asymetryczna dimetyloarginina, FMD flow-mediated vasodilation – poszerzenie indukowane zwiększonym przepływem, NMD nitroglycerin mediated vasodilation – poszerzenie indukowane nitrogliceryną, NTG nitrogliceryna, sICAM-1 soluble intercellular adhesion molecule 1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna, sVCAM-1 soluble vascular cell adhesion molecule 1 – naczyńniowa cząsteczka adhezyjna

## 6.9 Leczenie stosowane w czasie oceny śródbłónka

W czasie oceny funkcji śródbłónka 26 osób po OZP (26/82, 31%) nadal stosowało terapię przeciwkrzepliwą: 12 osób acenokumarol, 6 warfarynę i 8 rywaroksaban. Nikt z grupy kontrolnej nie otrzymywał leczenia przeciwkrzepliwego, ani przeciwkrzepliwego. Ponadto sześciu (6/82, 7,3%) pacjentów z ŻChZZ i dwóch (2/30, 6,6%) z grupy kontrolnej przyjmowało statyny. Leczenie hipotensyjne przedstawiono w tabeli 6.



**Tabela 6.** Leczenie hipotensyjne u osób poddanych ocenie śródbłonka

<b>Leki</b>	<b>GB n = 82</b>	<b>GK n = 30</b>	<b>p</b>
β-adrenolityki	9 (11%)	3 (10%)	0,84
Inhibitory konwertazy angiotensyny	5 (6,1%)	2 (6,6%)	0,74
Antagoniści receptora dla angiotensyny	2 (2,5%)		0,95
Antagoniści kanału wapniowego	3 (3,6%)	1 (3,3%)	0,62

### **6.10 Wyniki oceny w kierunku trombofilii**

U 7 pacjentów rozpoznano trombofilię; u 4 heterozygotyczną mutację typu Leiden genu czynnika V, u 1 osoby heterozygotyczną mutację G20210A genu protrombiny, u 2 stwierdzono antykoagulant tocznia. Pacjenci z rozpoznaniem trombofilii zostali zakwalifikowani do grupy pacjentów po przebytej sprowokowanej OZP.

### **6.11 Porównanie wyników pacjentów po epizodzie sprowokowanej i niesprowokowanej ostrej zatorowości płucnej**

Pacjenci po sprowokowanej OZP byli młodsi w porównaniu do chorych po niesprowokowanej OZP ( $35 \pm 9$  vs.  $41 \pm 11$ ,  $p = 0,01$ ). Nie odnotowano natomiast istotnych różnic pomiędzy tymi grupami, jeżeli chodzi o płeć, palenie papierosów, częstość występowania nadciśnienia tętniczego, wywiadu rodzinnego występowania choroby wieńcowej, wartości ciśnienia tętniczego, częstość serca, BMI, stężenia d-dimeru, NT-proBNP, kreatyniny, CRP, cholesterolu oraz parametry echokardiograficzne (Tabela 7). Pacjenci po nieprowokowanej OZP wykazywali tendencję do większego poszerzenia tętnicy ramiennej po podaniu NTG [ $0,46\text{cm}$  (0,37-0,58) vs.  $0,44$  cm (0,31 - 0,60),  $p=0,07$ ] i wyższych stężeń ADMA [ $0,55$   $\mu\text{mol/l}$  (0,23-0,84)] w porównaniu do chorych po sprowokowanej OZP [ $0,48$   $\mu\text{mol/l}$  (0,20-0,62);  $p = 0,10$ ]. Stężenia pozostałych biomarkerów dysfunkcji śródbłonka u pacjentów po OZP związanej z przemijającymi czynnikami ryzyka nie różniły się istotnie. Nie stwierdzono żadnych istotnych różnic w wynikach oceny ultrasonograficznej śródbłonka między pacjentami po niesprowokowanej OZP, a tymi po epizodzie prowokowanym określonym czynnikiem. Wyniki dotyczące stężeń biomarkerów i oceny ultrasonograficznej śródbłonka przedstawiono w Tabeli 7.

**Tabela 7.** Charakterystyka pacjentów po sprowokowanej i niesprowokowanej ostrej zatorowości płucnej

Parameter	sprowokowana OZP	niesprowokowana OZP	P
	n = 43	n = 39	
wiek [lata]	35 ± 9	41 ± 11	0,01
płeć [mężczyzna/kobieta]	18/21	26/17	0,14
aktywni palacze papierosów	8 (21%)	8 (19%)	0,52
nadciśnienie tętnicze	4 (10%)	9 (21%)	0,15
wywiad choroby wieńcowej w rodzinie	8 (21%)	14 (33%)	0,16
skurczowe ciśnienie tętnicze [mmHg]	118 ± 9	122 ± 9	0,32
rozkurczowe ciśnienie tętnicze [mmHg]	75 ± 7	76 ± 8	0,74
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	27 (16-41)	28 (19-40)	0,38
d-dimer [ng/ml]	200 (45-3371)	278 (47-1718)	0,34
kreatynina [mg/dl]	0,83 ± 0,16	0,86 ± 0,19	0,52
cholesterol całkowity [mg/dl]	191 ± 41	206 ± 42	0,21
CRP [mg/l]	2,6 (0,3-12,8)	1,8 (0,2-15,6)	0,20
NT-proBNP [pg/ml]	64 (19-104)	26 (7-114)	0,36
EF [%]	63 ± 2	64 ± 2	0,91
TRPG [mmHg]	21 ± 8	19 ± 7	0,29
TAPSE [mm]	25 ± 3	25 ± 3	0,56
spoczynkowy wymiar tętnicy ramiennej [cm]	0,36 (0,27-0,56)	0,40 (0,27-0,50)	0,17
maksymalny wymiar tętnicy ramiennej po FMD [cm]	0,40 (0,28-0,58)	0,42 (0,29-0,51)	0,23
bezwzględna różnica w wymiarze tętnicy ramiennej [cm]	0,02 (0,0-0,07)	0,02 (0,0-0,05)	0,60
FMD %	5,4 (1,0-20,3)	5,0 (0,8-14,9)	0,51
wymiar t.ramiennej przed NTG [cm]	0,37 (0,27-0,52)	0,40 (0,29-0,50)	0,12
maksymalny wymiar tętnicy ramiennej po NTG [cm]	0,44 (0,31-0,60)	0,46 (0,37-0,58)	0,07
bezwzględna różnica w wymiarze tętnicy ramiennej po NTG [cm]	0,07 (0,02-0,10)	0,08 (0,03-0,13)	0,28
NMD %	17,8 (5,7-29,9)	18,3 (6,7-32,1)	0,79
sVCAM-1 [ng/ml]	589 (349-2382)	696 (105-2348)	0,48
ADMA [μmol/l]	0,48 (0,20-0,62)	0,55 (0,23-0,84)	0,10
selektyna E [ng/ml]	27 (12-111)	26 (7-74)	0,72
sICAM-1 [ng/ml]	677 (367-835)	690 (279-1006)	0,47

ADMA asymmetric dimethylarginine – asymetryczna dimetyloarginina, BMI body mass index - wskaźnik masy ciała, CRP C-reactive protein - białko ostrej fazy, EF ejection fraction - frakcja wyrzutowa, FMD flow-mediated vasodilation – poszerzenie indukowane zwiększonym przepływem, NMD nitroglycerin mediated vasodilation – poszerzenie indukowane nitrogliceryną, NTG nitrogliceryna, NT-proBNP N-Terminal pro-brain natriuretic peptide - N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B, TAPSE tricuspid annular peak systolic excursion - skurczowe wychylenie pierścienia trójdzielnego, TRPG tricuspid regurgitation peak gradient - maksymalny gradient niedomykalności trójdzielnego, sICAM-1 soluble intercellular adhesion molecule 1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna, sVCAM-1 soluble vascular cell adhesion molecule 1 – naczyniowa cząsteczka adhezyjna

## **6.12 Nawroty żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej w obserwacji odległej**

Po ocenie funkcji śródbłonna pacjenci byli obserwowani w warunkach ambulatoryjnych. Mediana czasu obserwacji po badaniu śródbłonna wynosiła 16 miesięcy, co najmniej 12 miesięcy, a maksymalnie 72 miesięcy. W tym czasie stwierdzono 19 nawrotów ŻChZZ. U 7 pacjentów w tomografii komputerowej uwidoczniiono ubytki zakontrastowania w innych niż dotychczas tętnicach płucnych i rozpoznano nawrót OZP. W 12 przypadkach ŻChZZ nawróciła pod postacią ŻŻG. Piętnaście nawrotów wystąpiło u pacjentów po przebyłym niesprowokowanym epizodzie OZP, a tylko 4 przypadki u osób z wywiadem sprowokowanej OZP. Zwraca uwagę, że nawroty ŻChZZ w grupie pacjentów po sprowokowanej OZP występowały wyłącznie u kobiet (100%), podczas gdy wśród chorych z przebytą niesprowokowaną OZP płeć żeńska stanowiła jedynie 35%. U jednego pacjenta, 12 miesięcy po ocenie śródbłonna, na podstawie cewnikowania prawych jam serca, rozpoznano zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne. Wszystkie epizody nawrotów ŻChZZ wystąpiły u pacjentów niestosujących leczenia przeciwkrzepliwego.

## **6.13 Leczenie w czasie obserwacji po ocenie śródbłonna**

Siedemdziesięciu siedmiu pacjentów z 82 obserwowanych (94%) po badaniu funkcji śródbłonna pozostawała bez leczenia przeciwkrzepliwego. U 5 osób kontynuowano antykoagulację z powodu utrzymujących się zmian zakrzepowych w żyłach głębokich kończyn dolnych lub/i w tętnicach płucnych, bez cech nadciśnienia płucnego.

## **6.14 Wskaźniki czynności śródbłonna a częstość nawrotu**

Pacjenci, u których stwierdzono nawrót ŻChZZ byli starsi w porównaniu do tych, u których nie doszło do kolejnego epizodu ( $42 \pm 11$  lat vs.  $37 \pm 10$  lat,  $p = 0.07$ ). Między grupą po OZP z nawrotem, a osobami po OZP bez nawrotu ŻChZZ, nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach BMI, ciśnienia tętniczego krwi, stężeniach d-dimeru, kreatyniny, CRP, cholesterolu całkowitego, NT-proBNP, ani współwystępujących chorób. Podobne były także

wyniki badania echokardiograficznego i oceny poszerzenia tętnicy ramiennej indukowanej przepływem, czy nitrogliceryną. Stężenie ADMA i sVCAM-1 nie różniły się istotnie między grupami. W grupie pacjentów, u których stwierdzono nawrót choroby, stężenie selektyny E było istotnie statystycznie niższe w porównaniu do pacjentów bez nawrotu ŻChZZ (22 ng/ml (7-65) vs. 34 ng/ml (11-111),  $p < 0,035$ ), natomiast stężenie sICAM-1 było wyższe u osób, u których wystąpił nawrót choroby (712 ng/ml (432-1006) vs. 671 ng/ml (279-886),  $p = 0,06$ ).

### 6.15 Analiza jednoczynnikowa wskaźników ryzyka nawrotu

Analiza według modelu proporcjonalnego hazardu Coxa wykazała, że wysokie stężenie E-selektyny zmniejsza prawdopodobieństwo nawrotu ŻChZZ, podczas, gdy wysokie stężenie sICAM i wywiad przebytej niesprowokowanej OZP zwiększa ryzyko wystąpienia kolejnego epizodu (Tabela 8).

**Tabela 8.** Analiza regresji jednoczynnikowej Cox'a w przewidywaniu oceny ryzyka nawrotu żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej.

parametr	Hazard Risk (HR)	95% przedział ufności	p
wiek [lata]	1,03	0,99 - 1,08	0,11
płeć [żeńską]	1,11	0,45 - 2,73	0,82
wywiad niesprowokowanej OZP	3,7	1,2 - 11,2	0,02
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	1,03	0,94 - 1,13	0,50
d-dimer [ng/ml]	0,999	0,997 - 1,001	0,33
CRP [mg/l]	0,99	0,84 - 1,17	0,92
kreatynina [mg/dl]	0,46	0,04 - 6,08	0,56
FMD [%]	0,97	0,85 - 1,10	0,62
NMD [%]	1,002	0,94 - 1,07	0,95
sVCAM-1(ng/ml)	0,999	0,998 - 1,001	0,36
ADMA (μmol/l)	6,9	0,3 - 187,6	0,23
E-selektyna (ng/ml)	0,968	0,938 - 0,998	<0,04
sICAM-1 (ng/ml)	1,004	0,9998 - 1,008	0,06

ADMA asymmetric dimethylarginine - asymetryczna dimetyloarginina, BMI body mass index – wskaźnik masy ciała, CRP C-reactive protein – białko ostrej fazy, FMD flow-mediated vasodilation, wazodylatacja indukowana przepływem, NMD nitroglycerin-mediated dilatation, wazodylatacja indukowana nitrogliceryną sICAM-1 soluble intercellular adhesion molecule 1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna, sVCAM-1 soluble vascular cell adhesion molecule 1 – naczyniowa cząsteczka adhezyjna, OZP – ostra zatorowość płucna

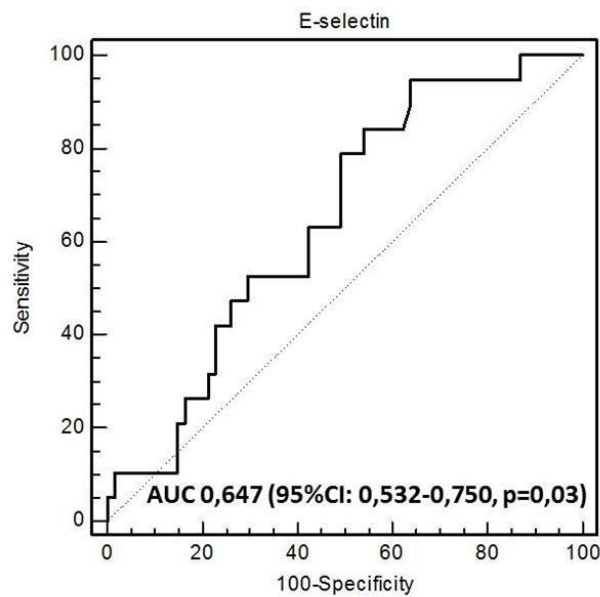
### 6.16 Analiza wieloczynnikowa wskaźników ryzyka nawrotu

W analizie wieloczynnikowej Cox'a wywiad niesprowokowanej OZP (HR 3.3, 95%CI: 1.1-10.1; p < 0,001), stężenie selektyny E (0.96, 95%CI: 0.93-0.99, p < 0,02) i sICAM-1 (1.004, 95%CI: 1.001-1.007, p = 0,04) były istotnymi predyktorami nawrotu ŻChZZ.

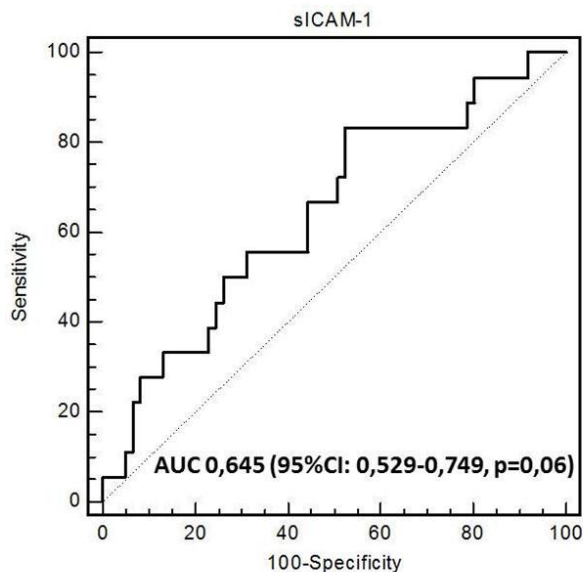
### 6.17 Czynniki ryzyka nawrotu w ocenie rokowania

Pole pod krzywą ROC dla E-selektyny w przewidywaniu nawrotu wyniosło 0,647 (95%CI: 0,532-0,750;  $p = 0,03$ ) (Rycina 7), podczas, gdy dla sICAM-1: 0,645 (95%CI: 0,529-0,749;  $p = 0,06$ ) (Rycina 8). Punkt odcięcia  $< 39$  ng/ml dla selektyny E charakteryzował się 95% czułością i 36% specyficznością, PPV 32% i NPV 96% w przewidywaniu nawrotu ŻChZZ, natomiast punkt odcięcia  $> 655$  ng/ml dla sICAM-1 miał 83% czułość i 48% specyficzność, PPV 32% i NPV 91% dla oceny ryzyka nawrotu ŻChZZ.

Rycina 7. Krzywa ROC dla selektyny-E w przewidywaniu nawrotu ŻChZZ.

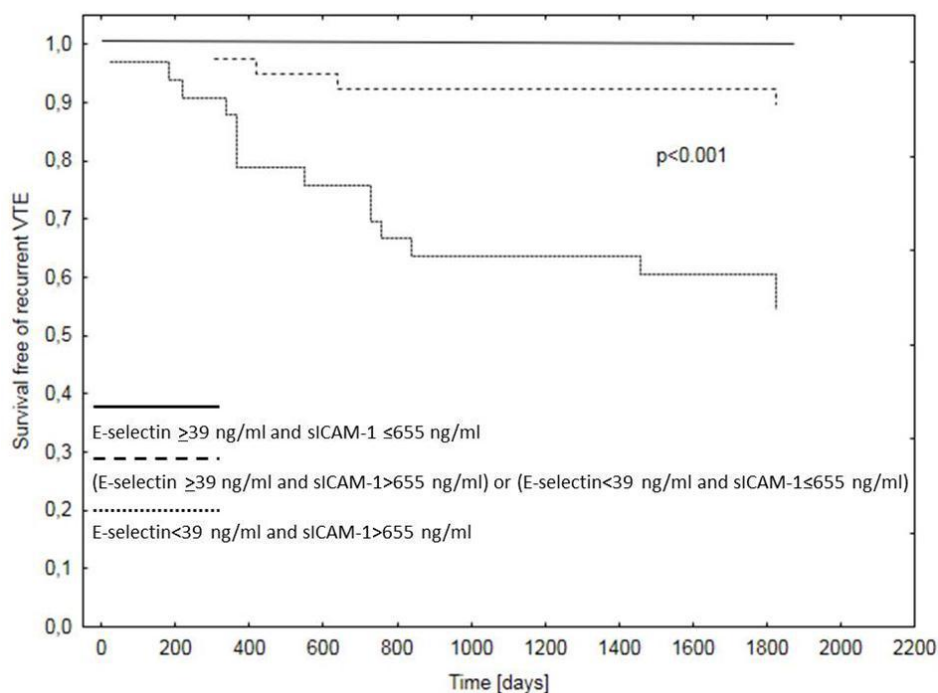


Rycina 8. Krzywa ROC dla sICAM-1 w przewidywaniu nawrotu ŻChZZ.



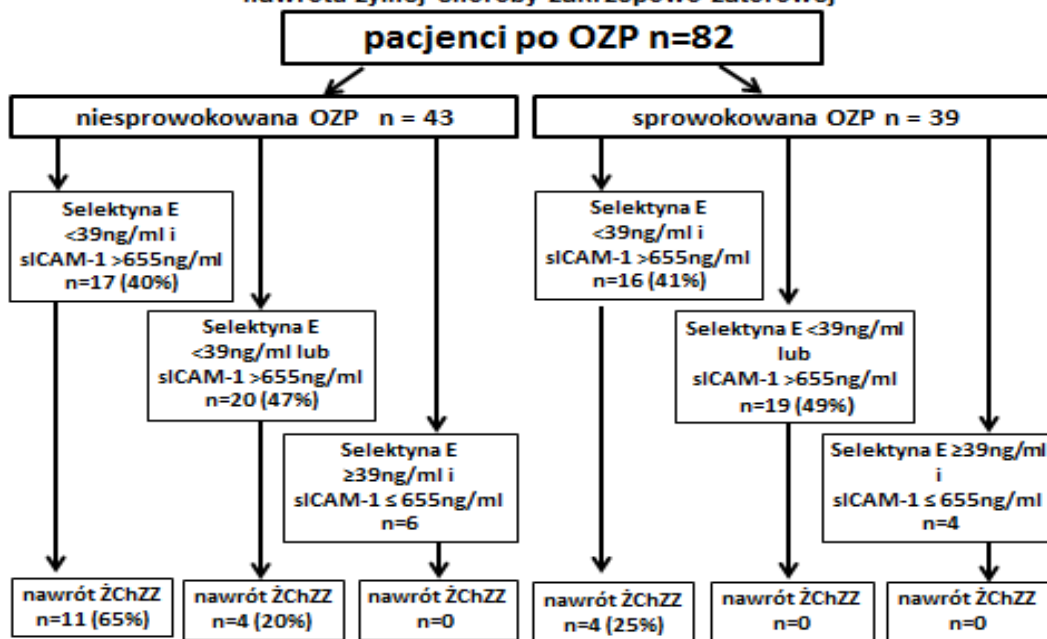
Stężenie E-selektyny poniżej 39 ng/ml i sICAM-1 powyżej 655 ng/ml stwierdzono u 15 pacjentów z nawrotem ŻChZZ i 18 osób bez nawrotu. Stężenie selektyny E < 39 ng/ml lub sICAM-1 > 655ng/ml oznaczono u 4 pacjentów z nawrotem i 38 bez nawrotu ŻChZZ, podczas, gdy żaden z pacjentów z selektyną E ≥ 39 ng/ml i sICAM-1 ≤ 655 ng/ml nie doznał nawrotu choroby (Rycina 9).

Rycina 9. Krzywe Kaplan-Meier przeżycia bez nawrotu żylniej choroby zakrzepowatorowej w zależności od stężenia selektyny E i sICAM-1.



U 17 osób (40%) po przebytej niesprowokowanej OZP stwierdzono niskie stężenie selektyny E < 39 ng/ml i wysokie stężenie sICAM-1 > 655 ng/ml, u 11 (65%) z nich rozpoznano nawrót ŻChZZ. E-selektynę < 39ng/ml albo sICAM-1 > 655 ng/ml obserwowano u 20 (47%) pacjentów po niesprowokowanej OZP, u 4 z nich (20%) stwierdzono nawrót ŻChZZ. Wśród pacjentów po przebytej sprowokowanej OZP stężenie selektyny E poniżej < 39 ng/ml i sICAM-1 powyżej 655 ng/ml wystąpiło u 16 (41%); u 4 z nich (25%) rozpoznano nawrót choroby. Selektyna E < 39 ng/ml albo sICAM-1 > 655 ng/ml były obecne u 19 (49%) pacjentów po OZP związanej z czynnikami ryzyka ŻChZZ, ale nikt z nich nie doznał nawrotu choroby, tak jak nikt z całej grupy pacjentów po przebytej OZP z selektyną E ≥ 39 ng/ml i sICAM-1 ≤ 655 ng/ml (Rycina 10).

Rycina 10. Wartość predykcyjna selektyny E i sICAM-1 w przewidywaniu nawrotu żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej



### 6.18 Łączna analiza nawrotów i antykoagulacji w obserwacji odległej

Ostatecznie po zakończonym okresie obserwacji 24 pacjentów otrzymywało leczenie przeciwkrzepliwe (29%): 19 pacjentów z powodu nawrotu ŻChZZ (23%), 4 chorych w związku z utrzymującymi się zmianami zakrzepowymi w żyłach głębokich kończyn dolnych i/lub tętnicach płucnych oraz 1 pacjent na skutek rozpoznania PZZNP.

Leczeni przeciwkrzepliwie pacjenci byli starsi ( $42 \pm 12$  vs.  $37 \pm 9$ ,  $p = 0,10$ ) i bardziej otyli (BMI  $28 \text{ kg/m}^2$  (20-41) vs.  $27 \text{ kg/m}^2$  (16-40),  $p = 0,06$ ) w porównaniu do pozostałych chorych z wywiadem OZP (Tabela 7). W grupie otrzymującej antykoagulację obserwowano także tendencję do niższych stężeń d-dimeru ( $174 \text{ ng/ml}$  (47-1406) vs.  $281 \text{ ng/ml}$  (45-3371),  $p=0,06$ ) i CRP ( $1,9 \text{ mg/l}$  (0,2-8,6) vs.  $2,2 \text{ mg/l}$  (0,3-15,6),  $p = 0,08$ ). Nie obserwowano natomiast różnic w stężeniach kreatyniny, cholesterolu, NT-proBNP, parametrach echokardiograficznych czy częstości występowania nadciśnienia tętniczego (Tabela 9). U pacjentów otrzymujących ostatecznie leczenie przeciwkrzepliwe obserwowano istotnie niższe stężenia selektyny E, niż u pozostałych pacjentów z wywiadem OZP (23 (7-65) vs. 30 (11-111),  $p < 0,04$ ). Nie stwierdzano natomiast różnic dotyczących FMD, ani innych biomarkerów funkcji śródbłonna (Tabela 9). Wyższe stężenia E-selektyny zmniejszyły prawdopodobieństwo antykoagulacji z OR 0,97 (95%CI: 0,93 -0,99). Pole pod krzywą ROC dla selektyny E w przewidywaniu przedłużonego leczenia przeciwkrzepliwego wynosiło 0,650 (95%CI: 0,535-0,753,  $p < 0,03$ ). Punkt odcięcia stężenia E-selektyny <39 ng/ml miał czułość 90%, swoistość 35%, PPV 32% i NPV 92% w przewidywaniu antykoagulacji.



**Tabela 9.** Porównanie pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową wymagających antykoagulacji na koniec obserwacji i pacjentów po OZP pozostających bez leczenia przeciwkrzepliwego.

parametr	pacjenci leczenia przeciwkrzepliwie n = 24	pacjenci bez antykoagulacji n = 58	p
wiek [lata]	42 ± 12	37 ± 9	0,10
pleć [mężczyźni/kobiety]	12/12	32/26	0,81
aktywni palacze papierosów	3 (13%)	13 (22%)	0,22
nadciśnienie tętnicze	6 (25%)	7 (12%)	0,19
wywiad choroby wieńcowej w rodzinie	5 (21%)	17 (29%)	0,53
skurczowe ciśnienie tętnicze [mmHg]	123 ± 8	119 ± 7	0,32
rozkurczowe ciśnienie tętnicze [mmHg]	78 ± 5	75 ± 8	0,51
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	28 (20-41)	27(16-40)	0,06
d-dimer [ng/ml]	174 (47-1406)	281 (45-3371)	0,06
kreatynina [mg/dl]	0,85 ± 0,20	0,85 ± 0,17	0,73
cholesterol całkowity [mg/dl]	208 ± 46	197 ± 40	0,32
CRP [mg/l]	1,9 (0,2-8,6)	2,2 (0,3-15,6)	0,08
NT-proBNP [pg/ml]	52 (22-114)	55 (7-104)	0,53
EF [%]	64 ± 3	64 ± 2	0,97
TRPG [mmHg]	20 ± 8	20 ± 8	0,99
TAPSE [mm]	25 ± 4	25 ± 3	0,86
wymiar tętnicy ramiennej [cm]	0,37 (0,27-0,47)	0,39 (0,27-0,56)	0,82
bezwzględne poszerzenie tętnicy ramiennej [cm]	0,02 (0,00-0,04)	0,02 (0,00-0,07)	0,71
FMD [%]	5,7 (0,8-9,5)	5,1 (0,9-20,3)	0,48
NMD %	19,2 (7,1-29,9)	17,8 (5,7-32,1)	0,64
sVCAM-1(ng/ml)	578 (275-1015)	656 (105-2382)	0,38
ADMA (μmol/l)	0,52 (0,25-0,84)	0,48 (0,20-0,80)	0,20
selektyna E (ng/ml)	21 (7-65)	35 (11-111)	<0,01
sICAM-1 (ng/ml)	684 (367-1006)	677 (279-886)	0,62

ADMA asymmetric dimethylarginine - asymetryczna dimetyloarginina, BMI body mass index - wskaźnik masy ciała, CRP C-reactive protein - białko ostrej fazy, EF ejection fraction - frakcja wyrzutowa, FMD flow-mediated vasodilation - poszerzenie indukowane zwiększonym przepływem, NMD nitroglycerin mediated vasodilation - poszerzenie indukowane nitrogliceryną, NT-proBNP N-Terminal pro-brain natriuretic peptide - N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B, TAPSE tricuspid annular peak systolic excursion - skurczowe wychylenie pierścienia trójdzielnego, TRPG tricuspid regurgitation peak gradient - maksymalny gradient niedomykalności trójdzielnej, sICAM-1 soluble intercellular adhesion molecule 1 - międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna, sVCAM-1 soluble vascular cell adhesion molecule 1 - naczyniowa cząsteczka adhezyjna

## VII. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

### 7.1 Dysfunkcja śródbłonna u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową

Śródbłonek odgrywa kluczową rolę w zapewnieniu prawidłowego funkcjonowania układu krwionośnego. Produkuje i uwalnia substancje wazoaktywne, a także regulujące układ krzepnięcia i fibrynolizy oraz czynniki wzrostu. W wyniku pobudzenia śródbłonna na jego powierzchni wzrasta ekspresja cząsteczek adhezyjnych, takich jak: ICAM-1, VCAM-1 oraz selektyny P i E, które inicjują adhezję i aktywację leukocytów, powodują ekspansję procesu zapalnego i sprzyjają tworzeniu zakrzepu<sup>101</sup>. Udowodniono, iż ‘tradycyjne’ czynniki ryzyka miażdżycy, takie jak hiperlipidemia, cukrzyca, hiperhomocysteinemia, palenie tytoniu, czy nadciśnienie tętnicze są związane z dysfunkcją śródbłonna<sup>64,65,67,68</sup>. Należy zauważyć, że palenie papierosów, otyłość, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze i cukrzyca są wspólnymi czynnikami ryzyka choroby wieńcowej i ŻChZZ<sup>4</sup>, ponadto wszystkie w/w powodują dysfunkcję śródbłonna<sup>19</sup>. Lerman zaproponował nawet, aby dysfunkcję śródbłonna, która jest wspólnym mianownikiem czynników ryzyka, uznać za najważniejszy czynnik ryzyka - „nadczynnik ryzyka”<sup>19</sup>. Dysfunkcja śródbłonna odgrywa kluczową rolę w zapoczątkowaniu i progresji miażdżycy i jest również istotnym markerem prognostycznym występowania zmian w tętnicach wieńcowych<sup>25</sup>. Z tego punktu widzenia wydaje się logiczne, że na podstawie oceny funkcji śródbłonna jest możliwe przewidywanie również podwyższonego ryzyka wystąpienia ŻChZZ.

#### 7.1.1 Czynniki ryzyka dysfunkcji śródbłonna u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową

W niniejszej pracy cukrzyca była kryterium wykluczającym z badania. Natomiast dobór grupy kontrolnej zaplanowano tak, aby zbliżony odsetek pacjentów z nadciśnieniem tętniczym był w grupie badanej (16 %) i wśród osób w grupie kontrolnej (17 %), podobny był również odsetek palaczy papierosów (19,5% vs. 20% w GK) oraz osób obciążonych rodzinnym występowaniem choroby wieńcowej (35% w grupie OZP i 30% w GK). Pacjenci z wywiadem OZP mieli wyższy wskaźnik masy ciała (BMI 27 kg/m<sup>2</sup> vs. 24 kg/m<sup>2</sup>, p < 0,01) niż osoby z grupy kontrolnej. Otyłość (BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>) rozpoznano u 53/83 (64%) pacjentów po przebytej OZP i u 12/30 (40%) osób GK. Średnie stężenie cholesterolu całkowitego było podobne w obu grupach: GB 199 mg/dl ± 41 vs. GK 194 mg/dl ± 37, p=0,58, nie było również istotnych różnic we frakcjach cholesterolu. Hipercholesterolemię stwierdzono u 47/82 (57%) pacjentów z ŻChZZ i 14/30 (47%) osób GK. Z powodu nadciśnienia tętniczego leczenie hipotensyjne otrzymywało 16% pacjentów po przebytej OZP

i 17% osób z grupie kontrolnej. Inne czynniki ryzyka takie jak cukrzyca stanowiły kryterium wyłączenia z badania.

### **7.1.2 Ultrasonograficzna ocena funkcji śródbłonka u pacjentów po przebytej ostrej zatorowości płucnej**

Badanie odpowiedzi śródbłonka przez pomiar rozszerzalności tętnicy ramiennej indukowanej przepływem jest metodą nieinwazyjną i wysoko powtarzalną. Zalecenia dotyczące standardów wykonywania tego badania zostały opracowane i opublikowane przez międzynarodową grupę badawczą<sup>88</sup>. Należy jednak pamiętać, że jest to metoda czasochłonna i wymaga wprawnego badacza<sup>67</sup>. Nawet niewielkie przesunięcie głowicy może zmienić wynik. Duża zmienność w zakresie wartości FMD uwarunkowana jest techniką badania i doбором badanej grupy. Jest to jedną z przyczyn braku norm dla FMD, w omawianej pracy przyjęto, tak jak Schroeder i współautorzy, wartość 4,5 % za granicę rozpoznania dysfunkcji śródbłonka<sup>89</sup>. W ten sposób zdefiniowaną dysfunkcję śródbłonka stwierdziliśmy u 45% pacjentów po OZP i jedynie u 3 % w grupie kontrolnej. Kooijman i wsp. udowodnili, że największe znaczenie dla oceny wazodylatacji odbywającej się przy współudziale NO ma czas okluzji ok. 5 min<sup>124</sup> i taki czas okluzji stosowano w niniejszym badaniu. W metaanalizie obejmującej 5547 uczestników stwierdzono, że względne ryzyko wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego zmieniało się o 0,87 (95%CI, 0,83-0,91] wraz ze zmianą FMD tętnicy ramiennej o 1%<sup>125</sup>. W pracy, która ukazała się w 2007 roku Migliacci i wsp. stwierdzili, że w małej grupie, 28 pacjentów z idiopatyczną zakrzepicą żylną rozszerzalność tętnicy ramiennej pod wpływem zwiększonego przepływu była istotnie mniejsza w porównaniu z grupą kontrolną ( $3,5 \pm 0,6$  % (95 % CI: 2,2 – 4,8) vs  $5,7 \pm 0,6$  % (95 % CI: 4,2 – 6,8);  $p = 0,015$ )<sup>20</sup>. Z kolei w przedstawianym badaniu, u pacjentów po OZP poszerzenie tętnicy ramiennej indukowane zwiększonym przepływem wyniosło 5,3% (0,8 – 20,3), natomiast w grupie kontrolnej 13,8 % (4,1 – 24,3),  $p < 0,0001$ ). Porównując wyniki omawianego badania, z opisanymi przez Migliacciego i wsp.<sup>20</sup>, warto zauważyć, iż grupa pacjentów włączonych do niniejszej analizy była średnio 20 lat młodsza. Prezentowane wyniki FMD były podobne do wartości otrzymanych przez Neunteufl i wsp.<sup>81</sup>, którzy badali rozszerzanie tętnicy ramiennej u osób z klinicznym rozpoznaniem choroby niedokrwiennej serca, a nie z ŻChZZ, natomiast osoby poddane ocenie były w zbliżonym wieku do analizowanej grupy. Czasami różnicę w wynikach FMD tłumaczy się miejscem okluzji, reaktywne przekrwienie po ucisku ramienia powoduje większą zmianę średnicy tętnicy ramiennej, niż po ucisku przedramienia<sup>126</sup>. W omawianym badaniu mankiet założony był na przedramię, tak jak w badaniu

przeprowadzonym przez Migliacciego i współpracowników<sup>20</sup>. Wśród pacjentów po OZP, włączonych do przedstawianego badania, odnotowano również mniejsze poszerzenie tętnicy ramiennej indukowane nitrogliceryną [18,1 % (5,7 – 32,1)] w porównaniu z grupą kontrolną [24% (12,2 – 42,7)],  $p < 0,01$ . Nie można odnieść tych wyników do badania przeprowadzonego w podobnej populacji, ponieważ w jedynym, poza prezentowanym, badaniu oceny śródbłonna u chorych ŻChZZ, Migliacci i współautorzy nie opublikowali wyników próby z podaniem nitrogliceryny<sup>20</sup>.

Tabela 10. Porównanie charakterystyki i wyników osób włączonych do omawianego badania i analizy Migliacciego i wsp.

parametr	Dzikowska-Diduch i wsp.			Migliacci i wsp.	
	OZP n = 82	niesprowokowana OZP n = 43	grupa kontrola n = 30	idiopatyczna ŻChZZ n = 28	grupa kontrolna n = 28
Wiek (lata)	38 ± 12	41 ± 11	38 ± 11	59 ± 2,8	58 ± 2,8
Płeć, M	44	26	15	20	20
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27 ± 12	28 ± 11	24	26,9 ± 0,9	24,5 ± 0,6
leczenie przeciwrzepliwe	26	11	0	6	6
Cholesterol całkowity	199 ± 41	206 ± 42	194 ± 37	195,5 ± 5,5	187,2±8,4
skurczowe ciś.	121 ± 13	122 ± 9	116 ± 15	135 ± 1,8	131 ± 3,1
rozkurczowe ciś.	78 ± 9	76 ± 8	73 ± 7	82 ± 1,2	80 ± 1,4
Czas od epizodu ŻChZZ (miesiące)	13,2±8,4	14,4 ± 0,8	-	25,8 ± 5,2	-
wymiar tętnicy ramiennej przed FMD	0,39±0,14	0,4 ± 0,11	0,34±0,13	0,43 ± 0,1	0,42 ± 0,1
bezwzględne FMD (cm)	0,02±0,03	0,02 ± 0,03	0,05±0,04	0,016±0,056	0,0215 ± 0,0027
FMD%	5,3 (0,8-20,3)	5,0 (0,8-14,9)	13,8 (4,1-24,3)	3,5 ± 0,6	5,7 ± 0,6

Mniejsza wazodylatacja w odpowiedzi na egzogenny tlenek azotu może świadczyć o upośledzonej funkcji mięśni gładkich naczyń i mniejszym potencjale naczyń do poszerzania być może w wyniku zmniejszonej reaktywności na NO. Taka sytuacja sugeruje również bardziej złożoną patofizjologię zaburzeń naczyniowych u pacjentów po przebytym epizodzie OZP niż tylko zaburzenia wynikające z produkcji NO przez śródbłonek. Wymaga podkreślenia faktu, że upośledzona rozszerzalność tętnicy ramiennej po podaniu NTG, była czynnikiem prognostycznym wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z chorobą wieńcową, obwodową miażdżycą tętnic oraz tętniakami aorty brzusznej<sup>90,91</sup>. Ponadto

u pacjentów po OZP w prezentowanej obserwacji NMD% korelowało odwrotnie z wywiadem palenia papierosów ( $r = -0,23$ ;  $p < 0,05$ ), co sugeruje, że nikotynizm mógł upośledzać reaktywność ściany naczyń w tej grupie. Warto dodać, że funkcję komórek endothelium można także oceniać przez tonometrię tętnic obwodowych w warunkach reaktywnego przekrwienia (ang. Reactive Hyperemia Peripheral Arterial Tonometry RH-PAT). Do tej pory opublikowano jedno badanie oceniające związek dysfunkcji śródbłonna oszacowanej przez tonometrię i  $\dot{V}ChZZ$ , u pacjentów przed planowanym zabiegiem ortopedycznym. W tej obserwacji istotnie częściej dochodziło do wystąpienia  $Z\dot{Z}G$  u pacjentów z obniżonym wskaźnikiem reaktywnego przekrwienia<sup>121</sup>.

### **7.1.3 Biochemiczna ocena funkcja śródbłonna u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo - zatorową**

#### **7.1.3.1 Asymetryczna dimetyloarginina**

Asymetryczna dimetyloarginina jest endogennym, kompetencyjnym inhibitorem syntetazy tlenu azotu (NOS) i jest uznawana za jeden ze wskaźników dysfunkcji śródbłonna<sup>92</sup>. Wykazano, że ADMA pozwala na przewidywanie zdarzeń sercowo-naczyniowych i śmiertelności w badaniach prospektywnych, niezależnie od innych czynników ryzyka<sup>96</sup>. Podwyższone stężenia ADMA obserwowano zarówno u osób z miażdżycą, jak i tych z czynnikami ryzyka dysfunkcji śródbłonna takimi jak: hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze i cukrzyca<sup>96,127,128</sup>. W jednym z dotychczas opublikowanych badań oceniających stężenia ADMA u chorych z  $\dot{V}ChZZ$ , nie stwierdzono różnic w stężeniu ADMA pomiędzy 39 pacjentami z potwierdzoną  $Z\dot{Z}G$ , a 35 osobami bez cech skrzeplin w badaniu ultrasonograficznym<sup>99</sup>. Natomiast Halici i współpracownicy stwierdzili istotnie podwyższone stężenie ADMA ( $p=0,028$ ) u pacjentów z płucną postacią  $\dot{V}ChZZ$ <sup>129</sup>. W prezentowanej pracy, stężenia ADMA wykazywały tendencję do wyższych wartości u pacjentów po OZP w porównaniu do osób z grupy kontrolnej (0,51  $\mu\text{mol/l}$  (0,20-0,84) vs. 0,38  $\mu\text{mol/l}$  (0,12-0,82);  $p = 0,09$ ). Co, ciekawe, było to jedyny biomarker dysfunkcji śródbłonna różniący pacjentów ze sprowokowaną i niesprowowokowaną OZP: 0,48  $\mu\text{mol/l}$  (0,20-0,62) vs 0,55  $\mu\text{mol/l}$  (0,23-0,84),  $p = 0,1$ .

#### **7.1.3.2 Cząsteczki adhezyjne: sICAM-1 i sVCAM-1**

Cząsteczki ICAM-1 oraz VCAM-1 mają budowę molekularną, przypominającą immunoglobuliny, są śródbłonkowymi receptorami dla integryn, eksponowanych na leukocytach i płytkach krwi, przez co, uczestniczą w adhezji krążących leukocytów. Podwyższone stężenia cząsteczek adhezyjnych współwystępują z blaszkami

miażdżycowymi<sup>130</sup>. Wykrywano również rozpuszczalne formy VCAM-1, ICAM-1 i selektyny E w związku z toczącymi się procesami zapalnymi<sup>130</sup>. Obie te cząsteczki adhezyjne były badane u chorych z hipercholesterolemią, u których obserwowano podwyższone stężenia ICAM-1, natomiast nie wykazano na ogół związku VCAM-1 z dyslipidemią<sup>131,132</sup>, poza jednym badaniem, w którym stężenie sVCAM-1 było istotnie wyższe<sup>133</sup>. Warto dodać, że wysokie poziomy sICAM-1 i sVCAM-1 są związane z niskim stężeniem HDL<sup>134</sup>. Z kolei związek niskich stężeń HDL z dysfunkcją śródbłónka potwierdza także korelacja stężenia HDL z rozszerzalnością tętnicy ramiennej<sup>135</sup>. U otyłych chorych obserwowano wysokie stężenia sICAM-1, zaś redukcja masy ciała powodowała zmniejszenie poziomu sICAM-1<sup>136</sup>. Co ciekawe stężenia sICAM-1 zmniejszają się także po leczeniu statyną<sup>137</sup>, natomiast stężenie sVCAM-1 pozostaje bez zmian. Nawet umiarkowane przewlekłe palenie papierosów jest związane z wyższym stężeniem sICAM-1<sup>138,139</sup>, natomiast porzucenie nałogu skutkuje gwałtownym spadkiem stężenia tej cząsteczki<sup>140</sup>. W cukrzycy typu 2 stwierdzano podwyższone stężenia sVCAM-1, które korelowały z glikemią na czczo, stężeniem peptydu C i insulinowrażliwością<sup>141</sup>. W badaniu NHS (Nurses' Health Study) obejmującym 121 700 pacjentów, stężenie sICAM-1 było predyktorem wystąpienia cukrzycy, natomiast poziom sVCAM-1 nie miał znaczenia w przewidywaniu tej choroby<sup>142</sup>. U pacjentów po 65 roku życia, bez chorób układu krążenia podwyższone stężenie sICAM-1 było związane z wyższym ryzykiem zgonu z jakiegokolwiek przyczyny, natomiast związek sICAM-1 i zgonem z powodu przyczyn sercowo-naczyniowych był istotny tylko dla kobiet<sup>143</sup>. W grupie osób po zabiegu chirurgicznym stężenie sVCAM-1, selektyny P i czynnika tkankowego było istotnie statystycznie wyższe ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,018$ ,  $p < 0,0028$  odpowiednio) u pacjentów z zakrzepicą żył głębokich w porównaniu do osób bez zakrzepicy<sup>144</sup>. W prezentowanej pracy pacjenci z wywiadem OZP mieli istotnie wyższe stężenie zarówno sICAM-1 jak i sVCAM-1 w porównaniu do ochotników z grupy kontrolnej. W jednym z dotychczas opublikowanych badań oceniającym sVCAM-1 u chorych z ŻChZZ, stwierdzono, że po ukończeniu 6-miesięcznego leczenia przeciwzakrzepowego, wyższe stężenia tego markera występują u chorych z nawrotem ZZG lub OZP (mediana 1115 (IQR: 1190) ng/ml (n=36) vs. 830 (IQR: 590) ng/ml (n=90),  $p < 0,01$ )<sup>108</sup>.

### **7.1.3.3 Selektyna E**

Selektyna E jest kluczową cząsteczką regulującą wiązanie leukocytów do uszkodzonej części śródbłonna, pośredniczy w rekrutacji krążących leukocytów, procesie „toczenia” i adhezji<sup>109</sup>. Selektyna E jest biomarkerem dysfunkcji śródbłonna. W większości badań stężenia rozpuszczalnej selektyny E były podwyższone u chorych z niestabilną chorobą wieńcową lub zawałem serca w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej<sup>105,106,115,116</sup>. Wysokie poziomy rozpuszczalnej selektyny E występują również częściej u chorych z nadciśnieniem tętniczym<sup>113,118</sup>. Selektyna E wykazuje silną korelację z BMI i ilością tkanki tłuszczowej<sup>136</sup>, czego nie stwierdzono w danej grupie badanej, mimo różnicy BMI, jej stężenie było podobne. W dotychczasowych pracach zwracano uwagę, że wyższe stężenia rozpuszczalnej selektyny E występują u chorych z cukrzycą<sup>117</sup>. W badaniu NHS w populacji 127 100 kobiet stwierdzono też, że podwyższony poziom rozpuszczalnej selektyny E pozwala przewidywać wystąpienie cukrzycy<sup>117,142</sup>. W niniejszym badaniu nie stwierdzono różnicy w stężeniach selektyny E między badanymi grupami, zarówno między grupą po OZP i grupą kontrolną, ani między pacjentami po przebytej sprowokowanej i niesprowokowanej OZP. Brak jest doniesień, na temat selektyny E wśród pacjentów z ŻChZZ, do których moglibyśmy odnieść przedstawiane obserwacje. Potrzebne są dalsze badania pozwalające określić znaczenie i rolę selektyny E u pacjentów z ŻChZZ.

### **7.1.4 Podsumowanie oceny funkcji śródbłonna u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo - zatorową**

W omawianym badaniu po raz pierwszy, stosując kompleksową ocenę, zarówno ultrasonograficzną, jak i oznaczenie biomarkerów, wykazano upośledzoną funkcję śródbłonna u pacjentów z ŻChZZ w porównaniu do dobranej pod względem wieku i płci grupy kontrolnej. Obserwacji dokonano na podstawie analizy starannie dobranej grupy chorych po OZP, poniżej 50 roku życia i po wykluczeniu stanów mogących wpływać na wynik oceny śródbłonna takich jak cukrzyca, czy przewlekła choroba nerek. Przedstawiane wyniki wydają się potwierdzać hipotezę, że dysfunkcja śródbłonna jest swoistym stanem często występującym u pacjentów z ŻChZZ. Jedyne, wcześniejsze badanie, wskazujące na obecność upośledzonej funkcji śródbłonna u chorych z ŻChZZ, było wykonane w znacznie mniejszej grupie chorych (28 pacjentów)<sup>20</sup>, do analizy włączono jedynie pacjentów z wywiadem idiopatycznej ŻChZZ, a ponadto byli to pacjenci istotnie starsi (średnio  $59 \pm 15$  lat) w porównaniu do omawianej grupy ( $38 \pm 11$  lat). Należy podkreślić, że wyniki oceny ultrasonograficznej rozszerzalności tętnicy ramiennej, wskazujące na obecność dysfunkcji

śródbłonka u 45% pacjentów z ŻChZZ, potwierdzone zostały wysokimi stężeniami biomarkerów. Stwierdzono istotnie wyższe stężenie sVCAM-1 i sICAM-1 u chorych po OZP w stosunku do grupy kontrolnej. Rozszerzalność tętnicy ramiennej indukowanej przepływem (FMD%) odwrotnie korelowała z wymiarami ciała, czyli ze wzrostem ( $r = -0,35$ ;  $p = 0,001$ ), masą ciała ( $r = -0,38$ ;  $p < 0,001$ ) i wskaźnikiem masy ciała ( $r = -0,23$ ;  $p < 0,05$ ) u pacjentów po OZP. Potwierdza to, że otyłość częściowo może przyczyniać się do obecności dysfunkcji śródbłonka<sup>145</sup>, jednak istotne znaczenie ma także rozkład tkanki tłuszczowej i występowanie otyłości brzusznej<sup>146</sup>, co nie było oceniane w niniejszej pracy. Warto również zwrócić uwagę na istotnie lepszą funkcję śródbłonka u kobiet w porównaniu z mężczyznami (8,0%(2,0-23,9) vs. 5,3%(0,8-24,3);  $p=0,001$ ) w grupie pacjentów po OZP. Za jedynie niewielkim wpływem otyłości na funkcję śródbłonka w prezentowanej obserwacji przemawiają także brak zależności pomiędzy masą ciała czy BMI a biochemicznymi wskaźnikami funkcji śródbłonka oraz NMD.

## **7.2 Dysfunkcja śródbłonka w ocenie ryzyka nawrotu żyłnej choroby zakrzepowozatorowej**

Rozpoznanie niesprowokowanej ŻChZZ ma określone, istotne konsekwencje kliniczne. Zmienia stratyfikację ryzyka nawrotu, jak i zwiększa ryzyko nawrotu, przez co wpływa na decyzję dotyczącą czasu leczenia przeciwkrzepliowego<sup>4</sup>. U chorych z idiopatyczną OZP powinno się prowadzić leczenie antykoagulacyjne, przez co najmniej 3 miesiące, po tym czasie przewlekłą terapię przeciwkrzepliwą, należy rozważyć u pacjentów z pierwszym idiopatycznym epizodem ŻChZZ i niskim ryzykiem krwawienia<sup>4</sup>. Natomiast po drugim idiopatycznym epizodzie ŻChZZ zaleca się stosowanie „bezterminowej antykoagulacji”<sup>4</sup>. Oszacowanie ryzyka nawrotu ŻChZZ jest procesem złożonym, wymaga rozważenia wielu zmiennych, niektórych nieprecyzyjnie określonych, a także wyników badań obrazowych i laboratoryjnych<sup>33</sup>. Na podstawie danych historycznych szacowane ryzyko nawrotu, po zakończeniu leczenia przeciwkrzepliowego, wynosi około 10% rocznie, ale było zwiększone, w przypadku choroby nowotworowej, trombofilii oraz gdy utrzymywał się przejściowy czynnik ryzyka predysponujący do ŻChZZ<sup>28</sup>. Stratyfikacja ryzyka nawrotu ŻChZZ jest bardziej złożona po idiopatycznym epizodzie, niż po sprowokowanym<sup>28</sup>. W nowszych badaniach, porównujących dabigatran i warfarynę, nawrót ŻChZZ lub zgon w przebiegu OZP wystąpiły u 2,3% chorych leczonych dabigatranem i 2,2% pacjentów stosujących warfarynę w czasie 6-miesięcznej obserwacji<sup>34</sup>. Podobną częstość nawrotów ŻChZZ stwierdzono u pacjentów z OZP leczonych rywaroksabanem 2,1%, w porównaniu z 1,8% w grupie



warfaryny<sup>147</sup>. Z kolei w badaniu porównującym edoksaban i warfarynę, w którym badany lek podawano przez okres 3–12 miesięcy, a wszystkich pacjentów obserwowano przez 12 miesięcy, wskaźnik nawrotów ŻChZZ wynosił 3,3% w grupie edoksabanu i 6,2% w grupie warfaryny (HR 0,52; 95% CI 0,28–0,98)<sup>148</sup>.

W czasie obserwacji pacjentów po ocenie funkcji śródbłonna, stwierdzono 19 nawrotów ŻChZZ. Wszystkie te epizody wystąpiły u pacjentów niestosujących leczenia przeciwkrzepliwego. Piętnaście (35% kobiet) nawrotów wystąpiło u pacjentów po przebytych niesprowokowanym epizodzie OZP, a tylko 4 (100% kobiet) u osób z wywiadem sprowokowanej OZP. Nasze wyniki wykazały istotny związek nawrotu ŻChZZ z niskim stężeniem selektyny E i wysokim stężeniem sICAM-1. Ponadto, udało nam się zidentyfikować punkty odcięcia pozwalające wykluczyć ryzyko nawrotu choroby z bardzo wysoką negatywną wartością predykcyjną. Punkt odcięcia < 39 ng/ml dla selektyny E charakteryzował się 32% PPV oraz 96% NPV, natomiast punkt odcięcia > 655 ng/ml dla sICAM-1 pozwalał w 32% przewidywać nawrót ŻChZZ i w 91% wykluczyć. Rozważając obydwa biomarkery i dodatkowo biorąc pod uwagę niesprowokowaną postać OZP można jeszcze lepiej ocenić ryzyko nawrotu ŻChZZ. Nasze wyniki są zgodne z doniesieniami Jilma i współautorów<sup>120</sup>, którzy opisali związek między homozygotycznym polimorfizmem nukleotydu Ser128Arg, w ludzkim genie dla selektyny E i nawrotem ŻChZZ<sup>120</sup>. Brak jednak danych, czy homozygoty mają obniżone, czy podwyższone stężenie selektyny E<sup>120</sup>. Na podstawie modelu mysiego wykazano, że E selektyna wzmacnia odpowiedź prozakrzepową i nasila działanie selektyny P<sup>149</sup>. Nie zostały, jak dotąd, opublikowane wyniki innych badań na temat zależności między selektyną E, a ŻChZZ. Co ciekawe, jedyną cytokiną, dla której opisywano już związek z nawrotami ŻChZZ jest sVCAM-1. Stwierdzono, że po ukończeniu 6-miesięcznego leczenia przeciwzakrzepowego ŻChZZ, wyższe stężenia sVCAM-1 występują u chorych, u których doszło do nawrotu ŻŻG lub OZP<sup>108</sup>.

### **7.3 Funkcja śródbłonna i przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne**

Najistotniejszym odległym powikłaniem zatorowości płucnej jest przewlekłe zakrzepowo-zatorowe nadciśnienie płucne, występujące u ok. 0,1–9,1% chorych po 2 latach od OZP<sup>43</sup>. W niniejszej obserwacji prowadzonej po ocenie funkcji śródbłonna tylko u 1 pacjenta po OZP doszło do rozwoju PZZNP. Trudno na tej podstawie wyciągać wnioski, choć rzeczywiście wartości FMD (5%) i NMD (7%) były niskie u tego chorego, natomiast oznaczone stężenie sVCAM-1 (956,25 ng/ml) i ADMA (0,667 μmol/l) wysokie. Przyczyna braku rekanalizacji w krążeniu płucnym, mimo leczenia przeciwkrzepliwego, jest nie w pełni poznana. Badania na

modelach zwierzęcych wskazują na związek dysfunkcji śródbłonna z przebudową naczyń płucnych<sup>44</sup>. Wykazano zmniejszoną aktywność syntazy tlenku azotu<sup>150</sup> w przewlekłej zakrzepicy w krążeniu płucnym i zwiększone stężenie endoteliny-1<sup>151</sup>, a także zwiększoną ekspresję receptorów dla ET(B)<sup>152</sup>. Reesink i wsp. stwierdzili korelację między stężeniem ET-1 u pacjentów z PZZNP przed endarterektomią tętnic płucnych, a stanem hemodynamicznym. Według tych autorów poziom ET-1 może być przydatny w przewidywaniu przetrwałego nadciśnienia płucnego<sup>153</sup>.

#### **7.4 Dysfunkcja śródbłonna – prawdopodobny, wspólny patomechanizm rozwoju żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej i miażdżycy**

Dobrze znane czynniki ryzyka chorób tętnic, zwłaszcza miażdżycy, takie jak palenie tytoniu, otyłość, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze i cukrzyca są również czynnikami ryzyka ŻChZZ<sup>4</sup>. W dotychczas publikowanych pracach wykazano także, częstsze występowanie bezobjawowych blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych u pacjentów z idiopatyczną ŻChZZ (47,1 %), niż u chorych z epizodem związanym z przejściowymi czynnikami ryzyka (27,4 %) i w dopasowanej pod względem wieku i płci grupie kontrolnej (32,0 %)<sup>51</sup>. Becattini i współautorzy zwrócili uwagę, że u pacjentów po idiopatycznej OZP częściej dochodzi do zdarzeń sercowo-naczyniowych w porównaniu z chorymi z zatorowością płucną związaną z przemijającymi czynnikami ryzyka<sup>53</sup>. Zdarzenia sercowo-naczyniowe zdefiniowane jako nawrót zatorowości płucnej, ostry zawał serca, udar mózgu i nagły zgon o niewyjaśnionej przyczynie, wystąpił u 47 spośród 209 pacjentów z idiopatyczną zatorowością płucną (7,5 % pacjentów/rok) i u 17 ze 151 chorych z zatorowością płucną związaną z przejściowymi czynnikami ryzyka (3,1 % pacjentów/rok) (RR 2,0; 95% CI 1,20–3,34; p=0.006)<sup>53</sup>. U 20 chorych z idiopatyczną OZP (3,2% pacjentów/rok) i 2 z OZP związaną z przejściowymi czynnikami ryzyka (0,4% pacjentów/rok) wystąpiły zdarzenia sercowo-naczyniowe w układzie tętniczym (RR 7,2; 95% CI 1,71–30,45; p=0.001)<sup>53</sup>. Natomiast Sorensen i wsp stwierdzili większe roczne ryzyko zawału i udaru u pacjentów po przebytej ZŻG (odpowiednio RR 1,60 i 2,19)<sup>54</sup>. Jeszcze częściej nagłe zdarzenia sercowo-naczyniowe występowały rok po przebytej OZP [zawał serca RR 2.60 (2.14-3.14), udar mózgu 2.93 (2.34-3.66)]<sup>54</sup>. Ryzyko nagłych zdarzeń podwyższało się w ciągu 20 lat obserwacji i powodowało 20-40% wzrost ryzyka wystąpienia zawału, bądź udaru, i nie różniło pomiędzy pacjentami z idiopatycznym lub sprowokowanym epizodem ŻChZZ<sup>54</sup>. Z drugiej strony rozpoznanie choroby serca powoduje wzrost krótkoterminowego ryzyka wystąpienia OZP, niezwiązanej z

zakrzepicą żył głębokich<sup>14</sup>. Ponadto w pojedynczych publikacjach wykazano, że leki, rutynowo stosowane u pacjentów z chorobą wieńcową, takie jak kwas acetylosalicylowy, czy statyny, zmniejszają ryzyko nawrotu ŻChZZ<sup>154,155,156</sup>, co również przemawia za wspólną etiologią choroby wieńcowej i ŻChZZ. Prawdopodobnie młody wiek, pacjentów włączonych do naszego badania, był przyczyną, że nie obserwowaliśmy zdarzeń sercowo-naczyniowych w układzie tętniczym. Warto jednak podkreślić, że w innych pracach z naszego ośrodka na starszych grupach chorych wykazano, częstsze występowanie istotnych zwężeń w tętnicach wieńcowych u pacjentów z nieoperacyjnym PZZNP, niż u pacjentów po przebytej OZP bez PZZNP (54.5% vs. 16.7%,  $p < 0.01$ )<sup>157</sup>. Ta grupa miała ryzyko choroby wieńcowej OR = 5.9, 95% (CI: 1.64–21.46,  $p = 0.007$ )<sup>157</sup>. Powyższe obserwacje sugerują wspólną etiologię chorób naczyń tętniczych i żylnych, a ŻChZZ można postrzegać jako część kontinuum chorób układu krążenia.

### **7.5. Ograniczenia pracy**

Głównym ograniczeniem pracy jest jednoośrodkowy charakter badania oraz fakt, że ocena funkcji śródbłonna została wykonana po ostrym epizodzie ŻChZZ. Uzyskane wyniki można interpretować zarówno jako konsekwencje przebytej OZP, jak i jej przyczynę, ponieważ pacjenci byli badani po fakcie. Z drugiej strony wydaje się nieprawdopodobne, aby zlokalizowana w krążeniu płucnym zakrzepica mogła mieć wpływ na funkcję śródbłonna ocenianą na podstawie rozszerzalności tętnicy ramiennej. Wreszcie wybrany moment badania śródbłonna wydaje się optymalny, ponieważ ocena w czasie OZP byłaby mało miarodajna, z powodu stosowanych leków i stresu, jaki towarzyszy pacjentowi, w związku z rozpoznaniem OZP i hospitalizacją. Koncepcja oceny funkcji śródbłonna 6 miesięcy po epizodzie OZP może być bardziej przydatna w zrozumieniu podstawowych mechanizmów, a z całą pewnością jest w pełni uzasadniona w przewidywaniu ryzyka nawrotu ŻChZZ. Dalsze ograniczenia pracy wynikają z zmienności i ograniczeń stosowanych metod badawczych. Omawiając ograniczenia naszej pracy musimy również zwrócić uwagę, że funkcję śródbłonna u pacjentów z ŻChZZ ocenialiśmy stosując badanie rozszerzalności tętnicy. Jednak badanie zmiany wymiaru tętnicy ramiennej pod wpływem zwiększonego przepływu jest aktualnie złotym standardem i jako badanie nieinwazyjne jest szeroko stosowane w różnych grupach pacjentów, a szczegółowe wytyczne zostały opublikowane już w 2002r. Poza tym, istnieje wiele danych sugerujących wspólną etiologię ŻChZZ i miażdżycy, którą być może jest właśnie dysfunkcja śródbłonna. Ponadto dysfunkcję śródbłonna potwierdziliśmy badaniami biochemicznymi.

## **VIII. WNIOSKI**

1. U pacjentów z ŻChZZ można oceniać funkcję śródbłónka przy zastosowaniu małoinwazyjnych pomiarów rozszerzalności tętnicy ramiennej oraz biomarkerów funkcji śródbłónka.
2. Dysfunkcja śródbłónka oszacowana za pomocą ultrasonograficznej oceny rozszerzalności tętnicy ramiennej i na podstawie podwyższonego stężenia biomarkerów występuje częściej u pacjentów z ŻChZZ, niż w grupie kontrolnej.
3. Wysokie stężenie sICAM-1 i niskie stężenie selektyny E jest związane ze zwiększonym ryzykiem nawrotu ŻChZZ i przedłużonym leczeniem przeciwzakrzepowym.

## IX. PIŚMIENNICTWO

1. Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, Agnelli G, Galie N, Pruszczyk P, Bengel F, Brady AJ, Ferreira D, Janssens U, Klepetko W, Mayer E, Remy-Jardin M, Bassand JP. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* Sep 2008;29:2276–315.
2. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction. Testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285-1295.
3. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109(suppl III):27-32.
4. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, Gibbs JS, Huisman MV, Humbert M, Kucher N, Lang I, Lankeit M, Lekakis J, Maack C, Mayer E, Meneveau N, Perrier A, Pruszczyk P, Rasmussen LH, Schindler TH, Svitil P, Vonk Noordegraaf A, Zamorano JL, Zompatori M. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 35(43):3033-69.
5. SIGN (Scottish Intercollegiate Guidelines Network). Risk Estimation and the Prevention of Cardiovascular Disease. A National Clinical Guideline. 2007. Report No. 97. <http://www.sign.ac.uk/pdf/sign97.pdf>.
6. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, Greer IA, Heit JA, Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost*, 2007; 98: 756–764.
7. Stein PD, Henry JW. Prevalence of acute pulmonary embolism among patients in a general hospital and at autopsy. *Chest*, 1995; 108: 978–981.
8. Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008; 28: 370–372
9. Pruszczyk P, Ciużyński M, Kostrubiec M. Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa. Wydanie I, Warszawa, Medical Tribune Polska 2012
10. Kroegel C, Reissig A. Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Respiration* 2003; 70:7-30.

11. López AJ, Kearon C, Lee A.Y. Deep vein thrombosis. *Hematology Am Soc Hemtol Educ Program*, 2004: 439-56.
12. Anderson FA Jr., Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation*, 2003; 107 (23 suppl. 1): I9–I16.
13. Prandoni P, Pesavento R, Sorensen HT, Gennaro N, Dalla Valle F, Minotto I, Perina F, Pengo V, Pagnan A. Prevalence of heart diseases in patients with pulmonary embolism with and without peripheral venous thrombosis: findings from a cross-sectional survey. *Eur J Intern Med*, 2009; 20: 470–473.
14. Sørensen HT, Horvath-Puho E, Lash TL, Christiansen CF, Pesavento R, Pedersen L, Baron JA, Prandoni P. Heart disease may be a risk factor for pulmonary embolism without peripheral deep venous thrombosis. *Circulation*, 2011; 124: 1435–1441.
15. Blanco-Molina A, Rota LL, Di Micco P, Brenner B, Trujillo-Santos J, Ruiz-Gamietea A, Monreal M; RIETE Investigators. Venous thromboembolism during pregnancy, postpartum or during contraceptive use. *Thromb Haemost*, 2010; 103: 306–311.
16. Henriksson P, Westerlund E, Wallen H, Brandt L, Hovatta O, Ekbom A. Incidence of pulmonary and venous thromboembolism in pregnancies after in vitro fertilisation: cross sectional study. *BMJ*, 2013; 346: e8632.
17. Severinsen MT, Kristensen SR, Johnsen SP, Dethlefsen C, Tjønneland A, Overvad K. Smoking and venous thromboembolism: a Danish follow-up study. *J Thromb Haemost*, 2009; 7: 1297–1303.
18. Enga KF, Braekkan SK, Hansen-Krone IJ, le Cessie S, Rosendaal FR, Hansen JB. Cigarette smoking and the risk of venous thromboembolism: the Tromso Study. *J Thromb Haemost*, 2012; 10: 2068–2074.
19. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial Dysfunction: A Marker of Atherosclerotic Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:168-175.
20. Migliacci R, Becattini C, Pesavento R, Davi G, Vedovati MC, Guglielmini G, Falcinelli E, Ciabattini G, Dalla Valle F, Prandoni P, Agnelli G, Gresele P. Endothelial dysfunction in patients with spontaneous venous thromboembolism. *Haematologica*. 2007 Jun;92(6):812-8.
21. Kearon C. Natural history of venous thromboembolism. *Circulation*, 2003; 107 (23 suppl. 1): I22–I30.
22. Sanchez O, Helley D, Couchon S, Roux A, Delaval A, Trinquart L, Collignon MA, Fischer AM, Meyer G. Perfusion defects after pulmonary embolism: risk factors and clinical significance. *J Thromb Haemost*, 2010; 8: 1248–1255.

23. Dalen JE. Pulmonary embolism: what have we learned since Virchow? Natural history, pathophysiology, and diagnosis. *Chest*, 2002; 122: 1440–1456.
24. Nicolaides AN, Allegra C, Bergan J. Management of chronic venous disorders of the lower limbs. Guidelines according to scientific evidence. *IntAngiol* 2008;27:1-59.
25. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3<sup>rd</sup>. Predictors of survival after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based, cohort study. *Arch Intern Med*. 1999 Mar 8;159(5):445-53.
26. Goldhaber SZ, Visani L, De Rosa M. Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry (ICOPER). *Lancet*, 1999; 353: 1386–1389.
27. Laporte S, Mismetti P, Decousus H, Uresandi F, Otero R, Lobo JL, Monreal M; RIETE Investigators. Clinical predictors for fatal pulmonary embolism in 15,520 patients with venous thromboembolism: findings from the Registro Informatizado de la Enfermedad TromboEmbolica venosa (RIETE) Registry. *Circulation*, 2008; 117:1711–1716.
28. Kyrle PA, Rosendaal FR, Eichinger S. Risk assessment for recurrent venous thrombosis. *Lancet*, 2010; 376: 2032–2039.
29. Iorio A, Kearon C, Filippucci E, Marcucci M, Macura A, Pengo V, Siragusa S, Palareti G. Risk of recurrence after a first episode of symptomatic venous thromboembolism provoked by a transient risk factor: a systematic review. *Arch Intern Med*, 2010; 170: 1710–1716.
30. Agnelli G, Prandoni P, Becattini C, Silingardi M, Taliani MR, Miccio M, Imberti D, Poggio R, Ageno W, Pogliani E, Porro F, Zonzin P; Warfarin Optimal Duration Italian Trial Investigators. Extended oral anticoagulant therapy after a first episode of pulmonary embolism. *Ann Intern Med*, 2003; 139: 19–25.
31. Heit JA. Predicting the risk of venous thromboembolism recurrence. *Am J Hematol*, 2012; 87 (suppl. 1): S63–S67.
32. Grifoni S, Vanni S, Magazzini S, Olivotto I, Conti A, Zanobetti M, Polidori G, Pieralli F, Peiman N, Becattini C, Agnelli G. Association of persistent right ventricular dysfunction at hospital discharge after acute pulmonary embolism with recurrent thromboembolic events. *Arch Intern Med*, 2006; 166: 2151–2156.
33. Zhu T, Martinez I, Emmerich J. Venous thromboembolism: risk factors for recurrence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009; 29: 298–310.

34. Schulman S, Granqvist S, Holmstrom M, Carlsson A, Lindmarker P, Nicol P, Eklund SG, Nordlander S, Lärfars G, Leijd B, Linder O, Loogna E. The duration of oral anticoagulant therapy after a second episode of venous thromboembolism. The Duration of Anticoagulation Trial Study Group. *N Engl J Med*, 1997; 336: 393–398.
35. Heit JA, Lahr BD, Petterson TM, Bailey KR, Ashrani AA, Melton LJ 3rd. Heparin and warfarin anti-coagulation intensity as predictors of recurrence after deep vein thrombosis or pulmonary embolism: a population-based cohort study. *Blood*, 2011; 118: 4992–4999.
36. Douketis JD, Gu CS, Schulman S, Ghirarduzzi A, Pengo V, Prandoni P. The risk for fatal pulmonary embolism after discontinuing anticoagulant therapy for venous thromboembolism. *Ann Intern Med*, 2007; 147: 766–774.
37. Schulman S. The effect of the duration of anticoagulation and other risk factors on the recurrence of venous thromboembolisms. Duration of Anticoagulation Study Group. *Wien Med Wochenschr*, 1999; 149: 66–69.
38. Cosmi B, Legnani C, Tosetto A, Pengo V, Ghirarduzzi A, Testa S, Prisco D, Poli D, Tripodi A, Marongiu F, Palareti G. Usefulness of repeated D-dimer testing after stopping anticoagulation for a first episode of unprovoked venous thromboembolism: the PROLONG II prospective study. *Blood*, 2010; 115: 481–488.
39. Rodger MA, Kahn SR, Wells PS, Anderson DA, Chagnon I, Le Gal G, Solymoss S, Crowther M, Perrier A, White R, Vickars L, Ramsay T, Betancourt MT, Kovacs MJ. Identifying unprovoked thromboembolism patients at low risk for recurrence who can discontinue anticoagulant therapy. *CMAJ*, 2008; 179: 417–426.
40. Douketis J, Tosetto A, Marcucci M, Baglin T, Cosmi B, Cushman M, Kyrle P, Poli D, Tait RC, Iorio A. Risk of recurrence after venous thromboembolism in men and women: patient level meta-analysis. *BMJ*, 2011; 342: d813.
41. Lijfering WM, Veeger NJ, Middeldorp S, Hamulyák K, Prins MH, Büller HR, van der Meer J. A lower risk of recurrent venous thrombosis in women compared with men is explained by sex-specific risk factors at time of first venous thrombosis in thrombophilic families. *Blood*, 2009; 114: 2031–2036.
42. Becattini C, Agnelli G, Pesavento R, Silingardi M, Poggio R, Taliani MR, Ageno W. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after a first episode of pulmonary embolism. *Chest*, 2006; 130: 172–175.



43. Lang IM, Pesavento R, Bonderman D, Yuan JX. Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a current understanding. *Eur Respir J*, 2013; 41: 462–468.
44. Delcroix M, Vonk Noordegraaf A, Fadel E, Lang I, Simonneau G, Naeije R. Vascular and right ventricular remodelling in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 2013; 41: 224–232.
45. Firth AL, Yao W, Ogawa A, Madani MM, Lin GY, Yuan JX. Multipotent mesenchymal progenitor cells are present in endarterectomized tissues from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010; 298: C1217–C1225.
46. Bonderman D, Wilkens H, Wakounig S, Schäfers HJ, Jansa P, Lindner J, Simkova I, Martischinig AM, Dudczak J, Sadushi R, Skoro-Sajer N, Klepetko W, Lang IM. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 2009; 33: 325–331.
47. Galie` N, Kim NH. Pulmonary microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3: 571–576.
48. Wong CL, Szydlo R, Gibbs S, Laffan M. Hereditary and acquired thrombotic risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2010; 21: 201–206.
49. Klok FA, Dzikowska-Diduch O, Kostrubiec M, Vliegen HW, Pruszczyk P, Hasenfuß G, Huisman MV, Konstantinides S, Lankeit M. Derivation of a clinical prediction score for chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism. *J Thromb Haemost*. 2016 Jan;14(1):121-8.
50. Lewczuk J, Piszko P, Jagas J, Porada A, Wójciak S, Sobkowicz B, MD, Wrabec K, Prognostic Factors in Medically Treated Patients With Chronic Pulmonary Embolism. *Chest*. 2001;119(3):818-823.
51. Roik M, Wretowski D, Łabyk A, Kostrubiec M, Irzyk K, Dzikowska-Diduch O, Lichodziejewska B, Cieurzyński M, Kurnicka K, Gołębiowski M, Pruszczyk P. Refined balloon pulmonary angioplasty driven by combined assessment of intra-arterial anatomy and physiology--Multimodal approach to treated lesions in patients with non-operable distal chronic thromboembolic pulmonary hypertension-Technique, safety and efficacy of 50 consecutive angioplasties. *Int J Cardiol*. 2016 Jan 15;203:228-35.

52. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AW, Prins MH, Girolami A. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2003 Apr 10;348(15):1435-41.
53. Becattini C, Agnelli G, Prandoni P, Silingardi M, Salvi R, Taliani MR, Poggio R, Imberti D, Ageno W, Pogliani E, Porro F, Casazza F. A prospective study on cardiovascular events after acute pulmonary embolism. *Eur Heart J.* 2005 Jan;26(1):77-83.
54. Sørensen HT1, Horvath-Puho E, Pedersen L, Baron JA, Prandoni P. Venous thromboembolism and subsequent hospitalisation due to acute arterial cardiovascular events: a 20-year cohort study. *Lancet.* 2007 Nov 24;370(9601):1773-9.
55. Blann A.D. Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2003/2004; 33: 256–261.
56. Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol* 1998;82:3S-4S
57. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–376.
58. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H1145-1149.
59. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F193-F206.
60. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG: Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996;79:984-991.
61. Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, Cosentino F, Deanfield J, Gallino A, Ikonomidis I, Kremastinos D, Landmesser U, Protogerou A, Stefanadis C, Tousoulis D, Vassalli G, Vink H, Werner N, Wilkinson I, Vlachopoulos C. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011.
62. Hutcherson IR, Griffith TM. Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. *Am J Physiol* 1991;261:H257-262.
63. Sudha S. Shankar, Helmut O. Steinberg, Obesity and Endothelial Dysfunction *Seminars in Vascular Medicine* 2005; 5(1): 56-64

64. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993 Nov;88(5 Pt 1):2149-55
65. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE. Passive Smoking and Impaired Endothelium-Dependent Arterial Dilatation in Healthy Young Adults. *N Engl J Med* 1996; 334:150-155 January 18, 1996
66. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:567-74.
67. Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetology* 2006; 5:4.
68. Celermajer DS, Sorensen K, Ryalls M, Robinson J, Thomas O, Leonard JV, Deanfield JE. Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Sep;22(3):854-8.
69. Zeiher AM, Drexler H, Saubier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*. 1993 Aug;92(2):652-62
70. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994 Nov 15;24(6):1468-74.
71. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn MP, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*. 1990;86:228-34.
72. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Walsh BW, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 1994 Dec 15;121(12):936-41.
73. Charakida M, Donald AE, Green H, Storry C, Clapson M, Caslake M, Dunn DT, Halcox JP, Gibb DM, Klein NJ, Deanfield JE. Early structural and functional changes

- of the vasculature in HIV-infected children: impact of disease and antiretroviral therapy. *Circulation*. 2005 Jul 5;112(1):103-9. Epub 2005 Jun 27.
74. Fichtlscherer S1, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2000 Aug 29;102(9):1000-6.
  75. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1995;332:481–7.
  76. Nakamura K, Oe H, Kihara H, Shimada K, Fukuda S, Watanabe K, Takagi T, Yunoki K, Miyoshi T, Hirata K, Yoshikawa J, Ito H. DPP-4 inhibitor and alpha-glucosidase inhibitor equally improve endothelial function in patients with type 2 diabetes: EDGE study. *Cardiovasc Diabetol*. 2014; 13: 110.
  77. Heather M. Johnson, MD, Linda K. Gossett, MD, Megan E. Piper, PhD, Susan E. Aeschlimann, BS, Claudia E. Korcarz, DVM, Timothy B. Baker, PhD, Michael C. Fiore, MD, MPH, and James H. Stein, MD. Effects of Smoking and Smoking Cessation on Endothelial Function: One-Year Outcomes from a Randomized Clinical Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2010 May 4; 55(18): 1988–1995.
  78. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340:1111-1115.
  79. Miyamoto M1, Kotani K, Ishibashi S, Taniguchi N. The Effect of Antihypertensive Drugs on Endothelial Function as Assessed by Flow-Mediated Vasodilation in Hypertensive Patients. *Int J Vasc Med*. 2012;2012:453264.
  80. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986 Oct 23; 315(17):1046-51.
  81. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997;129:111-118
  82. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wöfl G, Kostner K, Maurer G, Weidinger F. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol*. 2000 Jul 15;86(2):207-10.

83. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*. 1997 Aug;30(2):325-33. Review.
84. Kopeć G, Podolec P, Podolec J, Rubiś P, Zmudka K, Tracz W. Atherosclerosis progression affects the relationship between endothelial function and aortic stiffness. *Atherosclerosis*. 2009 May;204(1):250-4
85. Chrzanowski L, Drozd J, Jedrzejewski K, Danilewicz M, Kasprzak JD, Ciesielczyk M, Lipiec P, Krzemińska-Pakuła M. [Intravascular ultrasound imaging and histological evaluation of the aorta]. *Przegl Lek*. 2004;61(6):563-6
86. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, Karas RH, Udelson JE. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J*. 2003 Jul;146(1):168-74.
87. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995;74:247–53.
88. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: A report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257-65.
89. Schroeder S, Enderle MD, Ossen R, Meisner C, Baumbach A, Pfohl M, Herdeg C, Oberhoff M, Haering HU, Karsch KR. Noninvasive determination of endothelium-mediated vasodilation as a screening test for coronary artery disease: Pilot study to assess the predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography, and myocardial perfusion imaging. *Am Heart J*. 1999 Oct;138(4 Pt 1):731-9.
90. Raitakari OT, Seale JP, Celermajer DS. Impaired vascular responses to nitroglycerin in subjects with coronary atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2001; 87: 217–219.
91. Akamatsu D, Sato A, Goto H, Watanabe T, Hashimoto M, Shimizu T, Sugawara H, Sato H, Nakano Y, Miura T, Zukeran T, Serizawa F, Hamada Y, Tsuchida K, Tsuji I, Satomi S. Nitroglycerin-mediated vasodilation of the brachial artery may predict long-term cardiovascular events irrespective of the presence of atherosclerotic disease, *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 1266-1274.

92. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004; 109: 1813-18.
93. Vallance P1, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992 Mar 7;339(8793):572-5.
94. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med*. 2005; 10 Suppl 1: S73-81.
95. Fliser D. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an 'uraemic toxin' to a global cardiovascular risk molecule. *European Journal of Clinical Investigation* (2005) 35, 71–79.
96. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998 Nov 3;98(18):1842-7.
97. Nijveldt RJ1, Teerlink T, van Leeuwen PA. The asymmetrical dimethylarginine (ADMA)-multiple organ failure hypothesis. *Clin Nutr*. 2003 Feb;22(1):99-104.
98. Schulze F, Lenzen H, Hanefeld C, Bartling A, Osterziel KJ, Goudeva L, Schmidt-Lucke C, Kusus M, Maas R, Schwedhelm E, Strödter D, Simon BC, Mügge A, Daniel WG, Tillmanns H, Maisch B, Streichert T, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am Heart J*. 2006 Sep;152(3):493.e1-8.
99. Haider DG, Bucek RA, Reiter M, Minar E, Hron G, Kyrle PA, Mittermayer F, Wolzt M. The cardiovascular risk marker asymmetrical dimethylarginine is not affected by venous thromboembolism. *Transl Res*. 2006 Jul;148(1):26-9
100. Kielstein JT, Bode-Böger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, Hoepfer MM. Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jul;25(7):1414-8. Epub 2005 Apr 28.
101. Ponthieux A1, Herbeth B, Drosch S, Haddy N, Lambert D, Visvikis S. Biological determinants of serum Icam-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study. *Atherosclerosis* 172, 299–308.
102. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993 Nov;171(3):223-9.

103. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 May;18(5):842-51.
104. Postadzhiyan AS1, Tzontcheva AV, Kehayov I, Finkov B. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes. *Clin Biochem.* 2008 Feb;41(3):126-33.
105. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy R, Crean P, Walsh M. Evidence of prolonged inflammation in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1210-6.
106. Güray U, Erbay AR, Güray Y, Yilmaz MB, Boyaci AA, Sasmaz H, Korkmaz S, Kütük E. Levels of soluble adhesion molecules in various clinical presentations of coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 2004 Aug;96(2):235-40.
107. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet.* 1998 Jan 10;351(9096):88-92.
108. González-Ordóñez AJ, Fernández-Carreira JM, Fernández-Alvarez CR, Venta Obaya R, Macías-Robles MD, González-Franco A, Arias Garcia MA. The concentrations of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and lipids are independently associated with venous thromboembolism. *Haematologica.* 2003 Sep;88(9):1035-43.
109. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res.* 1996 Sep;79(3):560-9.
110. Chase SD, Magnani JL, Simon SI. E-selectin ligands as mechanosensitive receptors on neutrophils in health and disease. *Ann Biomed Eng.* 2012 Apr;40(4):849-59. doi: 10.1007/s10439-011-0507-y. Epub 2012 Jan 24.
111. Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Sep 16;187(2):584-9.
112. Roldán V, Marín F, Lip GY, Blann AD. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. *Thromb Haemost.* 2003 Dec;90(6):1007-20.
113. Blann AD, McCollum CN. von Willebrand factor, endothelial cell damage and atherosclerosis. *Eur J Vasc Surg.* 1994 Jan;8(1):10-5.

114. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997 Dec 16;96(12):4219-25.
115. Mizia-Stec K, Mandecki T, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Okon K, Twardowski R. P-selectin and E-selectin in serum of patients with coronary artery disease. *Pol Arch Med Wewn*. 2001 Dec;106(6):1137-44.
116. Mizia-Stec K, Zahorska-Markiewicz B, Mandecki T, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Maj E. Serum levels of selected adhesion molecules in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 2002 May;83(2):143-50.
117. Cominacini L1, Fratta Pasini A, Garbin U, Davoli A, De Santis A, Campagnola M, Rigoni A, Zenti MG, Moghetti P, Lo Cascio V. Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM: relation to metabolic control. *Diabetologia*. 1995 Sep;38(9):1122-4.
118. DeSouza CA, Dengel DR, Macko RF, Cox K, Seals DR. Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1997 Dec;10(12 Pt 1):1335-41.
119. Kalra VK, Ying Y, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1994 Jul;160(1):154-62.
120. Jilma B, Kovar FM, Hron G, Endler G, Marsik CL, Eichinger S, Kyrle PA. Homozygosity in the single nucleotide polymorphism Ser128Arg in the E-selectin gene associated with recurrent venous thromboembolism. *Arch Intern Med*. 2006 Aug 14-28;166(15):1655-9.
121. Suzuki H, Matsuzawa Y, Konishi M, Akiyama E, Takano K, Nakayama N, Kataoka S, Ebina T, Kosuge M, Hibi K, Tsukahara K, Iwahashi N, Endo M, Maejima N, Shinohara K, Taki N, Mitsugi N, Taguri M, Sugiyama S, Ogawa H, Umemura S, Kimura K. Utility of noninvasive endothelial function test for prediction of deep vein thrombosis after total hip or knee arthroplasty. *Circ J*. 2014;78(7):1723-32.
122. Diabetologiczne PT. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2011. *Diabetologia Praktyczna* 2011;12, Supplement A.
123. Galiè N, Hoepfer MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz



- C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 2009; 34:1219–1263.
124. Kooijman M1, Thijssen DH, de Groot PC, Bleeker MW, van Kuppevelt HJ, Green DJ, Rongen GA, Smits P, Hopman MT. Flow-mediated dilatation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans. *J Physiol*. 2008 Feb 15;586(4):1137-45. Epub 2007 Dec 20.
125. Inaba Y1, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2010 Aug;26(6):631-40.
126. Mannion TC, Vita JA, Keaney JF Jr, Benjamin EJ, Hunter L, Polak JF. Non-invasive assessment of brachial artery endothelial vasomotor function: the effect of cuff position on level of discomfort and vaso-motor responses. *Vasc Med* 1998; 3: 263-267.
127. Serg M, Kampus P, Kals J, Zagura M, Muda P, Tuomainen TP, Zilmer K, Salum E, Zilmer M, Eha J. Association between asymmetric dimethylarginine and indices of vascular function in patients with essential hypertension. *Blood Press*. 2011 Apr;20(2):111-6.
128. Nakhjavani M, Karimi-Jafari H, Esteghamati A, Khalilzadeh O, Asgarani F, Ghadiri-Anari A. ADMA is a correlate of insulin resistance in early-stage diabetes independent of hs-CRP and body adiposity. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2010 Sep;71(4):303-8.
129. Halici B, Sarinc Ulasli S, Günay E, Nural S, Sen S, Akar O, Celik S, Unlu M. Assessment of inflammatory biomarkers and oxidative stress in pulmonary thromboembolism: follow-up results. *Inflammation*. 2014 Aug;37(4):1186-90.
130. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. 1993 Oct;14(10):506–512.
131. Sampietro T, Tuoni M, Ferdeghini M, Ciardi A, Maraccini P, Prontera C, Sassi G, Taddei M, Bionda A. Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1997;96:1381–1385.
132. Hackman A, Abe Y, Insull W, Pownall H, Smith L, Dunn K, Gotto AM, Ballantyne CM. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidaemia. *Circulation*. 1996;93:1334–1338.
133. Desideri G, Marinucci MC, Tomassoni G, Masci PG, Santucci A, Ferri C. Vitamin E supplementation reduces plasma vascular cell adhesion molecule-1 and von

- Willebrand factor levels and increases nitric oxide concentrations in hypercholesterolemic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2940-5.
134. Lupattelli G, Marchesi S, Lombardini R, Siepi D, Bagaglia F, Pirro M, Ciuffetti G, Schillaci G, Mannarino. Mechanisms of high-density lipoprotein cholesterol effects on the endothelial function in hyperlipemia. *E Metabolism.* 2003 Sep;52(9):1191-5.
  135. Toikka JO, Ahotupa M, Viikari JS, Niinikoski H, Taskinen M, Irjala K, Hartiala JJ, Raitakari OT. Constantly low HDL-cholesterol concentration relates to endothelial dysfunction and increased in vivo LDL-oxidation in healthy young men. *Atherosclerosis.* 1999 Nov 1;147(1):133-8.
  136. Ito H, Ohshima A, Inoue M, Ohto N, Nakasuga K, Kaji Y, Maruyama T, Nishioka K. Weight reduction decreases soluble cellular adhesion molecules in obese women. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002 May-Jun;29(5-6):399-404.
  137. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2002 May;162(1):179-85
  138. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. 2002. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol* 89: 1117.
  139. Bergmann S1, Siekmeier R, Mix C, Jaross W. Even moderate cigarette smoking influences the pattern of circulating monocytes and the concentration of sICAM-1. *Respir Physiol.* 1998 Dec;114(3):269-75.
  140. Rohde LE1, Lee RT, Rivero J, Jamacochian M, Arroyo LH, Briggs W, Rifai N, Libby P, Creager MA, Ridker PM. Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Nov;18(11):1765-70.
  141. Matsumoto K, Sera Y, Ueki Y, Inukai G, Niiro E, Miyake S. Comparison of serum concentrations of soluble adhesion molecules in diabetic microangiopathy and macroangiopathy. *Diabet Med.* 2002 Oct;19(10):822-6
  142. Meigs JB1, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2004 Apr 28;291(16):1978-86.
  143. Jenny NS, Arnold AM, Kuller LH, Sharrett AR, Fried LP, Psaty BM, Tracy RP. Soluble intracellular adhesion molecule-1 is associated with cardiovascular disease risk and mortality in older adults. *J Thromb Haemost.* 2006 Jan;4(1):107-13.

144. Smith A, Quarmby JW, Collins M, Lockhart SM, Burnand KG. Changes in the levels of soluble adhesion molecules and coagulation factors in patients with deep vein thrombosis, *Thromb Haemost*, 82 (1999), 1593–1599.
145. Olson TP, Schmitz KH, Leon AS, Dengel DR. Vascular structure and function in women: relationship with body mass index. *Am J Prev Med*. 2006 Jun;30(6):487-92.
146. Brook RD, Bard RL, Ruberfire M, Ridker PM, Rajagopalan S. Usefulness of visceral obesity (waist/hip ratio) in predicting vascular endothelial function in healthy overweight adults *Am J Cardiol*, 88 (2001), pp. 1264–1269.
147. EINSTEIN–PE Investigators, Büller HR, Prins MH, Lensin AW, Décousus H, Jacobson BF, Minar E, Chlumsky J, Verhamme P, Wells P, Agnelli G, Cohen A, Berkowitz SD, Bounameaux H, Davidson BL, Misselwitz F, Gallus AS, Raskob GE, Schellong S, Segers A Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. *N Engl J Med*, 2012; 366: 1287–1297.
148. Hokusai-VTE Investigators, Büller HR, Décousus H, Grosso MA, Mercuri M, Middeldorp S, Prins MH, Raskob GE, Schellong SM, Schwocho L, Segers A, Shi M, Verhamme P, Wells P. Edoxaban versus warfarin for the treatment of symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med*, 2013; 369: 1406–1415.
149. Myers D, Farris D, Hawley A, Wroblewski S, Chapman A, Stoolman L, Knibbs R, Strieter R, Wakefield T. Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis. *J. Surg. Res*, 2002. 108:212–21
150. Fadel E1, Mazmanian GM, Baudet B, Detruit H, Verhoye JP, Cron J, Fattal S, Dartevelle P, Herve P. Endothelial nitric oxide synthase function in pig lung after chronic pulmonary artery obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Oct;162(4 Pt 1):1429-34.
151. Kim H, Yung GL, Marsh JJ, Konopka RG, Pedersen CA, Chiles PG, Morris TA, Channick RN. Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2000;15:640–648.
152. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers HJ. Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation* 2002;105:1034–1036.
153. Reesink HJ, Lutter R, Kloek JJ, Jansen HM, Bresser P. Hemodynamic correlates of endothelin-1 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2004;24:110s.

154. Becattini C, Agnelli G, Schenone A, Eichinger S, Bucherini E, Silingardi M, Bianchi M, Moia M, Ageno W, Vandelli MR, Grandone E, Prandoni P. Aspirin for preventing the recurrence of venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2012; 366(21):1959–1967.
155. Brighton TA, Eikelboom JW, Mann K, Mister R, Gallus A, Ockelford P, Gibbs H, Hague W, Xavier D, Diaz R, Kirby A, Simes J. Low-dose aspirin for preventing recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2012;367(21):1979–1987.
156. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Ridker PM. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2009;360:1851–1861.
157. Roik M, Wretowski D, Kostrubiec M, Dzikowska-Diduch O, Łabyk A, Irzyk K, Lichodziejewska B, Wyzgał A, Jankowski K, Pruszczyk P. High prevalence of severe coronary artery disease in elderly patients with non-operable chronic thromboembolic pulmonary hypertension referred for balloon pulmonary angioplasty. *Postepy Kardiologii Interwencyjnej*. 2016;12(4):355-359.