

Ocena stężenia wybranych cytokin zapalnych w surowicy krwi u pacjentów ze zwężeniem tętnicy szyjnej

Evaluation of the serum concentration of selected inflammatory cytokines in patients with carotid artery stenosis

Przemysław Puz¹, Anetta Lasek-Bal^{1,2}, Zofia Kazibutowska¹

¹Oddział Neurologii, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 7, Śląski Uniwersytet Medyczny, Górnośląskie Centrum Medyczne im. prof. Leszka Gieca, Katowice (Department of Neurology, Medical University of Silesia Hospital No. 7, Professor Leszek Giec Upper Silesian Medical Centre, Katowice, Poland)

²Wydział Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (School of Health Science, Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

Streszczenie

Wstęp: W powstawaniu i aktywacji blaszek miażdżycowych zwężających tętnicę szyjną istotną rolę pełni proces zapalny. Celem badania było określenie stężenia TNF-alfa, interleukiny-6 i interleukiny-10 w surowicy krwi pacjentów ze zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej (ICA). Drugim celem badania było porównanie stężeń wymienionych markerów zapalnych u pacjentów z objawowym i nieobjawowym zwężeniem tętnicy szyjnej. **Materiał i metody:** W badaniu uczestniczyło 65 pacjentów (K/M 20/45; w śr. wieku $66,29 \pm 7,77$ roku) z objawowym (39 osób) lub bezobjawowym (26 osób) miażdżycowym zwężeniem ICA ($\geq 50\%$ po jednej lub obu stronach). Grupę kontrolną tworzyło 30 zdrowych osób (K/M 20/10; w śr. wieku $61,03 \pm 9,08$ roku). **Wyniki:** U chorych ze zwężeniem ICA (zarówno objawowym, jak i nieobjawowym) średnie stężenie interleukiny-6 w surowicy było znacznie wyższe w porównaniu ze średnim stężeniem interleukiny-6 w surowicy osób z grupy kontrolnej (odpowiednio: $p = 0,0002$, $p = 0,0208$). Nie obserwowano znamienych statystycznie różnic w średnim stężeniu TNF-alfa oraz interleukiny-10 między grupą pacjentów a grupą kontrolną oraz między pacjentami z objawowym zwężeniem tętnicy a pacjentami z nieobjawowym zwężeniem tętnicy. **Wnioski:** U chorych z miażdżycowym zwężeniem ICA stwierdza się znamienne podwyższenie stężenia interleukiny-6 w surowicy, co sugeruje jej udział w tym procesie chorobowym. Cytokiny i inne mediatory zapalne u pacjentów ze zwężeniem ICA wymagają dalszych badań w celu lepszego rozumienia mechanizmu ich wpływu na kształtowanie i aktywność zmian miażdżycowych.

Słowa kluczowe: TNF-alfa, interleukina, zwężenie tętnicy szyjnej

Chirurgia Polska 2014, 16, 2, 57–65

Abstract

Background: The inflammatory process plays an important role in the formation, growth and destabilization of atherosclerotic plaque narrowing the internal carotid artery. The aim of the study was to determine the concentrations of TNF-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 in the serum of patients with internal carotid artery stenosis. Another aim was to compare the concentrations of these inflammatory markers in patients with symptomatic and asymptomatic internal carotid artery stenosis.

Material and methods: The study included 65 patients (F/M 20/45; aged 66.29 ± 7.77 ; 55–80) with symptomatic (39 individuals) or asymptomatic (26 individuals) atherosclerotic internal carotid artery stenosis above 50% on one or both sides. The control group consisted of 30 healthy volunteers (F/M 20/10; aged 61.03 ± 9.08 ; 50–78).

Results: The mean serum concentration of interleukin-6 was significantly higher both in the group of patients with symptomatic and asymptomatic ICA stenosis, as compared with the control group ($p = 0.0002$; $p = 0.0208$, respectively) There were no significant differences in serum concentration of TNF-alpha and interleukin-10 between patients and control group.

Conclusions: Patients with atherosclerotic stenosis of the internal carotid artery have shown significantly elevated levels of interleukin-6 in the serum, which suggests that it is involved in the disease process.

Cytokines and other inflammatory mediators in patients with carotid artery stenosis require further studies which would allow for a better understanding of the effect on the formation and activity of atherosclerotic lesions.

Key words: THF-alpha, interleukin, carotid artery stenosis

Polish Surgery 2014, 16, 2, 57–65

Wstęp

U około 15–20% chorych z udarem niedokrwiennym mózgu stwierdza się obecność zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej (ICA, *internal carotid artery*) [1, 2]. Główną przyczyną udaru niedokrwiennego mózgu związanego ze zwężeniem ICA są zatory mózgowo tętniczo-tętnicze a tylko część z nich (10–15%) wynika ze zmniejszenia objętości przepływającej krwi — u pacjentów, u których nie doszło do wykształcenia dostatecznego krążenia obocznego przez koło tętnicze mózgu [1–3]. Potencjalnymi czynnikami determinującymi wystąpienie objawów zwężenia ICA są: stopień zwężenia, morfologia (stabilność) blaszki miażdżycowej zwężającej tętnicę, skłonność do tworzenia zakrzepów w miejscu zwężenia, szybkość narastania zwężenia, rozwój krążenia obocznego, współwystępowanie zwężenia z innymi czynnikami ryzyka udaru mózgu [2, 4]. W powstawaniu, rozwoju oraz destabilizacji blaszek miażdżycowych zwężających ścianę ICA istotną rolę pełni proces zapalny [5, 6].

U chorych z udarem niedokrwiennym mózgu oprócz zwężenia ICA często stwierdza się obecność również innych przyczyn udaru, dlatego bardzo ważne jest określenie, czy to właśnie stwierdzone zwężenie było przyczyną udaru.

Poszukuje się więc dodatkowych wskaźników niestabilności blaszki miażdżycowej zwężającej ICA. Jednym z nich mogłoby być podwyższone stężenie cytokin zapalnych w surowicy chorych ze zwężeniem ICA.

Celem badania było określenie stężenia czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF-alfa, *tumor necrosis factor alpha*), interleukiny-6 (IL-6) i interleukiny-10 (IL-10) w surowicy krwi pacjentów ze zwężeniem ICA. Drugim celem badania było porównanie wartości stężeń wymienionych markerów zapalnych u pacjentów z objawowym i nieobjawowym zwężeniem ICA.

Material i metody

Badaniami objęto 65 pacjentów (K/M 20/45 w śr. wieku $66,29 \pm 7.77$ roku; w przedziale 55–80 lat) Górnośląskiego Centrum Medycznego w Katowicach, u których stwierdzono obecność objawowego (39 osób) lub bezobjawowego (26 osób) miażdżycowego zwężenia ICA powyżej 50% po jednej lub obu stronach.

Jako objawowe traktowano zwężenie, które było przyczyną wystąpienia u badanych dokonanego udaru mózgu, odwracalnego niedokrwiennego deficytu neurologicznego (RIND, *reversible ischemic neurological deficit*) lub

Introduction

Approximately 15–20% of patients with ischaemic stroke indicate the presence of internal carotid artery (ICA) stenosis [1, 2]. The main cause of ischaemic stroke associated with ICA stenosis is arterio-arterial embolus; only a portion of such emboli (10–15%) are due to the reduction of the blood flow volume — in patients who could not create sufficient collateral circulation through the Willis' circle [1–3]. Potential determinants of symptoms of internal carotid artery stenosis include: the degree of stenosis, the morphology (stability) of atherosclerotic plaque occluding the artery, a tendency to form clots at the site of stenosis, development of collateral circulation, the coexistence of stenosis and other risk factors of cerebral stroke [2, 4]. The inflammatory process serves an important role in the formation, growth and destabilization of atherosclerotic plaque narrowing the internal carotid artery [5, 6].

Other causes of stroke are also often present in patients with ischaemic cerebral stroke in addition to ICA stenosis, therefore it is important to determine whether such stroke was caused by that very stenosis.

Therefore, additional indicators of atherosclerotic plaque instability causing ICA stenosis are sought. One of them could be the elevated levels of inflammatory cytokines in the serum of patients with ICA stenosis.

The aim of the study was to determine the concentration of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in the serum of patients with internal carotid artery stenosis. Another aim was to compare the concentrations of these inflammatory markers in patients with symptomatic and asymptomatic carotid artery stenosis.

Material and methods

The study included 65 patients (F/M 20/45; aged 66.29 ± 7.77 ; 55–80) of the Upper Silesian Medical Centre in Katowice who revealed the presence of symptomatic (39 individuals) or asymptomatic (26 individuals) atherosclerotic internal carotid artery stenosis above 50% on one or both sides.

Symptomatic stenosis was defined as such that caused complete stroke, or reversible ischaemic neurological deficit (RIND) or transient ischaemic attack (TIA) in the subjects within 6 months before the study, which effects resulted from carotid artery stenosis.

The study excluded patients with carotid stenosis of other than atherosclerotic origins, with present infection

przemijającego napadu niedokrwiennego (TIA, *transient ischemic attack*) w ciągu 6 poprzedzających miesięcy wynikających ze zwężenia ICA.

Do badania nie kwalifikowano pacjentów ze zwężeniem ICA o przyczynie innej niż miażdżyca, z obecną infekcją (na podstawie badania przedmiotowego i podstawowych badań laboratoryjnych), niewydolnością nerek, chorobą neurologiczną z wyjątkiem objawów spowodowanych miażdżycowym zwężeniem ICA, ostrym udarem mózgu, przebytym zawałem serca, chorobą nowotworową oraz chorych podczas steroidoterapii.

Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników (K/M 20/10 w śr. wieku $61,03 \pm 9,08$ roku; w przedziale 50–78 lat).

U zakwalifikowanych przeprowadzono wywiad, badanie internistyczne i neurologiczne.

Następnie wykonano następujące procedury: oznaczenie w surowicy TNF-alfa, interleukiny-6, interleukiny-10. U pacjentów ze zwężeniem objawowym pierwsze badania laboratoryjne wykonano w okresie 15–154 dni (śr.: 75,28; mediana: 86 dni) od wystąpienia objawów niedokrwienia mózgu.

W celu oznaczenia stężenia badanych cytokin krew pobierano u pacjentów będących na czczo.

Oznaczenia stężenia TNF-alfa, interleukiny-6 i interleukiny-10 w surowicy wykonano przy użyciu zestawów immunoenzymatycznych EIA firmy Rai Biotach: Human IL-6 ELISA kit, Human IL-10 ELISA kit, Human TNF-alfa ELISA kit. Uzyskane wartości absorbancji odczytano przy długości fali 450 nm za pomocą Spektrometru Sirio S, wynik przedstawiono w pg/ml.

Badanie USG tętnic szyjnych wykonano przy użyciu głowicy liniowej L12-3 3,75–12 MHz (PHILIPS ENVISOR HD C.O.2) Naczynia badano metodą Duplex i uzupełniano badaniem za pomocą kolorowego doplera. Spośród 65 pacjentów ze zwężeniem ICA 31 osób (19 z objawowym i 12 z bezobjawowym zwężeniem ICA) miało zmiany miażdżycowe w ICA po przeciwnej stronie (27 zwężeń i 4 niedrożności). Następnie przeprowadzono przezczaszkowe badanie dopplerowskie (TCD, *transcranial doppler*) za pomocą aparatu PIONEER TC 2020 w celu wykluczenia $\geq 50\%$ zwężenia tętnic mózgowych.

W analizie statystycznej wykorzystano testy: U Manna-Whitneya, χ^2 , test Fishera dwustronny dokładny; jako znamienne przyjęto poziom istotności $p \leq 0,05$.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiej Akademii Medycznej.

Wyniki

Charakterystykę pacjentów ze zwężeniem ICA przedstawiono w tabeli I.

U chorych z objawowym zwężeniem ICA wystąpiły wcześniej: TIA w zakresie półkuli mózgowej — 8 pacjentów, przejściowe zaniewidzenie jednooczne — 2 pacjentów, odwracalny udar mózgu z objawami półkulowymi — 3 pacjentów, dokonany udar mózgu — 26 pacjentów. Czas od wystąpienia objawów do wykonania pierwszych badań w ramach obecnej pracy wynosił 15–154 dni (śr. 75,28; mediana 86 dni).

(based on physical examination and basic laboratory tests), renal insufficiency, neurological disease — except symptoms caused by atherosclerotic internal carotid artery stenosis, acute stroke, past myocardial infarction, neoplastic disease or symptoms occurring during present steroid therapy.

The control group consisted of 30 healthy volunteers (F/M 20/10; aged 61.03 ± 9.08 ; 50–78).

The qualified patients were interviewed in relation to their medical history; they also underwent internal medicine examination and neurological examination.

The following procedures were then performed: determination of serum TNF-alpha, interleukin-6 and interleukin-10. In patients with symptomatic stenosis the first laboratory tests were carried out in the period from 15 to 154 days (mean: 75.28; median: 86 days) after the onset of cerebral ischaemia.

In order to determine the concentration of cytokines, blood collection was performed in patients on an empty stomach.

Determination of the concentration of TNF-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 in the serum was performed with the use of the following EIA immunoenzyme sets by Rai Biotech: Human IL-6 ELISA kit, Human IL-10 ELISA kit, Human TNF-alpha ELISA kit. The resulting absorbance values were read at 450 nm using the Sirio S Spectrometer; the result is expressed in pg/mL.

Carotid artery ultrasound was performed using a linear probe L12-3 3.75–12 MHz (PHILIPS ENVISOR HD C.O.2). The vessels were examined using the Duplex method and supplemented by colour Doppler. Among the 65 patients with ICA stenosis, 31 individuals (19 with symptomatic and 12 with asymptomatic ICA stenosis) had atherosclerotic lesions in the ICA on the opposite side (27 stenoses and 4 occlusions). Then transcranial Doppler (TCD) was performed with the use of PIONEER TC 2020 to exclude $\geq 50\%$ stenoses of cerebral arteries.

The following tests were used in statistical analysis: Mann-Whitney test, χ^2 test, two-tailed Fisher's exact test; the level of significance $p \leq 0.05$ was treated as significant.

The studies were approved by the Bioethics Committee of the Silesian Medical Academy.

Results

Characteristics of the patients with ICA stenosis are shown in Table I.

Patients with symptomatic ICA stenosis exhibited previously: TIA in the area of cerebral hemisphere — 8 patients; amaurosis fugax — 2 patients; RIND with hemispheric symptoms — 3 patients; complete stroke — 26 patients. The time from the onset of symptoms to first examinations as part of the present study ranged from 15 to 154 days (mean: 75.28; median: 86 days).

Physical examination of the patients with symptomatic ICA stenosis revealed: hemiparesis — 24 patients, aphasia — 13 individuals, central paralysis of the facial nerve — 15 individuals, central paralysis of the hypoglossal nerve — 5 individuals, hemidysesthesia — 15 individuals,

Tabela I. Charakterystyka pacjentów z objawowym i bezobjawowym zwężeniem ICA
Table 1. Characteristics of the patients with symptomatic and asymptomatic ICA stenosis

	Pacjenci ze zwężeniem bezobjawowym <i>Patients with asymptomatic stenosis</i>	Pacjenci ze zwężeniem objawowym <i>Patients with symptomatic stenosis</i>	Wartość p <i>P value</i>
Liczba pacjentów (N)/ <i>The number of individuals (N)</i>	N = 26	N = 39	
Wiek (lata)/ <i>Age (years)</i> Średnia/ <i>Mean</i> Odchylenie standardowe (SD) <i>Zakres/Standard deviation (SD)/ Range</i>	68,88 7,59 56–80	64,56 7,47 55–80	0,0249*
Płeć/ <i>Gender</i> K/M/F/M	N (%) 9/17 (34,6/65,4)	N (%) 11/28 (28,2/71,8%)	0,5833**
Nadciśnienie tętnicze/ <i>Arterial hypertension</i>	N (%) 22 (84,62)	N (%) 35 (89,74)	0,7034***
Cukrzyca/ <i>Diabetes</i>	N (%) 5 (19,23)	N (%) 10 (25,64)	0,3862***
Zaburzenia gospodarki lipidowej/ <i>Lipid metabolism disorders</i>	N (%) 22 (84,62)	N (%) 36 (92,31)	0,4240***
Współistnienie objawów miażdżycy innych tętnic (choroba wieńcowa lub miażdżycza tętnic kończyn dolnych) <i>The coexistence of atherosclerotic symptoms related to other arteries (coronary disease or atheromatosis of lower limb arteries)</i>	N (%) 15 (57,69)	N (%) 22 (56,41)	0,9185**
Palenie papierosów/ <i>Smoking</i>	N (%) 8 (30,77)	N (%) 19 (48,72)	0,2011***
Wywiad rodzinny wskazujący na choroby układu krążenia <i>Family history pointing to vascular diseases</i>	N (%) 8 (30,77)	N (%) 15 (38,46)	0,5250**
Obecność zmian miażdżycowych w kontralateralnej ICA <i>Presence of atherosclerotic lesions in the contralateral ICA</i>	N (%) 12 (46,15)	N (%) 19 (48,71)	0,83932**

*test U Manna-Whitneya, **test chi², ***test Fishera dwustronny dokładny/U Mann-Whitney test; **Chi² test; ***Two-tailed Fisher's exact test

Tabela II. Średnie stężenie TNF-alfa, interleukiny-6 i interleukiny-10 u osób ze zwężeniem ICA i w grupie kontrolnej
Table II. The mean concentration of TNF-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 in patients with ICA stenosis and in the control group

	TNF-alfa [pg/ml]	IL-6 [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]
Chorzy ze zwężeniem ICA/ <i>Patients with ICA stenosis</i>	14,32 ± 6,08	13,65 ± 4,46	3,72 ± 2,52
Grupa kontrolna/ <i>Control group</i>	11,78 ± 5,45	5,88 ± 3,04	3,18 ± 2,58
Znamiennosc różnicy p/P value	0,0743	0,001	0,6224

W badaniu przedmiotowym pacjentów z objawowym zwężeniem ICA stwierdzono obecność: połowiczego niedowładów kończyn — 24 pacjentów, afazji — 13 osób, ośrodkowego niedowładów nerwu twarowego — 15 osób, ośrodkowego niedowładów nerwu podjęzykowego — 5 osób, połowicznych zaburzeń czucia — 15 osób, zespołu Gerstmana — 1 osoba, ataksji — 2 osoby, zaburzeń poznawczych — 1 osoba, niedowidzenia połowiczego jednoimiennego — 2 osoby.

Średnie stężenie TNF-alfa w surowicy chorych ze zwężeniem ICA nie różniło się znamienne w porównaniu ze średnim stężeniem TNF-alfa w surowicy osób z grupy kontrolnej (tab. II, ryc. 1).

W grupie chorych ze zwężeniem ICA średnie stężenie IL-6 w surowicy było znamienne wyższe w porównaniu ze średnim stężeniem IL-6 w surowicy osób z grupy kontrolnej (p = 0,001) (tab. II, ryc. 1).

Nie było istotnych statystycznie różnic między średnim stężeniem IL-10 w grupie chorych ze zwężeniem ICA i w grupie kontrolnej (tab. II, ryc. 1).

Średnie stężenie IL-6 w surowicy było znamienne wyższe zarówno w grupie chorych z objawowym, jak i bezobjawowym zwężeniem ICA w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio: p = 0,0002, p = 0,0208) (tab. III).

Gerstmann syndrome — 1 person, ataxia — 2 individuals, cognitive disorders — 1 person, homonymous hemianopsia — 2 individuals.

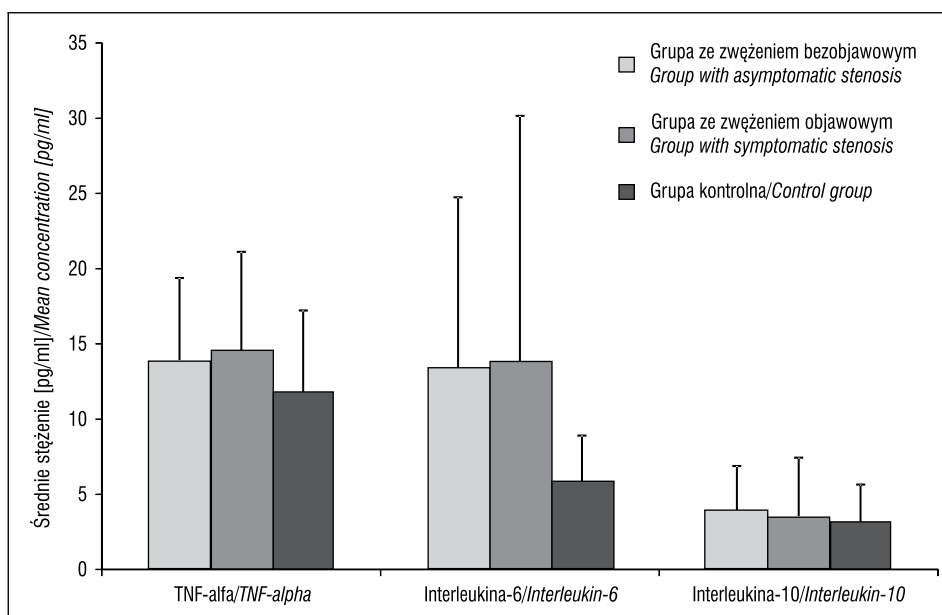
The mean serum concentration of TNF-alpha in patients with ICA stenosis was not significantly different than the mean serum concentration of TNF-alpha in the control group (Table II, Fig. 1).

In the group of patients with ICA stenosis, the mean serum concentration of interleukin-6 was significantly higher than the mean serum concentration of interleukin-6 in the control group (p = 0.001) (Table II, Fig. 1).

There were no statistically significant differences between the mean concentration of interleukin-10 in the group of patients with ICA stenosis and the control group (Table II, Fig. 1).

The mean serum concentration of interleukin-6 was significantly higher both in the group of patients with symptomatic and asymptomatic ICA stenosis, as compared with the control group (p = 0.0002; p = 0.0208, respectively) (Table III).

There were no statistically significant differences in the concentrations of TNF-alpha and interleukin-10 between the group with symptomatic ICA stenosis (mean concentration: 14.58 ± 6.54 pg/mL and 3.56 ± 3.19 pg/mL,



Rycina 1. Średnie stężenie TNF-alfa, interleukiny-6 i interleukiny-10 w surowicy chorych ze zwężeniem ICA objawowym i bezobjawowym oraz w grupie kontrolnej (średnia \pm SD)

Figure 1. Mean concentration of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 in participants of study (mean \pm SD)

Tabela III. Średnie stężenie interleukiny-6 w grupie chorych ze zwężeniem ICA bezobjawowym, objawowym i w grupie kontrolnej
Table III. Mean concentration of interleukin-6 in the groups of patients with asymptomatic and symptomatic ICA stenosis and in the control group

Grupa/Group	N	Średnie stężenie interleukiny-6 [pg/ml]/Mean concentration of interleukin-6 [pg/ml]	Odchylenie standardowe [pg/ml]/Standard deviation [pg/ml]	Wartość minimalna [pg/ml]/Minimum value [pg/ml]	Wartość maksymalna [pg/ml]/Maximum value [pg/ml]	Znamiennosc różnic (p)* (w porównaniu z grupą kontrolną)/Significance of differences (p)* (vs control group)
Chorzy z bezobjawowym zwężeniem ICA Patients with asymptomatic ICA stenosis	26	13,35	11,4	3,39	46,5	0,0002
Chorzy z objawowym zwężeniem ICA Patients with symptomatic ICA stenosis	39	13,84	16,33	1,11	68	0,0208
Kontrolna/Control group	30	5,88	3,04	1,4	13,2	

*test U Manna-Whitneya/**U Mann-Whitney test

Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniu TNF-alfa i IL-10 w grupie z objawowym zwężeniem ICA (odpowiednio średnie stężenie: $14,58 \pm 6,54$ pg/ml i $3,56 \pm 3,19$ pg/ml) w porównaniu z grupą kontrolną oraz w grupie ze zwężeniem bezobjawowym (TNF-alfa $13,93 \pm 5,45$ pg/ml, IL-10 $3,96 \pm 2,93$ pg/ml) w porównaniu z grupą kontrolną.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu TNF-alfa, IL-6 i IL-10 między grupą ze zwężeniem objawowym a grupą ze zwężeniem bezobjawowym.

Dyskusja

Zależność powstawania zmian miażdżycowych i związanych z nimi objawów klinicznych od nasilenia aktywności czynników zapalnych potwierdzają badania dotyczące uznanych markerów zapalnych, takich jak: białko C-reaktywne (CRP, *C-reactive protein*), OB, fibrynogen, liczba leukocytów w 1 mm^3 krwi [7–17]. W ostatnich latach wskazuje się również na udział cytokin zapalnych, między innymi TNF-alfa, IL-6 i IL-10 w powstawaniu, narastaniu,

respektively) and the control group, and between the group with asymptomatic stenosis (TNF-alpha — 13.93 ± 5.45 pg/mL; IL-10 — 3.96 ± 2.93 pg/mL) and the control group.

There were no statistically significant differences in the concentrations of TNF-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 between the group with symptomatic and the group with asymptomatic ICA stenosis.

Discussion

The relationship between the formation of atherosclerotic lesions, related clinical symptoms and the intensity of the activity of inflammatory factors is confirmed by the studies focused on recognized inflammatory markers, such as: C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), fibrinogen, leukocyte count in 1 mm^3 of blood [7–17]. In recent years it has been also indicated that inflammatory cytokines, also TNF-alpha, interleukin-6 and interleukin-10, take part in the formation, stabilization and destabilization of atherosclerotic carotid artery stenosis.

stabilizacji lub destabilizacji miażdżycowego zwężenia tętnic. Większość opublikowanych badań oceniających znaczenie TNF-alfa, Il-6 i Il-10 w rozwoju zmian miażdżycowych oparta jest na ocenie związku tych cytokin z powstawaniem miażdżycy tętnic wieńcowych [16–25].

Związek TNF-alfa z nasileniem miażdżycy aorty, tętnic biodrowych i udowych potwierdzają badania Rus i wsp. [25]. Autorzy ci wykazali intensywną produkcję TNF-alfa w zmienionej miażdżycowo ścianie naczyń z największym nagromadzeniem TNF-alfa w miejscach powstawania blaszek — pogrubiałej błonie wewnętrznej naczyń. Badania oceniające stężenie TNF-alfa u chorych ze zwężeniem ICA na ogół nie potwierdzają jej podwyższenia w surowicy w zależności zaawansowania zwężenia, chociaż wykazano znamienne większą ekspresję TNF-alfa w blaszkach miażdżycowych uzyskanych z endarterektomii pacjentów z objawowym zwężeniem ICA od pacjentów bezobjawowych. [26]. Elkind i wsp. nie stwierdzili istotnych zależności między stężeniem TNF-alfa w surowicy a nasileniem zmian miażdżycowych w tętnicach szyjnych [27]. Kotouzis i wsp., którzy badali w grupie 119 pacjentów ze zwężeniem ICA zależność stężenia TNF-alfa w surowicy od występowania objawów klinicznych zwężenia, nie stwierdzili znamiennych różnic stężenia TNF-alfa między grupą pacjentów z objawowym zwężeniem ICA a grupą pacjentów z bezobjawowym zwężeniem ICA [28]. Podobne wyniki przedstawiono w pracy Kaperonisa i wsp. [26].

W surowicy badanych w obecnej pracy nie stwierdzono znamiennych różnic stężenia TNF-alfa w zależności od obecności zwężenia czy też od obecności objawów zwężenia.

Brak istotnych różnic stężenia TNF-alfa w surowicy pacjentów z objawowym zwężeniem ICA w porównaniu z pacjentami ze zwężeniem bezobjawowym potwierdza więc wyniki badań innych autorów [26–28].

Brak istotnych różnic w stężeniu TNF-alfa między grupą z objawowym zwężeniem a grupą z bezobjawowym zwężeniem być może spowodowany na przykład obecnością w obu grupach niestabilnych blaszek miażdżycowych.

Dowody na powiązanie Il-6 z aktywnością zmian miażdżycowych są jeszcze bardziej wyraźne niż te, które wykazano dla TNF-alfa.

W badaniu Lee i wsp. podwyższone stężenie Il-6 okazało się niezależnym czynnikiem rokowniczym rozwoju wczesnych zmian miażdżycowych w ICA [29].

W grupie chorych ze zwężeniem ICA, zarówno objawowym, jak i bezobjawowym, badanych w obecnej pracy, stwierdzono istotnie wyższe wartości stężenia Il-6 w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną. Wynik ten potwierdza znaczenie Il-6 w powstawaniu miażdżycowego zwężenia ICA.

Podobne wyniki uzyskali Debing i wsp., którzy zbadali 180 pacjentów ze zwężeniem i 180 osób bez zwężenia [30]. Średnie stężenie Il-6 w grupie chorych ze zwężeniem wynosiło 11,9 pg/ml, zaś bez zwężenia 6,3 pg/ml.

Nie stwierdzono przy tym istotnych statystycznie różnic stężenia Il-6 między grupami. Natomiast Kotouzis i wsp. wykazali istotnie statystycznie wyższe wartości

Most of the published studies assessing the importance of TNF-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 for the development of atherosclerotic lesions are based on the assessment of the relationship between these cytokines and the formation of coronary artery atherosclerosis [16–25].

The relationship between TNF-alpha and the severity of atherosclerosis of the aorta, iliac and femoral arteries was confirmed by studies conducted by Rus *et al.* [25]. Those authors revealed that intense production of TNF-alpha occurs in the vascular wall with atherosclerotic lesions; the highest accumulation of TNF-alpha occurs at the site of plaque formation — a thickened internal membrane of the vessels. Although the atherosclerotic plaque obtained (by endarterectomy) from patients with symptomatic ICA stenosis demonstrated a significantly higher expression of TNF-alpha than the plaque from patients with asymptomatic ICA stenosis, studies assessing the levels of TNF-alpha in patients with ICA stenosis generally do not confirm that its increase in the serum depends on the severity of stenosis [26]. Elkind *et al.* found no significant correlation between serum levels of TNF-alpha and the severity of atherosclerotic lesions in the carotid arteries [27]. In a group of 119 patients with ICA stenosis Kotouzis *et al.* examined the relationship between TNF-alpha in the serum and the clinical signs of stenosis [28]. Those authors found no significant differences in the levels of TNF-alpha between the group of patients with symptomatic ICA stenosis and the group of patients with asymptomatic stenosis of the ICA. Similar results were presented in the study by Kaperonisa *et al.* [26].

In the serum of the present study subjects, there were no significant differences found in TNF-alpha levels which would depend on the presence of stenoses or stenotic symptoms.

The fact that there were no significant differences in the levels of TNF-alpha between the serum of the patients with symptomatic ICA stenosis and the patients with asymptomatic stenosis is consistent with the findings of other authors [26–28].

No significant differences in the concentration of TNF-alpha between the group with symptomatic stenosis and the group with asymptomatic stenosis may be due to the presence of unstable atherosclerotic plaque in both groups.

The evident link between interleukin-6 and the activity of atherosclerotic lesions is even more pronounced than the evidence demonstrated for TNF-alpha.

In the study by Lee *et al.*, elevated levels of interleukin-6 proved to be an independent predictor of the development of early atherosclerotic lesions in the ICA [29].

In the group of present study subjects with ICA stenosis, both symptomatic and asymptomatic, the levels of serum interleukin-6 were found to be significantly higher than in the control group. This result proves the importance of interleukin-6 in the development of atherosclerotic stenosis of the internal carotid artery.

Similar results were obtained by Debing *et al.* [30]. Those authors examined 180 patients with stenosis and 180 individuals without stenosis. The mean con-

stężenia Il-6 u pacjentów z objawowym zwężeniem ICA powyżej 70% [28]. Znaczenie Il-6 w rozwoju zmian miażdżycowych potwierdzono w badaniach doświadczalnych na modelach zwierzęcych [31, 32]. Badania Huber i wsp. potwierdzają udział Il-6 w powstawaniu wczesnych zmian miażdżycowych u ludzi, a badania Song i wsp. jej udział w wywoływaniu w ścianie naczynia reakcji zapalnej — reakcji ostrej fazy, sprzyjającej powstawaniu zmian miażdżycowych [32, 33].

Działanie prozapalne Il-6 we wczesnych i zaawansowanych przemianach ściany tętnic, a następnie w blaszce miażdżycowej prowadzi do zmiany składu komórkowego blaszki, zmiany właściwości i aktywności komórek, zmiany proporcji komórek do macierzy pozakomórkowej, sprzyjającej progresji i destabilizacji blaszki miażdżycowej. Interleukina 6 wywołuje zmiany zarówno lokalne, jak i systemowe, co prowadzi do dalszego nasilenia reakcji zapalnej i pogłębienia zmian miażdżycowych [34, 35].

Liczne doniesienia ostatniej dekady podkreślają protekcyjną rolę Il-10 w rozwoju miażdżycy [19, 20, 22, 23, 36, 37].

Protekcyjną rolę Il-10, stabilizującą blaszki miażdżycowe, potwierdzono w immunohistochemicznych badaniach blaszek, uzyskanych z różnych tętnic, w tym także tętnic szyjnych [38]. W badaniach doświadczalnych *in vivo* i *in vitro* potwierdzono udział Il-10 w zapobieganiu rozwoju miażdżycy poprzez hamowanie proliferacji i aktywności komórek zapalnych, zmniejszanie stężenia czynników prozapalnych i wzmacnianiu mechanizmów antyzapalnych [39–41].

U pacjentów biorących udział w obecnej pracy stwierdzono nieznamiennie różnice stężenia Il-10 między grupą chorych ze zwężeniem ICA (zarówno objawowym, jak i bezobjawowym) a grupą kontrolną oraz między grupą ze zwężeniem objawowym w porównaniu z grupą z bezobjawowym zwężeniem ICA.

Wzajemne zależności cytokin zapalnych w obrębie blaszek miażdżycowych są różnorodne i skomplikowane. Stężenie TNA-alfa, Il-6 i Il-10 w surowicy może zależeć od wielu czynników: genetycznych, czynników ryzyka i rozmaitych czynników zapalnych produkowanych lokalnie w blaszce miażdżycowej lub produkowanych poza blaszką. Różnorodność wzajemnych oddziaływań elementów biorących udział w kaskadzie przemian zapalno-proliferacyjnych blaszek miażdżycowych może powodować uzyskiwanie niejednoznacznych wyników w różnych badaniach dotyczących udziału cytokin w powstawaniu, progresji i destabilizacji blaszek miażdżycowych [42].

Powstawanie objawów, a więc destabilizacja blaszki, ma jednak ostry, szybko postępujący charakter. Dlatego pewne znaczenie przy ocenie stężenia badanych cytokin może mieć czas oznaczenia stężenia cytokin od wystąpienia objawów (u badanych w tej pracy pacjentów mieścił się on w granicach od 15 dni do 152 dni). Zależność stężenia cytokin zapalnych, szczególnie Il-10, w surowicy od czasu wystąpienia objawów podkreślają w swoich badaniach pacjentów z chorobą wieńcową Rajappa i wsp. [23]. Badacze ci stwierdzili wzrost stężenia Il-10 u chorych z nowo przebyłym zawałem serca. Wynik ten wskazuje

concentration of interleukin-6 in the group of patients with stenosis was 11.9 pg/mL; it was 6.3 pg/mL in those without stenosis.

Moreover, there were no statistically significant differences in the concentrations of interleukin-6 and between the group of patients with symptomatic stenosis and the one with asymptomatic stenosis.

However, Kotuoziš *et al.* presented significantly higher values for interleukin-6 concentration in patients with symptomatic ICA stenosis above 70% [28]. The importance of interleukin-6 in the development of atherosclerotic lesions was confirmed in experimental studies on animal models [31, 32]. Studies by Huber *et al.* confirm the role of interleukin-6 in the development of early atherosclerotic lesions; studies by Song *et al.* confirm its role in the induction of inflammatory reaction within the vessel wall — the acute phase response promoting the formation of atherosclerotic lesions [32, 33].

A pro-inflammatory effect of interleukin-6 in the early and advanced changes of the arterial wall and then in the atherosclerotic plaque leads to the change in cellular composition of the plaque, in the properties and activities of cells, and in the proportion of cells in relation to extracellular matrix which is conducive to progression and destabilization of atherosclerotic plaque. Interleukin-6 induces changes both locally and systemically, which leads to further intensification of the inflammatory response and to enhanced atherosclerotic lesions [34, 35].

Numerous reports of the last decade emphasized the protective role of interleukin-10 in the development of atherosclerosis [19, 20, 22, 23, 36, 37].

The protective role of interleukin-10, which stabilizes atherosclerotic plaque, was confirmed in immunohistochemical studies concerning the plaque derived from various arteries, also the carotid arteries [38]. In experimental studies *in vivo* and *in vitro*, it was confirmed that interleukin-10 takes part in the prevention of atherosclerotic development by inhibiting the proliferation and activation of inflammatory cells, decreasing the concentration of pro-inflammatory agents and strengthening anti-inflammatory mechanisms [39–41].

The patients participating in the present study exhibited insignificant differences in the levels of interleukin-10 between the group of patients with ICA stenosis (both symptomatic and asymptomatic) and the control group and between the group with symptomatic stenosis and the group with asymptomatic ICA stenosis.

Interdependence of inflammatory cytokines within the atherosclerotic plaques is diverse and complicated. TNA-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 serum levels may depend on many factors: genetic factors, risk factors and various inflammatory agents produced locally in the atherosclerotic plaque or outside of it. The diversity of the interaction between the elements involved in the cascade of inflammatory and proliferative changes of atherosclerotic plaque can result in ambiguous effects inconsistent between various studies related to the participation of cytokines in the development, progression and destabilization of atherosclerotic plaque [42].

na wzmożoną aktywność antyzapalną w postaci wzrostu stężenia Il-10 w odpowiedzi na destabilizację blaszek miażdżycowych w tętnicach wieńcowych.

Wyniki uzyskane w obecnej pracy i dostępne w piśmiennictwie wskazują, że podwyższone stężenie omawianych cytokin współistnieje z obecnością miażdżycowego zwężenia ICA. Zależność ta wydaje się największa w stosunku do Il-6.

Wnioski

1. U chorych z miażdżycowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej stwierdza się znamienne podwyższenie stężenia Il-6 w surowicy, co sugeruje jej udział w tym procesie chorobowym.
2. Cytokiny i inne mediatory zapalne u pacjentów ze zwężeniem tętnicy szyjnej wymagają dalszych badań w celu lepszego rozumienia mechanizmu ich wpływu na kształtowanie i aktywność zmian miażdżycowych.

Piśmiennictwo (References)

1. Dziedzic T. Etiologia udaru niedokrwiennego. In: Szczudlik A, Członkowska A, Kwieciński H, Słowik A (ed.). Udar mózgu. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2007: 96–100.
2. Biller J, Betsy BL. Choroba niedokrwienna naczyń mózgowych. W: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J (ed.). Neurologia w praktyce klinicznej. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2006: 1429–1491.
3. Stoll G, Jander S, Sitzer M, Muller W, Sandmann W, Siebler M. Die instabile Karotisstenose — eine entzündliche Erkrankung? *Nervenarzt* 2000; 71: 955–962.
4. Sacco RL. Patogeneza, klasyfikacja oraz epidemiologia chorób naczyniowych mózgu. W: Rowland LP, red wydania drugiego polskiego. Neurologia Merritta, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2008: 279–295.
5. Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 115–126.
6. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135–1139.
7. Magyar M, Szikszai Z, Balla J et al. Early onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. *Stroke* 2003; 34: 58–63.
8. Sabeti S, Exner M, Mlekusch W et al. Prognostic impact of fibrinogen in carotid atherosclerosis: nonspecific indicator of inflammation or independent predictor of disease progression? *Stroke* 2005; 36: 1400–1404.
9. Elkind M, Cheng J, Alcala B, Paik M, Sacco R. Elevated white blood cell count and carotid plaque thickness The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* 2001; 32: 842–849.
10. Assayag EB, Bova I, Kesler A, Berliner S, Shapira I, Bornstein NM. Erythrocyte aggregation as an early biomarker in patients with asymptomatic carotid stenosis. *Dis Markers* 2008; 24: 33–39.
11. Schlager O, Exner M, Mlekusch W et al. C-reactive protein predicts future cardiovascular events in patients with carotid stenosis. *Stroke* 2007; 38: 1263–1268.
12. Garcia BA, Ruiz C, Chacon P, Sabin JA, Matas M. High-sensitivity C-reactive protein in high grade carotid stenosis: Risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg*. 2003; 38: 1018–1024.
13. Hoshi T, Kitagawa K, Yamagami H, Furukado S, Hougaku H, Hori M. Relation between interleukin-6 level and subclinical

However, the formation of symptoms, and thus plaque destabilization, is acute and progresses rapidly. Therefore, the time from the onset of symptoms to the assessment of cytokine concentration (for the study subjects it fell within the range of 15–152 days) may have some importance for the assessment of cytokine concentration. In the study of patients with coronary disease, Rajappa *et al.* emphasized that the serum levels of inflammatory cytokines, especially interleukin-10, depend on the time of the onset of symptoms [23]. Those investigators reported increased concentrations of interleukin-10 in patients with myocardial infarction. Such results suggest that increased anti-inflammatory activity is expressed as increased levels of interleukin-10 in response to destabilization of atherosclerotic plaque in the coronary arteries.

The results obtained in the present study and the results available in the literature indicate that elevated levels of the cytokines coexist with the presence of atherosclerotic stenosis of the ICA. This relationship appears to be the strongest for interleukin-6.

Conclusions

1. Patients with atherosclerotic stenosis of the internal carotid artery have shown significantly elevated levels of interleukin-6 in the serum, which suggests that it is involved in the disease process.
 2. Cytokines and other inflammatory mediators in patients with carotid artery stenosis require further studies which would allow for a better understanding of the effect on the formation and activity of atherosclerotic lesions.
-
- intracranial large-artery atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008; 197: 326–332.
14. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 2364–2367.
 15. Andresdottir MB, Sigfusson N, Sigvaldason H, Gudnason V. Erythrocyte sedimentation rate, an independent predictor of coronary heart disease in men and women: The Reykjavik Study. *Am J Epidemiol*. 2003; 158: 844–851.
 16. Natali A, L'Abbate A, Ferrannini E. Erythrocyte sedimentation rate, coronary atherosclerosis, and cardiac mortality. *Eur Heart J*. 2003; 24: 639–648.
 17. Kofoed SC, Witttrup HH, Sillesen H, Nordestgaard BG. Fibrinogen predicts ischemic stroke and advanced atherosclerosis but not echolucent, rupture prone carotid plaques. *Eur Heart J*. 2002; 24: 567–576.
 18. Gotsman I, Stabholz A, Planer D et al. Serum cytokine tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 associated with the severity of coronary artery disease: indicators of an active inflammatory burden? *Isr Med Assoc J*. 2008; 10: 494–498.
 19. Lai S, Fishman EK, Lai H, Pannu H, Detrick B. Serum IL-6 levels are associated with significant coronary stenosis in cardiovascularly asymptomatic inner-city black adults in the US. *Inflamm Res*. 2009; 58: 15–21.
 20. Sukhija R, Fahdi I, Garza L et al. Inflammatory markers, angiographic severity of coronary artery disease, and patient outcome. *Am J Cardiol*. 2007 1; 99: 879–884.

21. Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC. Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina. *Circulation* 2001; 104: 746–749.
22. Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokuno H, Daida H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2003; 91: 133–136.
23. Rajappa M, Sen SK, Sharma A. Role of pro-/anti-inflammatory cytokines and their correlation with established risk factors in South Indians with coronary artery disease. *Angiology* 2009; 60: 419–426.
24. Reilly MP, Rohatgi A, McMahon K et al. Plasma cytokines, metabolic syndrome, and atherosclerosis in humans. *J Investig Med.* 2007; 55: 26–35.
25. Rus Hg, Niculescu F, Vlaicu R. Tumor necrosis factor-alpha in human arterial wall with atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1991; 89: 247–254.
26. Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Perrea D, Kostakis AG, Karayannakos PE. The association of carotid plaque inflammation and Chlamydia pneumoniae infection with cerebrovascular symptomatology. *J Vasc Surg.* 2006; 44: 1198–1204.
27. Elkind MS, Cheng J, Boden-Albala B et al. Tumor necrosis factor receptor levels are associated with carotid atherosclerosis. *Stroke* 2002; 33: 31–37.
28. Koutouzis M, Rallidis LS, Peros G et al. Serum interleukin-6 is elevated in symptomatic carotid bifurcation disease. *Acta Neurol Scand.* 2009; 119: 119–125.
29. Lee WY, Allison MA, Kim DJ, Song CH, Barrett-Connor E. Association of interleukin-6 and C-reactive protein with subclinical carotid atherosclerosis (the Rancho Bernardo Study). *Am J Cardiol.* 2007; 99: 99–102.
30. Debing E, Peeters E, Demanet C, De Waele M, Van den Brande P. Markers of inflammation in patients with symptomatic and asymptomatic carotid artery stenosis: a case-control study. *Vasc Endovascular Surg.* 2008; 42: 122–127.
31. Hoshi T, Kitagawa K, Yamagami H, Furukado S, Hougaku H, Hori M. Relation between interleukin-6 level and subclinical intracranial large-artery atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008; 197: 326–332.
32. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2364–2367.
33. Song L, Schindler C. IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2004; 177: 43–51.
34. Libby P, Ridker P. Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation* 1999; 100: 1148–1150.
35. Jakóbsiak M. *Immunologia.* Warszawa, PWN 1998.
36. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 683–765.
37. Mallat Z, Besnard S, Duriez M et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res.* 1999; 85: 17–24.
38. Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin, E, Leseche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques. Relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 611–616.
39. Pinderski L, Hedrick C, Olvera T et al. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vivo and in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2823–2825.
40. Pinderski L, Fischbein MP, Subbanagounder G et al. Overexpression of interleukin 10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Circ Res.* 2002; 90: 1064–1071.
41. Potteaux S, Esposito B, van Ostrom O et al. Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1474–1478.
42. Girndt M, Kohler H. Interleukin 10: an update on its relevance for cardiovascular risk. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 8: 1976–1679.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

dr n. med. Anetta Lasek-Bal
Department of Neurology, Medical University of Silesia Hospital No. 7, Professor Leszek Giec Upper Silesian Medical Centre
ul. Ziółowa 45/47, 40–735 Katowice, Poland
tel.: 00 48 32 359 83 06; faks: 00 48 32 202 95 92
e-mail: alasek@gcm.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 6.10.2014 r.