

Anna Cisowska-Maciejewska, Maria Konarska,  
Andrzej Głąbiński

Received: 27.05.2010

Accepted: 08.06.2010

Published: 30.06.2010

## Chemokiny w patogenezie udaru niedokrwiennego mózgu

### Chemokines in pathogenesis of ischaemic stroke

Oddział Kliniczny Propedeutyki Neurologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Oddział Kliniczny Propedeutyki Neurologicznej, Uniwersytet Medyczny, ul. Pabianicka 62, 93-513 Łódź

Praca finansowana ze środków własnych

#### Streszczenie

Chemokiny są cytokinami działającymi na określone subpopulacje leukocytów. Stanowią rodzinę ponad 50 białek o stosunkowo małej masie cząsteczkowej (8-12 kDa). Wyróżniamy kilka grup chemokin: CXC, CC, CX3C, C. Działają one na komórki docelowe za pośrednictwem odpowiednich receptorów C-R, CC-R, CXC-R, CX3C-R. Zidentyfikowano dotąd około 20 receptorów dla chemokin. Wykazano, że z danym receptorem mogą się zwykle wiązać różne chemokiny, a dana chemokina może wykazywać powinowactwo do więcej niż jednego receptora. Chemokiny są zaangażowane w szereg procesów fizjologicznych, m.in. w patogenezę udaru niedokrwiennego mózgu. Zasadnicza rola chemokin polega na ich udziale w rozwoju reakcji zapalnej. Chemokiny odgrywają również kluczową rolę w dojrzewaniu i funkcjonowaniu układu immunologicznego. Ponadto są zaangażowane w patogenezę wielu różnorodnych schorzeń, takich jak zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera, nowotwory mózgu. Zwiększona ekspresja chemokin w mózgu jest następstwem działania różnorodnych bodźców, takich jak niedokrwienie, uszkodzenie aksonalne czy obecność substancji o działaniu neurotoksycznym. Dotychczas przebadano wiele chemokin pod kątem ich udziału w rozwoju blaszki miażdżycowej w tętnicach szyjnych, zarówno na materiale zwierzęcym, jak i na materiale ludzkim. Oceniano między innymi ekspresję wybranych chemokin w blaszkach miażdżycowych pobranych od pacjentów z krytycznym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej poddanych zabiegowi endarterektomii. Analizowano chemokiny należące do różnych klas o udowodnionym, ale nie do końca zbadanym udziale w patogenezie miażdżycy i jej powikłań (tj. CCL2, CXCL1, CX3CL1, CCL5, CXCL1). Ponadto oceniano stężenie wybranych chemokin we krwi obwodowej oraz ekspresję wybranych chemokin na komórkach jednójądrazstych krwi obwodowej u pacjentów z restenozą i bez niej. Są one także zaangażowane w patogenezę rozwoju powikłań blaszki miażdżycowej, tj. udaru niedokrwiennego mózgu czy zawału mięśnia sercowego. W niniejszej pracy przedstawiono dane dotyczące udziału różnych chemokin i ich receptorów. Wyniki badań eksperymentalnych z wyciszeniem genów czy zastosowaniem agonistów receptorów chemokinowych pozwalają mieć nadzieję na rozwój nowych terapii chorób naczyniowych.

**Słowa kluczowe:** chemokiny, udar niedokrwienne, miażdżycy, receptory chemokinowe, tętnica szyjna

#### Summary

Chemokines are cytokines which attract certain supopulations of leukocytes. They constitute the family of 50 proteins of low molecular weight (8-12 kDa). They are divided into four groups: CXC, CC, CX3C, C. Chemokines acts via receptors C-R, CC-R, CXC-R, CX3C-R. About 20 receptors for chemokines are described so far. Many chemokines may bind to one receptor and one chemokine may target more than one receptor. Chemokines exert many physiological activities as well as can be involved in pathogenesis of ischaemic stroke. The main role of chemokines is engagement into development of inflammatory reaction. Chemokines are engaged also in maturation and function of immunological system as well. Further they are engaged into pathogenesis of many other pathologies like myocardial infarction, ischaemic stroke, multiple sclerosis, Alzheimer's disease, brain tumours. The increased expression of chemokines in the brain is induced by different stimulus as ischaemia, axonal damage, or presence of neurotoxic substances. Till now, many chemokines were investigated because of their participation in development of atheromatous plaque in carotid arteries of animal models and humans is increased as well. Expression of selected chemokines on atheromatous plaques from patients operat-

ed because of critical stenosis of internal carotid artery was described. Chemokines belonging to different classes (CCL2, CXCL1, CX3CL1, CCL5, CXCL1) with proven but not finally investigated participation in atherogenesis and its complications were analysed. Furthermore concentration of selected chemokines in peripheral blood and expression of some chemokines on peripheral blood mononuclear cells from patients with and without restenosis was also published. Chemokines are engaged also in complications of atherosclerosis such as ischaemic stroke or myocardial infarction. The goal of this review was to highlight the role of various chemokines and their receptors in such conditions. Experimental data with knock-out genes or agonists of chemokine receptors give the hope to development of new therapies for brain ischaemia.

**Key words:** chemokines, ischaemic stroke, atherosclerosis, chemokine receptors, cervical artery

## CHEMOKINY I ICH RECEPTORY

Chemokiny są cytokinami wykazującymi działanie chemotaktyczne w stosunku do określonych subpopulacji leukocytów<sup>(1)</sup>. Stanowią one rodzinę ponad 50 białek o stosunkowo małej masie cząsteczkowej (8-12 kDa). Pomimo różnic w sekwencji aminokwasów białka te wykazują podobną budowę trzeciorzędową<sup>(2,3)</sup>. Zawierają co najmniej trzy jednostki: domenę N-końcową, jednostkę o strukturze  $\beta$ -pofalduwanej kartki oraz  $\alpha$ -helisę na C-końcu. Chemokiny zawierają co najmniej cztery reszty cysteiny zlokalizowane w sposób konserwatywny na N-końcu. Wyjątek stanowi limfotaktyna, która swą budową i czynnością przypomina pozostałe chemokiny, ale posiada jedynie dwie cząsteczki cysteiny<sup>(1)</sup>.

Na podstawie liczby i rozmieszczenia reszt cysteiny chemokiny dzielimy na cztery klasy: CXC ( $\alpha$ ), CC ( $\beta$ ), CX3C ( $\gamma$ ) oraz C ( $\delta$ ). Chemokiny C-X-C charakteryzują się tym, że pomiędzy dwiema resztami cysteiny występuje inny aminokwas. Zależnie od obecności pomiędzy fragmentem N-końcowym a pierwszą cząsteczką cysteiny motywu ELR (tj. następującej sekwencji aminokwasów: kwas glutaminowy – leucyna – arginina) cytokiny dzielimy na dwie grupy: chemokiny ELR(+) i ELR(-)<sup>(4)</sup>. Przykładem chemokiny CXC jest CXCL1 (*growth-regulated oncogene*, GRO- $\alpha$ ), która działa poprzez receptor CXCR2 chemotaktycznie na neutrofile. Nazwa GRO- $\alpha$  odzwierciedla działanie mitogenne tej chemokiny w stosunku do linii komórkowych czerniaka. Jest ona wytwarzana przez komórki jednojądrzaste<sup>(1,5,6)</sup>.

Chemokiny CC zawierają na N-końcu dwie reszty cysteiny bezpośrednio sąsiadujące ze sobą. Chemokiny ELR(+) działają chemotaktycznie w stosunku do neutrofilii, natomiast ELR(-) oddziałują na komórki jednojądrzaste<sup>(7)</sup>. Przykładem są chemokiny MCPs (*monocyte chemoattractant proteins*; białka chemotaktyczne dla monocytów), do których zaliczamy co najmniej kilka chemokin (MCP-1, -2, -3, -4, -5). W badaniach *in vitro* wykazano, że CCL2/MCP-1 działa chemotaktycznie (poprzez nasilenie ekspresji integryn) na monocyt<sup>(8,9)</sup>. Podobne działanie wykazuje w stosunku do aktywowanych limfocytów T (CD4, CD8), ale nie limfocytów B; dane na temat wpływu MCP-1 na komórki NK są rozbieżne<sup>(10-12)</sup>. Chemokina MCP-1 powoduje uwalnianie histaminy z bazofili<sup>(13-15)</sup>. Nieco słabsze działanie chemotaktyczne na monocyt wywierają chemokiny MCP-2 i MCP-3<sup>(16-19)</sup>; w przeciwieństwie jednak do MCP-1 działają chemotaktycznie także w stosunku do eozynofili<sup>(20-22)</sup>, a MCP-3/CCL7 działa również na komórki dendrytyczne<sup>(23)</sup>. MCP-4 wykazuje działanie chemotaktyczne w stosunku do eozynofili, działając przez ten sam receptor co eotaksyna<sup>(24)</sup>. Chemokina CCL/MCP-5 działa

chemotaktycznie poprzez CCR2 na monocyt, eozynofile, limfocyty T<sup>(25,26)</sup>. Wykazano dużą ekspresję tej chemokiny w tkance płucnej w przebiegu chorób o podłożu alergicznym, a zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciw MCP-5 zmniejszało nacieki z eozynofili w płucach<sup>(26)</sup>. Innym przykładem chemokiny C-C jest CCL5. Chemokina ta jest produkowana przez makrofagi, płytki krwi, limfocyty T. Działa przez receptor CCR5, CCR1 i CCR3. Receptor CCR5 wykazuje ekspresję na makrofagach, komórkach śródbłonka, komórkach mięśni gładkich. Interakcja CCL5/CCR5 powoduje rekrutację monocytów i limfocytów T.

Chemokiny C (chemokiny  $\gamma$ ) zawierają tylko jedną resztę cysteiny na N-końcu. Jedynym reprezentantem jest limfotaktyna, która działa silnie chemotaktycznie na limfocyty T (ale nie na monocyt)<sup>(1)</sup>.

Chemokiny C-X3-C charakteryzują się tym, że dwie pierwsze reszty cysteinowe na fragmencie N-końcowym są przedzielone trzema innymi aminokwasami. Jedynym przykładem jest chemokina CX3CL1, zwana neurotaktyną lub fraktalkiną<sup>(1,27)</sup>. CX3CL1 wykazuje ekspresję przede wszystkim na komórkach jednojądrzastych, neuronach, komórkach nabłonka. Fraktalkina działa poprzez receptor CX3CR1, który występuje głównie na komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych (*smooth muscle cells*, SMCs). Wykazano w warunkach *in vitro*, że fraktalkina działa chemotaktycznie na ludzkie komórki mięśni gładkich.

Chemokiny CXC i CC wykazują ekspresję (zarówno konstytutywną, jak i pobudzaną przez mediatory zapalenia) na różnych komórkach mózgowia: komórkach glejowych (mikrogleju, oligodendrogleju, astrocytach), neuronach, komórkach śródbłonka, a także leukocytach osiadłych w obrębie mózgowia oraz leukocytach krążących we krwi<sup>(7)</sup>. Co więcej wzrost ekspresji tych chemokin poprzedza migrację leukocytów do tkanki mózgowej<sup>(7)</sup>. Chemokiny są niezbędne dla prawidłowej komunikacji między różnymi komórkami (glej – glej, neuron – neuron, neuron – glej)<sup>(1)</sup>.

## RECEPTORY DLA CHEMOKIN

Zidentyfikowano około 20 receptorów dla chemokin<sup>(28)</sup>. Są one zbudowane z 7 śródbłonowych domen sprzężonych z białkiem G (*G-protein-coupled receptors*, GPCR). Biorąc pod uwagę zdolność wiązania ligandu, receptory dla chemokin dzielimy na klasy: C-R, CC-R, CXC-R, CX3C-R. Wykazano, że z danym receptorem mogą się zwykle wiązać różne chemokiny, a dana chemokina może wykazywać powinowactwo do więcej niż jednego receptora. Kluczowe znaczenie dla wiązania i aktywacji receptora ma domena N-końcowa<sup>(29,30)</sup>. Interakcja między ligandem uruchamia różnorodne

szlaki metaboliczne, tj. może prowadzić do aktywacji fosfolipazy C i zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia<sup>(31,32)</sup>, hamowania cykazy adenylanowej i zmniejszenia stężenia cAMP, aktywacji kinazy białkowej (PK; *mitogen-activated protein kinase*)<sup>(33)</sup>.

### CHEMOKINY W PATOGENEZIE UDARU NIEDOKRWIENNEGO MÓZGU

Zasadnicza rola chemokin polega na ich udziale w rozwoju reakcji zapalnej. Chemokiny odgrywają również kluczową rolę w dojrzewaniu i funkcjonowaniu układu immunologicznego. Ponadto są zaangażowane w patogenęz wielu różnych schorzeń, takich jak zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera, nowotwory mózgu. Zwiększona ekspresja chemokin w mózgu jest następstwem działania rozmaitych bodźców, takich jak niedokrwienie, uszkodzenie aksonalne czy obecność substancji o działaniu neurotoksycznym (np.  $\beta$ -amyloid)<sup>(34)</sup>.

Dotychczas przebadano wiele chemokin pod kątem ich udziału w patogeniezie udaru niedokrwienno-mózgowego, zarówno na modelach zwierzęcych, jak i w badaniach na materiale ludzkim. W eksperymentalnym modelu udaru niedokrwienno-mózgowego wywołanym poprzez zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (*middle cerebral artery occlusion*, MCAo) wykazano zwiększoną ekspresją mRNA dla CCL2 i CCL3 w tkance mózgowej po upływie 2 godzin od początku udaru i jej narastanie do maksymalnych wartości w ciągu pierwszych 48 godzin. Immunoreaktywność dla CCL2 miała charakter rozsiany i dotyczyła nie tylko obszaru niedokrwienia. W przypadku CCL3 rozkład ekspresji pokrywał się z obszarami pobudzenia astrogleju<sup>(35)</sup>. Jiang i wsp. wykazali u szczurów w warunkach *in vivo* po upływie 24 godzin od MCAo znaczący wzrost ekspresji CCL2 i CCL3 w obrębie półkuli mózgu objętej niedokrwieniem, zwiększoną migrację do miejsca uszkodzenia mózgu komórek HUCBCs (*human umbilical cord blood cells*; ludzkie komórki krwi pępowinowej) oraz nasilenie ekspresji receptorów dla chemokin na powierzchni tych ostatnich komórek. Migrację HUCBCs można zablokować, stosując przeciwciała poliklonalne skierowane przeciw CCL2 i CCL3<sup>(36)</sup>. W innych badaniach na myszach wykazano, że iniekcja CCL3 do komórki mózgu zwiększała rozmiar obszaru niedokrwienia tkanki mózgowej oceniany po upływie 48 godzin od trwającego przez godzinę MCAo z następczą reperfuzyją<sup>(37)</sup>. Z drugiej strony dokomorowa iniekcja vMIP-II (*viral macrophage inflammatory protein-II*) będącego szerokowidmowym antagonistą receptorów dla chemokin zmniejszała, w sposób zależny od dawki, rozmiar ogniska niedokrwienia mózgu badany w podobnych warunkach<sup>(37)</sup>. Chemokina CCL2 poprzez receptor CCR2 działa chemotaktycznie na monocyty, ponadto zwiększa przepuszczalność sztucznej bariery krew-mózg (hodowla astrocytów i komórek śródbłonna) w warunkach zarówno *in vitro* po niedokrwieniu/niedotlenieniu, jak i *in vivo* (po podaniu dokomorowym CCL2). Dzieje się tak dzięki redystrybucji połączeń typu TJ (*tight junction*; połączenia szczelinowe)<sup>(38,39)</sup>. Co więcej, u myszy knock-out w zakresie receptora CCR2(-/-) poddanych przemijającemu ogniskowemu niedokrwieniu mózgu stwierdzono mniejszy rozmiar ogniska niedokrwienia, znacząco mniejszą przepuszczalność bariery

krew-mózg oraz mniejszy obrzęk półkuli mózgowej poddanej niedokrwieniu. Efekt ten wiązano ze zmniejszeniem nasilenia nacieku z monocytów i neutrofilii. Dodatkowo myszy takie wykazywały zmniejszoną ekspresję cytokin zapalnych w okresie reperfuzyji<sup>(39)</sup>. Z kolei u myszy *knock-out* w zakresie CCL2 poddanych trwałej MCAo obszar niedokrwienia oceniany w ciągu pierwszych 24 godzin udaru był mniejszy w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto wykazano mniejszy naciek z neutrofilii w obrębie ogniska udarowego i na jego obrzeżach oraz mniejszy rozplam astrocytów na obrzeżach udaru i we wzgórzu po upływie 2 tygodni od MCAo<sup>(40)</sup>. Podobne efekty (mniejszy rozmiar ogniska udarowego, mniejsze nasilenie odpowiedzi komórkowej) obserwowano po transfekcji dokomorowej adenowirusowym zmutowanym genem CCL2 (7ND) po upływie 90 minut od wywołania miejscowego niedokrwienia mózgu u szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem tętniczym<sup>(41)</sup>. Co więcej, na modelu zwierzęcym wykazano zwiększoną ekspresję CCL2 w ścianie naczyniowej we wczesnych stadiach formowania się tętniaka; podobne obserwacje poczyniono również na materiale ludzkim. Zablockowanie MCP-1 przez 7ND powodowało hamowanie formowania tętniaków u szczurów. Oprócz tego stwierdzono, że u myszy knock-out w zakresie genu dla CCL2 znacznie rzadziej występują tętniaki oraz obserwuje się mniejszy odczyn komórkowy z makrofagów w ścianie naczyniowej.

Terao i wsp.<sup>(42)</sup> wykazali, że adhezja leukocytów i płytek krwi w naczyniach żylnych mózgowia, rozmiar ogniska udaru niedokrwienno-mózgowego i przepuszczalność bariery krew-mózg oceniane po 60 minutach od MCAo z następczą reperfuzyją były znacząco mniejsze u myszy *knock-out* w zakresie genu dla CCL5 [*CCL5(-/-)*] w porównaniu z myszami kontrolnymi<sup>(43)</sup>. Co więcej, zastosowanie antagonisty receptora dla tej chemokiny (Met-RANTES) hamowało w warunkach *in vivo* progresję blaszki miażdżycowej u myszy z hipercholesterolemią. Było to skojarzone ze zmniejszeniem ekspresji wielu chemokin i ich receptorów, zmniejszeniem nasilenia nacieku z leukocytów oraz zwiększeniem zawartości kolagenu w blaszce, co znamionuje stabilną blaszkę miażdżycową<sup>(44)</sup>.

Oceniano również ekspresję CX3CL1/fraktalkiny i jej receptora (CXCR1) w mózgu szczurów po niedokrwieniu mózgu wywołanym przemijającą MCAo. Wykazano przejściowo podwyższoną ekspresję chemokiny CX3CL1 w obumarłych neuronach kory mózgu po 12 godzinach od niedokrwienia. Po 24-48 godzinach obserwowano znaczący wzrost immunoreaktywności dla fraktalkiny w obrębie morfologicznie nietkniętych neuronów korowych znajdujących się w obszarze penumbry; immunoreaktywność ta wracała do wartości wyjściowych po 7 dniach od niedokrwienia. Wzmocniona ekspresja CX3CL1 dotyczyła również komórek śródbłonna w obszarze niedokrwienia, którą rejestrowano po upływie 48 godzin oraz po 7 dniach od rozwoju niedokrwienia. Jednocześnie wykazano obecność receptora CX3CR1 na pobudzonych komórkach mikrogleju w obszarze niedokrwienia po 24 i 48 godzinach oraz 7 dniach od niedokrwienia<sup>(45)</sup>.

U chorych z udarem niedokrwienno-mózgowym wykazano podwyższony poziom niektórych chemokin we krwi obwodowej lub/i płynie mózgowo-rdzeniowym<sup>(7,46-48)</sup>. W płynie mózgowo-rdzeniowym obserwowano podwyższony poziom chemokin CXCL1, CXCL5, CXCL6, podczas gdy ich stężenie we krwi obwodowej



nie różniło się w porównaniu z grupą kontrolną. Co więcej, poziom CXCL5 w płynie mózgowo-rdzeniowym wykazywał dodatnią korelację z wielkością ogniska niedokrwienia ocenianego na podstawie rozmiaru obszaru hipodensyjnego stwierdzanego w badaniu tomografii komputerowej mózgu<sup>(7,43,47-49)</sup>. Wykazano również znacząco podwyższone stężenie CXCL8 we krwi obwodowej pacjentów w 1., 3. i 7. dobie udaru niedokrwinnego mózgu, co przyczyniało się do aktywacji ich leukocytów wielojądrzastych<sup>(50)</sup>.

### CHEMOKINY W PATOGENEZIE MIAŻDŻYCY W TĘTNICACH SZYJNYCH

Dotychczas przebadano wiele chemokin pod kątem ich udziału w rozwoju blaszki miażdżycowej w tętnicach szyjnych, zarówno na materiale zwierzęcym, jak i na materiale ludzkim. Oceniano m.in. ekspresję wybranych chemokin w blaszkach miażdżycowych pobranych od pacjentów z krytycznym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej poddanych zabiegowi endarterektomii. Analizowano chemokiny należące do różnych klas o udowodnionym, ale nie do końca zbadanym udziale w patogenezie miażdżycy i jej powikłań (tj. CCL2, CXCL1, CX3CL1, CCL5, CXCL1). Ponadto oceniano stężenie wybranych chemokin we krwi obwodowej oraz ekspresję wybranych chemokin na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) u pacjentów z restenozą i bez niej<sup>(51)</sup>.

Najlepiej została przebadana w tym zakresie chemokina CCL2. Jest ona produkowana przez monocyty, komórki śródbłonna naczyń, komórki mięśni gładkich naczyń (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs), fibroblasty. Zwiększoną zawartość MCP-1 wykazano w ludzkich blaszkach miażdżycowych o dużej zawartości makrofagów<sup>(51)</sup>, a także we krwi pacjentów po przebytym ostrym zespole wieńcowym oraz u pacjentów z restenozą po zabiegu angioplastyki naczyń wieńcowych. Chemokina CCL2 działa chemotaktycznie na monocyty i limfocyty T poprzez receptor CCR2. Wykazano ponadto, że receptor CCR2 wykazuje ekspresję na monocytach krwi obwodowej wyizolowanych z krwi żyłnej obwodowej pacjentów z hipercholesterolemią. W badaniach *in vitro* wykazano, że CCL2 powoduje rekrutację monocytów w ścianie naczyniowej oraz odgrywa istotną rolę w hiperplazji błony wewnętrznej (neointima) i proliferacji komórek mięśni gładkich, co skutkuje pogrubieniem kompleksu intima-media. Ponadto CCL2 może nasilać adhezję monocytów do pobudzonych komórek śródbłonna wykazujących ekspresję integryny E<sup>(52)</sup>. Dużą zawartość CCL2 stwierdzono na różnych typach komórek w obrębie blaszek miażdżycowych pobranych od ludzi podczas zabiegu endarterektomii (tj. w komórkach mięśni gładkich naczyń, komórkach mezenchymalnych błony wewnętrznej oraz w monocytach i makrofagach)<sup>(53)</sup>. W badaniach *in vitro* wykazano, że ludzkie komórki śródbłonna produkują CCL2 pod wpływem zmodyfikowanych lipoprotein LDL (oxLDL)<sup>(54)</sup>. W modelach transgenicznych wyciszenie genu CCL2 lub CCR2 powodowało zmniejszoną częstość występowania miażdżycy i mniejsze nasilenia zmian miażdżycowych<sup>(55)</sup>. Dane dotyczące zawartości CCL2 w surowicy krwi u ludzi w różnych stanach patologicznych są odmienne. Mosedale i wsp.<sup>(56)</sup> nie znaleźli różnic w stężeniu CCL2 we krwi chorych z miażdżycą (potwierdzoną badaniem USG dopplerowskim tętnic

szyjnych lub badaniem koronarograficznym) w porównaniu z grupą kontrolną. Dane na temat zawartości CCL2 we krwi pacjentów z udarem niedokrwinnym mózgu są rozbieżne. Losy i Zaremba<sup>(48)</sup> wykazali znaczący wzrost stężenia CCL2 w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów w ostrej fazie udaru niedokrwinnego mózgu, natomiast stężenie we krwi nie różniło się u tych pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną. Z kolei inni badacze<sup>(46,57)</sup> wykazali wzrost stężenia CCL2 we krwi pacjentów z udarem niedokrwinnym mózgu.

Oceniano również wpływ estrogenów na ekspresję CCL2 i jej receptora. Stork i wsp.<sup>(53)</sup> wykazali u kobiet w okresie pomenopauzalnym, że 17 $\beta$ -estradiol zmniejsza stężenie CCL2 we krwi obwodowej. W badaniach na zwierzętach stwierdzono natomiast, że estrogeny zmniejszają ekspresję CCL2, a także jej receptora CCR2 w blaszkach miażdżycowych (zarówno podstawową, jak i indukowaną przez hipercholesterolemię)<sup>(58)</sup>. W hodowlach miocytów i komórek śródbłonna z tętnic wieńcowych pobranych od kobiet 17 $\beta$ -estradiol zmniejszał ekspresję mRNA dla CCL2, jak również stężenie samej chemokiny<sup>(59)</sup>. Przeciwmiażdżycowe działanie estrogenów odbywa się prawdopodobnie za pośrednictwem tlenku azotu (NO), który hamuje ekspresję CCL2<sup>(60)</sup>.

Innym przykładem chemokiny CC zaangażowanej w patogenezę miażdżycy jest eotaksyna. Analiza immunohistochemiczna ludzkich blaszek miażdżycowych wykazała ekspresję eotaksyny przez komórki mięśni gładkich oraz obecność komórek CCR3+ w obszarach blaszek bogatych w makrofagi (Haley i wsp., 2000). Nie znaleziono różnic w stężeniu krążącej eotaksyny (ocenianym metodą ELISA) pomiędzy pacjentami z miażdżycą i bez zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych<sup>(56)</sup>.

Innym przykładem chemokiny obecnej w ścianie naczyniowej jest fraktalkina/CX3CL1, która wykazuje ekspresję przede wszystkim na leukocytach jednojądrzastych krwi, komórkach śródbłonna, a także na komórkach dendrytycznych, nabłonkowych i neuronach. Fraktalkina występuje w dwóch postaciach: związanej z błoną komórkową (unieruchomionej) oraz rozpuszczalnej. Przejście formy błonowej w rozpuszczalną odbywa się pod wpływem odpowiednich metaloproteinaz. Wysoką aktywność tych enzymów wykazano w blaszkach miażdżycowych. Zwiększenie ilości chemokiny rozpuszczalnej generuje w ścianie naczyniowej gradient stężeń odpowiedzialny za jej działanie chemotaktyczne w stosunku do monocytów, limfocytów T. Chemokina CX3CL stanowi unikalną chemokinę, ponieważ oprócz działania chemotaktycznego funkcjonuje również jako cząsteczka adhezyjna<sup>(61,62)</sup>. Wykazano, że fraktalkina jest zlokalizowana na blaszkach miażdżycowych u ludzi w obrębie komórek mięśni gładkich błony środkowej i odpowiada za ścisłą adhezję napływających do blaszki miażdżycowej monocytów do tych komórek. Przejście formy związanej z błoną komórkową w rozpuszczalną wiąże się ze zwiększeniem nacieku z monocytów i jednoczesnym osłabieniem adhezji, co może stanowić istotny czynnik w destabilizacji blaszki miażdżycowej<sup>(63)</sup>. CX3CL działa poprzez receptor CX3CR1. Wykazano, że niektóre polimorfizmy genu kodującego ten receptor (np. CX3CR1-I249) wiążą się ze zmniejszeniem gęstości tych receptorów na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC), co może z kolei wiązać się ze zmniejszeniem ryzyka rozwoju miażdżycy u heterozygot<sup>(64)</sup>.

Chemokina CCL5 jest produkowana przez makrofagi, płytki krwi i limfocyty T. Działa poprzez receptory CCR5, CCR1 i CCR3. Receptor CCR5 wykazuje ekspresję na makrofagach, komórkach śródbłonna, komórkach mięśni gładkich. W obrębie blaszek miażdżycowych u ludzi CCL5 wykazuje ekspresję na makrofagach i limfocytach T. Interakcja CCL5/CCR5 powoduje rekrutację monocytów i limfocytów T w obrębie blaszki miażdżycowej. Zwiększone stężenie CCL5 w surowicy krwi stwierdzono u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym, a także z hiperhomocysteinemią. Leung i wsp.<sup>(65)</sup> wykazali, że stężenie CCL5 jest wyższe w surowicy krwi kobiet w porównaniu z mężczyznami. W piśmiennictwie brak danych dotyczących udziału CCL5 w patogenezie miażdżycy.

We krwi obwodowej pacjentów zarówno ze stabilną, jak i niestabilną dławicą piersiową wykazano zwiększone stężenie CXCL1 w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie to było istotnie wyższe u pacjentów z niestabilną dławicą piersiową. Wykazano ponadto zwiększoną ekspresję GRO $\beta$  i  $\gamma$  na monocytach wyizolowanych z krwi obwodowej pacjentów z chorobą niedokrwienną mięśnia sercowego<sup>(66)</sup>.

Reasumując, zarówno badania na modelach zwierzęcych, jak i na materiale ludzkim potwierdzają udział różnych chemokin w patogenezie miażdżycy i jej powikłań, tj. udaru niedokrwiennego mózgu czy choroby niedokrwienną mięśnia sercowego. Wyniki badań eksperymentalnych z wyciszaniem genów czy zastosowaniem agonistów receptorów chemokinowych pozwalają mieć nadzieję na rozwój nowych terapii chorób naczyniowych.

## PIŚMIENNICTWO:

### BIBLIOGRAPHY:

- Rollins B.J.: Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909-928.
- Clark-Lewis I., Kim K.S., Rajarathnam K. i wsp.: Structure-activity relationships of chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57: 703-711.
- Clore G.M., Gronenborn A.M.: Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J.* 1995; 9: 57-62.
- Vandercappellen J., Van Damme J., Struyf S.: The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 2008; 267: 226-244.
- Cochran B.H., Reffel A.C., Stiles C.D.: Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 1983; 933: 939.
- Richmond A., Belentien E., Thomas H.G. i wsp.: Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to beta-thromboglobulin. *EMBO J.* 1988; 7: 2025-2033.
- Zaremba J., Ilkowski J., Losy J.: Serial measurements of levels of the chemokines CCL2, CCL3 and CCL5 in serum of patients with acute ischaemic stroke. *Folia Neuropathol.* 2006; 44: 282-289.
- Jiang Y., Beller D.I., Frenzl G., Graves D.T.: Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 1992; 148: 2423-2428.
- Vaddi K., Newton R.C.: Regulation of monocyte integrin expression by  $\beta$ -family chemokines. *J. Immunol.* 1994; 153: 4721.
- Carr M.W., Roth S.J., Luther E. i wsp.: Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1994; 91: 3652-3656.
- Loetscher P., Seitz M., Clark-Lewis I. i wsp.: Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release. *J. Immunol.* 1996; 156: 322-327.
- Allavena P., Bianchi G., Zhou D. i wsp.: Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 3233-3236.
- Bischoff S.C., Krieger M., Brunner T., Dahinden C.A.: Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 1271-1275.
- Kuna P., Reddigari S.R., Rucinski D. i wsp.: Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 489-493.
- Alam R., Lett-Brown M.A., Forsythe P.A. i wsp.: Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for basophils. *J. Clin. Invest.* 1992; 89: 723-728.
- Ugucioni M., D'Apuzzo M., Loetscher M. i wsp.: Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 64-68.
- Van Damme J., Proost P., Lenaerts J.P., Opdenakker G.: Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 59-65.
- Sozzani S., Locati M., Zhou D. i wsp.: Receptors, signal transduction, and spectrum of action of monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57: 788-794.
- Proost P., Wuyts A., Van Damme J.: Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J. Leukoc. Biol.* 1996; 59: 67-74.
- Dahinden C.A., Geiser T., Brunner T. i wsp.: Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 751-756.
- Weber M., Ugucioni M., Ochensberger B. i wsp.: Monocyte chemotactic protein MCP-2 activates human basophil and eosinophil leukocytes similar to MCP-3. *J. Immunol.* 1995; 154: 4166-4172.
- Noso N., Proost P., Van Damme J., Schröder J.M.: Human monocyte chemotactic proteins-2 and 3 (MCP-2 and MCP-3) attract human eosinophils and desensitize the chemotactic responses towards RANTES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 200: 1470-1476.
- Sozzani S., Sallusto F., Luini W. i wsp.: Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J. Immunol.* 1995; 155: 3292-3295.
- Ugucioni M., Loetscher P., Forssmann U. i wsp.: Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 2379-2384.
- Sarafi M.N., Garcia-Zepeda E.A., MacLean J.A. i wsp.: Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 99-109.
- Jia G.Q., Gonzalo J.A., Lloyd C. i wsp.: Distinct expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemotactic protein-5 in lung allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1939-1951.
- Banisadr G., Rostène W., Kitabgi P., Parsadaniantz S.M.: Chemokines and brain functions. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 2005; 4: 387-399.
- Murphy P.M.: International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 2002; 54: 227-229.
- Clark-Lewis I., Schumacher C., Baggiolini M., Moser B.: Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH<sub>2</sub>-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 23128-23134.
- Proudfoot A.E., Power C.A., Hoogewerf A.J. i wsp.: Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 2599-2603.

31. Jones S.A., Moser B., Thelen M.: A comparison of post-receptor signal transduction events in Jurkat cells transfected with either IL-8R1 or IL-8R2. Chemokine mediated activation of p42/p44 MAP-kinase (ERK-2). *FEBS Lett.* 1995; 364: 211-214.
32. Knall C., Young S., Nick J.A. i wsp.: Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 2832-2838.
33. Bajetto A., Barbero S., Bonavia R. i wsp.: Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J. Neurochem.* 2001; 77: 1226-1236.
34. Minami M., Satoh M.: Role of chemokines in ischemic neuronal stress. *Neuromolecular Med.* 2005; 7: 149-155.
35. Kim J.S., Gautam S.C., Chopp M. i wsp.: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neuroimmunol.* 1995; 56: 127-134.
36. Jiang L., Newman M., Saporta S. i wsp.: MIP-1 $\alpha$  and MCP-1 induce migration of human umbilical cord blood cells in models of stroke. *Curr. Neurovasc. Res.* 2008; 5: 118-124.
37. Takami S., Minami M., Nagata I. i wsp.: Chemokine receptor antagonist peptide, viral MIP-II, protects the brain against focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001; 21: 1430-1435.
38. Stamatovic S.M., Shakui P., Keep R.F. i wsp.: Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005; 25: 593-606.
39. Dimitrijevic O.B., Stamatovic S.M., Keep R.F., Andjelkovic A.V.: Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006; 26: 797-810.
40. Hughes P.M., Allegrini P.R., Rudin M. i wsp.: Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22: 308-317.
41. Kumai Y., Ooboshi H., Takada J. i wsp.: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy protects against focal brain ischemia in hypertensive rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004; 24: 1359-1368.
42. Terao S., Yilmaz G., Stokes K.Y. i wsp.: Blood cell-derived RANTES mediates cerebral microvascular dysfunction, inflammation, and tissue injury after focal ischemia-reperfusion. *Stroke* 2008; 39: 2560-2570.
43. Losy J., Zaremba J., Skrobański P.: CXCL1 (GRO- $\alpha$ ) chemokine in acute ischaemic stroke patients. *Folia Morphol.* 2006; 65: 1-5.
44. Veillard N.R., Steffens S., Burger F. i wsp.: Differential expression patterns of proinflammatory and antiinflammatory mediators during atherogenesis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 2339-2344.
45. Tarozzo G., Campanella M., Ghiani M. i wsp.: Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in response to ischaemia-reperfusion brain injury in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 15: 1663-1668.
46. Arekelian A.A., Boiadzhian A.S., Petrek M. i wsp.: The role of cytokines in ischemic stroke. *Klin. Med. (Mosk.)* 2005; 83: 22-24.
47. Losy J., Zaremba J.: Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebro-spinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke* 2001; 32: 2695-2696.
48. Losy J., Zaremba J., Skrobański P.: CXCL1 (GRO- $\alpha$ ) chemokine in acute ischaemic stroke patients. *Folia Neuropathol.* 2005; 43: 97-102.
49. Zaremba J., Skrobański P., Losy J.: The level of chemokine CXCL5 in the cerebrospinal fluid is increased during the first 24 hours of ischemic stroke and correlates with the size of early brain damage. *Folia Morphol.* 2006; 65: 1-5.
50. Grau A.J., Reis A., Bugge F. i wsp.: Monocyte function and plasma levels of interleukin-8 in acute ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.* 2001; 192: 41-47.
51. Nelken N.A., Coughlin S.R., Gordon D., Wilcox J.N.: Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 1121-1127.
52. Gerszten R.E., Garcia-Zepeda E.A., Lim Y.C. i wsp.: MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999; 398: 718-723.
53. Störk S., Baumann K., von Schacky C., Angerer P.: The effects of 17 $\beta$ -estradiol on MCP1 serum levels in postmenopausal women. *Cardiovasc. Res.* 2002; 53: 642-649.
54. Cushing S.D., Berliner J.A., Valente A.J. i wsp.: Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 5134-5138.
55. Boring L., Gosling J., Cleary M., Charo I.F.: Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 894-897.
56. Mosedale D.E., Smith D.J., Aitken S. i wsp.: Circulating levels of MCP-1 and eotaxin are not associated with presence of atherosclerosis or previous myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2005; 183: 268-274.
57. Reynolds M.A., Kirchick H.J., Dahlen J.R. i wsp.: Early biomarkers of stroke. *Clin. Chem.* 2003; 49: 1733-1739.
58. Pervin S., Singh R., Rosenfeld M.E. i wsp.: Estradiol suppresses MCP-1 expression In vivo: implications for atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18: 1575-1582.
59. Seli E., Selam B., Mor G. i wsp.: Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. *Menopause* 2001; 8: 296-301.
60. Tedeschi-Reiner E., Reiner Z.: Estrogens and risk for onset of atherosclerosis. *Lijec. Vjesn.* 2001; 123: 135-141.
61. Bazan J.F., Bacon K.B., Hardiman G. i wsp.: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385: 640-644.
62. Imai T., Hieshima K., Haskell C. i wsp.: Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1 which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997; 91: 521-530.
63. Ludwig A., Berkhout T., Moores K. i wsp.: Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and is modulated by metalloproteinase activity. *J. Immunol.* 2002; 168: 604-612.
64. Lavergne E., Labreuche J., Daoudi M. i wsp.: Adverse associations between CX3CR1 polymorphisms and risk of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 847-853.
65. Leung J., Jayachandran M., Kendall-Thomas J. i wsp.: Pilot study of sex differences in chemokine/cytokine markers of atherosclerosis in humans. *Gen. Med.* 2008; 5: 44-52.
66. Breland U.M., Halvorsen B., Hol J. i wsp.: A potential role of the CXC chemokine GRO $\alpha$  in atherosclerosis and plaque destabilization: downregulatory effects of statins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 1005-1011.