

Maria Konarska-Król, Piotr Szpakowski, Piotr Kaźmierski, Andrzej Głąbiński

## Chemokiny CCL3 i CCL5 jako potencjalne markery stabilności blaszki miażdżycowej w tętnicach szyjnych – badania wstępne

### CCL3 and CCL5 as potential markers of carotid atherosclerotic plaque stability – preliminary research

Klinika Neurologii i Udarów Mózgu, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska  
Adres do korespondencji: Maria Konarska-Król, ul. Warszawska 86 m. 12, 91-503 Łódź, e-mail: mariakonarska1@wp.pl

#### ORCID iDs

1. Maria Konarska-Król  <https://orcid.org/0000-0002-3247-5284>
2. Piotr Szpakowski  <https://orcid.org/0000-0002-0189-7652>
3. Piotr Kaźmierski  <https://orcid.org/0000-0002-0592-5219>
4. Andrzej Głąbiński  <https://orcid.org/0000-0002-1305-1494>

#### Streszczenie

**Wprowadzenie:** Miażdżycza tętnic szyjnych jest jedną z głównych przyczyn udaru niedokrwiennego mózgu. Hipotezą weryfikowaną w badaniu było istnienie związku między ekspresją wybranych markerów zapalenia a stabilnością blaszki miażdżycowej w udarze mózgu. **Cel:** Cel pracy stanowiło zbadanie poziomu chemokin CCL3 i CCL5 w osoczu i w blaszkach miażdżycowych z tętnic szyjnych w odniesieniu do przebytego udaru niedokrwiennego mózgu oraz morfologii i stabilności blaszek. **Materiał i metody:** Poziom chemokin CCL3 i CCL5 oznaczano metodą ELISA w osoczu i w supernatantach z homogenatów blaszek miażdżycowych pobranych od pacjentów poddanych zabiegowi endarterektomii z powodu co najmniej 70-procentowego zwężenia światła tętnicy szyjnej. **Wyniki:** Stwierdzono obecność badanych chemokin w blaszkach miażdżycowych, a poziom chemokiny CCL3 był podwyższony w blaszkach niestabilnych. Dodatkowo pacjenci z miażdżycą wykazywali istotnie wyższy poziom chemokiny CCL5 w osoczu w porównaniu z osobami zdrowymi. **Wnioski:** Chemokiny CCL3 i CCL5 prawdopodobnie biorą udział w procesach zapalnych towarzyszących rozwojowi blaszki miażdżycowej, ale wymaga to potwierdzenia w dalszych badaniach.

**Słowa kluczowe:** udar mózgu, blaszka miażdżycowa, chemokiny, CCL3, CCL5

#### Abstract

**Introduction:** Carotid atherosclerosis is one of the main causes of ischaemic stroke. The study verified the hypothesis on the relationship between the expression of selected inflammatory markers and the stability of atherosclerotic plaque in stroke patients. **Aim:** The aim of the study was to determine CCL3 and CCL5 levels in both plasma and carotid atherosclerotic plaques in relation to the history of ischaemic stroke, as well as to assess plaque morphology and stability. **Materials and methods:** The levels of CCL3 and CCL5 chemokines were determined by ELISA for both plasma and supernatants of atherosclerotic plaque homogenates from patients undergoing endarterectomy due to at least 70% carotid artery stenosis. **Results:** Both chemokines were found in atherosclerotic plaques, with elevated CCL3 in unstable plaques. Furthermore, patients with atherosclerosis showed significantly higher plasma CCL5 compared to healthy individuals. **Conclusions:** The chemokines CCL3 and CCL5 are likely to be involved in the inflammatory processes contributing to the development of atherosclerotic plaque, but this needs to be confirmed in further studies.

**Keywords:** stroke, atherosclerotic plaque, chemokines, CCL3, CCL5

## WSTĘP

Udar mózgu charakteryzuje się wystąpieniem ogniskowych lub uogólnionych zaburzeń czynności mózgu na tle naczyniowym. Zgodnie z definicją zaproponowaną w 2013 roku przez Amerykańskie Towarzystwo Kardiologiczne (American Heart Association, AHA) i Amerykańskie Towarzystwo Udarowe (American Stroke Association, ASA) udar niedokrwienny mózgu można rozpoznać w przypadku obecności ostrych objawów ogniskowego uszkodzenia mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki i spełnienia co najmniej jednego z następujących kryteriów: patologiczne świeże ogniska niedokrwienia mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki w badaniu neuroobrazowym, utrzymywanie się objawów klinicznych ogniskowego uszkodzenia mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki przez co najmniej 24 godziny (lub ww. objawy prowadzące do zgonu), ustąpienie objawów ogniskowego uszkodzenia mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki w wyniku leczenia reperfuzyjnego (Błażejewska-Hyżorek *et al.*, 2019). Udar mózgu jest jedną z najczęstszych przyczyn niepełnosprawności i zgonów na świecie (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015). Ze względu na etiologię wyróżnia się udar niedokrwienny, krwotoczny, krwotok podpajęczynówkowy i zakrzepicę zatok żylnych; udar niedokrwienny mózgu występuje najczęściej. Do modyfikowalnych czynników ryzyka udaru niedokrwiennego należą: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, dyslipidemia, otyłość, nikotynizm; z kolei do niemodyfikowalnych czynników ryzyka zaliczamy wiek i czynniki genetyczne (O'Donnell *et al.*, 2010).

Zwężenie tętnic szyjnych, którego główną przyczyną są blaszki miażdżycowe, często prowadzi do udaru niedokrwiennego (Adams *et al.*, 2018). Miażdżycza tętnic szyjnych w odcinku zewnątrzczaszkowym odgrywa ważną rolę w etiologii udaru niedokrwiennego i jest czynnikiem ryzyka podlegającym leczeniu. Choroba ta wiąże się z postępującym, przewlekłym procesem zapalnym średnich i dużych tętnic (Hansson, 2005). Uznaje się, że zwężenie tętnic szyjnych na tle miażdżycowym odpowiada za około 20–25% udarów niedokrwiennych mózgu (Roger *et al.*, 2011). Pęknięcie i oderwanie się blaszki miażdżycowej i/lub skrzepiny spowodowane ich niestabilnością mogą skutkować całkowitym zamknięciem światła naczynia albo zmniejszeniem przepływu w tętnicy, a w dalszej konsekwencji – ostrym niedokrwieniem mózgowia (Członkowska i Grodzka, 2000).

Endarterektomia tętnic szyjnych (*carotid endarterectomy*, CEA) to inwazyjna metoda leczenia zwężenia tętnic szyjnych, mająca na celu poprawę krążenia mózgowego i zapobieganie udarom powstającym w mechanizmie zakrzepowozatorowym. Głównym celem zabiegu jest prewencja udaru niedokrwiennego mózgu. Endarterektomię definiuje się jako wycięcie zmian miażdżycowych błony wewnętrznej i środkowej tętnicy. Podstawą kwalifikacji do rewaskularyzacji tętnic szyjnych za pomocą CEA jest stopień zwężenia

naczynia, oceniany najczęściej w badaniu ultrasonograficznym metodą Dopplera. Badania kliniczne wykazały większą skuteczność endarterektomii tętnic szyjnych w prewencji udaru niedokrwiennego w porównaniu z leczeniem zachowawczym (Orrapin i Rerkasem, 2017). Dotyczy to zarówno pacjentów objawowych, jak i bezobjawowych ze zwężeniem tętnicy szyjnej. Według wytycznych opublikowanych w 2022 roku przez Towarzystwo Chirurgów Naczyniowych (Society for Vascular Surgery) w celu zmniejszenia ryzyka pierwszego lub kolejnego epizodu udaru niedokrwiennego mózgu zaleca się proponowanie CEA chorym ze zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej przekraczającym 50% i prezentującym homolateralne objawy niedokrwienia mózgu oraz chorym bezobjawowym o zwężeniu większym niż 70% (AbuRahma *et al.*, 2022). Jak wynika z badań, ryzyko wystąpienia epizodu niedokrwienia mózgu w ciągu 2 lat wynosiło u pacjentów poddanych endarterektomii 9%, podczas gdy u osób leczonych zachowawczo – 26% (Jonas *et al.*, 2014; Orrapin i Rerkasem, 2017).

Chemokiny (chemotaktyczne cytokiny) stanowią dużą grupę białek o małej masie cząsteczkowej (8–12 kDa) zaangażowanych w wiele procesów biologicznych: chemotaksję, angiogenezę, hematopoezę, homeostazę, degranulację leukocytów, aktywację procesów adhezyjnych czy embriogenezę (Chen *et al.*, 2018). Uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej i patogenezie chorób o podłożu zapalnym. Biorąc pod uwagę liczbę i wzajemne położenie reszt cysteinowych, chemokiny dzielimy na cztery grupy: CC-, CXC-, CX3C- i XC-, gdzie C oznacza resztę cysteinową, a X – dowolne reszty aminokwasowe. Wyróżnia się cztery grupy receptorów dla chemokin w zależności od ich ligandów: CCR, CXCR, CX3CR i XCR (Griffith *et al.*, 2014; Konarska-Król *et al.*, 2015). Chemokina CCL3, znana również jako MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein-1 alpha*), bierze udział w rekrutacji i aktywacji leukocytów do miejsca zapalenia poprzez interakcję z receptorami CCR1, CCR4 i CCR5. Wiele doniesień wskazuje na istotny udział CCL3 w patogenezie miażdżycy (Guan *et al.*, 2001). W proces miażdżycy zaangażowane są też inne chemokiny, wśród nich CCL5 (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, RANTES), której obecność można stwierdzić w blaszkach miażdżycowych. Chemokina CCL5 wykazuje aktywność hemotaktyczną dla eozynofiliów, bazofilów i limfocytów T, wchodząc w interakcję z receptorami CCR1, CCR3, CCR4 i CCR5; może być syntetyzowana i wydzielana przez płytki krwi, limfocyty T CD8+, komórki nabłonkowe, fibroblasty i inne (Herder *et al.*, 2011). Udowodniono udział CCL5 w patogenezie miażdżycy oraz innych chorób, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, stwardnienie rozsiane czy astma (Gonzalo *et al.*, 2000).

## CEL PRACY

Celem pracy była weryfikacja hipotezy, że reakcja zapalna towarzysząca miażdżycy wpływa na stabilność blaszki miażdżycowej i występowanie udaru niedokrwiennego

mózgu. Cel zrealizowano poprzez pomiar poziomu markerów zapalenia – chemokin prozapalnych CCL3 i CCL5 – w osoczu i blaszce miażdżycowej osób poddanych zabiegowi endarterektomii.

## MATERIAŁ I METODY

Blaszki miażdżycowe i krew pobrano od pacjentów hospitalizowanych w Oddziale Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Onkologicznej Wojewódzkiego Wielospecjalistycznego Centrum Onkologii i Traumatologii (WWCOiT) im. Mikołaja Kopernika w Łodzi. Chorzy włączeni do badania zostali zakwalifikowani do endarterektomii tętnicy szyjnej wewnętrznej z powodu zmian miażdżycowych powodujących co najmniej 70-procentowe zwężenie tętnicy. Z badania wykluczono pacjentów z migotaniem przedsionków, przebytym udarem krwotocznym i lakunarnym mózgu, chorobą autoimmunologiczną, hematologiczną albo nowotworową, aktywnym stanem zapalnym lub infekcją, niewydolnością nerek i niewydolnością wątroby. Ponadto do kryteriów wykluczających zaliczono zawał mięśnia sercowego czy zabieg operacyjny w ostatnich 12 miesiącach, leczenie immunosupresyjne w ostatnich 6 miesiącach, zakrzepicę żylną, niedożywienie, zatrucie, zespół zależności alkoholowej. Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu. Zabiegi endarterektomii tętnic szyjnych były wykonywane ze wskazań medycznych, niezależnie od toczącego się badania.

Do badania włączono 61 pacjentów – 35 mężczyzn i 26 kobiet – w wieku od 41 do 85 lat (średnia wieku: 66,4 roku). Przed zabiegiem chorzy byli poddawani neurologicznemu badaniu fizykalnemu z wykorzystaniem Skali Narodowego Instytutu Zdrowia (National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS). U osób, które przeżyły udar niedokrwienny mózgu, wykonano badanie tomograficzne mózgowia w celu oceny lokalizacji i rozległości zmian niedokrwiennych. Metodą ultrasonografii dopplerowskiej tętnic domózgowych oceniono stopień zwężenia tętnic szyjnych. Krew pobierano 24 godziny przed zabiegiem operacyjnym. Blaszki miażdżycowe uzyskane w trakcie endarterektomii były oceniane makroskopowo przez doświadczonych chirurgów naczyniowych pod kątem morfologii i klasyfikowane zgodnie z klasyfikacją blaszek miażdżycowych AHA, w której typ VI to blaszka owrzodziła (niestabilna), natomiast typy IV, V, VII i VIII to blaszki stabilne.

Grupę badaną poddano ocenie klinicznej i podzielono na pacjentów objawowych i bezobjawowych. Chorzy objawowi ( $n = 34$ ) to ci, którzy w ciągu 6 miesięcy przed zabiegiem przeżyli udar niedokrwienny mózgu lub przemijający mózgowy napad niedokrwienia (*transient ischaemic attack*, TIA) i u których objawy korespondowały ze zwężeniem tętnicy szyjnej. Pacjenci bezobjawowi nie prezentowali objawów neurologicznych związanych z niedokrwieniem mózgowia w ciągu 6 miesięcy przed endarterektomią. Chorzy bezobjawowi ( $n = 27$ ) operowani byli z powodu zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej od 70% do 99%

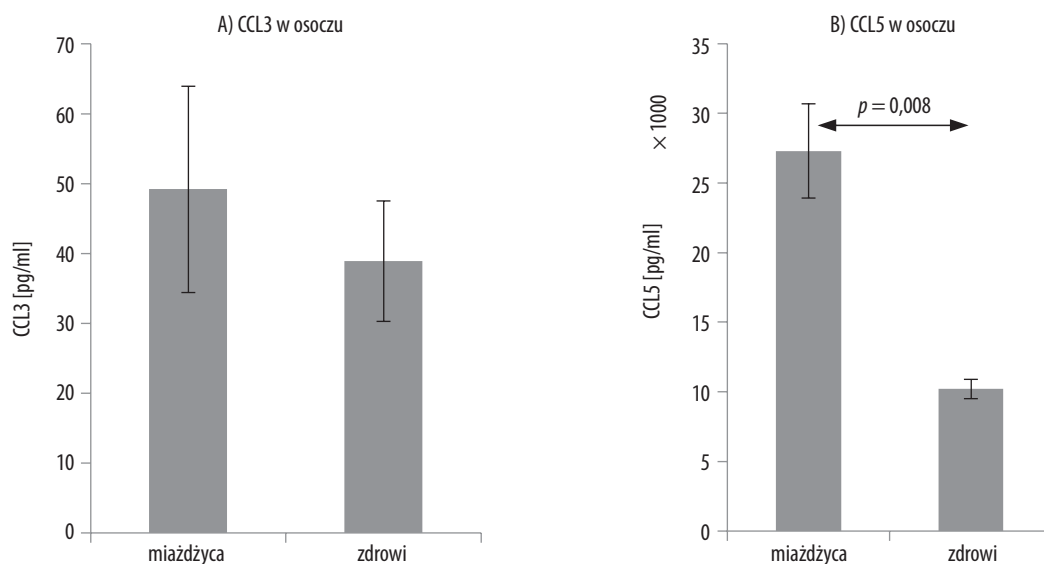
w ramach profilaktyki pierwotnej udaru niedokrwiennego mózgu. Wszyscy pacjenci przed zabiegiem i po nim przyjmowali statyny (inhibitory reduktazy HMG-CoA) i kwas acetylosalicylowy (150 mg). Grupę kontrolną ( $n = 33$ ), od której pobierano jedynie krew, stanowili zdrowi ochotnicy – bez mózgowego incydentu naczyniowego w wywiadzie, zmian miażdżycowych tętnic szyjnych (potwierdzonych w badaniu ultrasonograficznym metodą Dopplera tętnic domózgowych) i pozostałych schorzeń, które stanowiły kryteria wykluczające dla grupy badanej.

## Materiały biologiczne

Krew obwodową pobierano od uczestników badania w objętości 4 ml do probówki na antykoagulant ( $K_2$ EDTA) i odwirowywano ( $2000 \times g$ , 15', 4°C), następnie zbierano osocze i przechowywano je w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$  w celu wykonania oznaczeń metodą ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Blaszki miażdżycowe pobrane od pacjentów podczas endarterektomii umieszczano w buforze do ekstrakcji białek (Tissue Extraction Buffer II, Life Technologies) wzbogaconym o koktajl inhibitorów proteaz (cOmplete mini, Roche) i homogenizowano w homogenizatorze Ultra-Turrax (IKA Werke). Przed homogenizacją mechaniczną blaszki miażdżycowe były przepłukiwane w roztworze PBS, ważone, cięte nożyczkami na mniejsze części w sterylnych warunkach i homogenizowane w buforze do ekstrakcji białek z inhibitorami proteaz (0,5 ml buforu na 100 mg homogenizowanej tkanki). Każdą probówkę homogenizowano 4-krotnie w 1-minutowych cyklach z 20-minutowymi przerwami, z inkubacją w temperaturze 4°C. Następnie homogenaty blaszek miażdżycowych były odwirowywane ( $8000 \times g$ , 20', 4°C), a supernatanty – zbierane i przechowywane w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$  do późniejszych oznaczeń. W pomiarach poziomów chemokin CCL3 i CCL5 w osoczu i blaszkach miażdżycowych wykorzystano metodę ELISA. Wszystkie próbki badano dwukrotnie. Oznaczenia wykonano na płytkach typu *half-area* (Greiner) przy użyciu gotowych zestawów przeciwciał, według protokołów dostarczonych przez producentów. Otrzymane wyniki poziomu stężeń badanych chemokin znormalizowano w odniesieniu do wagi homogenizowanych blaszek miażdżycowych i liczby ekstraktów tkanek użytych do homogenizacji. Wszystkie badania prowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (nr zgody RNN/293/13/KB).

## Analiza statystyczna

W analizie statystycznej wykorzystano oprogramowanie Statistica 13.1. Do badania rozkładu normalnego użyto testu Shapiro–Wilka. Dla zmiennych z rozkładem normalnym w celu porównania grup zastosowano test Studenta. Do porównania grup dla zmiennych, które nie odpowiadały kryteriom dopasowania do rozkładu normalnego, posłużył nieparametryczny test *U* Manna–Whitneya.



Ryc. 1. Stężenie chemokin CCL3 (A) i CCL5 (B) w osoczu pacjentów z miażdżycą (grupa badana) w porównaniu z grupą kontrolną (zdrowi ochotnicy). Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM. Do porównania grup wykorzystano nieparametryczny test U Manna-Whitneya z powodu niespełniania założeń rozkładu normalnego (weryfikacja w teście Shapiro-Wilka)

## WYNIKI

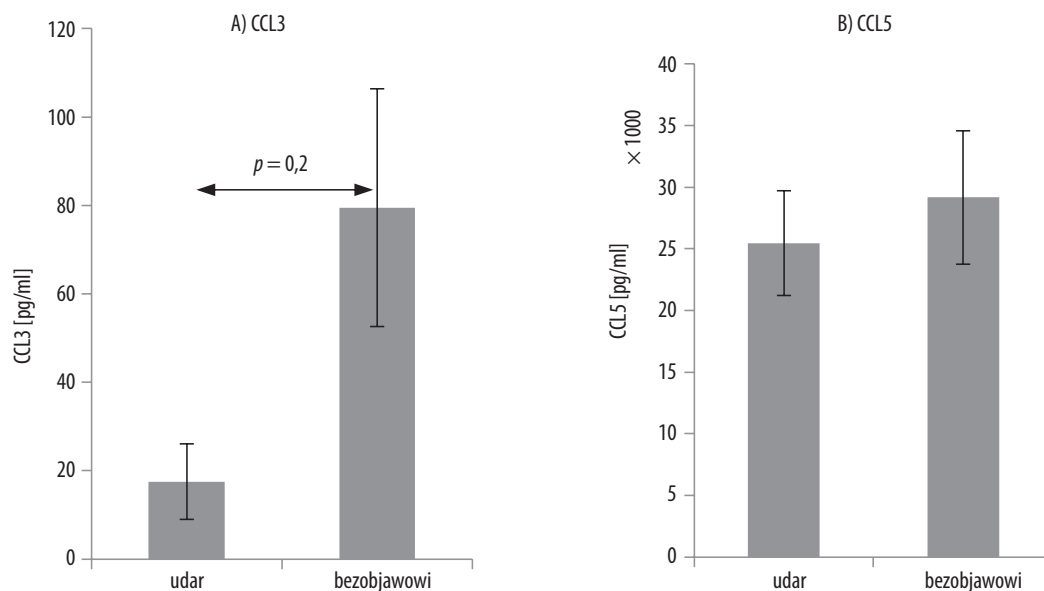
### Charakterystyka badanych grup

Przeprowadzono analizę krwi pobranej od 26 kobiet (43%) i 35 mężczyzn (57%) – pacjentów poddanych zabiegowi endarterektomii tętnicy szyjnej wewnętrznej z powodu co najmniej 70-procentowego jej zwężenia. Większą część stanowili chorzy objawowi ( $n = 34$ , 56%). Po endarterektomii blaszki miażdżycowe pobrane od 52% pacjentów zaklasyfikowano jako blaszki

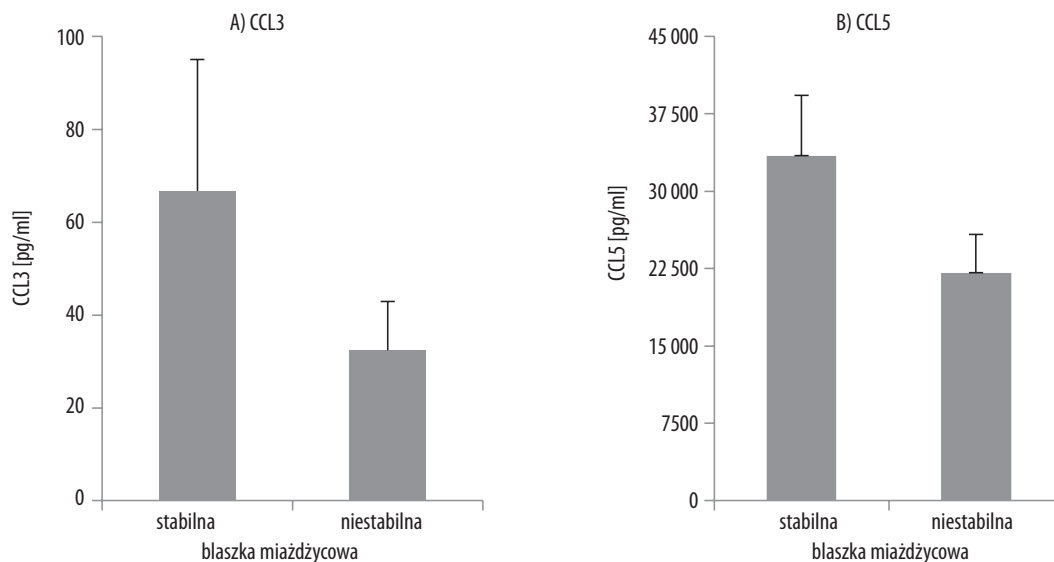
niestabilne (typ VI), pozostałe określono jako stabilne. Analiza związku charakteru blaszek miażdżycowych z wywiadem chorobowym uczestników badania ujawniła, że niestabilne blaszki stwierdzono u 62% pacjentów objawowych i u tylko 42% pacjentów bezobjawowych (obserwacja nieistotna statystycznie).

### Stężenie chemokin w osoczu

U pacjentów z miażdżycą wykazano istotnie wyższy poziom chemokiny CCL5 w osoczu (średnia  $27\ 310,7 \pm 23\ 885,2$  pg/ml)



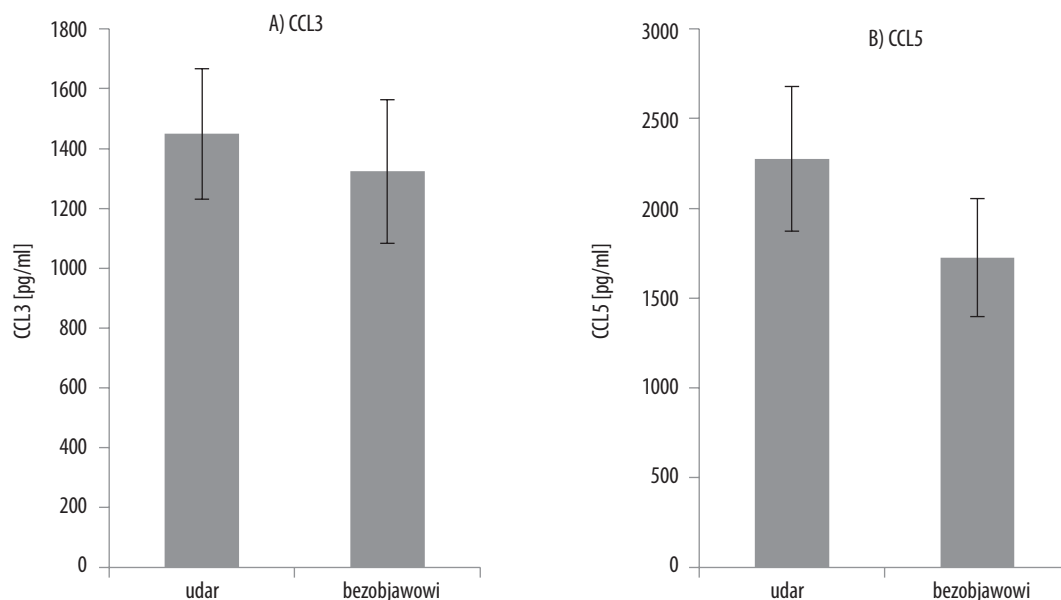
Ryc. 2. Stężenie chemokin CCL3 (A) i CCL5 (B) w osoczu pacjentów z objawami neurologicznymi (udar) i bezobjawowych. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM. Do porównania grup wykorzystano nieparametryczny test U Manna-Whitneya z powodu niespełniania założeń rozkładu normalnego (weryfikacja w teście Shapiro-Wilka)



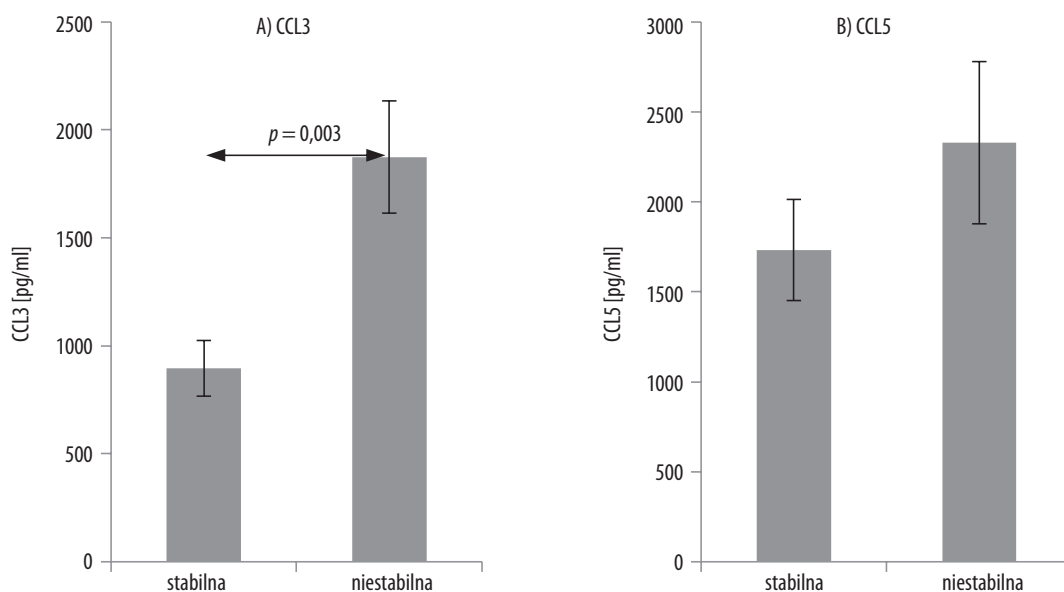
Ryc. 3. Stężenie chemokin CCL3 (A) i CCL5 (B) w osoczu pacjentów a stabilność blaszki miażdżycowej. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM. Do porównania grup wykorzystano nieparametryczny test U Manna-Whitneya z powodu niespełniania założeń rozkładu normalnego (weryfikacja w teście Shapiro-Wilka)

w porównaniu z grupą osób bez miażdżycy (średnia  $10\,206,6 \pm 98,4$  pg/ml). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w poziomie chemokiny CCL3 w osoczu chorych z miażdżycą (średnia  $49,2 \pm 101,1$  pg/ml) i zdrowych ochotników (średnia  $56,1 \pm 105,8$  pg/ml) (ryc. 1). Nie odnotowano także istotnych statystycznie różnic w poziomie chemokiny CCL5 w osoczu pacjentów bezobjawowych (średnia

$29\,159,5 \pm 27\,032,7$  pg/ml) i objawowych, którzy przebyli udar niedokrwienny mózgu (średnia  $25\,461,9 \pm 21\,228,8$  pg/ml). Stężenie CCL3 w osoczu było niższe u chorych objawowych (średnia  $17,5 \pm 40,9$  pg/ml) niż u bezobjawowych (średnia  $79,5 \pm 131,6$  pg/ml) (ryc. 2). Stężenia chemokin CCL3 i CCL5 w osoczu nie różniły się znacząco między grupami pacjentów z blaszkami stabilnymi i niestabilnymi (ryc. 3).



Ryc. 4. Stężenie chemokin CCL3 (A) i CCL5 (B) w homogenatach blaszek miażdżycowych pacjentów po udarze i bezobjawowych. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM. Do porównania grup wykorzystano nieparametryczny test U Manna-Whitneya z powodu niespełniania założeń rozkładu normalnego (weryfikacja w teście Shapiro-Wilka)



Ryc. 5. Stężenie chemokin CCL3 (A) i CCL5 (B) w homogenatach blaszek miażdżycowych pacjentów ze stabilnymi (n = 27) i niestabilnymi (n = 28) blaszkami miażdżycowymi. Dane przedstawione jako średnia ± SEM. Do porównania grup wykorzystano nieparametryczny test U Manna-Whitneya z powodu niespełnienia założeń rozkładu normalnego (weryfikacja w teście Shapiro-Wilka)

### Stężenie chemokin w blaszkach miażdżycowych

Analizie poddano blaszki miażdżycowe pobrane od 55 pacjentów. W większości homogenatów blaszek miażdżycowych stwierdzono wysokie stężenia obu badanych chemokin. Nie ujawniono korelacji między poziomem chemokin a nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą, dyslipidemią, paleniem papierosów, płcią i wiekiem. Nie wykazano też istotnych różnic między chorymi bezobjawowymi a objawowymi pod względem stężeń CCL3 i CCL5 w homogenatach blaszek miażdżycowych (ryc. 4). Biorąc pod uwagę charakter blaszki miażdżycowej, stwierdzono istotnie niższy poziom chemokiny CCL3 w homogenatach blaszek stabilnych ( $896,0 \pm 670,2$  pg/ml; n = 27) w porównaniu z blaszkami niestabilnymi ( $1874,8 \pm 1375,7$  pg/ml; n = 28) (ryc. 5). Nie odnotowano natomiast istotnej różnicy stężeń chemokiny CCL5 w homogenatach blaszek miażdżycowych stabilnych i niestabilnych (ryc. 5).

### OMÓWIENIE

W prezentowanym badaniu u pacjentów z miażdżycą tętnic szyjnych wykazano istotnie wyższy poziom chemokiny CCL5 w osoczu niż u osób zdrowych (ryc. 1). Nie stwierdzono natomiast różnicy w poziomie CCL5 w osoczu chorych objawowych w porównaniu z bezobjawowymi (ryc. 2). W przypadku chemokiny CCL3 stężenie było wyższe w osoczu pacjentów bezobjawowych niż objawowych (ryc. 2). Należy podkreślić, że w pracy nie wykazano istotnych różnic w poziomie chemokin w osoczu chorych ze stabilnymi i niestabilnymi blaszkami miażdżycowymi (ryc. 3).

Z kolei Badacz i wsp. (2019) wskazali na istotnie niższy poziom CCL5 w surowicy chorych z niestabilnymi blaszkami miażdżycowymi (uwidocznionymi w ultrasonograficznym badaniu dopplerowskim) oraz pacjentów, u których stwierdzono zgon w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych. Autorzy sugerują, że niski poziom CCL5 w surowicy może identyfikować osoby z niestabilnymi blaszkami miażdżycowymi i wysokim ryzykiem zdarzeń sercowo-naczyniowych (Badacz *et al.*, 2019). Yun-Bo i wsp., wykorzystując modele zwierzęce, wykazali wyższe stężenie CCL5 zarówno w surowicy krwi królików z niestabilnymi blaszkami miażdżycowymi, jak i w samych blaszkach niestabilnych w porównaniu z blaszkami stabilnymi (Lv *et al.*, 2014).

W swoim badaniu analizowaliśmy blaszki miażdżycowe pobrane od pacjentów poddanych endarterektomii. Rezultaty wskazują na wyższe stężenie chemokiny CCL3 w homogenatach niestabilnych blaszek miażdżycowych w porównaniu z homogenatami blaszek stabilnych (ryc. 5). Dla chemokiny CCL5 nie uzyskaliśmy takiej zależności. Biorąc pod uwagę objawy kliniczne chorych, nie stwierdziliśmy istotnych statystycznie różnic w poziomach chemokin CCL3 i CCL5 w blaszkach miażdżycowych u pacjentów objawowych i bezobjawowych (ryc. 4). Natomiast w badaniu Grufmana i wsp. okazało się, że blaszki miażdżycowe chorych objawowych charakteryzują się wyższym poziomem CCL5 niż blaszki chorych bezobjawowych (Grufman *et al.*, 2014). Podobnie Shalhoub i wsp. zaobserwowali wyższe stężenie licznych chemokin, m.in. CCL5, w blaszkach miażdżycowych pacjentów z objawową stenozą tętnic szyjnych wewnętrznych (Shalhoub *et al.*, 2016).

Głównymi ograniczeniami niniejszej pracy są stosunkowo mała liczebność porównywanych grup oraz różnica w strukturze wiekowej i płciowej między grupami

badanymi a kontrolnymi. Opisywane badania są badaniami wstępnymi i będą kontynuowane na większej liczbie chorych w grupie badanej i kontrolnej, z zachowaniem odpowiedniej struktury wiekowej i płciowej. Zaskakujące wyniki dotyczące wyższego poziomu chemokiny CCL3 w osoczu pacjentów bezobjawowych w porównaniu z objawowymi przy wyższym jej stężeniu w blaszkach niestabilnych w porównaniu ze stabilnymi wymagają dalszych badań na większych grupach. Jedno z możliwych wyjaśnień jest konsekwencją metodologii pracy. Otóż u pacjentów objawowych krew była pobierana wraz z blaszkami po udarze mózgu, natomiast pacjenci bezobjawowi nie przebyli udaru mózgu. Niestabilne blaszki miażdżycowe rozpoznaliśmy u 62% pacjentów objawowych i 42% bezobjawowych. Wyższe stężenie CCL3 w osoczu chorych bezobjawowych może być efektem działania czynnika, który nie został uwzględniony przy rekrutacji uczestników badania, a generuje dodatkową zmienność. U 54% pacjentów bezobjawowych w osoczu stwierdzono CCL3 w stężeniu >10 pg/ml, podczas gdy w grupie pacjentów objawowych było to jedynie 17%. Analiza statystyczna wartości stężenia tej chemokiny z uwzględnieniem wyłącznie osób z CCL3 w osoczu nie wykazała istotnych różnic między grupami.

## WNIOSKI

Uzyskane wyniki sugerują udział chemokin CCL3 i CCL5 w rozwoju blaszki miażdżycowej. Podwyższony poziom CCL3 w homogenatach z niestabilnych blaszek miażdżycowych może wskazywać na znaczenie tej chemokiny w regulacji immunologicznej odpowiedzi komórkowej powiązanej z niestabilnością blaszki miażdżycowej. Z kolei chemokina CCL5 wydaje się związana z rozwojem miażdżycy, na co wskazuje jej podwyższony poziom w osoczu pacjentów z miażdżycą w porównaniu z osobami zdrowymi. Należy podkreślić konieczność dalszych badań, które potwierdziłyby obserwowane zależności na większej grupie chorych i pozwoliły na identyfikację elementów komórkowego układu odpornościowego, w których regulację zaangażowane są chemokiny CCL3 i CCL5 oraz ich receptory.

### Konflikt interesów

*Autorzy nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.*

## Piśmiennictwo

- AbuRahma AF, Avgerinos ED, Chang RW et al.: Society for Vascular Surgery clinical practice guidelines for management of extracranial cerebrovascular disease. *J Vasc Surg* 2022; 75 (1S): 4S–22S.
- Adams A, Bojara W, Schunk K: Early diagnosis and treatment of coronary heart disease in asymptomatic subjects with advanced vascular atherosclerosis of the carotid artery (type III and IV b findings using ultrasound) and risk factors. *Cardiol Res* 2018; 9: 22–27.
- Badacz R, Podolec J, Przewlocki T et al.: The role of chemokine CCL5/RANTES and metalloproteinase-9 as inflammatory modulators in symptomatic internal carotid artery stenosis. *J Physiol Pharmacol* 2019; 70. DOI: 10.26402/jpp.2019.4.06.
- Błażejewska-Hyżorek B, Czernuszenko A, Członkowska A et al.: Wytyczne postępowania w udarze mózgu. *Pol Przegl Neurol* 2019; 15 (Supl A): 1–156.
- Chen K, Bao Z, Tang P et al.: Chemokines in homeostasis and diseases. *Cell Mol Immunol* 2018; 15: 324–334.
- Członkowska A, Gromadzka G: Związek czynników immunologicznych z etiopatogenezą i przebiegiem klinicznym udaru mózgu. *Neurol Neurochir Pol* 2000; 34 (3 Suppl): 13–26.
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators: Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 385: 117–171.
- Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A et al.: Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  in the inflammatory component of allergic airway disease. *J Immunol* 2000; 165: 499–508.
- Griffith JW, Sokol CL, Luster AD: Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 659–702.
- Grufman H, Schiopu A, Edsfeldt A et al.: Evidence for altered inflammatory and repair responses in symptomatic carotid plaques from elderly patients. *Atherosclerosis* 2014; 237: 177–182.
- Guan E, Wang J, Norcross MA: Identification of human macrophage inflammatory proteins 1 $\alpha$  and 1 $\beta$  as a native secreted heterodimer. *J Biol Chem* 2001; 276: 12404–12409.
- Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685–1695.
- Herder C, Peeters W, Illig T et al.: RANTES/CCL5 and risk for coronary events: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort, Athero-Express and CARDIoGRAM studies. *PLoS One* 2011; 6: e25734.
- Jonas DE, Feltner C, Amick HR et al.: Screening for asymptomatic carotid artery stenosis: a systematic review and meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2014; 161: 336–346.
- Konarska-Król M, Kacperska MJ, Walenczak J et al.: The role of selected chemokines and their receptors in the pathogenesis and destabilisation of atheromatous plaques in the carotid arteries. *Aktualn Neurol* 2015; 15: 41–46.
- Lv YB, Jing J, Li JM et al.: Assessment of RANTES levels as the indicators of plaque vulnerability in rabbit models of atherosclerosis. *Pathol Res Pract* 2014; 210: 1031–1037.
- O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L et al.; INTERSTROKE investigators: Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* 2010; 376: 112–123.
- Orrapin S, Rerkasem K: Carotid endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 6: CD001081.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM et al.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee: Heart disease and stroke statistics – 2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011; 123: e18–e209.
- Shalhoub J, Viiri LE, Cross AJ et al.: Multi-analyte profiling in human carotid atherosclerosis uncovers pro-inflammatory macrophage programming in plaques. *Thromb Haemost* 2016; 115: 1064–1072.