Akademia Medyczna w Gdańsku

Zakład Immunologii, Katedra Histologii i Immunologii
Akademii Medycznej w Gdańsku

Joanna Lidia Więckiewicz

Polimorfizm regionu promotorowego genu interleukiny 6 (IL-6) u osób chorujących na chorobę niedokrwienną serca

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Jolanta Myśliwska

Praca finansowana ze środków KBN (nr grantu 3PO5B 175 22)
oraz AMG (praca W-948)

Gdańsk 2006

Pragnę serdecznie podziękować:

Promotorowi pracy Pani Profesor Jolancie Myśliwskiej za wszechstronną pomoc, okazaną życzliwość i wsparcie oraz cenne wskazówki podczas wykonywania pracy oraz przygotowywania rozprawy;

Panu Profesorowi Janowi Rogowskiemu, Panu Profesorowi Januszowi Siebertowi oraz Doktorowi Krzystofowi Szyndlerowi za wspaniałą współpracę i życzliwą pomoc w zebraniu materiału i opracowaniu danych;

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Immunologii, z którymi miałam przyjemność pracować, a szczególnie Łukaszowi Hakowi oraz pani Krystynie Wilczewskiej, Monice Młotkowskiej i Małgorzacie Jarosz za pomoc w części doświadczalnej oraz cenne uwagi;

Wszystkim Pracownikom Katedry Histologii i Immunologii za miłą atmosferę oraz wszechstronną pomoc.

SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW ZASTOSOWANYCH W PRACY 4

1. WSTĘP 7

1.1. ROLA ZAPALENIA W PATOGENEZIE CHOROBY WIEŃCOWEJ 7
1.2. REAKCJA ZAPALNA POWSTAJĄCA W WYNIKU ZABIEGU POMOSTOWANIA TĘTNIC WIEŃCOWYCH 12
1. 3. BIOLOGIA INTERLEUKINY 6 (IL-6) 13
1.3.1. Cytokiny rodziny IL-6 13
1.3.2. Receptory IL-6 14
1.3.3. Regulacja ekspresji i działania IL-6 15
1.3.3.1. Regulacja transkrypcji 15
1.3.3.2. Regulacja stabilności mRNA 17
1.3.3.3. Regulacja na poziomie białka 18
1.3.4. Biologiczne działanie IL-6 18
1.4. ROLA IL-6 W PATOGENEZIE CHOROBY NIEDOKRWIENNEJ SERCA 20
1.4.1. Rola IL-6 w powstawaniu zmian miażdżycowych 20
1.4.2. IL-6 a czynniki ryzyka ChNS 22
1.4.3. IL-6 w chorobie niedokrwiennej serca 22
1.4.4. Interleukina 6 w reakcji zapalnej na zabieg pomostowania tętnic wieńcowych 23
1.5. POLIMORFIZM REGIONU PROMOTOROWEGO GENU IL-6 25

2. CELE PRACY 27

3. MATERIAŁY I METODY 28

3.1. BADANA POPULACJA 28
3.2. MATERIAŁY 31
3.2.1. Odczynniki 31
3.2.2. Bufory i roztwory 32
3.2.3. Materiały jednorazowego użytku 34
3.2.4. Przeciwciała monoklonalne 34
3.2.5. Podłoża hodowlane 35
3.2.6. Linie komórkowe 35
3.2.7. Aparatura 35
3.2.8. Programy komputerowe 36
3.3. METODY 37
3.3.1. Izolacja genomicznego DNA z krwi 37
3.3.2. Oznaczanie polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 37
3.3.2.1. Oznaczanie polimorfizmu w pozycjach -174, -572 i -597 oraz określanie haplotypu 37
3.3.2.2. Określanie polimorfizmu genu IL-6 w pozycji -174 39
3.3.2.3. Określanie polimorfizmu genu IL-6 w pozycji -597 40
3.3.3. Elektroforeza poliakrylamidowa DNA 41
3.3.4. Uzyskiwanie surowic 41
3.3.5. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC) 41
3.3.6. Metody hodowli komórek 42
3.3.6.1 Hodowle mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC) 42
3.3.6.2. Hodowla linii komórkowej B9 43
3.3.7. Oznaczanie poziomu bioaktywnej IL-6 w surowicy 43
3.3.8. Oznaczenia cytometryczne 44

3.3.8.1. Barwienie antygenów powierzchniowych 44
3.3.8.2. Barwienie antygenów powierzchniowych i cytokin wewnątrzplazmatycznych 45
3.3.8.3. Oznaczanie stężenia cytokin w surowicy krwi metodą CBA (Cytometric Bead Array) 46
3.3.9. Obliczenia statystyczne 47

4. WYNIKI 48

4.1. ANALIZA ROZKŁADÓW POJEDYNCZYCH POLIMORFIZMÓW ORAZ POSZERZONYCH GENOTYPÓW GENU IL-6 W POPULACJI CHORYCH ORAZ W POPULACJI KONTROLNEJ 48
4.1.1. Polimorfizmy -597, -572 oraz -174 IL-6 w populacji chorych oraz w populacji kontrolnej 48
4.1.2. Rozkład haplotypów oraz złożonych genotypów genu IL-6 w populacji chorych oraz w populacji kontrolnej 50
4.2. ANALIZA PRZEDOPERACYJNA CHORYCH W ASPEKCIE POLIMORFIZMU REGIONU PROMOTOROWEGO GENU IL-6 53
4.2.1. Analiza przedoperacyjna chorych, podział pod względem złożonych genotypów IL-6 53
4.3. PRODUKCJA INTERLEUKINY 6 IN VITRO 57
4.3.1. Produkcja IL-6 przez monocyty osób zdrowych oraz osób z chorobą wieńcową 58
4.3.2. Związek polimorfizmu genu IL-6 z produkcją IL-6 przez monocyty 59
4.4. PRODUKCJA INTERLEUKINY 6 IN VIVO 65
4.4.1. Poziomy interleukiny 6 w surowicy krwi chorych w kontekście polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 65
4.4.2. Dynamika wyrzutu IL-6 w okresie okołooperacyjnym 66
4.5. ANALIZA ZWIĄZKU POLIMORFIZMU GENU IL-6 Z PARAMETRAMI OSTREJ REAKCJI ZAPALNEJ POWSTAJĄCEJ W WYNIKU ZABIEGU POMOSTOWANIA TĘTNIC 70
4.5.1. Wpływ zabiegu na parametry morfologii krwi 70
4.5.2. Wpływ zabiegu na stężenie cytokin w surowicy krwi 74
4.5.3. Wpływ zabiegu na markery aktywacji komórek krwi 75
4.5.4. Wpływ zabiegu na fenotyp i stan aktywacji monocytów 78
4.5.4.1. Charakterystyka zdolności subpopulacji monocytów do produkcji IL-6 78
4.5.4.2. Wpływ zabiegu na skład procentowy subpopulacji monocytów 80
4.5.4.3. Wpływ zabiegu na ekspresję cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni monocytów 84
4.6. WYSTĘPOWANIE POWIKŁAŃ OKOŁOOPERACYJNYCH, ANALIZA W KONTEKŚCIE POLIMORFIZMU REGIONU PROMOTOROWEGO GENU IL-6 89

5. DYSKUSJA 94

5.1. ZWIĄZEK POLIMORFIZMU GENU IL-6 Z RYZYKIEM CHOROBY NIEDOKRWIENNEJ SERCA 97
5.2. WPŁYW POLIMORFIZMU REGIONU PROMOTOROWEGO GENU IL-6 NA PRODUKCJĘ IL-6 99
5.2.1. Spontaniczna oraz stymulowana LPS-em produkcja IL-6 99
5.2.2. Wpływ statyn na wydzielanie IL-6 101
5.2.3. Produkcja IL-6 in vivo 103

5.3. INTENSYWNOŚĆ REAKCJI ZAPALNEJ NA ZABIEG POMOSTOWANIA TĘTNIC WIEŃCOWYCH A POLIMORFIZM GENU IL-6 104
5.3.1. Ekspresja markerów aktywacji w okresie okołooperacyjnym..... 106
5.3.2. Subpopulacje monocytów krwi obwodowej w okresie okołooperacyjnym 107
5.4. WYSTĘPOWANIE POWIKŁAŃ OKOŁOOPERACYJNYCH A POLIMORFIZM GENU IL-6 112
6. WNIOSKI 115
7. STRESZCZENIE PRACY 116
8. LITERATURA 120

Spis skrótów zastosowanych w pracy

A - adenina
ACE - (ang. angiotensin-converting enzyme) konwertaza angiotensyny
ACTH - hormon adrenokortykotropowy
ApoE - (ang. apolipoprotein E) apolipoproteina E
C - cytozyna
CABG - (ang. coronary artery bypass grafting) zabieg pomostowania tętnic wieńcowych
CCS - klasyfikacja nasilenia dolegliwości dławicowych według kryteriów Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego
CD - (ang. cluster of differntation) antygeny różnicowania
ChNS - choroba niedokrwienna serca
CNTF - (ang. ciliary neurotropic factor) rzęskowy czynnik neurotropowy
CRE - (ang. cAMP responsive element) element odpowiedzi na cAMP
CRP - białko C reaktywne
DMSO - dimerkaptosulfotlenek
DNA - kwas dezoksyrybonukleinowy
EDTA - wersenian sodowy
ER - receptor dla estrogenów
EuroSCORE - (ang. European System for Cardiac Operative Risk Evaluation) punktacja ryzyka zgonu okołooperacyjnego po zabiegach kardiochirurgicznych
FasL - ligand cząsteczki Fas
FcR - receptor dla fragmentu Fc immunoglobuliny
FCS - (ang. fetal calf serum) płodowa surowica cielęca
FSC - (ang. forward scater) rozproszenie czołowe światła lasera
G - guanina
gp - glikoproteina
GR - receptor dla glikokortykoidów
GRE - (ang. glucocorticoid response element) element odpowiedzi na glikortykoidy
HDL - (ang. high density lipoprotein) lipoproteina o wysokiej gęstości
ICAM - (ang. intercellular adhesion molecule) cząsteczka adhezji międzykomórkowej
IFN - interferon
IGF - (ang. insulin-like growth factor) insulinopodobny czynnik wzrostu
IL - interleukina
IL-6R - receptor dla interleukiny 6
IP-10 - (ang. IFN-inducible protein of 10kDa) indukowane przez interferon białko o masie 10kDa
I-TAC - (ang. IFN gamma–inducible T cell chemoattractant) czynnik chemotaktyczny limfocytów T indukowany przez interferon gamma
kDa - kilo Daltonów
KPU - krążenie pozaustrojowe
kz - kilo zasad
LDL - (ang. low density lipoprotein) lipoproteina o niskiej gęstości

LDLR - (ang. low density lipoprotein receptor) receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości
LFA - (ang. leukocyte function-associated antigen) antygen związany z funkcjonowaniem leukocytów
LIF - (ang. leukemia inhibitory factor) czynnik hamujący białaczki
LPL - (ang. lipoprotein lipase) lipaza lipoproteinowa
LPS - lipopolisacharyd ścian bakteryjnych
LVEF - frakcja wyrzutowa lewej komory
MAPK - (ang. mitogen-activated protein kinase) kinaza białkowa aktywowana mitogenami
MCP-1 - (ang. monocyte chemoattractant protein-1) białko chemotaktyczne monocytów-1
M-CSF - (ang. macrophage colony stimulating factor) czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
MIDCAB - (ang. minimally invasive direct coronary artery bypass) minimalnie inwazyjne bezpośrednie pomostowanie aortalno-wieńcowe
Mig - (ang. monokine induced by IFN-gamma) monokina indukowana interferonem gamma
min. - minuta
MMP - (ang. matrix metalloproteinase) metaloproteinaza macierzy
MRE - (ang. multi response element) element odpowiedzi na wiele czynników
mRNA - (ang. messenger RNA) matrycowy (informacyjny) RNA
MSR - (ang. macrophage scavenger receptor) receptor zmiatający makrofagów
MTT - bromek (3-4.5 dimethylthiazol-2-yl)-2.5 diphenyl-tetrazolium
NF-κB - (ang. nuclear factor κB) czynnik transkrypcyjny κB
NF-IL-6 - (ang. nuclear factor IL-6) czynnik transkrypcyjny IL-6
OPCABG - (ang. off-pump coronary artery bypass grafting) pomostowanie aortalno--wieńcowe bez krążenia pozaustrojowego
OR - (ang. odds ratio) iloraz szans
OSM - (ang. oncostatin M) onkostatyna M
ox-LDL - oksydacyjnie zmodyfikowane LDL
PAI-1 - (ang. plasminogen activator inhibitor-1) inhibitor aktywatora plazminogenu-1
PBL - (ang. peripheral blood lymphocytes) limfocyty krwi obwodowej
PBMC - (ang. peripheral blood mononuclear cells) mononuklearne komorki krwi obwodowej
PBS - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
PCI - (ang. percutaneous coronary intervention) przezskórna interwencja wieńcowa
PCR - (ang. polymerase chain reaction) łańcuchowa reakcja polimerazy
PDGF - (ang. platelet-derived growth factor) czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego
PHA - fitohemaglutynina
PMA - (ang. phorbol-12-myristate-13-acetate) octan mirystynianu forbolu, ester forbolu
PPAR - (ang. peroxisome proliferator-activated receptor) receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów
RFLP - (ang. restriction fragment length polymorphism) polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
RNA - kwas rybonukleinowy

SAA - (ang. serum amyloid A) surowiczy amyloid A
sek. - sekunda
SNP - (ang. single nucleotide polymorphism) polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SS - (ang. side scater) rozproszenie boczne światła lasera
STAT - (ang. signal transducers and activators of transcription) białka przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję
T - tymina
TGF - (ang. transforming growth factor) transformujący czynnik wzrostu
TNF - (ang. tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworów
VCAM - (ang. vascular cell adhesion molecule) cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych
VLA - (ang. very late antigen) późny antygen
WBC - (ang. white blood cells) białe krwinki
WHO - (ang. World Health Organization) - Światowa Organizacja Zdrowia

1. WSTĘP

Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2002 roku 16,7 mln zgonów na świecie, czyli 29,2% całkowitej liczby zgonów, spowodowane było chorobami układu krążenia[1]. Spośród nich najczęstszą przyczyną była choroba niedokrwienna, stanowiąc przyczynę 7,2 mln zgonów. Co ciekawe, mimo iż choroby układu krążenia uważane są za choroby cywilizacyjne, około 80% wszystkich zgonów z powodu chorób układu krążenia miało miejsce w krajach o niskim lub średnim dochodzie. W Polsce w 2002 roku zgony z powodu chorób układu krążenia stanowiły 41,8% wszystkich zgonów u mężczyzn i 53,1% zgonów u kobiet, a wśród nich najczęstszą przyczyną zgonów była choroba wieńcowa.
Choroba niedokrwienna serca (ChNS) określana jest także często mianem choroby wieńcowej, ze względu na to, iż najczęstszą przyczyną niedokrwienia mięśnia sercowego jest zwężenie lub zamknięcie światła tętnic wieńcowych spowodowane rozwojem w ich ścianach blaszek miażdżycowych. Konsekwencją zwężenia światła tętnic wieńcowych jest ograniczenie dopływu krwi i tlenu do mięśnia sercowego, co może powodować jego dysfunkcję aż do zatrzymania pracy serca.

Do istotnych czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca zalicza się: palenie papierosów, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, podwyższone stężenie cholesterolu LDL, niskie stężenie cholesterolu HDL, wiek, płeć męską, otyłość i nadwagę oraz czynniki genetyczne. Opisuje się również rolę czynników środowiskowych, statusu socjoekonomicznego, narażenia na infekcje. Powstanie i przebieg choroby jest wynikiem nałożenia się działania wielu czynników, a wspólnym efektem ich oddziaływania jest wywoływanie i modulowanie stanu zapalnego.

1.1. Rola zapalenia w patogenezie choroby wieńcowej

Najnowsze teorie powstawania i rozwoju zmian miażdżycowych w ścianach naczyń zwracają uwagę na kluczową rolę procesu zapalnego w patogenezie tych zmian. Teoria zaproponowana przez Rossa[2] zakłada, iż proces powstawania i rozwoju blaszki miażdżycowej jest przewlekłym procesem zapalnym w ścianie

naczynia zapoczątkowanym uszkodzeniem lub aktywacją komórek śródbłonka. Główne czynniki ryzyka ChNS, takie jak nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów, hiperglikemia, modyfikowane cząsteczki LDL mogą przyczyniać się do dysfunkcji śródbłonka i aktywacji cząsteczek adhezyjnych, wydzielania czynników chemotaktycznych dla monocytów i limfocytów T. Kluczowymi komórkami odpowiedzialnymi za podtrzymywanie stanu zapalnego i aktywnymi na każdym etapie choroby są wywodzące się z monocytów makrofagi oraz limfocyty T[3]. Komórki te wydzielają szereg cytokin, chemokin, czynników wzrostu i enzymów proteolitycznych, które przyczyniają się dalszego rozwoju blaszki miażdżycowej.

Etapy powstawania i rozwoju blaszki miażdżycowej wg Libby'iego[4]:

- wstępne uszkodzenie – aktywacja komórek śródbłonka, ekspresja cząsteczek adhezyjnych i czynników chemotaktycznych dla leukocytów, przyciąganie leukocytów, gromadzenie pozakomórkowych lipidów;
- nacieczenie włóknisto-tłuszczowe – różnicowanie się monocytów w makrofagi, a następnie w wypełnione lipidami komórki piankowate, migracja i proliferacja komórek mięśniowych gładkich, wytwarzanie cytokin i czynników wzrostu;
- stabilna blaszka – blaszka otoczona kolagenową pokrywą, wewnątrz blaszki duże ilości komórek mięśniowych gładkich oraz komórek piankowatych, obecne niewielkie ogniska martwicy i apoptozy, wytwarzanie cytokin prozapalnych;
- niestabilna blaszka podatna na pęknięcie – nasilone wydzielanie metaloproteinaz i cytokin prozapalnych, liczne ogniska martwicy, pęknięcie pokrywy włóknistej, powstanie zakrzepu; na tym etapie może dojść do zamknięcia światła naczynia przez powstający zakrzep i w efekcie do ostrego zespołu wieńcowego;
- uwapniona, włóknista blaszka – powstaje często po resorpcji zakrzepu, w wyniku procesów naprawczych dochodzi do znacznej proliferacji komórek mięśniowych gładkich i zwiększenia grubości pokrywy włóknistej; na tym etapie blaszka powoduje znaczne zwężenie tętnicy i wywołuje objawy dławicy piersiowej.

Już w bardzo wczesnych zmianach miażdżycowych obserwuje się napływ leukocytów do ściany naczynia, co zaobserwowano zarówno w zwierzęcych modelach, jak i u ludzi. Na przykład we fragmentach naczyń pobranych od dzieci i młodych osób, bez klinicznych objawów choroby niedokrwiennej serca

stwierdzono obecność nacieczeń tłuszczowych i infiltrację ściany naczyń przez monocyty[5]. W warunkach fizjologicznych komórki śródbłonka naczyń nie wykazują ekspresji cząsteczek adhezyjnych, które umożliwiają adhezję i rekrutację komórek odpowiedzi zapalnej. Uszkodzenie bądź aktywacja komórek śródbłonka inicjuje na nich ekspresję selektyn, integryn oraz innych cząsteczek adhezyjnych. Spośród nich najistotniejszą rolę wydaje się pełnić VCAM-1 (CD106), cząsteczka będąca receptorem dla integryny α4β1 (VLA-4) na monocytach i limfocytach T[6]. Wykazano, iż ekspresja tej cząsteczki jest gwałtownie indukowana przy zaburzeniach przepływu krwi bądź w odpowiedzi na wzrost stężenia cholesterolu we krwi, a ponadto lokalizowana jest w miejscach podatnych na powstawanie blaszek miażdżycowych[7]. Co więcej, myszy z genetycznym defektem ekspresji VCAM-1 charakteryzowały się znacznym zahamowaniem powstawania zmian miażdżycowych w naczyniach[8]. Inną cząsteczką adhezyjną zaangażowaną w patogenezę procesu miażdżycowego jest ICAM-1 (CD54), dla której ligandami są intergyny LFA-1 (CD18/CD11a) na limfocytach T i Mac-1 (CD18/CD1b) na monocytach. Oddziaływanie cząsteczek adhezyjnych z odpowiadającymi im ligandami na powierzchni monocytów i limfocytów T umożliwia ich migrację do błony podstawnej naczyń.

Charakterystyczną cechą miażdżycowego procesu zapalnego jest akumulacja w naczyniach tylko monocytów i limfocytów, bez napływu granulocytów występującego w typowej reakcji zapalnej. Kluczowymi czynnikami chemotaktycznymi odpowiedzialnymi za transmigrację leukocytów są MCP-1 dla monocytów[9] [10] oraz chemokiny z rodziny CXC: IP-10, Mig i I-TAC dla limfocytów T[11]. Białko chemotaktyczne monocytów-1 (MCP-1) jest produkowane przez komórki mięśniówki gładkiej, komórki śródbłonka oraz makrofagi we wszystkich fazach procesu miażdżycowego[12], a ciągły napływ monocytów oraz aktywacja powstałych z nich makrofagów są kluczowe dla powstawania oraz progresji blaszki miażdżycowej. Udział makrofagów i monocytów w patogenezie miażdżycy związany jest z ich zdolnością do podtrzymywania i wzmacniania lokalnego stanu zapalnego przez produkcję cytokin, składowych dopełniacza, proteaz, wolnych rodników tlenowych, jak również inicjowanie odpowiedzi swoistej poprzez prezentację antygenów limfocytom T.

Monocyty, które napłynęły do ściany naczyń, różnicują się w makrofagi zdolne do akumulacji lipidów. W procesie pobierania lipidów biorą udział receptory zmiatacze (ang. scavenger receptors) m.in. SR-A I i II, CD36, MARCO, SR-PSOX oraz CD68[13]. Receptory zmiatacze zdolne są do rozpoznawania motywów charakterystycznych dla patogenów, komórek apoptotycznych oraz modyfikowanych lipoprotein. W ścianie naczyń głównymi ligandami tych receptorów są oksydacyjnie bądź enzymatycznie modyfikowane cząsteczki LDL (ox-LDL, e-LDL). Internalizacja lipoprotein prowadzi do przekształcania lipidów w estry cholesterolu, w efekcie makrofagi przekształcają się w obładowane lipidami komórki piankowate. Akumulacja lipidów jest sygnałem aktywacji dla makrofagów stymulując ekspresję m.in. IL-1[14] oraz sygnałem proproliferacyjnym dla komórek[15] [16]. Aktywowane makrofagi i komórki piankowate produkują TNFα, IL-1, IL-6, TGFβ, PDGF, IGF-1 – cytokiny i czynniki wzrostu odpowiedzialne za aktywację i proliferację komórek mięśni gładkich, limfocytów T, samych makrofagów[17].

Proces dojrzewania blaszki miażdżycowej charakteryzuje się dalszym napływem i gromadzeniem się makrofagów, komórek tucznych i aktywowanych limfocytów T wewnątrz blaszki. Dodatkowo dochodzi do proliferacji komórek mięśni gładkich, które produkują duże ilości kolagenu i innych elementów macierzy pozakomórkowej przyczyniając się do powstawania pokrywy włóknistej blaszki[18]. W miarę gromadzenia się komórek stanu zapalnego i powstawania komórek piankowatych zaczynają być również wydzielane czynniki inicjujące apoptozę (TNF, FasL) i dochodzi do powstawania początkowo niewielkich ognisk apoptozy[19] [20] [21].

W niestabilnej blaszce miażdżycowej rdzeń lipidowy staje się obszerny, zwiększa się liczba komórek stanu zapalnego w ramionach blaszki, a tzw. czapka włóknista staje się cienka i podatna na pęknięcia[22] [23]. Szczególną rolę w destabilizacji blaszki pełnią metaloproteinazy (MMP) produkowane przez makrofagi. Powodują one destrukcję czapki włóknistej oraz stymulują wydzielanie cytokin prozapalnych, białek ostrej fazy i kolejnych metaloproteinaz[24] [25]. Przerwanie ciągłości pokrywy włóknistej blaszki miażdżycowej prowadzi do powstania skrzepliny w tętnicach wieńcowych. Pokrywa włóknista blaszki ulega stałej dynamicznej przebudowie, a procesy syntezy i degradacji kontrolowane są przez mediatory stanu zapalnego. Cytokiny prozapalne stymulują syntezę metaloproteinaz, a w szczególności kolagenaz trawiących włókna kolagenowe

odpowiedzialne za mechaniczną wytrzymałość pokrywy włóknistej. Z drugiej strony cytokiny te mają również zdolność do hamowania syntezy kolagenu przez komórki mięśniówki gładkiej[26] oraz mogą indukować apoptozę tych komórek[27] [28] [29], przez co także przyczyniają się do niestabilności blaszki. Stwierdzono również, iż odsetek makrofagów i limfocytów T wśród komórek znajdujących się w obrębie blaszki jest wyższy u pacjentów, u których wystąpił ostry epizod wieńcowy w porównaniu do pacjentów ze stabilną dusznicą bolesną[30]. Do uszkodzenia blaszki dochodzi najczęściej na krawędziach pokrywy włóknistej w ramionach blaszki, czyli w tych jej regionach, gdzie dochodzi do akumulacji komórek stanu zapalnego[31].

Innym mechanizmem prowadzącym do powstawania skrzeplin w naczyniach wieńcowych jest powstawanie powierzchniowej nadżerki błony wewnętrznej będącej wynikiem apoptozy komórek śródbłonka bądź ich złuszczania pod wpływem metaloproteinaz i w efekcie odsłonięcie macierzy podśróbłonkowej o silnych właściwościach koagulacyjnych[32]. Co ciekawe, wykazano, iż nadżerki powstają często na powierzchni blaszek z niewielkimi naciekami komórek stanu zapalnego, a obfitującymi w komórki mięśni gładkich, często blaszki tego typu obserwowano u kobiet i młodych osób[33].

Badania angiograficzne wykazały, iż wśród blaszek prowadzących do zawałów około 60% stanowiły blaszki strukturalnie podatne na uszkodzenie, o cienkiej pokrywie z dużym rdzeniem złożonym z lipidów i ogniskami zapalenia i martwicy, a pozostałe 40% blaszek było blaszkami funkcjonalnie podatnymi na uszkodzenie z nadżerkami śródbłonka i procesem zapalnym przebiegającym od strony światła naczynia[31].

Opisany powyżej proces powstawania i rozwoju blaszek miażdżycowych prowadzący do powstania choroby niedokrwiennej serca w znacznym stopniu zależy od komórek układu immunologicznego – makrofagów i limfocytów T oraz produkowanych przez nie cytokin, w tym interleukiny 6.

1.2. Reakcja zapalna powstająca w wyniku zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych

Przyjęte schematy terapeutyczne leczenia choroby wieńcowej zakładają farmakoterapię, przezskórną angioplastykę naczyń lub zabieg kardiochirurgiczny w zależności od nasilenia objawów choroby i stopnia zwężenia naczyń. Operacyjne pomostowanie tętnic wieńcowych jest najbardziej obciążającą ze stosowanych metod leczenia, ale daje szybką i znaczącą poprawę stanu chorego[34 35].

Dwa podstawowe typy zabiegu pomostowania tętnic to klasyczny zabieg z wykorzystaniem krążenia pozaustrojowego oraz coraz powszechniej stosowany zabieg bez krążenia pozaustrojowego (OPCABG; ang. off-pump coronary artery bypass grafting). Oba typy zabiegów wywołują uogólnioną reakcję zapalną objawiającą się aktywacją dopełniacza, leukocytów oraz płytek krwi. Reakcja zapalna jest generalnie uważana za odpowiedź adaptacyjną, ale u niektórych osób ma tak duże nasilenie, że może prowadzić do zawału serca, udaru czy zespołu niewydolności wielonarządowej. Do czynników wywołujących reakcję zapalną należą: uraz operacyjny, reperfuzja niedokrwionych organów, endotoksyny oraz w przypadku zabiegów z krążeniem pozaustrojowym – kontakt krwi z elementami systemu krążenia pozaustrojowego[36].

W trakcie zabiegu pomostowania tętnic dochodzi do aktywacji dopełniacza na drodze alternatywnej. Już po kilku minutach od rozpoczęcia zabiegu obserwuje się podwyższone poziomy składowych C3a i C5a, a w okresie od pół godziny do 2 godzin po zabiegu stwierdzane były najwyższe poziomy tych składowych i to zarówno w przypadku zabiegów przeprowadzanych w krążeniu pozaustrojowym, jak i bez[37]. W przypadku zabiegów z krążeniem pozaustrojowym maksymalne stężenia C3a i C5a były wyższe niż w przypadku zabiegów OPCABG, a począwszy od 4 godziny po zabiegu poziomy aktywowanych składowych dopełniacza zaczynały się wyrównywać. Tej wczesnej odpowiedzi zapalnej towarzyszy wyrzut cytokin regulujących odpowiedź zapalną: IL-6, IL-8, TNFα[38]. Sygnały te inicjują reakcję ostrej fazy, która pojawia się niezależnie od typu zabiegu, jaki był wykonywany. Największe nasilenie reakcji ostrej fazy i najwyższa aktywacja odpowiedzi zapalnej

występuje w przypadku zabiegów pomostowania tętnic z wykorzystaniem krążenia pozaustrojowego i jest szczególnie nasilona w trakcje zabiegu i w bardzo wczesnym okresie pozabiegowym. W kolejnych okresach nasilenie odpowiedzi zapalnej stopniowo opada, osiągając podobne natężenie dla obu typów zabiegu. Jednym z wczesnych etapów jest mobilizacja neutrofili ze szpiku kostnego i związana z tym obserwowana leukocytoza. Są prace wskazujące, iż aktywacja neutrofili pojawia się tuż po rozpoczęciu operacji, a jeszcze przed podłączeniem do krążenia pozaustrojowego[39], co świadczy o tym, że sam uraz operacyjny jest wystarczającym czynnikiem do wywołania silnej odpowiedzi zapalnej.

1. 3. Biologia interleukiny 6 (IL-6)

1.3.1. Cytokiny rodziny IL-6

Na podstawie struktury trzeciorzędowej białka oraz zdolności wiązania do wspólnej podjednostki receptora wyróżniono rodzinę cytokin IL-6. W skład tej rodziny wchodzą: IL-6, IL-11, LIF (czynnik hamujący białaczkę), OSM (onkostatyna M), CNTF (rzęskowy czynnik neurotropowy), CT-1 (kardiotropina 1) oraz CLC (cytokina podobna do kardiotropiny). Cytokiny rodziny IL-6 mają zarówno pro-, jak i antyzapalne właściwości, biorą udział w aktywacji reakcji ostrej fazy, regulacji odpowiedzi immunologicznej, hematopoezie[40]. W zależności od typu komórki docelowej i stanu jej aktywacji mogą prowadzić do aktywacji genów odpowiedzialnych za proliferację, różnicowanie, aktywację bądź apoptozę komórek. Częściowo pokrywające się funkcje cytokin rodziny IL-6 wynikają z ich oddziaływania na komórki poprzez wspólną podjednostkę receptora gp130.

Dane z doświadczeń na zwierzętach z nokautowanymi genami kodującymi cytokiny rodziny IL-6 wykazały, iż każda z nich posiada charakterystyczny dla siebie zestaw funkcji biologicznych, dając unikalny fenotyp po inaktywacji[41]. Inaktywacja IL-6 skutkuje upośledzeniem reakcji ostrej fazy oraz odpowiedzi przeciwwirusowej[42], nokaut czynnika hamującego białaczkę (LIF) objawia się żeńską niepłodnością wynikającą z defektu implantacji embrionów[43], a delecja rzęskowego czynnika neurotropowego (CNTF) skutkowała degeneracją neuronów

motorycznych[44]. Natomiast delecja wspólnej podjednostki receptora gp130 była letalna już na etapie rozwoju embrionalnego[45].

1.3.2. Receptory IL-6

Funkcjonalny receptor dla IL-6 składa się z dwóch podjednostek: gp130, która odpowiedzialna jest za przekazywanie sygnału pobudzenia do wnętrza komórki oraz podjednostki α specyficznej dla IL-6 - IL-6Rα (gp80) odpowiedzialnej za rozpoznawanie i wiązanie IL-6. Ekspresja podjednostki alfa jest ściśle regulowana i ograniczona tylko do niektórych typów komórek (hepatocyty, monocyty, neutrofile, limfocyty T i B), natomiast podjednostka gp130 jest obecna na większości typów komórek. Obie podjednostki są białkami błonowymi I typu z jedną domeną przezbłonową i N-końcową częścią zewnątrzkomórkową, w której znajduje się charakterystyczny motyw czterech zakonserwowanych reszt cysteinowych oraz motyw WSXWS[46].

Uważa się, że kompleks aktywujący komórkę jest heksamerem składającym się z dwóch cząsteczek IL-6, dwóch podjednostek α oraz dwóch cząsteczek gp130[47]. Alternatywna hipoteza zakłada istnienie tetramerycznego kompleksu składającego się z dwóch cząsteczek gp130 oraz IL-6Rα i IL-6[48]. IL-6 w pierwszej kolejności wiąże się z receptorem specyficznym (IL-6Rα), następnie dochodzi do wiązania z podjednostkami gp130 i ich dimeryzacja aktywuje sygnalizację wewnątrzkomórkową. Homodimeryzacja podjednostki gp130 prowadzi do aktywacji kinaz tyrozynowych związanych z cytoplazmatycznym odcinkiem gp130: Jak1, Jak2 i Tyk2 oraz fosforylacji czynników transkrypcyjnych STAT1 i STAT3[49] [50]. Poza szlakiem sygnalizacji Jak/STAT IL-6 aktywuje również w komórkach sygnalizację poprzez kinazy MAP i prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF-IL-6, AP-1[51]. Do aktywacji kinaz MAP dochodzi poprzez aktywację białek Ras i Raf, ta droga sygnalizacji wydaje się być szczególnie istotna dla efektu proliferacyjnego wywieranego przez IL-6[52].

Obie podjednostki receptora dla IL-6 mogą występować w formie rozpuszczalnej w surowicy krwi i wpływać na efekt wywierany przez cytokinę. O ile rozpuszczalna forma podjednostki alfa (sIL-6Rα) działa agonistycznie i uwrażliwia na IL-6 także te komórki, które nie są zdolne do ekspresji IL-6Rα[53], to rozpuszczalna

forma gp130 (sgp130) działa antagonistycznie[54]. W obecności rozpuszczalnej formy gp130 rozpuszczalna forma podjednostki alfa potęguje antagonistyczny efekt sgp130[55]. Uważa się, iż rozpuszczalne formy receptorów IL-6 działają jako rodzaj systemu buforującego ogólnoustrojową odpowiedź na IL-6[56].

Podwyższone stężenia sIL-6Rα obserwowano między innymi w szpiczaku mnogim[57], reumatycznym zapaleniu stawów[58], zakażeniu wirusem HIV[59]. Rozpuszczalna forma receptora IL-6Rα może powstawać w wyniku alternatywnego cięcia i składania mRNA[60], jak również w wyniku enzymatycznej proteolizy formy błonowej[61]. Natomiast rozpuszczalna forma gp130 powstaje wyłącznie w wyniku alternatywnego cięcia i składania mRNA[62].

1.3.3. Regulacja ekspresji i działania IL-6

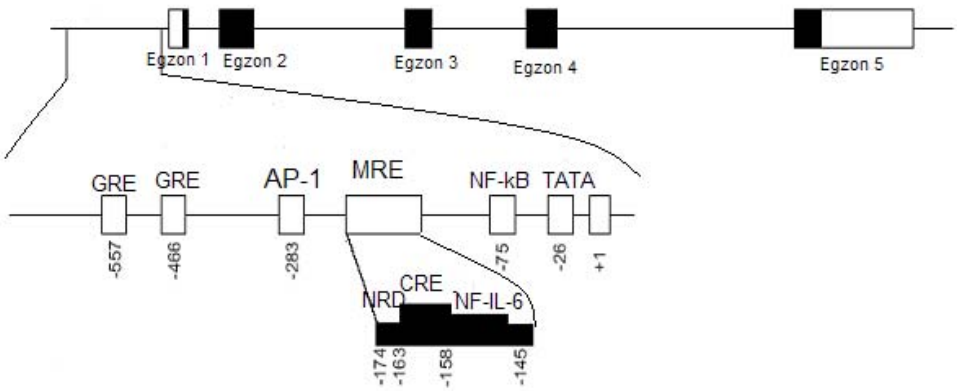
Ludzki gen kodujący interleukinę 6 znajduje się na chromosomie 7 (7p21)[63] i składa się z 5 egzonów i 4 intronów[64]. Sekwencja kodująca ma wielkość około 5kz. Ludzka interleukina 6 ma masę molekularną 21-28 kDa w zależności od modyfikacji posttranslacyjnych. Łańcuch białkowy powstający na matrycy genu składa się 212 aminokwasów, z których 28 tworzy sekwencję sygnałową, po jej odcięciu powstaje dojrzałe białko zbudowane ze 184 aminokwasów[65].

Regulacja ekspresji IL-6 jest bardzo złożona, odbywa się na kilku głównych poziomach: poprzez regulację poziomu transkrypcji, regulację translacji, regulację wydzielania. Dodatkowo istnieją także liczne mechanizmy regulacji efektu biologicznego wywieranego przez tę cytokinę związane z obecnością rozpuszczalnych receptorów w płynach ustrojowych, z wiązaniem krążącej IL-6 z przeciwciałami anty-IL-6 i anty-IL-6R oraz z tempem jej eliminacji z krążenia.

1.3.3.1. Regulacja transkrypcji

Najistotniejszy wpływ na poziom ekspresji IL-6 wydaje się mieć regulacja na poziomie transkrypcji. W obrębie regionu promotorowego genu IL-6 opisano sekwencje TATA box i GATA box oraz miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych: AP-1, NF-κB oraz tzw. sekwencję MRE (ang. multiple response element). Sekwencja MRE obejmuje odcinek -174 do -145 i pośredniczy w aktywacji promotora IL-6 między innymi przez TNF, IL-1α, forskolinę, PMA.

W obrębie sekwencji MRE wyróżnić można: miejsce wiązania czynnika NF-IL-6 (-158 do -145), sekwencję CRE (element odpowiedzi na cAMP, miejsce wiązania czynnika CREB; -163 do -158) oraz domenę regulacji negatywnej (NRD; -174 do -164) [66 67 68].

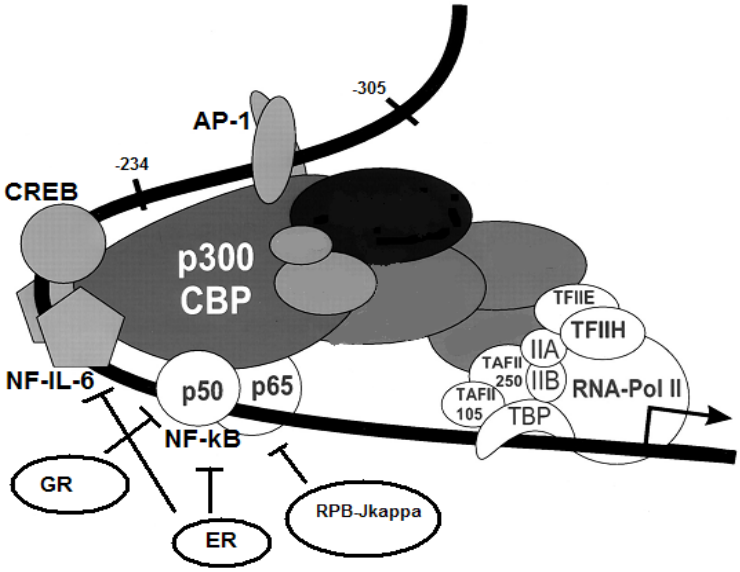


Rysunek 1.3.3.1.1. Schemat genu IL-6 z zaznaczonymi miejscami regulacji transkrypcji. GRE – miejsce wiązania receptora glikokortykoidowego, AP-1 – miejsce wiązania czynnika AP-1, MRE – element odpowiedzi na wiele czynników, NRD – domena regulacji negatywnej, CRE – element odpowiedzi na cAMP, miejsce wiązania CREB, NF-IL-6 – miejsce wiązania czynnika NF-IL-6, NF-κB – miejsce wiązania czynnika NF-κB. Modyfikacja własna na podstawie Park i wsp.[69]

Oprócz czynników działających aktywująco na ekspresję IL-6 opisano również szereg czynników działających hamująco, np. glikokortykoidy, estrogeny, androgeny, IL-4, TGFβ, c-Fos. Wśród elementów promotora odpowiedzialnych za hamowanie ekspresji wyróżnić można miejsca wiązania receptora glikokortykoidowego (GRE; -466 do -461 oraz -557 do -552) i domenę regulacji negatywnej w obrębie sekwencji MRE. Część czynników działających hamująco na ekspresję IL-6 działa także poprzez wpływ na aktywność czynników transkrypcyjnych takich jak NF-κB, NF-IL-6, AP-1. Wykazano, iż receptor dla glikokortykoidów (GR) wiąże się z podjednostką p65 NF-κB i hamuje aktywację promotora IL-6[70]. Glikortykoidy mają także zdolność do indukcji syntezy I-κB, co skutkuje sekwestracją NF-κB w cytoplazmie[71]. Również estrogeny wykazują hamujący wpływ na ekspresję IL-6, mimo braku sekwencji wiążącej receptor estrogenowy (ER) w obrębie promotora IL-6[72]. Efekt ten w dużej mierze wynika

z oddziaływania ER z NF-κB i NF-IL-6 i hamowania ich zdolności do wiązania się z DNA[73].

W aktywacji promotora genu IL-6 bierze udział kilkanaście białek: czynniki transkrypcyjne (NF-κB, NF-IL-6, CREB, AP-1), kompleks holoenzymu polimerazy RNA II oraz liczne koaktywatory i białka adaptorowe (Rys. 1.3.3.1.2.). Dodatkowo zdolność do ekspresji jest również modulowana (hamowana) przez białka represorowe, aktywowane receptory hormonów sterydowych oraz dostępność czynników transkrypcyjnych.



Rysunek 1.3.3.1.2. Model aktywnego transkrypcyjnie promotora genu IL-6 wraz z kompleksem holoenzymu polimerazy RNA II, czynnikami transkrypcyjnymi oraz białkami adaptorowymi. RNA-Pol II, TFIIH, TFIIE, IIA, IIB, TAFII 105, TAFII 250 i TBP – – składniki holoenzymu polimerazy RNA II, p50 i p65 – podjednostki NF-κB, p300/CBP – – białko wiążące CREB, koaktywator, ER – receptor dla estrogenów, GR – receptor dla glikokortykoidów, RPB-Jκ – represor, białko Jκ wiążące sekwencję sygnałową rekombinacji. Modyfikacja własna na podstawie Vanden Berghe i wsp.[74].

1.3.3.2. Regulacja stabilności mRNA

W przypadku IL-6, podobnie jak i innych cytokin, jednym z elementów regulacji produkcji jest regulacja stabilności mRNA. mRNA IL-6 posiada w niepodlegającym translacji odcinku 3' sekwencję bogatą w AU (ang. AU-rich sequence) odpowiedzialną za szybką degradację mRNA. Zauważono, iż aktywacja szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej poprzez aktywowaną stresem kinazę MAP p38 (p38 MAPK) prowadzi do stabilizacji mRNA wielu cytokin, w tym IL-6[75].

1.3.3.3. Regulacja na poziomie białka

IL-6 jest również regulowana na poziomie proteolizy aktywnego białka. Cytokina ta indukuje uwalnianie proteaz serynowych przez neutrofile, takich jak elastaza, proteinaza 3 i katepsyna G, które poza innymi działaniami mogą również rozkładać IL-6[76]. Jak wydaje się, proces ten jest jednym z elementów negatywnego sprzężenia zwrotnego prowadzącego do wygaszania lokalnego stanu zapalnego, a IL-6 może być częściowo chroniona przed inaktywacją poprzez związanie z rozpuszczalnym receptorem[77].

Innym mechanizmem regulacji działania IL-6 jest szybkie usuwanie cytokiny z krążenia. Kiedy podawano szczurom znakowaną jodem IL-6, jej okres półtrwania w krążeniu wynosił 2 min.[78]. Organem odpowiedzialnym za akumulację i usuwanie IL-6 była wątroba[79]. IL-6 wiązała się z receptorami na powierzchni hepatocytów i była wraz z nimi internalizowana, powodując całkowity, przejściowy zanik ekspresji receptorów w ciągu 30-60 min.[80].

Kolejny mechanizm regulacji efektu wywieranego przez IL-6 na komórki związany jest z obecnością w płynach ustrojowych rozpuszczalnych receptorów dla tej cytokiny. Kompleks IL-6/sIL-6Rα działa aktywująco na komórki, umożliwia również cytokinie oddziaływanie na te typy komórek, które nie posiadają ekspresji błonowej formy IL-6Rα. Natomiast rozpuszczalna forma gp130 (sgp130) hamuje wiązanie kompleksu IL-6/sIL-6Rα do błonowej formy gp130, hamując w ten sposób zdolność oddziaływania na komórkę. Wykazano jednakże, iż sgp130 hamuje tylko efekt wywierany przez sIL-6Rα, nie wpływając na aktywację pośredniczoną przez błonową formę IL-6Rα[81].

1.3.4. Biologiczne działanie IL-6

Interleukina 6 produkowana jest przez szereg różnych komórek podczas infekcji, stanu zapalnego czy uszkodzenia tkanek, a jej stężenie w surowicy krwi znacznie wzrasta w różnych stanach chorobowych. Wśród komórek zdolnych do produkcji IL-6 są zarówno komórki układu immunologicznego: monocyty, limfocyty T i B, neutrofile, komórki NK, jak i szereg innych typów komórek, m. in. takich jak: keratynocyty, fibroblasty, komórki śródbłonka, komórki mięśniowe[82].

Cytokinie tej początkowo nadano szereg różnych nazw wynikających z jej plejotropowego działania, takich jak: interferon β2, czynnik stymulujący hepatocyty, czynnik różnicowania limfocytów B, czynnik różnicowania cytotoksycznych limfocytów T. Jednymi z pierwszych opisanych efektów działania IL-6 była zdolność do indukcji produkcji białek ostrej fazy przez hepatocyty[83], a także wpływ na różnicowanie limfocytów B[84] oraz aktywację i proliferację limfocytów T[85]. Wykazano także wpływ tej cytokiny na hematopoezę poprzez stymulację proliferacji hematopoetycznych komórek macierzystych[86 87] oraz stymulację dojrzewania i różnicowania megakariocytów[88 89]. IL-6 wykazywała *in vitro* zdolność do hamowania wzrostu fibroblastów i komórek śródbłonka oraz stymulowała różnicowanie neuronów[90]. Ważnym efektem działania IL-6 jest także zdolność do indukcji ACTH oraz jej działanie pirogenne[91 92].

IL-6 pełni istotną rolę jako cytokina regulująca odpowiedź immunologiczną zarówno w odpowiedzi na infekcję, jak i w stanie zapalnym wywołanym innymi czynnikami. Poza wspomnianym wcześniej wpływem na mechanizmy efektorowe humoralnej i komórkowej odpowiedzi swoistej cytokina ta wywiera również istotny wpływ na funkcjonowanie komórek odpowiedzi nieswoistej: uwrażliwia monocyty i neutrofile na bodźce wywołujące wybuch tlenowy[93] oraz zwiększa aktywność cytotoksyczną komórek NK[94].

W stanie zapalnym oddziaływanie kompleksu IL-6/sIL-6Rα na komórki śródbłonka, czyli tzw. transsygnalizacja IL-6, powoduje zmianę produkcji chemokin odpowiedzialnych za napływ neutrofili (IL-8) na chemokiny odpowiedzialne za rekrutację monocytów (MCP-1)[95].

Przyjęło się uważać IL-6 za cytokinę prozapalną, jednakże wywiera ona również szereg efektów o charakterze przeciwzapalnym. Charakteryzuje się między innymi zdolnością do obniżania produkcji cytokin prozapalnych TNFα i IL-1 przez stymulowane PBMC *in vitro*[96]. Może również oddziaływać systemowo na cytokiny prozapalne poprzez aktywację syntezy agonisty receptora IL-1 (IL-1Ra) i uwalniania rozpuszczalnego receptora p55 dla TNF, hamującego działanie tej cytokiny[97] oraz poprzez indukcję wydzielania glikokortykosterydów[98]. Również część białek ostrej fazy wydzielanych w odpowiedzi na IL-6 ma charakter

przeciwzapalny, między innymi inhibitory proteaz, takie jak antytrypsyna, antychymotrypsyna.
W modelu wstrząsu septycznego wywołanego przez LPS wykazano protekcyjne działanie IL-6[99]. Wyniki te zostały także potwierdzone w badaniach u myszy z nokautowanym genem IL-6, gdzie dowiedziono, iż IL-6 jest odpowiedzialna za hamowanie zarówno lokalnej, jak i systemowej odpowiedzi zapalnej na LPS poprzez zmniejszanie akumulacji neutrofili oraz produkcji cytokin prozapalnych, takich jak TNFα, IFNγ, GM-CSF[100].

W wielu stanach chorobowych obserwuje się znaczne podwyższenie stężenia IL-6 w surowicy krwi i bada związek tej cytokiny z procesami patofizjologicznymi. Stwierdzono podwyższone stężenia IL-6 w chorobach limfoproliferacyjnych (m. in. w szpiczaku mnogim[101 102], przewlekłej białaczce limfatycznej[103]), osteoporozie[104], chorobie Alzheimera[105 106], reumatycznym zapaleniu stawów[107], toczniu trzewnym układowym[108] i innych chorobach o charakterze autoimmunologicznym bądź zapalnym.

1.4. Rola IL-6 w patogenezie choroby niedokrwiennej serca

Jak wynika z przedstawionego wcześniej opisu powstawania i rozwoju blaszki miażdżycowej, komórki stanu zapalnego oraz wydzielane przez nie czynniki, w tym cytokiny, pełnią istotną rolę na każdym etapie tego procesu. Szczególnie istotna wydaje się być rola interleukiny 6, cytokiny ważnej zarówno dla przebiegu lokalnej reakcji zapalnej w obrębie blaszki miażdżycowej, jak i wywołującej szereg efektów ogólnoustrojowych, w tym reakcję ostrej fazy. Nie bez znaczenia dla przebiegu procesu miażdżycowego jest również immunoregulacyjne działanie tej cytokiny.

1.4.1. Rola IL-6 w powstawaniu zmian miażdżycowych

Badania *in vitro* wykazały, iż IL-6 może być produkowana przez większość typów komórek zaangażowanych w patogenezę miażdżycy. Duże ilości IL-6

wytwarzają makrofagi i powstające z nich komórki piankowate oraz proliferujące bądź aktywowane przez IL-1 komórki mięśniówki gładkiej[109 110]. Również aktywowane komórki śródbłonka naczyń są zdolne do produkcji IL-6. Co ciekawe, w kohodowlach komórek śródbłonka i monocytów aktywowanych IFNγ wykazano, iż to komórki śródbłonka były głównym źródłem IL-6[111].

Szereg prac wykazało obecność IL-6 w blaszkach miażdżycowych zarówno u ludzi[112 113], jak i w badaniach na zwierzętach[114]. Badania immunohistochemiczne wykazały, iż IL-6 produkowana jest przez makrofagi i komórki mięśniowe gładkie obecne w blaszce miażdżycowej[115]. Co więcej - zaobserwowano również liniową korelację między lokalną produkcją tej cytokiny a wielkością blaszki[116]. Podanie rekombinowanej IL-6 myszom z genetycznie uwarunkowaną skłonnością do miażdżycy ($ApoE^{-/-}$) nasilało tworzenie wczesnych blaszek miażdżycowych[117]. Ponadto wstrzyknięcie IL-6 wywoływało wzrost stężenia IL-6, IL-1β, TNFα oraz fibrynogenu, natomiast pozostawało bez wpływu na stężenie cholesterolu w surowicy badanych zwierząt.

Z kolei podwójnie nokautowane myszy $ApoE^{-/-}$ $IL\text{-}6^{-/-}$ hodowane na normalnej diecie wykazywały podwyższone stężenia cholesterolu oraz zwiększone tworzenie blaszek miażdżycowych w stosunku do pojedynczo nokautowanych myszy $ApoE^{-/-}$ oraz $IL\text{-}6^{-/-}$, jak również myszy szczepu dzikiego[118]. Natomiast napływ komórek stanu zapalnego do blaszki miażdżycowej był u myszy $ApoE^{-/-}$ $IL\text{-}6^{-/-}$ znacząco zahamowany w stosunku do myszy $ApoE^{-/-}$, podobnie zahamowana była ekspresja i wydzielanie IL-10. Autorzy sugerują podwójną modulującą rolę IL-6 w miażdżycy, polegającą z jednej strony na hamowaniu gromadzenia się lipidów w blaszce, a z drugiej strony na zwiększaniu napływu leukocytów do powstającej blaszki.

Omawiana cytokina w znaczący sposób wpływa również na aktywację komórek zaangażowanych w patogenezę miażdżycy. IL-6 stymuluje makrofagi do produkcji TNF-α w odpowiedzi na LPS[119] oraz aktywuje monocyty do produkcji MCP-1[120], czyli czynników które bądź potęgują lokalny stan zapalny, jak TNF, bądź zwiększają napływ monocytów do ściany naczynia, jak MCP-1. W stosunku do komórek mięśniówki gładkiej IL-6 działa proproliferacyjnie[121 122] oraz stymuluje

ich migrację[123]. Interesujący jest wpływ IL-6 na pobieranie cholesterolu LDL przez makrofagi oraz na ekspresję receptorów dla różnych form LDL na powierzchni tych komórek. IL-6 stymuluje ekspresję receptora zmiatacza CD36 oraz zwiększa degradację oksydatywnie zmodyfikowanych LDL (ox-LDL)[124]. Z drugiej strony inni badacze wykazali, iż IL-6 hamuje wiązanie i pobieranie acetylowanych LDL (ac-LDL) przez receptor MSR (ang. macrophage scavenger receptor)[125].

1.4.2. IL-6 a czynniki ryzyka ChNS

U osób palących papierosy stwierdza się podwyższone poziomy zarówno cytokin prozapalnych IL-6 i TNF, jak i białek ostrej fazy, co prawdopodobnie wynika z przewlekłej reakcji zapalnej toczącej się płucach palaczy[126]. Także przewlekłe infekcje w różnych narządach indukują produkcję IL-6, która poprzez swoje działanie ogólnoustrojowe oraz wpływ na komórki ściany naczyń przyczynia się do postępu procesu miażdżycowego[127]. Wykazano, iż stres psychosocjalny podwyższa stężenie IL-6 w surowicy krwi, prawdopodobnie poprzez działanie katecholamin na komórki tkanki tłuszczowej. Podwyższone stężenia IL-6 stymulują oś podwzgórze-przysadka-nadnercza prowadząc do oporności na insulinę, otyłości centralnej oraz dyslipidemii. Co więcej, wynikający z tego przyrost masy tkanki tłuszczowej prowadzi do dalszego wzrostu stężenia IL-6. Dowiedziono, iż u osób otyłych oraz pacjentów z cukrzycą typu 2 występują podwyższone poziomy krążącej IL-6, szczególnie u tych pacjentów, który mają również cechy zespołu metabolicznego[128 129].

1.4.3. IL-6 w chorobie niedokrwiennej serca

Liczne wyniki badań stężenia IL-6 w surowicy krwi wykazały związek między podwyższonym stężeniem tej cytokiny w surowicy krwi osób zdrowych a przyszłym ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej serca i jej powikłań. Wykazano związek między podwyższonymi stężeniami IL-6 i CRP a śmiertelnością w grupie zdrowych osób powyżej 70-tego roku życia[130]. Podobnie w badaniu 620 kobiet w wieku powyżej 65 lat wysokie stężenie IL-6 w surowicy krwi związane

było ze zwiększoną śmiertelnością[131]. W dużym, prospektywnym badaniu obejmującym 14 916 zdrowych mężczyzn zaobserwowano, iż wyższe wyjściowe stężenia IL-6 ponad dwukrotnie zwiększały ryzyko wystąpienia zawału serca w okresie sześciu lat od rozpoczęcia badania[132].

Wydaje się, że IL-6 może być również markerem niestabilności blaszki miażdżycowej. Obserwowano wyższą produkcję IL-6 w niestabilnych blaszkach miażdżycowych w porównaniu do stabilnych, dodatkowo współwystępowała również zwiększona produkcja IL-8 i IL-18 oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9[133]. Wyższe stężenia IL-6 w surowicy były związane z niską echogennością blaszek, będącą cechą charakterystyczną niestabilnej blaszki[134].

Podwyższone poziomy IL-6 oraz IL-1Ra w czasie dwóch pierwszych dni hospitalizacji z powodu niestabilnej dusznicy bolesnej były związane z ryzykiem wystąpienia ostrych zdarzeń sercowych w trakcie hospitalizacji[135]. Co ciekawe, w innej pracy tej grupy zauważono, iż stężenia IL-6 oraz CRP i SAA po angioplastyce przezskórnej nie zmieniały się istotnie u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową oraz u pacjentów z niestabilną chorobą wieńcową, którzy wykazywali się prawidłowymi poziomami tych markerów stanu zapalnego przed zabiegiem. Natomiast u pacjentów z niestabilną dusznicą bolesną z wyjściowo podwyższonymi stężeniami markerów stanu zapalnego obserwowano znaczne podwyższenie ich stężeń także po zabiegu[136]. Autorzy spekulują, iż uszkodzenie blaszki miażdżycowej samo z siebie nie jest głównym czynnikiem wywołującym wzrost stężenia białek ostrej fazy, a obserwowane podwyższone poziomy markerów stanu zapalnego są wyrazem nadreaktywności układu immunologicznego.

1.4.4. Interleukina 6 w reakcji zapalnej na zabieg pomostowania tętnic wieńcowych

Zabieg pomostowania tętnic, stosowany u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca w celu przywrócenia właściwego przepływu krwi w tętnicach wieńcowych, wywołuje reakcję zapalną, której jednym z przejawów jest znaczny wzrost stężenia cytokin prozapalnych w surowicy krwi.

Stężenie IL-6 w surowicy krwi bardzo szybko i gwałtownie wzrasta niezależnie od typu zabiegu operacyjnego. Porównano stężenia cytokin po zabiegu pomostowania tętnic z krążeniem pozaustrojowym, przezskórnej interwencji wieńcowej (ang. percutaneous coronary intervention, PCI) z krążeniem pozaustrojowym i tradycyjnej przezskórnej interwencji wieńcowej bez krążenia pozaustrojowego[137]. Takie podejście pozwoliło porównać wpływ krążenia pozaustrojowego oraz uszkodzenia tkanek wywołanego zabiegiem operacyjnym na wyrzut cytokin. Najwyższe stężenie IL-6 zaobserwowano u chorych poddanych pomostowaniu tętnic (640±165,4 pg/ml), niższe u chorych poddanych PCI z krążeniem pozaustrojowym (170,4±165,4 pg/ml) i najniższe u osób poddanych tradycyjnemu PCI (13,6±22,3 pg/ml). Z przedstawionych danych wynika, iż uraz operacyjny ma większy wpływ na podwyższenie stężenia IL-6 w surowicy niż samo zastosowanie krążenia pozaustrojowego. Te wyniki są zgodne z danymi z prac porównujących wpływ pomostowania tętnic z krążeniem pozaustrojowym (ang. on-pump coronary artery bypass grafting, CABG) i bez krążenia pozaustrojowego (ang. off-pump coronary artery bypass grafting, OPCABG) oraz minimalnie inwazyjnego bezpośredniego pomostowania aortalno-wieńcowego (ang. minimally invasive direct coronary artery bypass, MIDCAB). Zabiegi z krążeniem pozaustrojowym (CABG) lub bez (OPCABG) nie różniły się dynamiką wyrzutu IL-6[138] [139] lub różniły tylko nieznacznie[140]. Natomiast u chorych z jednonaczyniową chorobą poddanych zabiegowi minimalnie inwazyjnemu (MIDCAB) stwierdzono niższy poziom IL-6 po 24 godzinach po zabiegu w porównaniu do osób z trójnaczyniową chorobą wieńcową operowanych tradycyjną metodą z krążeniem pozaustrojowym[141]. Co ciekawe, w tym samym badaniu, w punkcie maksymalnego wyrzutu cytokiny – 4 godziny po zabiegu nie było różnic w stężeniu IL-6 w zależności od typu zabiegu.

Wyniki opisywanych oraz licznych innych badań wskazują, iż stężenie IL-6 w surowicy krwi po zabiegu koreluje z wielkością urazu operacyjnego[142]. Wysokie stężenia tej cytokiny związane były także z występowaniem pooperacyjnych epizodów niedokrwiennych[143].

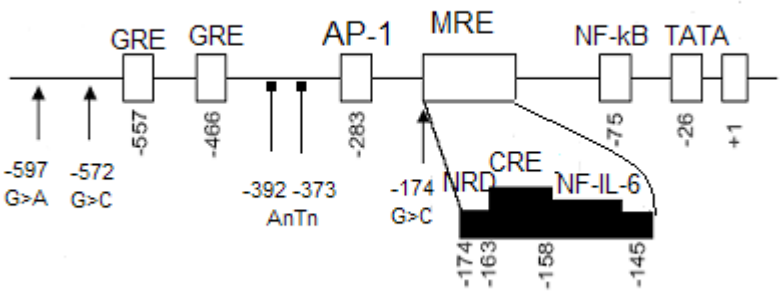
1.5. Polimorfizm regionu promotorowego genu IL-6

Szacuje się, że konwencjonalne czynniki ryzyka ChNS takie jak wiek, płeć, wskaźnik masy ciała, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, palenie tytoniu odpowiadają za około 50% zachorowań[144]. Poza wymienionymi czynnikami istotny wpływ na ryzyko rozwoju choroby mają czynniki genetyczne[145]. Do dobrze opisanych genetycznych markerów ryzyka należą polimorfizmy i mutacje w obrębie genów kodujących apolipoproteinę E (ApoE)[146], enzym konwertujący angiotensynę (ACE)[147], lipazę lipoproteinową (LPL)[148], receptor dla LDL (LDLR), śródbłonkową syntazę tlenku azotu[149], inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1)[150].

Ze względu na rolę IL-6 w przebiegu stanu zapalnego oraz w patogenezie ChNS również polimorfizm genu IL-6 może pełnić rolę czynnika ryzyka bądź czynnika wpływającego na przebieg choroby.

W genie kodującym IL-6 opisano istnienie kilku miejsc polimorficznych. W regionie promotorowym istnieją trzy substytucje pojedynczych nukleotydów (SNP) w pozycjach: -174, -572 i -597 oraz miejsce o różnej ilości powtórzeń AT (AnTn) w pozycji -392 do -373[151]. Polimorfizmy -174 i -572 są substytucjami G na C, a polimorfizm -597 G na A. Dodatkowo opisano również istnienie polimorfizmu w regionie niekodującym 3' genu IL-6[152].

Polimorfizm -174 IL-6 leży obrębie ważnego elementu regulującego transkrypcję genu – sekwencji MRE (ang. multi response element). Fragment między -225 a -164, w obrębie którego znajduje się miejsce polimorficzne -174, określono jako region regulacji negatywnej[153], co więcej - zamiana G na C w pozycji -174 powoduje powstanie potencjalnego miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego NF-1[154 155]. Natomiast pozostałe miejsca polimorficzne znajdują się w regionach, w których nie stwierdzono wiązania się czynników transkrypcyjnych bądź represorów transkrypcji.



Rysunek 1.5.1. Rozmieszczenie miejsc polimorficznych w obrębie promotora genu IL-6. GRE – miejsce wiązania receptora glikokortykoidowego, AP-1 – miejsce wiązania czynnika AP-1, MRE – element odpowiedzi na wiele czynników, NRD – domena regulacji negatywnej, CRE – element odpowiedzi na cAMP, miejsce wiązania CREB, NF-IL-6 – miejsce wiązania czynnika NF-IL-6, NF-κB – miejsce wiązania czynnika NF-κB. Modyfikacja własna na podstawie Park i wsp.[69]

Polimorfizmy, szczególnie te znajdujące się w obrębie regionów promotorowych, mogą wpływać na ekspresję genów bądź poprzez zmianę sekwencji wiążącej czynnik transkrypcyjny, bądź też powodując zmiany konformacyjne w DNA wpływające na siłę wiązania czynników transkrypcyjnych i białek pomocniczych. W zależności od typu komórki oraz stopnia i sposobu jej aktywacji odmienne szlaki sygnalizacji oraz czynniki transkrypcyjne mogą być zaangażowane w aktywację transkrypcji. To tłumaczy otrzymane przez badaczy różne efekty oddziaływania polimorfizmu na aktywność transkrypcyjną promotora w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem różnych konstruktów genetycznych[151 154]. Wiele prac opisuje również związek między polimorfizmem regionu promotorowego, w szczególności w pozycji -174, a przebiegiem wielu chorób, zwłaszcza schorzeń o podłożu autoimmunologicznym[156 157] bądź zapalnym[158 159]. Badano również zależność między polimorfizmem genu IL-6 a schorzeniami układu krążenia, w tym chorobą niedokrwienną serca, zawałem mięśnia sercowego[160 161], i miażdżycą naczyń obwodowych[162]. Wyniki tych prac nie są jednoznaczne, co wynika z kompleksowego, wieloczynnikowego podłoża patogenetycznego tych chorób, tym niemniej wpływ polimorfizmu na lokalne wydzielanie cytokiny oraz jej rola w przebiegu odpowiedzi zapalnej skłaniają do przeprowadzenia szczegółowej analizy tej zależności.

2. CELE PRACY

1. Określenie częstości występowania polimorfizmów: -174, -572 i -597 genu IL-6 oraz tworzonych przez nie złożonych genotypów u chorych z chorobą niedokrwienną serca.

2. Ocena związku polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 ze zdolnością monocytów krwi obwodowej do produkcji tej cytokiny.

3. Określenie związku polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 z nasileniem reakcji zapalnej po zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych.

4. Ocena związku polimorfizmu genu IL-6 z występowaniem powikłań okołooperacyjnych po zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Badana populacja

Do badań zakwalifikowano 318 osób poddawanych zabiegowi pomostowania tętnic wieńcowych z powodu przewlekłej choroby niedokrwiennej serca. Doboru dokonano losowo spośród pacjentów Kliniki Kardiochirurgii Akademii Medycznej w Gdańsku (kierownik: prof. dr hab. Jan Rogowski) poddawanych zabiegowi pomostowania tętnic. Materiał do badań pobierano od 4 osób operowanych w jednym dniu tygodnia.

Grupę kontrolną stanowiły 103 zdrowe osoby w zbliżonym wieku, bez objawów choroby niedokrwiennej serca, u których na podstawie wywiadu lekarskiego i przyjętych kryteriów kardiologicznych wykluczono chorobę wieńcową.

Osoby biorące udział w badaniach poinformowane zostały o ich celach i przebiegu oraz wyraziły zgodę na uczestnictwo w nich. Projekt badania został zaakceptowany przez Komisję Etyczną Akademii Medycznej w Gdańsku.

Materiał do badań stanowiła krew żylna obwodowa pobierana do probówek z EDTA (do oznaczeń polimorfizmu), z heparyną (do oznaczeń cytometrycznych) oraz probówek bez antykoagulanta (do oznaczeń poziomów cytokin w surowicy).

Dane kliniczne gromadzono w Klinice Kardiochirurgii AMG przeprowadzając wywiad lekarski oraz analizując kartę zgłoszenia chorego do Kliniki. Zbieraniem danych oraz przygotowaniem bazy danych zajmował się dr Krzysztof Szyndler z Kliniki Kardiochirurgii. Zbierano dane dotyczące: czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca, charakterystyki klinicznej choroby, przyjmowanych leków, charakterystyki zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych oraz dane dotyczące powikłań pooperacyjnych.

Dane na temat częstości występowania czynników ryzyka ChNS obejmowały: wiek, płeć, wskaźnik masy ciała (BMI, body mass index), nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, palenie tytoniu, występowanie incydentów wieńcowych w najbliższej rodzinie (krewni pierwszego stopnia) przed 60. rokiem życia, wartość frakcji lipidowych. Dodatkowo dokumentowano czas trwania choroby wieńcowej (jako czas od wystąpienia pierwszych dolegliwości dławicowych bądź rozpoczęcia leczenia zachowawczego do momentu leczenia operacyjnego), występowanie w

przeszłości zawału serca bądź migotania przedsionków, niestabilną chorobę wieńcową według kryteriów Braunwalda[163], wartość frakcji wyrzutowej lewej komory serca (LVEF), nasilenie dolegliwości dławicowych określane za pomocą klasyfikacji Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego – CCS, ryzyko zgonu okołooperacyjnego określane za pomocą punktacji EuroSCORE [164], liczba istotnie zwężonych tętnic w badaniu angiograficznym (>50% światła naczynia dla pnia lewej tętnicy wieńcowej oraz >75% dla gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej, gałęzi okalającej lewej tętnicy wieńcowej lub prawej tętnicy wieńcowej).

Tabela 3.1.1. Występowanie czynników ryzyka choroby wieńcowej oraz charakterystyka kliniczna pacjentów w analizowanej populacji.

	Średnia±SD lub %	**Minimum--maksimum**
Płeć męska, n (%)	234 (72,9%)	-
Wiek, lata	62,41±8,86	42-82
BMI, kg/m^2	28,23±4,07	17,3-44,14
Nadciśnienie tętnicze, %	68,4%	-
Czas trwania nadciśnienia tętniczego, lata	11,35±9,55	0,25-40
Cukrzyca, %	26,8%	-
Czas trwania cukrzycy, lata	9,87±8,18	0,25-30
Cholesterol całkowity, mg/dl	217,46±51,44	98-363
Cholesterol LDL, mg/dl	136,72±43,82	38-283
Cholesterol HDL, mg/dl	44,66±13,53	9-97
Trójglicerydy, mg/dl	167,3±104,39	31-982
Kreatynina, mg/dl	1,14±0,25	0,7-2,8
Palenie tytoniu, %: niepalący/palacz/ex-palacz	26,92 / 9,44 / 63,64	-
Choroba wieńcowa w wywiadzie rodzinnym,%	52,3%	-
Ciśnienie skurczowe, mmHg	137,21±21,25	80-215
Ciśnienie rozkurczowe, mmHg	82,17±12,97	50-130
Czas trwania dławicy piersiowej, lata	8,02±7,14	0,12-35
Niestabilna dławica piersiowa, %	14,8%	-
Zawał serca w wywiadzie, %	64,1%	-
Migotanie przedsionków w wywiadzie, %	11,2%	-
Frakcja wyrzutowa, %	53,06±10,06	20-70
Liczba zwężonych naczyń, %: 1 / 2 / 3	5,38 / 29,75 / 64,87	-
CCS, pkt; mediana (rozstęp kwartylny)	3 (2-3)	0-4
NYHA, pkt; mediana (rozstęp kwartylny)	0 (0-2)	0-3
EuroSCORE, pkt; mediana (rozstęp kwartylny)	3 (1-5)	0-13

Na podstawie wywiadu lekarskiego oceniano farmakoterapię choroby wieńcowej ze szczególnym uwzględnieniem częstości przyjmowania: statyn, inhibitorów enzymu konwertującego angiotensyny lub blokerów receptorów angiotensyny, kwasu acetylosalicylowego, beta-blokerów, nitratów i blokerów kanału wapniowego.

Tabela 3.1.2. Charakterystyka farmakoterapii choroby wieńcowej w badanej grupie.

	%
Kwas acetylosalicylowy, %	92,7
Beta-blokery, %	82,6
Nitraty, %	79,8
Statyny, %	78,5
Blokery enzymu konwertującego lub receptora angiotensyny, %	62,3
Blokery kanału wapniowego, %	22,5

Charakterystyka zabiegu pomostowania tętnic obejmowała rodzaj zabiegu, liczbę wykonanych pomostów naczyniowych, czas trwania krążenia pozaustrojowego (KPU), czas pobytu na oddziale pooperacyjnym (POP) oraz łączny czas hospitalizacji po zabiegu (tabela 3.1.3.).

Tabela 3.1.3. Charakterystyka zabiegu oraz przebiegu pooperacyjnego w badanej grupie.

	Średnia±SD lub %	**Minimum--maksimum**
Liczba wykonanych pomostów tętniczych	2,68±0,92	1-5
Zabieg w KPU, %	50,8%	-
Czas trwania KPU, min	85,71±30,33	34-214
Czas pobytu na POP, godziny	35,5±30,07	4-235
Czas do wypisu, dni	6,35±1,97	4-30

KPU – krążenie pozaustrojowe; POP – oddział pooperacyjny

Dodatkowo zbierano dane dotyczące okresu pooperacyjnego, ze szczególnym uwzględnieniem występowania powikłań okołooperacyjnych. Wyróżniono ciężkie powikłania okołooperacyjne, do których zaliczono: zgon okołooperacyjny (w ciągu 30 dni od zabiegu), zawał mięśnia sercowego (definiowany przy wystąpieniu dwóch z następujących zaburzeń: nowe patologiczne Q w EKG, CK-MB>30 U/l lub nowe zaburzenia kurczliwości w obrazie echokardiograficznym) oraz zespół małego rzutu

(konieczność stosowania wspomagania krążenia za pomocą kontrapulsacji wewnątrzaortalnej oraz ciśnienie skurczowe <80mmHg, wskaźnik objętości minutowej lewej komory < 2,0 l/min/m^2, ciśnienie zaklinowania w tętnicy płucnej>20mmHg).

W grupie 50 osób poddawanych zabiegowi pomostowania tętnic z użyciem krążenia pozaustrojowego przeprowadzono szczegółową analizę odpowiedzi zapalnej na zabieg. Od osób tych pobierano krew na dzień przed zabiegiem, 3, 24 i 72 godziny po zakończeniu zabiegu.

3.2. Materiały

3.2.1. Odczynniki

2-merkaptoetanol (Serva, Niemcy);
agaroza (Roth, Niemcy);
alkohol etylowy absolutny (POCh, Polska);
azydek sodu (Sigma, USA);
bis-akrylamid, akrylamid (Roth, Niemcy);
bromek etydyny (Sigma, USA);
cielęca surowica płodowa (FCS) (Gibco BRL, USA);
dNTPs - wodny roztwór zawierający dATP, dCTP, dGTP i dTTP w stężeniu 10mM każdy (Fermentas, Litwa);
EDTA (Sigma, USA);
enzym restrykcyjny BseGI (*Fok*I) (Fermentas, Litwa);
enzym restrykcyjny SfaNI (NEB, Wielka Brytania);
Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia, Szwecja);
GolgiStop (BD Pharmingen, USA);
interleukina 6 (Sigma, USA);
kwas borowy (Serva, Niemcy);
lowastatyna (Polpharma, Polska)
LPS *E.coli* 0128:B12 (Difco, USA);
mewalonian (Sigma, USA);
PHA (Sigma, USA);
PMA (Sigma, USA);
Polimeraza DNA DyNAzyme II (Finnzymes, Finlandia);

roztwór penicylina/streptomycyna (Sigma, USA);

RPMI 1640; (BioMed, Polska);

saponina (Sigma, USA);

Sybr Gold®, czuły barwnik fluoryzujący po związaniu z DNA (Molecular Probes, USA);

Tris (Serva, Niemcy);

Uropolina (POCh, Polska)

woda redestylowana wolna od nukleaz (Promega Corp., USA);

wzorzec masowy pUC Mix (Fermentas, Litwa)

zestaw do izolacji genomicznego DNA z krwi DNA Blood Mini (A&A Biotechnology, Polska);

3.2.2. Bufory i roztwory

Bufor PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} do barwień cytometrycznych

NaCl	8,59g
Na_2HPO_4	1,25g
NaN_3	0,98g
EDTA (dwusodowy)	3,7g
Woda redestylowana	1000ml

Ustalić pH 7,4, autoklawować, przechowywać w 4ºC w ciemności

Bufor SB do barwień cytometrycznych antygenów wewnątrzkomórkowych

Inaktywowana FCS	1ml
NaN_3	0,098g
PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+}	do 100ml

Ustalić pH 7,4, przefiltrować (filtr 0,22µm), przechowywać w 4ºC w ciemności

Bufor PW do barwień cytometrycznych antygenów wewnątrzkomórkowych

Saponina	0,1g
NaN_3	0,098g
PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+}	do 100ml

Ustalić pH 7,4-7,6, przefiltrować (filtr 0,22µm), przechowywać w 4ºC w ciemności

Bufor CC do barwień cytometrycznych antygenów wewnątrzkomórkowych

Inaktywowana FCS	1ml
Saponina	0,1
NaN_3	0,098g
PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+}	do 100ml

Ustalić pH 7,4-7,6, przefiltrować (filtr 0,22µm), przechowywać w 4ºC w ciemności

Bufor utrwalający do barwień cytometrycznych antygenów wewnątrzkomórkowych

Paraformaldehyd	4g
PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+}	100ml

Ustalić pH 7,4-7,6, paraformaldehyd rozpuszczać w PBS w 56ºC, przechowywać w 4ºC w ciemności

Bufor TBE (5× stężony):

Tris	54g
Kwas borowy	27,5g
0,5M EDTA pH 8,0	20ml
H_2O destylowana	do 1000ml

30% roztwór akrylamidów (29g akrylamidu, 1g N,N'-metylenbisakrylamidu w 100ml wody)

Bufor obciążający do elektroforezy agarozowej

0,25% w/v błękit bromofenolowy
40% w/v sacharoza
0,1M EDTA pH 8,0
0,55% w/v SDS

Mieszanina Ficoll/Uropolina, gęstość 1,007g/cm^3

24 części 9% w/v Ficoll
10 części 33,9% w/v Uropolina

Roztwór bromku etydyny 5mg/ml (w/v)

Roztwór wzorca masy molekularnej pUC Mix

10µl wzorca masy pUC Mix (0,5mg/ml)
20 µl buforu obciążającego (6×)
90 µl wody dejonizowanej

Roztwory do lizowania i utrwalania krwi pełnej do barwień cytometrycznych antygenów powierzchniowych

Roztwór A – lizujący (600µl/50µl krwi)

Kwas mrówkowy	0,6ml
Woda destylowana	do 500ml

Roztwór B – stabilizujący błony komórkowe leukocytów (240µl/50µl krwi)

Węglan sodu	1,5g
Chlorek sodu	3,63g
Siarczan sodu	7,83g
Woda destylowana	250ml

Roztwór C – utrwalający komórki (100 µl/50µl krwi)

Paraformaldehyd	1g
Woda destylowana	100ml

Roztwór lowastatyny

Lowastatynę w nieaktywnej formie laktozowej otrzymano w darze od firmy POLPHARMA S.A. Aktywną formę hydroksykwasu otrzymano przez rozpuszczenie 40mg laktonu w 1ml absolutnego alkoholu etylowego, dodanie 1,5ml 0,1M roztworu NaOH i inkubację przez 2 godziny w 50ºC[165]. Ustalono pH 7,2, uzupełniono wodą destylowaną do objętości 20ml, a następnie przefiltrowano przez filtr o średnicy 0,22µm (Millipore). Otrzymany roztwór o stężeniu 5mM rozporcjowano i przechowywano w temperaturze -20ºC.

Roztwór mewalonianu

1mM mewalonianu (0,126g) rozpuszczono w 1ml alkoholu etylowego 99,6% i uzupełniono 9ml wody. Otrzymany roztwór przefiltrowano filtrem o średnicy 0,22µm (Millipore). Uzyskany roztwór o stężeniu 100mM rozporcjowano i przechowywano w -20ºC.

3.2.3. Materiały jednorazowego użytku

Butelki do hodowli komórkowych (NUNC, Dania)

Filtry strzykawkowe 0,22µm (Milipore)

Pipety jednorazowe typu balonik (Sigma, USA)

Płytki 24-dołkowe (NUNC, Dania)

Płytki 96-dołkowe, płaskodenne (NUNC, Dania; Sarstedt, USA)

Probówki do cytometru (Medlab, Polska; Falcon, USA)

Probówki typu Eppendorf 1,5ml (Medlab, Polska)

Probówki typu Eppendorf 2ml (Medlab, Polska)

Probówki typu Falcone na 15ml (Medlab, Polska)

Probówki typu Falcone na 50ml (Medlab, Polska)

Szalki do hodowli (NUNC, Dania)

Tipsy do pipet (Medlab, Polska)

3.2.4. Przeciwciała monoklonalne

CD11a (LFA-1) FITC, klon G43-25B, mysie IgG_{2a}, κ; (BD Pharmingen, USA)

CD11b (Mac-1) PE, klon ICRF44, mysie IgG_1, κ; (BD Pharmingen, USA)

CD14 FITC, klon TUK4, mysie IgG_{2a}, κ; (DakoCytomation, Dania)

CD14 FITC, klon M5E2, mysie IgG_{2a}, κ; (BD Pharmingen, USA)

CD14 ECD, klon RMO52, mysie IgG_{2a}; (Immunotech, Beckman Coulter, Francja)

CD16 FITC, klon 3G8, mysie IgG_1, κ; (BD Pharmingen, USA)

CD16 PE-Cy5, klon 3G8, mysie IgG_1, κ; (BD Pharmingen, USA)

CD54 PE, klon HA58, mysie IgG_1, κ; (BD Pharmingen, USA)

IL-6 PE, klon MQ2-6A3, szczurze IgG_{2a}, κ; (BD Pharmingen, USA)

Kontrola izotypowa FITC, klon MOPC-21, mysie IgG_1, κ; (BD Pharmingen, USA)

Kontrola izotypowa FITC, klon G155-178, mysie IgG_{2a}, κ; (BD Pharmingen, USA)

Kontrola izotypowa FITC, klon DAK-GO5, mysie IgG_{2a}, κ (DakoCytomation, Dania)

Kontrola izotypowa PE, klon MOPC-21, mysie IgG_1, κ; (BD Pharmingen, USA)

Kontrola izotypowa PE-Cy5, klon MOPC-21, mysie IgG_1, κ; (BD Pharmingen, USA)

Kontrola izotypowa ECD, klon 679,1Mc7, mysie IgG_1; (Immunotech, Beckman Coulter, Francja)

Kontrola izotypowa PE do barwień wewnątrzkomórkowych, klon R35-95, szczurze IgG_{2a}, κ; (BD Pharmingen, USA)

3.2.5. Podłoża hodowlane

Podłoże do hodowli PBMC

RPMI z 5% FCS, L-glutaminą, pirogronianem

Podłoże do hodowli komórek linii B9

RPMI 1640 z 3% FCS, 20μM 2-merkaptoetanolu (2-ME), L-glutaminą, pirogronianem, penicyliną, streptomycyną i 10U/ml rekombinowanej ludzkiej IL-6 (Sigma, USA)

3.2.6. Linie komórkowe

B9 – linia mysia, komórki linii ciągłej szpiczaka, wrażliwe na IL-6; dar dr L. Aarden, Netherland Red Cross, Amsterdam, Holandia

3.2.7. Aparatura

aparat do elektroforezy agarozowej (Kucharczyk, Polska)

aparat do elektroforezy akrylamidowej (Bio-Rad, USA)

cytometr przepływowy Epics XL (Coulter, USA)

cytometr przepływowy LSRII (BD, USA)

czytnik płytek Sumal PE2 (Niemcy)

fluorescencyjny czytnik płytek BIO-TEK FL600 (USA)
inkubator z regulowanym przepływem CO_2 (Heraeus, Niemcy)
komora laminarna (Heraeus, Niemcy; Polon, Polska)
mieszadełko magnetyczne (IKA, Niemcy)
mikroskop odwrócony LM2
mikroskop świetlny Studer
pH-metr uniwersalny Φ 32 (Beckman, USA)
spektrofotometr MBA2000 (Perkin Elmer, USA)
termoblok (JWElectronic, Polska)
termocykler T3 (Biometra, Niemcy)
termocykler Tgradient (Biometra, Niemcy)
urządzenie do lizy i utrwalania komórek Qprep Epics Immunology Workstation (Coulter, USA)
vortex (IKA, Niemcy)
waga elektroniczna (Rad-Wag, Polska)
wirówka 3K15 (Sigma, USA)
wirówka 4K15 (Sigma, USA)
zamrażarka -80°C Polar 550H (AS Biomedica, Włochy)
zestaw do fotografowania i analizy obrazu (UVP, Niemcy)

3.2.8. Programy komputerowe

BD Cytometric Bead Array Software (BD, USA) – analiza danych CBA
FacsDiva (BD, USA) – system zarządzający cytometrem przepływowym LSRII (BD, USA)
Grab-It (UVP, Niemcy) – utrwalanie i obróbka zdjęć z transiluminatora
KC5 (Biotec, Japonia) – analiza danych uzyskanych z czytników płytek
Statistica, wersja 7.1 (StatSoft Inc., USA) – analiza statystyczna wyników
System II 3.0 (Coulter, USA) – system zarządzający cytometrem przepływowym Epics XL (Coulter, USA), wstępna analiza wyników badań cytometrycznych
WinMDI 2.8 – analiza wyników badań cytometrycznych, program stworzony przez Josepha Trottera, dostępny pod adresem: http://facs.scripps.edu/software.html

3.3. Metody

3.3.1. Izolacja genomicznego DNA z krwi

DNA było izolowane przy pomocy zestawu Blood Mini firmy A&A Biotechnology.

Do 1ml krwi dodawano 0,5ml buforu lizującego erytrocyty, całość mieszano, aż roztwór stał się szkarłatnie przezroczysty, a następnie wirowano przez 3 minuty przy 12 tys. obrotów/min. Supernatant usuwano, a do osadu dodawano 100µl buforu Tris i dokładnie pipetowano. Następnie dodawano 200µl uniwersalnego buforu lizującego i 20µl Proteinazy K, całość mieszano i inkubowano 30 min. w 37ºC. Po inkubacji próbkę intensywnie worteksowano i nanoszono na minikolumnę do oczyszczania DNA. Kolumnę wirowano 1 min. przy 12 tys. obrotów/min. i dodawano 500µl buforu płuczącego A1. Po kolejnym wirowaniu (1 min., 12 tys. obrotów/min.) minikolumnę przenoszono do nowej probówki, dodawano 400µl buforu A1 i wirowano 2 min. przy 12 tys. obrotów/min. Minikolumnę przenoszono do nowej probówki i dodawano 200µl buforu Tris (10mM TRIS.HCL pH8,5), próbkę inkubowano 5 min. w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano 1 min. przy 12 tys. obrotów/min. Minikolumnę usuwano, a uzyskane DNA przetrzymywano w -20ºC do czasu dalszych analiz.

3.3.2. Oznaczanie polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6

3.3.2.1. Oznaczanie polimorfizmu w pozycjach -174, -572 i -597 oraz określanie haplotypu

Polimorfizm genu IL-6 w pozycjach -174, -572, -597 określano metodą PCR przy użyciu starterów specyficznych dla alleli. Zastosowano 6 starterów o sekwencjach:

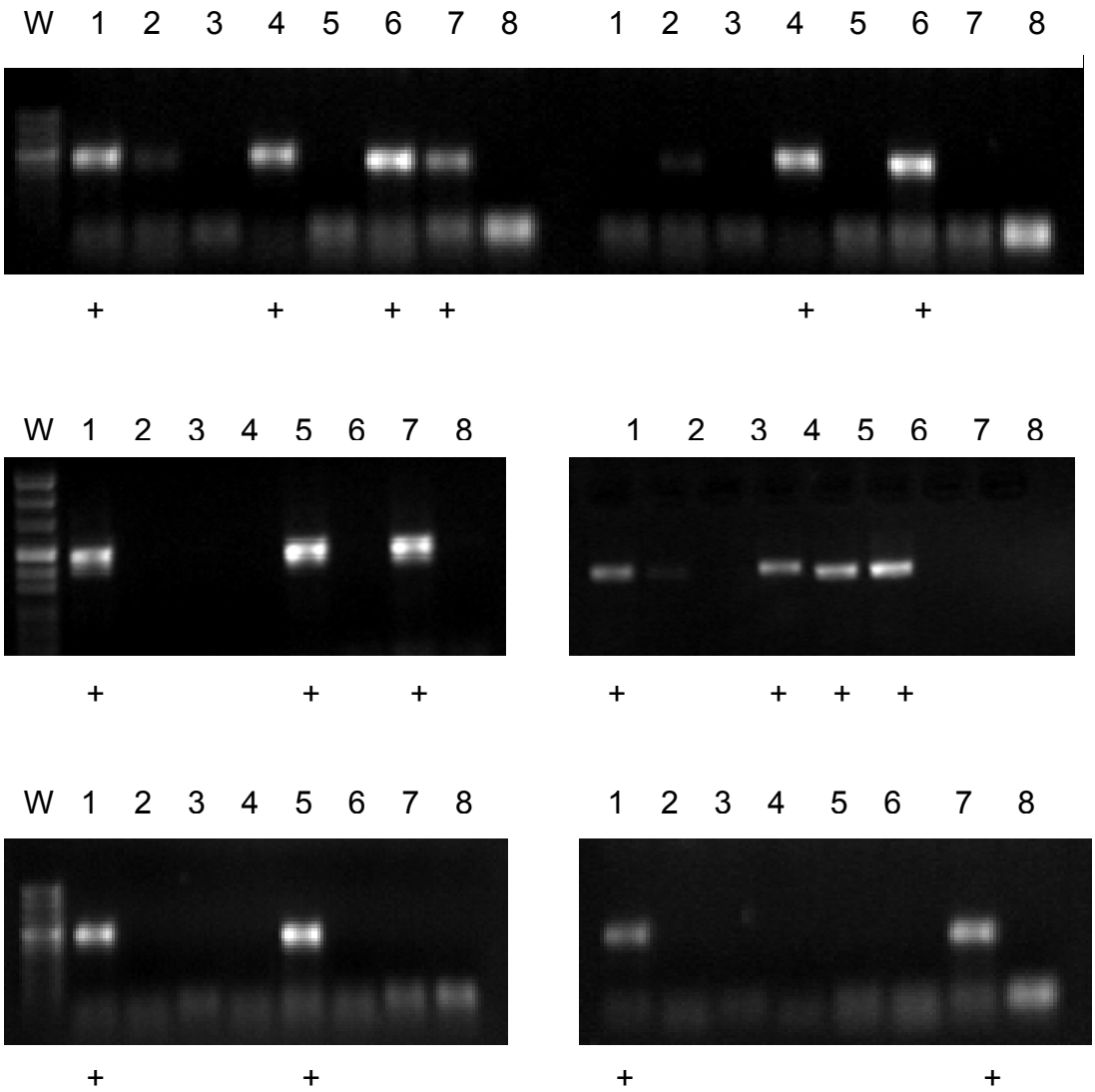
- 5’ AAGTAACTGCACGAAATTTGAGGG 3’ – oznaczony -597 G
- 5’ AAGTAACTGCACGAAATTTGAGGA 3’ – oznaczony -597 A
- 5’ GGCCAGGCAGTTCTCTACAACAGCCG 3’ – oznaczony -572 G
- 5’ GGCCAGGCAGTTCTCTACAACAGCCC 3’ – oznaczony -572 C
- 5’ TGCAATGTGACGTCCTTTAGCATG 3’ – oznaczony -174 G
- 5’ TGCAATGTGACGTCCTTTAGCATC 3’ – oznaczony -174 C

Dla każdej badanej osoby przeprowadzano 8 reakcji PCR z zastosowaniem wymienionych wyżej starterów w następujących kombinacjach:

Numer r-cji PCR	Zastosowane startery	Amplifikacja, jeśli w pozycji:			Długość produktu PCR (bp)
		-597	-572	-174	
1	-597 G i -174 C	G		G	471
2	-597 G i -174 G	G		C	471
3	-597 A i -174 C	A		G	471
4	-597 A i -174 G	A		C	471
5	-572 G i -174 C		G	G	438
6	-572 G i -174 G		G	C	438
7	-572 C i -174 C		C	G	438
8	-572 C i -174 G		C	C	438

Warunki reakcji PCR: 40ng genomowego DNA, po 10pmoli starterów, 200µM dNTP, 2mM $MgCl_2$, 0.4U polimerazy, woda do objętości 25µl. Profil temperaturowy: 3 min. 95°C, 5 cykli: 35 sek. 95°C, 45 sek. 70°C, 35 sek. 72°C, 21 cykli: 25 sek. 95°C, 50 sek. 65°C, 40 sek. 72°C, 4 cykle: 35 sek. 95°C, 60 sek. 55°C, 90 sek. 72°C. Po zakończeniu reakcji PCR przeprowadzano elektroforezę produktów reakcji w 1,5% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny.

Występowało sześć podstawowych kombinacji wyników reakcji PCR przedstawionych na rysunku 3.3.2.1.1., odpowiadających poszczególnym złożonym genotypom. Były to kombinacje: 1456 (odpowiadająca genotypowi GGG/AGC), 46 (GGG/GGG), 15 (AGC/AGC), 157 (GGG/GCG), 1467 (AGC/GCG) oraz 17 (GCG/GCG).



Rysunek 3.3.2.1.1. Wyniki elektroforezy produktów PCR oznaczania polimorfizmów -597, -572 i -174 oraz złożonych genotypów IL-6. W – oznacza wzorzec masowy, 1-8 – kolejne reakcje PCR według schematu przedstawionego powyżej. Począwszy od lewego górnego rogu kolejno przykładowe wyniki dla osoby o genotypie AGC/GCG, AGC/AGC, GGG/GCG, GGG/AGC, GGG/GGG i GCG/GCG.

3.3.2.2. Określanie polimorfizmu genu IL-6 w pozycji -174

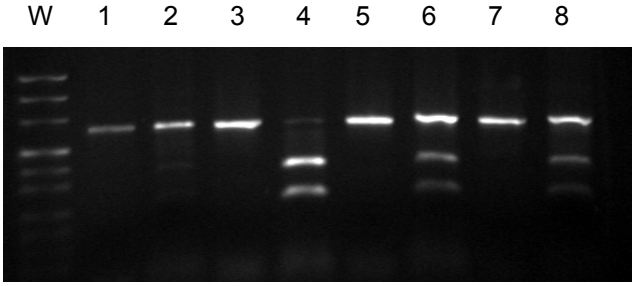
W części próbek polimorfizm genu IL-6 w pozycji -174 określono dodatkowo metodą PCR-RFLP w celu potwierdzenia wyników uzyskanych poprzednią metodą. Reakcję PCR przeprowadzano z użyciem starterów o sekwencji:

5' CAGAAGAACTCAGATGACTGG 3' (starter 5')

5' GCTGGGCTCCTGGAGGGG 3' (starter 3')

Warunki reakcji PCR: 40ng genomowego DNA, po 10pmoli starterów, 200µM dNTP, 2mM $MgCl_2$, 0.4U polimerazy, woda do objętości 50µl. Profil temperaturowy: 95°C 1 min., 63°C 1 min., 72°C 2 min. przez 30 cykli, końcowe

wydłużanie 72°C 10 min. Produkty reakcji PCR cięto enzymem restrykcyjnym SfaNI w 37ºC przez 12 godzin a następnie przeprowadzano elektroforezę w 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny.



Rysunek 3.3.2.2.1. Wyniki analizy metodą PCR-RFPL polimorfizmu -174 IL-6. W – oznacza wzorzec masowy, 1-8 – kolejno produkty reakcji PCR przed i po cięciu enzymem SfaNI.

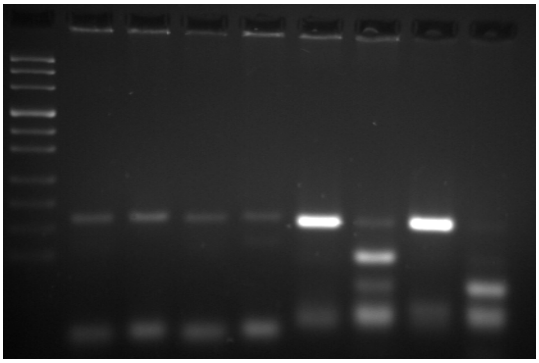
3.3.2.3. Określanie polimorfizmu genu IL-6 w pozycji -597

W części próbek polimorfizm genu IL-6 w pozycji -597 określono dodatkowo metodą PCR-RFLP w celu potwierdzenia wyników uzyskanych poprzednią metodą. Reakcję PCR przeprowadzano z użyciem starterów o sekwencji

5' GGAGACGCCTTGAAGTAACTGC 3' (starter 5')

5' GAGTTTCCTCTGACTCCATCGCAG 3' (starter 3')

Warunki reakcji PCR: 40ng genomowego DNA, po 25pmoli starterów, 200µM dNTP, 2mM $MgCl_2$, 1U polimerazy, woda do objętości 50µl. Profil temperaturowy: 94°C 40 sek., 55°C 40 sek., 72°C 1 min. przez 35 cykli, końcowe wydłużanie 72°C 3 min. Produkty reakcji PCR cięto enzymem restrykcyjnym BseGI (FokI) w 55ºC przez 16 godzin, a następnie przeprowadzano elektroforezę w 3% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny lub 8% żelu poliakrylamidowym wybarwianym bromkiem etydyny.



Rysunek 3.3.2.3.1. Wyniki analizy metodą PCR-RFPL polimorfizmu -597 IL-6. W – oznacza wzorzec masowy, 1-8 – kolejno produkty reakcji PCR przed i po cięciu enzymem BseGI.

3.3.3. Elektroforeza poliakrylamidowa DNA

Szklane płyty myto i odtłuszczano metanolem, następnie wkładano przekładki i umieszczano w aparacie do wylewania żeli. Przygotowano roztwór na 8% żel składający się z 5,32ml 30% roztworu akrylamidów, 2ml 10×TBE, 12,54ml wody, 200µl 10% nadsiarczanu amonu i 20µl TEMED. Po uszczelnieniu aparatu wlewano przygotowany roztwór aż do napełnienia aparatu, a następnie wkładano grzebień. Po polimeryzacji żelu (ok. 30-60 min.) wyjmowano grzebień i wstawiano żel do aparatu do elektroforezy. Aparat napełniano buforem 1×TBE i nanoszono na żel po 20µl próbki po cięciu enzymem restrykcyjnym wymieszanej z 4µl buforu obciążającego, naprzemiennie z 15µl produktu reakcji PCR przed cięciem wymieszanego z 4µl buforu obciążającego. Podłączano zasilanie i przeprowadzano rozdział elektroforetyczny. Po rozdziale żel delikatnie zdejmowano z płyt i umieszczano w naczyniu zawierającym wodny roztwór bromku etydyny (0,5µg/ml). Barwiono 10-20 min. i oglądano w świetle UV.

3.3.4. Uzyskiwanie surowic

Krew pobraną do probówek bez antykoagulanta (5ml) wirowano przez 15 min. 2500 obrotów/min., a uzyskaną surowicę rozdzielano do sterylnych probówek typu eppendorf i przechowywano w -80°C do czasu wykonania dalszych analiz.

3.3.5. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC)

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) uzyskiwano drogą wirowania krwi w gradiencie stężeń mieszaniny Ficollu i uropoliny o gęstości 1,077g/ml. Krew pobierano do sterylnej probówki z heparyną sodową, następnie rozcieńczano ją w buforze PBS w stosunku 1:1 i nawarstwiano na mieszaninę Ficollu i uropoliny. Probówki wirowano przez 15 min. przy prędkości 2500 obrotów/min., a następnie za pomocą pipetki pasterowskiej delikatnie ściągano obłoczek leukocytarny. Uzyskane komórki dwukrotnie płukano buforem PBS i odwirowywano, a następnie zawieszano w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 5% płodowej surowicy cielęcej (FCS) (Gibco).

3.3.6. Metody hodowli komórek

3.3.6.1 Hodowle mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC)

Po wyizolowaniu PBMC komórki zawieszano w stężeniu 1×10^6/ml w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 5% FCS (Gibco). Hodowle komórkowe zakładano na 24-dołkowych plastikowych płytkach (Nunc) dodając po 1mln komórek na dołek.

Dla każdego z pacjentów przygotowywano hodowle:

1) niestymulowane (kontrola, spontaniczna produkcja IL-6)
2) inkubacja z lowastatyną w stężeniu 10^{-6}M (badanie wpływu lowastatyny na spontaniczną produkcję IL-6)
3) LPS w stężeniu 1μg/ml (stymulowana produkcja IL-6)
4) LPS 1μg/ml i lowastatyna 10^{-6}M (badanie wpływu lowastatyny na indukowaną LPS-em produkcję IL-6)

Dodatkowo u 10 pacjentów wprowadzono trzy dodatkowe inkubacje z:

1) mewalonianem 5×10^{-6}M,
2) lowastatyną 10^{-6}M i mewalonianem 5×10^{-6}M
3) LPS-em 1μg/ml, lowastatyną 10^{-6}M i mewalonianem 5×10^{-6}M.

Mewalonian jest produktem reakcji hamowanej przez lowastatynę, dodanie go do hodowli służyło jako kontrola specyficzności działania lowastatyny. Dodanie mewalonianu do hodowli z lowastatyną bądź lowastatyną i LPS-em odwracało działanie lowastatyny w 75-98%, natomiast sam mewalonian tylko nieznacznie wpływał na komórki.

Inkubacje z lowastatyną (oraz mewalonianem) przeprowadzano przez noc, następnie do wszystkich dołków dodawano GolgiStop (BD) (odczynnik hamujący transport przez aparat Golgiego, rutynowo stosowany przy cytometrycznym oznaczaniu cytokin wewnątrzplazmatycznych) oraz do odpowiednich dołków LPS i przeprowadzano 5-godzinną inkubację. Po inkubacji zbierano komórki z płytki i wykonywano barwienie cytometryczne.

W początkowych doświadczeniach sprawdzono efekt działania różnych stężeń lowastatyny na żywotność komórek. Po 24- i 48-godzinnych hodowlach w obecności lowastatyny w stężeniach od 10^{-4}M do 10^{-9}M komórki wybarwiano 0,4% roztworem (w/v) Trypanu Blue (Sigma) i zliczano martwe komórki (niebieskie, matowe). Stężenia 10^{-6}-10^{-9}M nie zmniejszały żywotności komórek, dając <3%

martwych komórek po 24- i 48-godzinnej hodowli. Do dalszych badań wybrano stężenie lowastatyny 10^{-6}M.

3.3.6.2. Hodowla linii komórkowej B9

3.3.6.2.1. Pasażowanie

Komórki linii B9 hodowano w cieplarce w 37ºC w atmosferze zawierającej 5% CO_2 w pożywce RPMI 1640 [z 3% FCS, 20µM 2-merkaptoetanolu (2-ME), L-glutaminą, pirogronianem, penicyliną, streptomycyną i 10U/ml rekombinowanej ludzkiej IL-6 (Sigma)]. Co dwa dni hodowlę odmładzano poprzez rozpipetowanie komórek i usunięcie pożywki wraz z większością komórek. Do pozostałych komórek dodawano nową pożywkę.

3.3.6.2.2. Mrożenie i rozmrażanie

Zamrożone komórki przechowywano w ciekłym azocie. Po wyjęciu z ciekłego azotu ampułkę z komórkami umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 37ºC i ogrzewano aż do zaobserwowania ostatniego kryształka lodu. Następnie komórki przenoszono do probówki wirowniczej, dodawano pożywki i wirowano 1500 obrotów/min. przez 5 min. w celu usunięcia DMSO. Nadsącz zlewano, osad komórek zawieszano w nowej pożywce i przenoszono do butelki hodowlanej.
W celu zamrożenia komórek zbierano je z butelki, odwirowywano 1500 obrotów/min. przez 5 min. i po usunięciu nadsączu zawieszano w 1ml pożywki do mrożenia zawierającej DMSO, a następnie przenoszono do krioampułek. Zamrażano stopniowo: najpierw w -80ºC, a potem przenoszono do ciekłego azotu.

3.3.7. Oznaczanie poziomu bioaktywnej IL-6 w surowicy

Poziom bioaktywnej IL-6 w surowicy oznaczano z wykorzystaniem linii komórkowej B9 wrażliwej na IL-6. Metoda pomiaru biologicznej aktywności IL-6 jest do wielu lat wykonywana w Katedrze Histologii i Immunologii AMG[166 167 168]. Komórki linii B9 w stężeniu 1×10^4/50µl zawieszone w pożywce RPMI 1640 z 3% FCS, L-glutaminą, pirogronianem, penicyliną i streptomycyną inkubowano w 96-dołkowej sterylnej płytce płaskodennej w obecności 5µl rozcieńczonej 1:10 próbki. Wszystkie próby wykonywano w trzech powtórzeniach. Płytki inkubowano 48 godzin w cieplarce w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO_2,

przy wysokiej wilgotności. Aktywność biologiczną IL-6 określano za pomocą pomiaru proliferacji komórek B9 po inkubacji przy użyciu testu kolorymetrycznego MTT. Do każdego z dołków dodawano 20µl sterylnego roztworu MTT [bromek 3-4.5 dimethylthiazol-2-yl)-2.5 diphenyl-tetrazolium] (Sigma) o stężeniu 5mg/ml i inkubowano 3 godziny w cieplarce. Następnie do każdego z dołków dodawano 100µl kwaśnego izopropanolu z 0,04N HCl i wytrząsano płytkę przez 15 min. do rozpuszczenia kryształków MTT. Gęstość optyczną odczytywano przy długości fali 570nm używając czytnika płytek FL600 (Biotek). Specyficzność testu potwierdzano dodając do dołków przeciwciało blokujące anty-IL-6 (Genzyme) w mianie 1:10, 1:20 i 1:50, uzyskując zahamowanie efektu wywieranego przez IL-6. Wyniki uzyskane z dołków eksperymentalnych odnoszono do krzywej standardowej uzyskanej z dołków zawierających seryjne rozcieńczenia rekombinowanej ludzkiej IL-6 (Sigma).

3.3.8. Oznaczenia cytometryczne

Oznaczenia cytometryczne antygenów zewnątrzkomórkowych oraz cytokin wewnątrzplazmatycznych wykonano przy użyciu cytometru przepływowego Epics XL (Coulter), a badanie stężenia cytokin metodą CBA wykonano przy użyciu cytometru przepływowego LSRII (BD).

3.3.8.1. Barwienie antygenów powierzchniowych

Barwienie wykonywano w ciągu godziny od pobrania krwi. Do probówek cytometrycznych rozdzielano po 50µl pełnej krwi. Następnie do probówek dodawano po 100µl rozcieńczeń odpowiednich przeciwciał zawieszonych w PBS z 1% FCS przygotowanych tuż przed barwieniem. Próbki inkubowano 30 minut w ciemności w temperaturze 4°C delikatnie wytrząsając. Następnie lizowano erytrocyty i utrwalano komórki za pomocą roztworów A, B i C [rozdział 3.3.2.] przy użyciu urządzenia do lizy i utrwalania komórek QPrep Epics Immunology Workstation (Coulter). Przygotowane próbki analizowano w cytometrze przepływowym, a uzyskane wyniki analizowano za pomocą programu WinMDI 2.8.

W celu określenia specyficzności wiązania przeciwciał monoklonalnych stosowano kontrole izotypowe połączone z takimi samymi barwnikami jak używane

we właściwym barwieniu. Korekcję nakładających się widm fluorescencji barwników uzyskano przeprowadzając przed rozpoczęciem analiz kompensację nakładających się widm stosując odpowiednie pojedyncze i podwójne barwienia (swoiste przeciwciało z jednym fluorochromem i kontrola izotypowa z innym).

Regiony do analizy wybierano na podstawie obrazu FSS [ang. forward scatter; rozproszenie czołowe (odbicie) światła lasera odpowiadające wielkości komórki] i SS [side scatter; rozproszenie boczne (ugięcie) światła lasera odpowiadające ziarnistości komórki]. Bramkowano populację monocytów, limfocytów bądź granulocytów, a kolejne bramkowania subpopulacji wykonywano na podstawie analizy fluorescencji odpowiednich fluorochromów związanych z zastosowanymi przeciwciałami. [Dokładne bramkowania przedstawione są w rozdziale Wyniki przy odpowiednich analizach.]

3.3.8.2. Barwienie antygenów powierzchniowych i cytokin wewnątrzplazmatycznych

Komórki rozdzielano do probówek cytometrycznych, dodawano 2ml buforu SB, rozpipetowywano i wirowano 5 min. przy 1500 obrotów/min. Supernatant usuwano i do każdej z probówek dodawano 100µl buforu SB zawierającego odpowiednie przeciwciało przeciwko antygenom zewnątrzkomórkowym. Próbki inkubowano 20 min. w ciemności, następnie dodawano 2ml buforu SB i wirowano 5min. przy 1500 obrotów/min. Supernatant usuwano, a do osadu komórek dodawano po 200µl buforu utrwalającego, rozpipetowywano i inkubowano 20 min. w ciemności. Do każdej probówki dodawano po 2ml buforu CC, inkubowano w ciemności przez 30 min., a następnie wirowano 5 min. przy 1500 obrotów/min. i usuwano supernatant. Do każdej probówki dodawano 100µl buforu PW zawierającego odpowiednią ilość przeciwciała do barwienia antygenów wewnątrzkomórkowych, rozpipetowywano i inkubowano 30 min. w ciemności. Następnie dodawano po 2ml buforu PW, próbki wirowano 5 min. przy 1500 obrotów/min. i usuwano supernatant. Do każdej próbówki dodawano 0,5ml 2% formaliny w PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} i analizowano w cytometrze przepływowym. Skład buforów SB, PW i CC podano w rozdziale 3.2.2.

3.3.8.3. Oznaczanie stężenia cytokin w surowicy krwi metodą CBA (Cytometric Bead Array)

Stężenie cytokin układu Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNFα i IFNγ) oznaczano w surowicy krwi pacjentów metodą CBA (Cytometric Bead Array) z wykorzystaniem zestawu Human Th1/Th2 Cytokine Kit II firmy BD Biosciences. Metoda CBA oparta jest na wykorzystaniu cytometrii przepływowej do jednoczesnego pomiaru wielu rozpuszczalnych cząstek przy użyciu znakowanych fluorescencyjnie kulek. Sześć rodzajów kulek o różnej intensywności fluorescencji pokrytych przeciwciałami przeciwko badanym cytokinom mieszanych jest z przeciwciałami do detekcji oraz badanymi próbkami tworząc kompleks: kulka--cytokina-przeciwciało detekcyjne. Po pomiarze cytometrycznym dane analizowane są pomocą programu BD CBA Analysis Software.

Wykonanie testu:

Liofilizowane standardy cytokin rozpuszczano w buforze do rozcieńczeń, a następnie przygotowano seryjne rozcieńczenia standardów (5000, 2500, 1250, 625, 312,5, 156, 80, 40 , 20 i 0 pg/ml). Przygotowano mieszaninę kulek (Capture Beads) po 10µl/próbkę z każdej z kulek i rozdzielono po 50µl mieszaniny do probówek cytometrycznych. Następnie do probówek dodano po 50µl przeciwciał do detekcji (PE Detection Reagent) oraz po 50µl surowicy lub przygotowanych standardów. Otrzymane mieszaniny reakcyjne inkubowano w ciemności przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji próbki płukano (1ml Wash Buffer) i wirowano 5 minut 200×g. Usuwano supernatant i do osadu dodawano 300µl buforu (Wash Buffer). Tak przygotowane próbki analizowano za pomocą cytometrii przepływowej.

Analiza cytometryczna:

Próbki analizowano przy użyciu cytometru LSR II (BD) i programu FacsDIVA. Przed analizą dokonano kalibracji cytometru i ustawienia parametrów odczytu za pomocą dołączonych do zestawu kulek kalibracyjnych (Cytometer Setup Beads). Na podstawie cytogramu FSS/SS bramkowano kulki i odczytywano fluorescencję na detektorach FL1, FL2 oraz FL3. Zbierano po 1800 sygnałów z bramki. Następnie dane analizowano za pomocą programu BD CBA Software.

3.3.9. Obliczenia statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonywano przy użyciu programu Statistica, wersja 7.1. (Statsoft Inc.). Zgodność rozkładu zmiennych ilościowych z rozkładem normalnym analizowana była za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa. Zmienne niezależne spełniające założenia dla testów parametrycznych analizowane były za pomocą testu t Studenta (porównania dwóch grup zmiennych) bądź analizy wariancji (ANOVA) (porównania wielu prób). Zmienne niezależne niespełniające założeń testów parametrycznych analizowane były za pomocą testów nieparametrycznych: testu U Manna-Whitneya (porównania dwóch prób) bądź testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa (porównania wielu prób). Zmienne zależne spełniające założenia dla testów parametrycznych analizowane były za pomocą testu t Studenta dla zmiennych zależnych (porównania dwóch prób). Zmienne zależne niespełniające założeń testów parametrycznych analizowane były za pomocą testów nieparametrycznych: testu Wilcoxona lub testu znaków (porównania dwóch prób) bądź testu ANOVA rang Friedmana (porównania wielu prób). Zmienne jakościowe porównywane były za pomocą testu χ^2 . Jedno- i wielowymiarową analizę wariancji dla zmiennych z powtarzanymi pomiarami przeprowadzono za pomocą testu ANOVA z powtarzanymi pomiarami.

Iloraz szans (OR – odds ratio) obliczano za pomocą regresji logistycznej. W modelu, w którym zakładano kodominujący (addytywny) efekt haplotypu GGG, genotyp GGG/GGG kodowano jako 2, GGG/X jako 1, a X/X jako 0. Przy założeniu recesywnego wpływu haplotypu GGG genotyp GGG/GGG kodowano jako 1, a genotypy GGG/X i X/X jako 0. W modelu przyjmującym dominujący efekt haplotypu GGG genotypy GGG/GGG i GGG/X oznaczano jako 1, a genotyp X/X jako 0. Jako X oznaczano wszystkie inne haplotypy niż GGG. Analogiczne kodowanie do wykonania regresji logistycznej przyjęto dla pojedynczych polimorfizmów.

4. WYNIKI

4.1. Analiza rozkładów pojedynczych polimorfizmów oraz poszerzonych genotypów genu IL-6 w populacji chorych oraz w populacji kontrolnej

4.1.1. Polimorfizmy -597, -572 oraz -174 IL-6 w populacji chorych oraz w populacji kontrolnej

W obrębie regionu promotorowego genu interleukiny 6 (IL-6) opisano istnienie trzech jednonukleotydowych substytucji (SNP – ang. single nuleotide polymorphism) w pozycjach: -174 (zamiana G na C), -572 (zamiana G na C) i -597 (zamiana G na A).

Tabela 4.1.1.1. przedstawia rozkład poszczególnych genotypów i alleli w populacji osób z chorobą wieńcową oraz w grupie kontrolnej obejmującej osoby zdrowe.

Tabela 4.1.1.1. Wyniki oznaczania polimorfizmu -174, -572 i -597 regionu promotorowego genu IL-6 w populacji chorych z chorobą wieńcową oraz w populacji kontrolnej.

	Chorzy	Grupa kontrolna	poziomy p
-174 G/C			
GG (%)	92 (28,9%)	35 (34%)	
GC (%)	151 (47,5%)	47 (45,6%)	
CC (%)	75 (23,6%)	21 (20,4%)	
	χ^2=1,4; p=0,5		
częstość allelu C	47,3%	43,2%	p=0,3
-572 G/C			
GG (%)	279 (87,7%)	85 (82,5%)	
GC (%)	35 (11%)	16 (15,5%)	
CC (%)	4 (1,3%)	2 (2%)	
	χ^2=1,8; p=0,4		
częstość allelu C	6,8%	9,7%	p=0,16
-597 G/A			
GG	92 (28,9%)	36 (35%)	
GA	151 (47,5%)	46 (44,6%)	
AA	75 (23,6%)	21 (20,4%)	
	χ^2=1,1; p=0,6		
częstość allelu A	47,3%	42,7%	p=0,25

Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie genotypów lub alleli między badanymi grupami. Polimorfizmy -174 i -597 okazały się być ze sobą sprzężone (allel G -174 sprzężony z allelem G -597; allel C -174 sprzężony z allelem A -597), dlatego też w dalszej analizie pojedynczych polimorfizmów pominięto polimorfizm -597. Częstość występowania allelu C -174 IL-6 wynosiła 47,3% w populacji osób chorych oraz 43,2% w populacji osób zdrowych (p=0,3), częstość allelu A -597 IL-6 ze względu na sprzężenie była podobna – w populacji chorych wynosiła 47,3%, a w grupie kontrolnej 42,7% (p=0,25). Allel C polimorfizmu -572 IL-6 był natomiast allelem występującym rzadko w populacji, jego częstość w grupie osób chorych wynosiła 6,8%, a w grupie kontrolnej 9,7% (p=0,16).

Porównanie liczebności obserwowanych oraz oczekiwanych zgodnie z rozkładem według prawa Hardy'ego-Weinberga dla poszczególnych genotypów polimorfizmów -174 i -572 IL-6 przedstawia tabela 4.1.1.2.

Tabela 4.1.1.2. Porównanie obserwowanych i oczekiwanych liczebności genotypów polimorfizmów -174 i -572 IL-6 w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej.

	Chorzy				Grupa kontrolna			
	GG	GC	CC	p	GG	GC	CC	p
-174								
obserwowane, n (%)	92 (28,9%)	151 (47,5%)	75 (23,6%)	χ^2=0,4	35 (43%)	47 (45,6%)	21 (20,4%)	χ^2=0,3
oczekiwane, n (%)	88 (27,8%)	159 (49,85%)	71 (22,3%)	p=0,82	33 (32,3%)	51 (49%)	19 (18,7%)	p=0,85
-572								
obserwowane, n (%)	279 (87,7%)	35 (11%)	4 (1,3%)	χ^2=1	85 (82,5%)	16 (15,5%)	2 (2%)	χ^2=5
oczekiwane, n (%)	276 (86,9%)	40 (12,7%)	2 (0,46%)	p=0,6	84 (81,5%)	18 (17,5%)	1 (0,94%)	p=0,79

Zarówno w grupie chorych, jak i w grupie zdrowych nie stwierdzono istotnych odchyleń rozkładu genotypów od rozkładu opisywanego prawem Hardy'ego-Weinberga, dla wszystkich grup wartość p dla testu chi-kwadrat była większa od 0,05.

4.1.2. Rozkład haplotypów oraz złożonych genotypów genu IL-6 w populacji chorych oraz w populacji kontrolnej

Analiza haplotypów wykazała istnienie pięciu haplotypów: GGG, AGC, GCG, GGC i AGG (oznaczanych kolejno: allel występujący w pozycji -597 , -572 i -174). Ze względu na to, iż haplotypy GGC i AGG występowały tylko w pojedynczych przypadkach (po jednym haplotypie AGG i GGC w grupie chorych i jeden haplotyp GGC w grupie kontrolnej) haplotypów tych nie uwzględniano w dalszej analizie statystycznej.

Złożone (poszerzone) genotypy obejmowały jednoczesną analizę obu haplotypów występujących u danej osoby (pochodzących z obu chromosomów). Zaobserwowano występowanie sześciu podstawowych złożonych genotypów: GGG/GGG, GGG/AGC, AGC/AGC, GGG/GCG, GCG/AGC i GCG/GCG oraz dwóch bardzo rzadkich: GGG/AGG oraz GCG/GGC. Ze względu na bardzo niską częstość występowania, złożone genotypy GGG/AGG i GCG/GGC pominięto w toku dalszej analizy statystycznej. Występowanie poszczególnych haplotypów przedstawiono w tabeli 4.1.2.1.

Tabela 4.1.2.1. Rozkład haplotypów w populacji chorych z chorobą wieńcową oraz w populacji kontrolnej.

	Chorzy	Grupa kontrolna	poziomy p
Haplotyp GGG			
GGG 0*	88 (27,7%)	30 (29,1%)	
GGG 1	169 (53,1%)	50 (48,5%)	
GGG 2	61 (19,2%)	23 (22,3%)	
	χ^2=0,76; p=0,7		
częstość GGG	45,8%	46,6%	p=0,8
Haplotyp AGC			
AGC 0	93 (29,2%)	36 (35%)	
AGC 1	150 (47,2%)	45 (43,7%)	
AGC 2	75 (23,6%)	22 (21,3%)	
	χ^2=1,2; p=0,5		
częstość AGC	47,2%	43%	p=0,3
Haplotyp GCG			
GCG 0	279 (87,7%)	85 (82,5%)	
GCG 1	35 (11%)	16 (15,5%)	
GCG 2	4 (1,3%)	2 (2%)	
	χ^2=1,8; p=0,4		
częstość GCG	6,8%	9,7%	p=0,16

* - liczby 0, 1 i 2 przy poszczególnych haplotypach oznaczają, ile razy dany haplotyp występuje u danej osoby

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych haplotypów między badanymi grupami. Częstość występowania haplotypu GGG wynosiła w grupie chorych 45,8%, a w grupie kontrolnej 46,6%. Haplotyp AGC występował częściej w grupie chorych (47,2%) niż w grupie kontrolnej (43%), ale różnica nie była istotna statystycznie. Rzadki haplotyp GCG występował częściej w grupie osób bez choroby niedokrwiennej (9,7%) niż w grupie chorych (6,8%), ale różnica ta również nie była istotna (p=0,16).

Tabela 4.1.2.2. Rozkład złożonych genotypów w populacji chorych z chorobą wieńcową oraz w populacji kontrolnej.

	Chorzy	Grupa kontrolna
Złożone genotypy		
GGG/AGC	141 (44,3%)	40 (38,8%)
AGC/AGC	75 (23,6%)	21 (20,4%)
GGG/GGG	61 (19,2%)	23 (22,3%)
GGG/GCG	26 (8,2%)	10 (9,7%)
GCG/AGC	9 (2,8%)	6 (5,8%)
GCG/GCG	4 (1,3%)	2 (1,9%)
GGG/AGG	1 (0,3%)	0 (0%)
GGG/GGC	1 (0,3%)	1 (0,97%)
	χ^2=4,7; p=0,7	

Również rozkład występowania złożonych genotypów nie różnił się między grupami (p=0,7). Najczęściej występującym złożonym genotypem był genotyp GGG/AGC (heterozygoty dwóch podstawowych haplotypów). Często występowały również homozygoty AGC/AGC i GGG/GGG. Pozostałe genotypy występowały z częstością poniżej 10%, a dwa z nich (GGG/AGG i GGG/GGC) wystąpiły tylko w pojedynczych przypadkach (częstość poniżej 1%).

Porównanie liczebności oczekiwanych zgodnie z rozkładem według prawa Hardy'ego-Weinberga oraz liczebności obserwowanych w badanych populacjach przedstawia tabela 4.1.2.3.

Tabela 4.1.2.3. Porównanie obserwowanych i oczekiwanych liczebności złożonych genotypów genu IL-6 w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej.

	Chorzy			Grupa kontrolna		
	obserwowane, n (%)	oczekiwane, n (%)	p	obserwowane, n (%)	oczekiwane, n (%)	P
Złożone genotypy						
GGG/AGC	141 (44,3%)	137(47,2%)		40 (38,8%)	41 (40%)	
AGC/AGC	75 (23,6%)	71 (22,3%)		21 (20,4%)	19 (18,5%)	
GGG/GGG	61 (19,2%)	66 (21%)	χ^2=6	23 (22,3%)	22 (21,7%)	χ^2=1
GGG/GCG	26 (8,2%)	20 (6,2%)	p=0,31	10 (9,7%)	9 (9%)	p=0,6
GCG/AGC	9 (2,8%)	20 (6,4%)		6 (5,8%)	9 (8,3%)	
GCG/GCG	4 (1,3%)	2 (0,46%)		2 (1,9%)	1 (0,94%)	

Częstość występowania złożonych genotypów w obu badanych grupach zgodna była z rozkładem wynikającym z prawa Hardy'ego-Weinberga (p>0,05 w teście χ^2).

Podsumowanie

Rozkład genotypów oraz częstości występowania alleli i haplotypów genu IL-6 nie różnił się między badanymi grupami osób z chorobą niedokrwienną serca oraz osób z grupy kontrolnej. Częstości występowania pojedynczych genotypów oraz złożonych genotypów w obu badanych grupach były zgodne z rozkładem wynikającym z prawa Hardy'ego-Weinberga.

4.2. Analiza przedoperacyjna chorych w aspekcie polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6

4.2.1. Analiza przedoperacyjna chorych, podział pod względem złożonych genotypów IL-6

Analizę danych przedoperacyjnych chorych, podzielonych pod względem złożonych genotypów IL-6 przedstawia poniższa tabela.

Tabela 4.2.1.1. Analiza czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca w aspekcie złożonych genotypów IL-6

Złożony genotyp	**GGG/GGG**	**GGG/AGC**	**AGC/AGC**	**GGG/GCG**	**GCG/AGC**	**GCG/GCG**	**p**
n=316	61	141	75	26	9	4	-
Płeć męska, n (%)	46(75,4%)	99(70,2%)	56(74,7%)	20(76,9%)	6(66,7%)	3(75%)	0,94
Wiek, lata	64,3±8,7	61±8,8	63,1±8,4	63,3±10,2	66±8,5	56±7,2	**0,03**
BMI, kg/m^2	27,6±3,5	28,7±4	28,1±4	28,1±4	26±4,7	27,2±3	0,14
Nadciśnienie tętnicze, %	63,9	72,7	65,7	61,5	66,7	50	0,68
Cukrzyca, %	36,1	24,5	20,1	26,9	33,3	25	0,43
Cholesterol całk., mg/dl	213±47	222±54	214±50	214±47	206±53	234±58	0,87
Cholesterol LDL, mg/dl	149±46	134±41	134±45	129±39	125±54	174±34	0,19
Cholesterol HDL, mg/dl	45±13	45±14	45±12	42±11	43±23	45±5	0,79
Trójglicerydy, mg/dl	150±60	179±125	164±100	150±75	165±102	235±83	0,56
Palenie, %							
niepalący	27,8	25,6	30,3	20	22,2	75	
palacz	9,3	9,3	13,6	5	0	0	0,5
eks-palacz	62,9	65,1	56,1	75	77,8	25	
Obciążony wywiad rodzinny,%	57,4	52,1	55,9	26,3	55,6	50	0,3

Rozkład czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca nie różnił się istotnie między grupami. Istotna różnica dotyczyła tylko wieku chorych w momencie operacji (p=0,03). Co ciekawe, chorzy nie różnili się istotnie statystycznie wiekiem w momencie wystąpienia pierwszych objawów, natomiast

różnili się czasem trwania dławicy piersiowej (p=0,009) (tabela 4.2.1.2.). Ze względu na brak normalności rozkładu obie zmienne były analizowane testem nieparametrycznym ANOVA Kruskala-Wallisa. Porównując poszczególne grupy genotypowe wykazano istotną różnicę w wieku pacjentów w momencie operacji tylko dla grupy osób o genotypie GGG/GGG i GGG/AGC. Pozostałe grupy nie różniły się między sobą. Natomiast czas trwania choroby niedokrwiennej był bardziej zróżnicowany w poszczególnych grupach: homozygoty GGG/GGG charakteryzowały się dłuższym czasem trwania choroby w porównaniu do osób o genotypach GGG/AGC, AGC/AGC oraz GCG/GCG. U osób o genotypie GCG/AGC średni czas trwania dławicy piersiowej był najdłuższy, istotne statystycznie różnice wykazano w stosunku do osób o genotypach GGG/AGC i AGC/AGC. Osoby o najrzadszym genotypie GCG/GCG charakteryzowały się bardzo krótkim czasem trwania choroby, istotnie krótszym od wartości w grupach GGG/GCG i GCG/AGC, ale trzeba zaznaczyć, iż była to grupa o bardzo niewielkiej liczebności, stąd należy ostrożnie interpretować wyniki uzyskane dla tej grupy.

Gdy przeprowadzono analizę rozkładu czynników ryzyka ChNS w kontekście haplotypów IL-6 zauważono, iż osoby homozygotyczne pod względem haplotypu GGG (grupa GGG2, genotyp GGG/GGG) w stosunku do połączonych pozostałych grup charakteryzowały się wyższym poziomem cholesterolu LDL (p=0,028) i większym odsetkiem występowania cukrzycy (p=0,051).

Tabela 4.2.1.2. przedstawia analizę charakterystyki klinicznej choroby wieńcowej u chorych podzielonych pod względem złożonych genotypów IL-6.

Tabela 4.2.1.2. Analiza charakterystyki klinicznej choroby wieńcowej w aspekcie złożonych genotypów IL-6

Złożony genotyp	**GGG/GGG**	**GGG/AGC**	**AGC/AGC**	**GGG/GCG**	**GCG/AGC**	**GCG/GCG**	**p**
n=316	61	141	75	26	9	4	
Wiek zachorowania, lata	54,7±11,3	53,7±10,3	56,3±10,7	53±9,1	52,7±10,6	54,1±7,1	0,67
Czas trwania dławicy piersiowej, lata	9,8±8,2	7,3±6,3	7±7,2	9,8±7,9	13,3±8	1,9±1	**0,009**
Niestabilna dławica piersiowa, %	14,7	15,1	14,9	11,5	22,2	0	0,93
Zawał serca w wywiadzie, %	66,7	64,7	60,8	60	77,8	50	0,87
Migotanie przedsionków w wywiadzie, %	13,3	8,9	10,1	13,4	22,2	25	0,69
Frakcja wyrzutowa, %	52,9±10,6	53±9,5	54,8±8,5	49,9±11	50±16,6	48,7±19,3	0,55
Liczba zwężonych naczyń, %							
1	1,6	9,4	2,7	0	11,1	0	
2	24,6	31,9	35,1	26,9	0	0	0,059
3	73,8	58,7	62,2	73,8	88,9	100	
EuroSCORE, pkt	3,6±2,6	3±2,3	3,1±2,2	3,1±2,2	4,1±3,6	2,5±2,5	0,58

Nie wykazano różnic między grupami genotypowymi a frakcją wyrzutową lewej komory, przebytymi zawałami serca, migotaniem przedsionków, liczbą osób z niestabilną dławicą piersiową, punktacją EuroSCORE i liczbą istotnie zwężonych tętnic wieńcowych, choć w tym ostatnim przypadku wartość p była zbliżona do istotnej statystycznie. Bardziej szczegółowa analiza liczby zwężonych naczyń w poszczególnych grupach wykazała, iż grupa osób o genotypie GGG/GGG wraz ze wszystkimi osobami, które posiadały rzadki haplotyp GCG, charakteryzowała się wysokim odsetkiem (powyżej 70% osób) występowania

trójnaczyniowej choroby wieńcowej (p=0,025 dla GGG/GGG+GCG/X vs GGG/AGC i AGC/AGC).

Podsumowanie:

Nie stwierdzono różnic w rozkładzie czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca w zależności od polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6. Również podstawowa charakterystyka kliniczna choroby nie różniła się u osób posiadających różne warianty alleliczne badanego genu.

Szczegółowa analiza wykazała, iż grupa o genotypie GGG/GGG wykazywała pewne cechy charakterystyczne: większy odsetek chorych z cukrzycą, wyższe stężenia cholesterolu LDL, większy odsetek chorych z trójnaczyniową chorobą wieńcową, co mogłoby wskazywać na inny przebieg procesów miażdżycowych u tych osób.

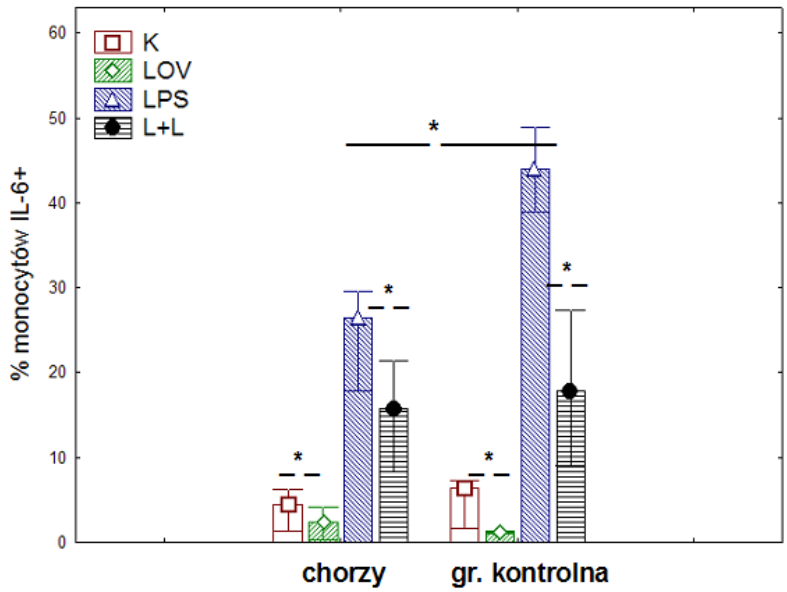
4.3. Produkcja interleukiny 6 in vitro

Uważa się, iż aktywność transkrypcyjna genu może być modyfikowana poprzez istnienie miejsc polimorficznych w regionach regulacji transkrypcji szczególnie, jeśli zmiany sekwencji dotyczą miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych. Badania *in vitro* są uznanym sposobem analizy tego efektu. Ze względu na to, iż literatura podaje rozbieżne dane dotyczące wpływu polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 na ekspresję tej cytokiny, postanowiono go określić wybierając jako badany model monocyty, będące komórkami produkującymi duże ilości IL-6, a dodatkowo pełniącymi istotną rolę w patogenezie miażdżycy.

Metodą cytometrii przepływowej analizowano zdolność monocytów do produkcji wewnątrzplazmatycznej IL-6. Jak wspomniano we wstępie, monocyty są kluczowymi komórkami układu immunologicznego biorącymi udział zarówno w procesach prowadzących do powstania blaszki miażdżycowej, jak i w patogenezie powikłań choroby wieńcowej. Zastosowano model badawczy, w którym komórki PBMC hodowano bez żadnych dodatków (określanie zdolności komórek do spontanicznej produkcji IL-6), inkubowano w obecności lowastatyny (badanie wpływu statyny na spontaniczną produkcję IL-6), stymulowano LPS-em (badanie wpływu silnego stymulanta) bądź hodowano w obecności LPS-u i lowastatyny (badanie wpływu lowastatyny na indukowaną przez LPS produkcję IL-6). [Dokładny opis metodyki znajduje się w rozdziale Materiały i metody.] Zastosowana metoda pozwala na określenie zdolności do produkcji badanej cytokiny przez określone komórki, w tym przypadku monocyty, przy zachowaniu warunków zbliżonych do fizjologicznych, czyli możliwości oddziaływań z limfocytami.

4.3.1. Produkcja IL-6 przez monocyty osób zdrowych oraz osób z chorobą wieńcową

W pierwszej kolejności zbadano zdolność do produkcji IL-6 przez PBMC pochodzące od osób z grupy kontrolnej oraz z grupy chorych. W zastosowanych warunkach doświadczalnych tylko monocyty (komórki CD14+) produkowały IL-6.



Rysunek 4.3.1.1. Oznaczanie wewnątrzplazmatycznej IL-6 w monocytach osób z grupy chorych oraz z grupy kontrolnej. K – bez stymulacji, LOV – inkubacja z lowastatyną (10^{-6}M), LPS – stymulacja LPS-em (1μg/ml), L+L – stymulacja LPS-em (1μg/ml) oraz lowastatyną (10^{-6}M). Wykresy przedstawiają medianę oraz rozstęp kwartylny, * - oznacza różnice istotne statystycznie ($p<0,05$). Porównania między grupą chorych a grupą kontrolną wykonano testem U Manna-Whitneya, natomiast porównania pomiędzy różnymi inkubacjami (K vs LOV oraz LPS vs L+L) wykonano testem Wilcoxona dla każdej z grup oddzielnie.

Zgodnie z oczekiwaniami spontaniczna produkcja IL-6 była niska, a stymulacja przez LPS wywołała w obu grupach znaczną indukcję produkcji IL-6 przez monocyty (Rys. 4.3.1.1.). Efekt działania lowastatyny obserwowany był jako zmniejszenie odsetka komórek zdolnych do produkcji IL-6. Lowastatyna hamowała spontaniczną produkcję IL-6 przez monocyty, efekt ten był istotny statystycznie zarówno w grupie chorych, jak i w grupie kontrolnej. Również produkcja IL-6 indukowana LPS-em była hamowana w czasie jednoczesnej inkubacji z lowastatyną i LPS-em. W obu badanych grupach efekt ten był istotny statystycznie.

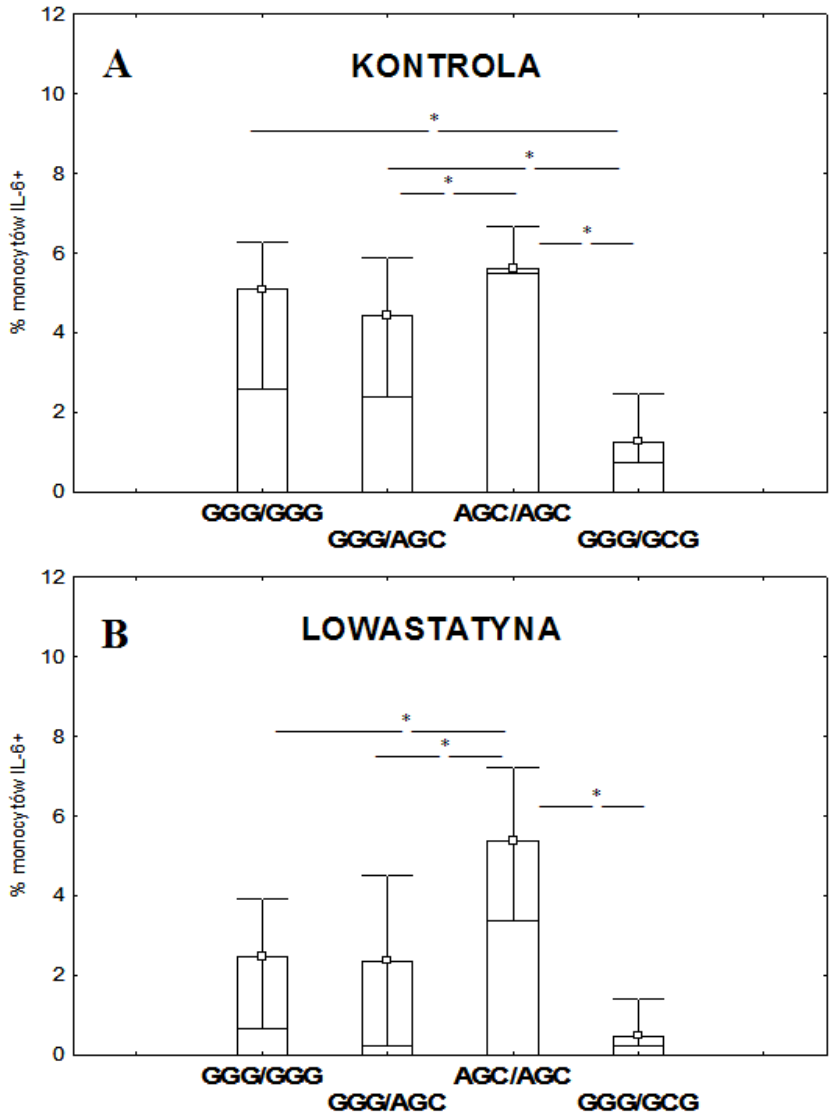
Porównanie między komórkami pochodzącymi od osób chorych oraz osób z grupy kontrolnej wykazało, iż spontaniczna produkcja IL-6 była na porównywalnym poziomie w obu badanych grupach, natomiast po stymulacji LPS-em odsetek komórek IL-6+ był znacząco niższy u pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej (p=0,009) (Rys. 4.3.1.1.). Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami w poziomie komórek IL-6+ po inkubacji z lowastatyną oraz lowastatyną i LPS-em.

Podsumowując, monocyty pochodzące od pacjentów z chorobą wieńcową charakteryzowały się niższą reaktywnością na LPS niż komórki pochodzące od osób grupy kontrolnej, natomiast spontaniczna produkcja cytokiny była na podobnym poziomie w obu badanych grupach. Hamujący wpływ statyny na indukowaną oraz spontaniczną produkcję IL-6 był istotny statystycznie i podobny w obu badanych grupach.

4.3.2. Związek polimorfizmu genu IL-6 z produkcją IL-6 przez monocyty

Kolejnym krokiem była analiza wpływu polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 na produkcję wewnątrzplazmatycznej IL-6 przez monocyty osób chorych.

Wpływ złożonych genotypów na produkcję IL-6 przedstawiono na rysunkach 4.3.2.1. i 4.3.2.2. Do analizy włączono cztery najczęściej występujące złożone genotypy IL-6: GGG/GGG, GGG/AGC, AGC/AGC oraz GGG/GCG.

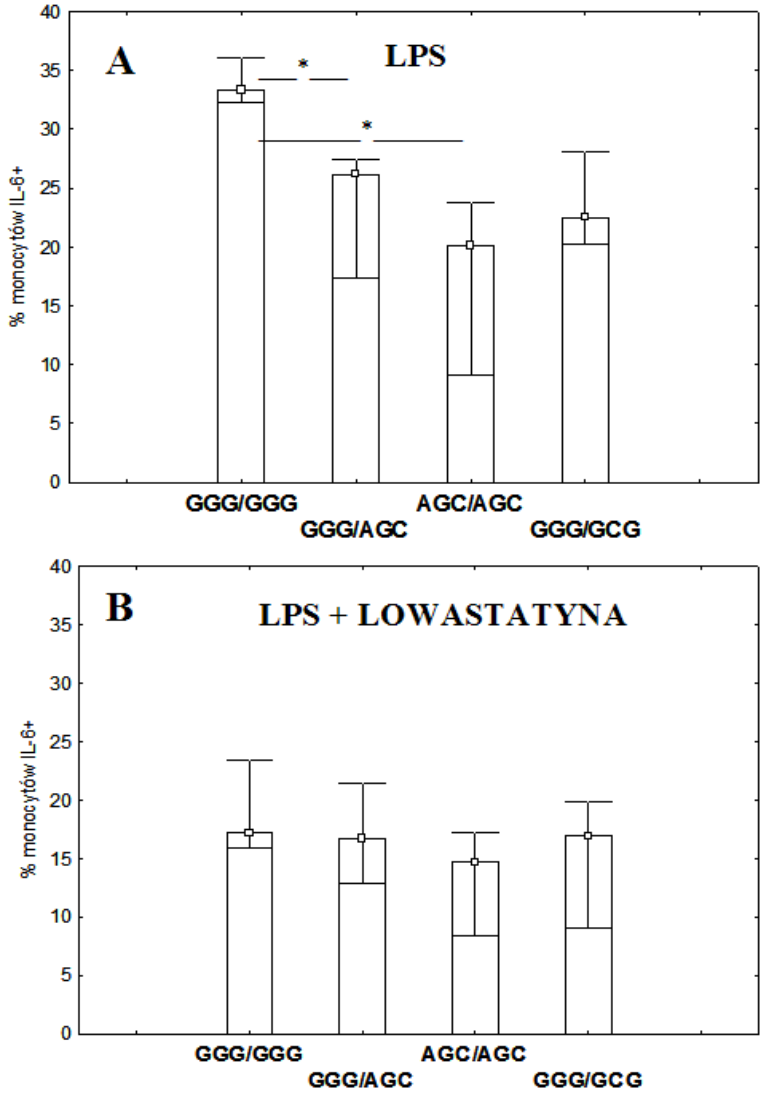


Rysunek 4.3.2.1. Wpływ złożonych genotypów na wewnątrzplazmatyczną produkcję IL-6 przez monocyty (procent monocytów IL-6+). **A)** spontaniczna produkcja, **B)** wpływ inkubacji z lowastatyną. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp kwartylny. * - istotne statystycznie różnice między grupami o różnych genotypach.

Spontaniczna produkcja IL-6 istotnie statystycznie różniła się u posiadaczy różnych złożonych genotypów IL-6 (p=0,013) (Rys 4.3.2.1.A.). Hodowle komórek pochodzących od posiadaczy genotypu GGG/GCG charakteryzowały się niższą spontaniczną produkcją IL-6 niż hodowle pochodzące od posiadaczy genotypu GGG/GGG (p=0,04), GGG/AGC (p=0,038) i AGC/AGC (p=0,0014). Ponadto monocyty homozygot AGC/AGC produkowały istotnie więcej IL-6 niż osób o genotypie GGG/AGC (p=0,033).

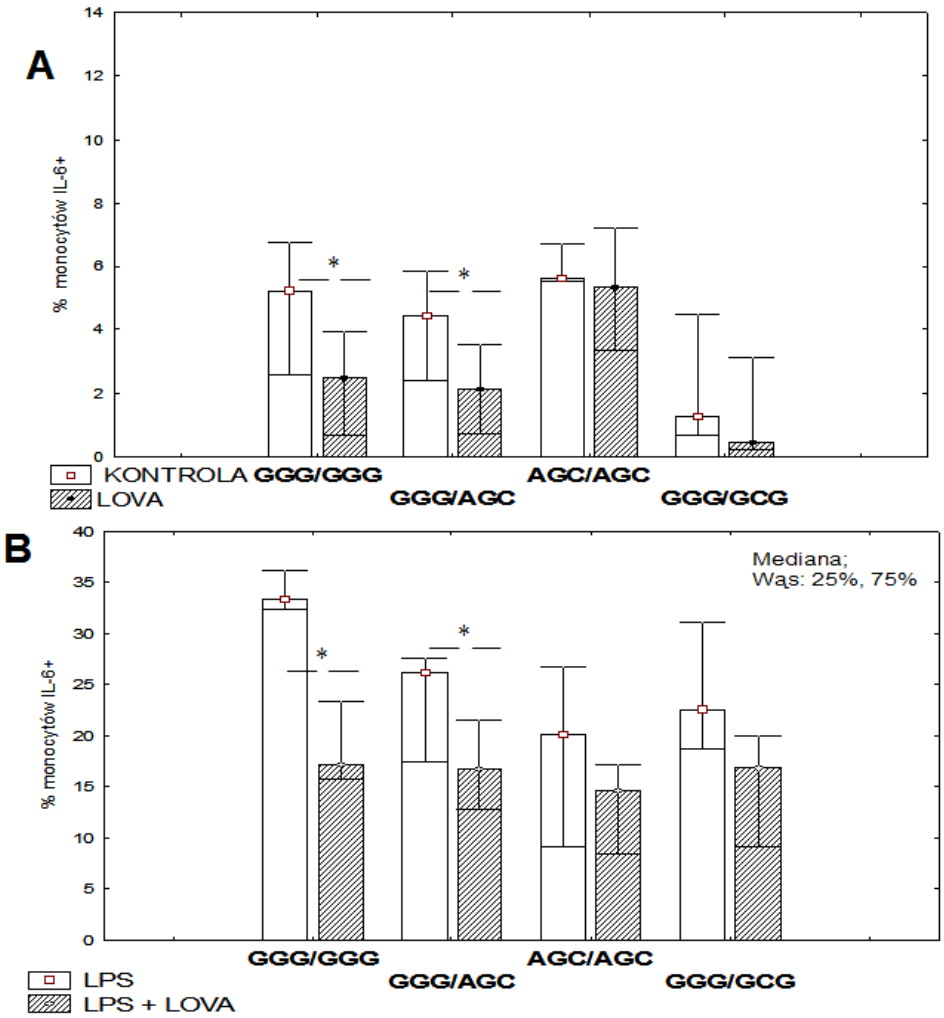
Zdolność do produkcji IL-6 po inkubacji z lowastatyną także różniła się między komórkami pochodzącymi od osób o różnych genotypach (p=0,018)

(Rys. 4.3.2.1.B.). Monocyty osób o genotypie AGC/AGC charakteryzowały się większą zdolnością do produkcji IL-6 niż komórki pochodzące od pozostałych osób.



Rysunek 4.3.2.2. Wpływ złożonych genotypów na wewnątrzplazmatyczną produkcję IL-6 przez monocyty (procent monocytów IL-6+). **A)** produkcja IL-6 indukowana LPS-em oraz **B)** stymulacja LPS-em w obecności lowastatyny. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp kwartylny. * - istotne statystycznie różnice między grupami o różnych genotypach.

Efekt stymulacji LPS-em istotnie różnił się u posiadaczy różnych złożonych genotypów (p=0,015) (Rys. 4.3.2.2.A.). Monocyty pochodzące od homozygot GGG/GGG (stanowiące większą część grupy homozygot GG -174) były silniej indukowane do produkcji IL-6 niż komórki od osób z grupy GGG/AGC (p=0,009) oraz AGC/AGC (p=0,002). Po jednoczesnej inkubacji komórek z lowastatyną i LPS-em odsetek monocytów produkujących IL-6 nie różnił się między grupami (p=0,65) (Rys. 4.3.2.2.B.).

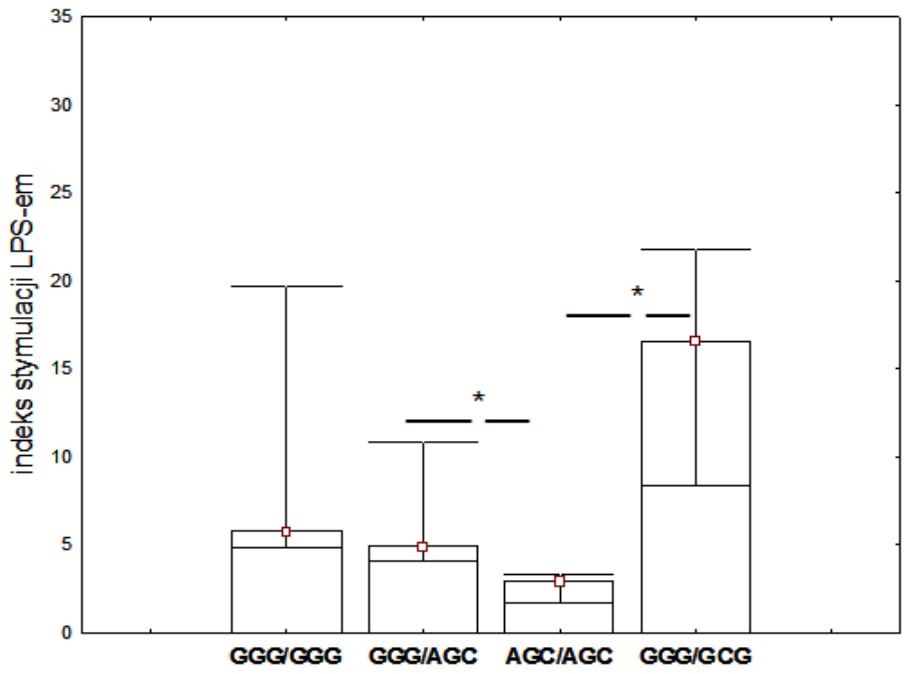


Rysunek 4.3.2.3. Wpływ lowastatyny na produkcję wewnątrzplazmatycznej IL-6 w różnych grupach genotypowych. **A)** spontaniczna produkcja (jasne słupki) oraz wpływ inkubacji z lowastatyną (ciemne słupki), **B)** produkcja IL-6 indukowana LPS-em (jasne słupki) oraz stymulacja LPS-em w obecności lowastatyny (ciemne słupki). Dane przedstawione jako mediana i rozstęp kwartylny. * - istotny statystycznie wpływ inkubacji z lowastatyną w poszczególnych genotypach.

Określono również wpływ inkubacji z lowastatyną na obniżenie spontanicznej produkcji IL-6 w poszczególnych grupach genotypowych (Rys. 4.3.2.3.). Mimo, iż w całej grupie pacjentów efekt lowastatyny był istotny statystycznie szczegółowa analiza wykazała, iż tylko w komórkach pochodzących od osób o genotypach GGG/GGG i GGG/AGC produkcja IL-6 była znacząco zahamowana ($p<0,05$) (Rys. 4.3.2.3.A.). Analogicznie wpływ lowastatyny na zdolność monocytów do produkcji IL-6 po stymulacji LPS-em był istotny tylko w hodowlach pochodzących od osób o genotypach GGG/GGG i GGG/AGC (Rys. 4.3.2.3.B.).

Kolejnym krokiem była analiza związku haplotypu IL-6 z produkcją tej cytokiny. Wpływ haplotypu najsilniej uwidocznił się po stymulacji LPS-em (p=0,005). Osoby posiadające dwa haplotypy GGG (grupa GGG2; GGG/GGG) charakteryzowały się silniejszą indukcją produkcji IL-6 niż osoby z grupy GGG1 (posiadające jeden haplotyp GGG, drugi dowolny inny) (p=0,007) oraz osoby z grupy GGG0 (posiadające oba haplotypy inne niż GGG) (p=0,002).

Ważnym wskaźnikiem skuteczności stymulacji jest także zdolność do aktywacji ponad poziom spontanicznej produkcji. Reaktywność monocytów wobec LPS-u obrazuje tzw. indeks stymulacji. Wyraża on stosunek komórek produkujących IL-6 po stymulacji LPS-em w odniesieniu do produkcji IL-6 w hodowlach niestymulowanych. Analiza indeksu stymulacji IL-6 przez LPS wykazała istotne różnice w odpowiedzi na LPS dla komórek pochodzących od osób o różnych złożonych genotypach (p=0,024) (Rys. 4.3.2.4.). Osoby o genotypie AGC/AGC (odpowiadające homozygotom CC -174 IL-6) charakteryzowały się niższą reaktywnością w odpowiedzi na LPS w porównaniu do osób o genotypach GGG/AGC i GGG/GCG (w obu przypadkach p<0,05).



Rysunek. 4.3.2.4. Wpływ złożonych genotypów IL-6 na indeks stymulacji LPS-em. Indeks stymulacji LPS-em wyrażony jako stosunek komórek produkujących IL-6 po stymulacji LPS-em w odniesieniu do produkcji IL-6 w hodowlach niestymulowanych. * - oznacza p<0,05. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp kwartylny.

Podsumowanie:

Zdolność do produkcji IL-6 przez monocyty pochodzące od osób o różnych wariantach polimorficznych genu IL-6 różniła się w zależności od czynnika indukującego produkcję cytokiny.

Reaktywność na silny czynnik indukujący – LPS wyrażona jako indeks stymulacji LPS-em była najniższa w grupie AGC/AGC (odpowiadającej grupie homozygot CC -174 IL-6). Prawdopodobnie wynika to z faktu, iż była to grupa, która charakteryzowała się najwyższą spontaniczną produkcją tej cytokiny. Największy odsetek komórek zdolnych do produkcji IL-6 po stymulacji LPS-em stwierdzono w grupie GGG/GGG, natomiast najwyższą reaktywnością na LPS mierzoną indeksem stymulacji charakteryzowały się komórki osób z grupy GGG/GCG (obie grupy odpowiadają grupie homozygot GG -174 IL-6).

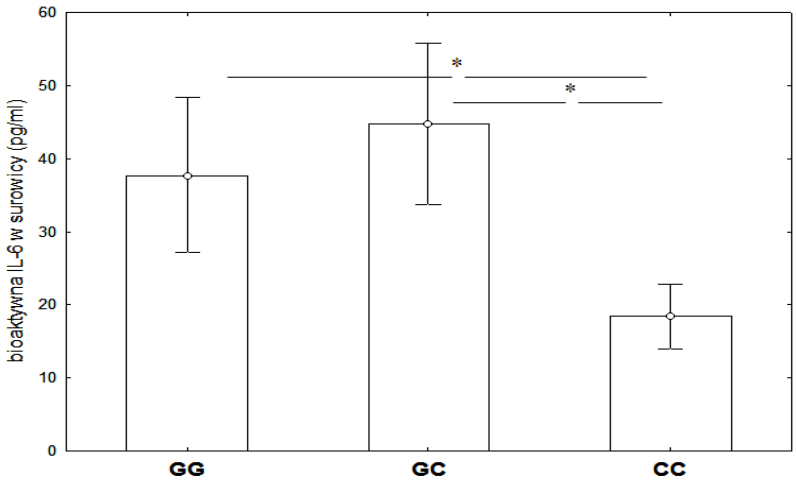
Inkubacja z lowastatyną wykazywała istotny wpływ zarówno na spontaniczną, jak i indukowaną LPS-em produkcję IL-6. Wykazano hamujący efekt lowastatyny na zdolność do produkcji IL-6 w hodowlach pochodzących od osób o genotypach GGG/GGG i GGG/AGC. W pozostałych grupach inkubacja z lowastatyną nie wpływała znacząco na zdolność monocytów do produkcji IL-6.

4.4. Produkcja interleukiny 6 in vivo

4.4.1. Poziomy interleukiny 6 w surowicy krwi chorych w kontekście polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6

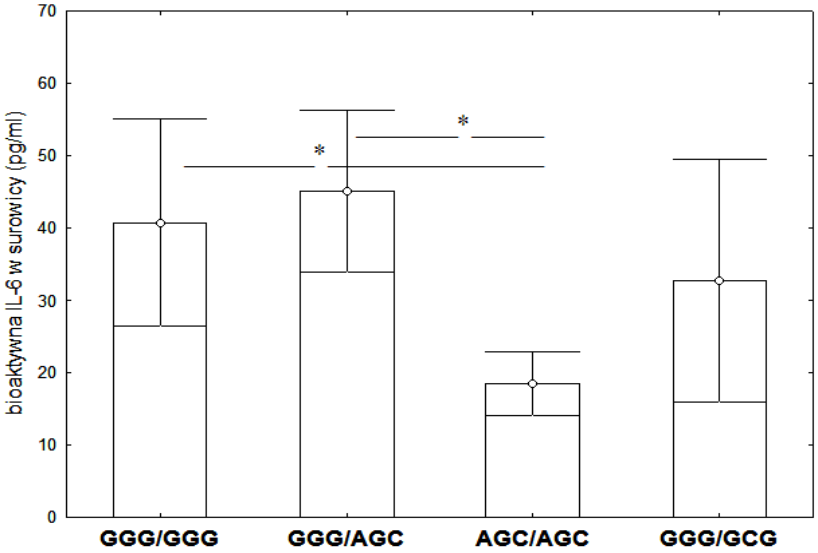
Poziom IL-6 mierzony w surowicy krwi jest wypadkową produkcji tej cytokiny przez różne komórki organizmu (m.in. monocyty, adipocyty, komórki śródbłonka), a także szybkości jej usuwania z krążenia oraz występowania w formie wolnej bądź związanej z rozpuszczalnymi receptorami. Dlatego też poza badaniem wydzielania *in vitro* tej cytokiny przez komórki krwi [rozdział 4.3.] postanowiono przeanalizować związek polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 z poziomem tej cytokiny mierzonym w surowicy krwi. Wybrano metodę biologiczną pomiaru poziomu IL-6, która ma tę zaletę nad metodami pomiaru opartymi na wiązaniu IL-6 przez swoiste przeciwciało, że mierzy aktywność biologiczną cytokiny, a nie tylko wykrywa samo białko, które może już być inaktywowane. Metoda biologiczna pozwala także na określenie aktywności całego kompleksu cytokina-rozpuszczalne receptory.

Analiza wpływu pojedynczych polimorfizmów wykazała istotny wpływ polimorfizmu -174 IL-6 na poziom bioaktywnej IL-6 w surowicy krwi (p=0,0048) (Rys. 4.4.1.1.), natomiast polimorfizm -572 IL-6 nie wpływał istotnie na ilość tej cytokiny w surowicy. W przypadku polimorfizmu -174 homozygoty CC charakteryzowały się znacząco niższymi poziomami IL-6 w surowicy krwi niż dwie pozostałe grupy (p<0,05).



Rysunek 4.4.1.1. Poziom bioaktywnej IL-6 w surowicy chorych w kontekście polimorfizmu -174 IL-6. * - p<0,05

Poziom bioaktywnej IL-6 w surowicy krwi chorych różnił się istotnie w zależności od złożonego genotypu IL-6 (p=0,011) (Rys. 4.4.1.2.). Szczegółowa analiza wykazała, iż grupa o genotypie AGC/AGC (odpowiadająca osobom o genotypie CC -174 IL-6) charakteryzowała się niższym poziomem IL-6 niż grupy osób o genotypie GGG/GGG oraz GGG/AGC (p<0,05).



Rysunek 4.4.1.2. Poziom bioaktywnej IL-6 w surowicy chorych w kontekście złożonych genotypów IL-6. * - p<0,05

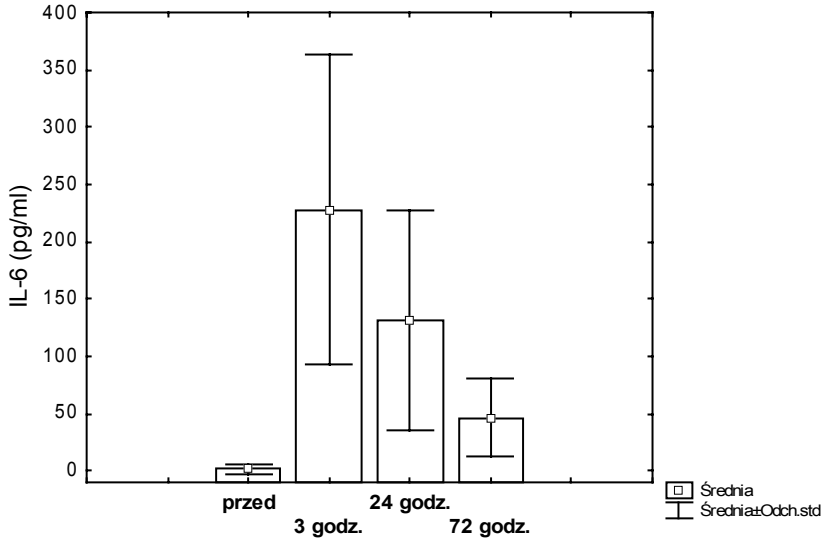
Podsumowanie

Poziom bioaktywnej IL-6 w surowicy krwi u osób chorych na chorobę niedokrwienną serca zależny był od polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6. Osoby o genotypie AGC/AGC, dla których wykazano wcześniej niższą reaktywność na stymulację LPS-em, charakteryzowały się także niższym poziomem IL-6 w surowicy.

4.4.2. Dynamika wyrzutu IL-6 w okresie okołooperacyjnym

W grupie 30 pacjentów przeprowadzono badanie poziomu IL-6 w surowicy krwi w okresie okołooperacyjnym. Krew do badania pobierano przed zabiegiem, a także 3, 24 i 72 godziny po zabiegu. Badanie wykonano metodą CBA (cytometric bead array) przy użyciu zestawu CBA Th1/Th2 firmy BD.

Poziom IL-6 w surowicy krwi w okresie okołooperacyjnym przedstawia Rys. 4.4.2.1. Zaobserwowano znaczące różnice w poziomie IL-6 w surowicy po zabiegu w porównaniu do poziomów tej cytokiny przed zabiegiem (p<0,001 dla wszystkich punktów czasowych). Najwyższy poziom IL-6 obserwowano trzy godziny po zabiegu, następnie ilość krążącej cytokiny stopniowo obniżała się, pozostając jednak w ostatnim badanym punkcie czasowym (72 godziny po zabiegu) podwyższona w porównaniu do ilości tej cytokiny przed zabiegiem.



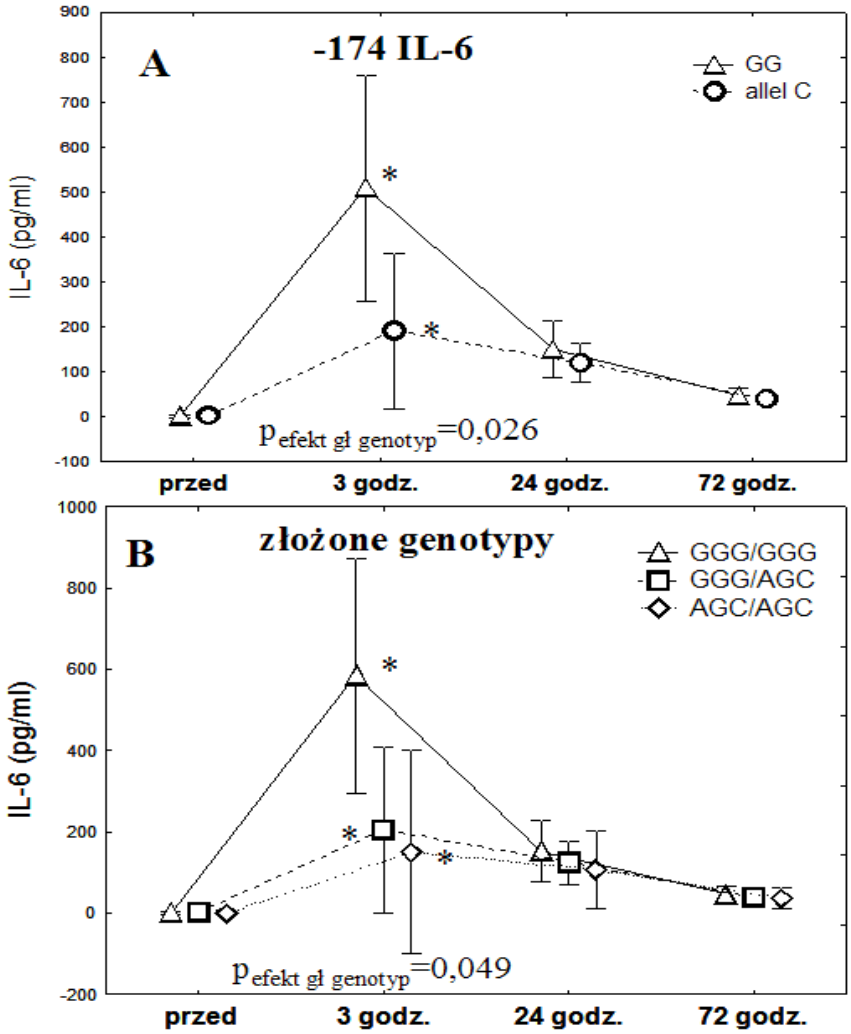
Rysunek 4.4.2.1. Stężenia IL-6 w surowicy chorych w okresie okołooperacyjnym.

Analiza korelacji poziomów IL-6 przed zabiegiem z poziomami tej cytokiny mierzonymi po zabiegu wykazała istotną statystycznie dodatnią korelację dla poziomów IL-6 mierzonych w surowicy krwi 24 i 72 godziny po zabiegu (odpowiednio: r=0,57, p=0,001 oraz r=0,49, p=0,004) .

Stężenie IL-6 w surowicy krwi istotnie różniło się w okresie okołooperacyjnym w zależności od posiadanego polimorfizmu genu IL-6. W analizie uwzględniono trzy najczęściej występujące złożone genotypy: GGG/GGG, GGG/AGC i AGC/AGC. Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 na poziom tej cytokiny (ANOVA efekt główny $_{genotypu}$ F=3,38 p=0,049; efekt interakcji: F=2,48 p=0,029) (Rys. 4.4.2.2.B.). W badanych punktach istotna różnica dotyczyła trzech godzin po zabiegu (p=0,008), gdzie osoby o genotypie GGG/GGG charakteryzowały się wyższym poziomem IL-6 w surowicy w porównaniu do grup GGG/AGC

i AGC/AGC (p<0,01). Osoby o genotypie GGG/GCG wykazywały podobną tendencję do wysokich stężeń IL-6 w surowicy trzy godziny po zabiegu, jednak ze względu na niewielką liczebność tej grupy wynik nie był istotny statystycznie.

Analogiczne wyniki uzyskano biorąc pod uwagę wyłącznie polimorfizm -174. Osoby posiadające allel C i homozygoty GG różniły się stężeniem tej cytokiny w okresie okołooperacyjnym (ANOVA efekt główny $_{genotypu}$ F=5,46 p=0,026; efekt interakcji: F=3,87 p=0,012) (Rys. 4.4.2.2.A.). Punkt najwyższego wyrzutu IL-6, 3 godziny po zabiegu, był punktem dla którego stwierdzono różnice między porównywanymi grupami.



Rysunek 4.4.2.2. Wpływ polimorfizmu genu IL-6 na stężenie IL-6 w surowicy krwi w okresie okołooperacyjnym. **A)** Analiza polimorfizmu -174 IL-6. **B)** Analiza złożonych genotypów IL-6. Dane przedstawione jako średnia i 95% przedział ufności, * - p<0,05.

Warto zwrócić uwagę, iż mimo generalnie niższych wartości stężeń IL-6 uzyskiwanych metodą CBA w porównaniu do danych uzyskanych metodą biologiczną [Rozdział 4.4.1.], w przypadku obu metod pomiaru uzyskano analogiczne wyniki wpływu polimorfizmu genu na poziom cytokiny w surowicy. Obserwowana różnica w poziomach IL-6 wynika z zastosowania różnych metod pomiaru – metody opartej na wiązaniu IL-6 przez specyficzne przeciwciała (test CBA) oraz metody badającej efekt biologiczny cytokiny (metoda biologiczna). Taki wynik obu testów jest zgodny z oczekiwaniami.

Podsumowanie

Stężenie IL-6 w surowicy istotnie różniło się w okresie okołooperacyjnym w zależności od posiadanego polimorfizmu genu IL-6. Osoby o genotypie GGG/GGG, dla których wykazano wcześniej największą zdolność do produkcji tej cytokiny po stymulacji LPS-em, wykazywały się również najbardziej nasiloną produkcją tej cytokiny w odpowiedzi na zabieg operacyjny.

4.5. Analiza związku polimorfizmu genu IL-6 z parametrami ostrej reakcji zapalnej powstającej w wyniku zabiegu pomostowania tętnic

Zabieg pomostowania tętnic wieńcowych jest zabiegiem wywołującym uogólnioną odpowiedź organizmu, między innymi ostrą reakcję zapalną charakteryzującą się znaczną leukocytozą, wzrostem temperatury ciała, wyrzutem szeregu cytokin, aktywacją komórek układu immunologicznego oraz komórek śródbłonka.

Ze względu na to, iż typ zabiegu (zabieg w krążeniu pozaustrojowym lub bez) może modulować przebieg i intensywność reakcji zapalnej w analizie wpływu zabiegu na parametry morfologii krwi obwodowej, uwzględniono typ zabiegu jako dodatkową zmienną, natomiast w pozostałych analizach (cytokin, markerów aktywacji, fenotypu i stanu aktywacji monocytów) uwzględniono tylko osoby poddane zabiegowi w krążeniu pozaustrojowym.

4.5.1. Wpływ zabiegu na parametry morfologii krwi

Jak wcześniej wspomniano, ze względu na to, iż typ zabiegu wpływa na parametry morfologii krwi obwodowej, analizy wpływu polimorfizmu genu IL-6 na parametry morfologiczne dokonano włączając do analizy statystycznej rodzaj zabiegu (zabieg w krążeniu pozaustrojowym lub bez) jako dodatkową zmienną jakościową. Analizowano liczbę leukocytów, neutrofili, monocytów, limfocytów oraz płytek krwi u osób poddanych zabiegowi pomostowania tętnic przed zabiegiem, pierwszego dnia po zabiegu rano i popołudniu, drugiego dnia oraz czwartego lub piątego dnia. Dla wszystkich analizowanych parametrów krwi zmiany w okresie okołooperacyjnym były istotne statystycznie. Liczba białych krwinek, neutrofili oraz monocytów gwałtownie wzrastała po zabiegu, obniżała się natomiast liczba limfocytów i płytek krwi (Tabela 4.5.1.1.). W obu typach zabiegu (z krążeniem pozaustrojowym i bez) dynamika zmian liczby komórek krwi była istotna statystycznie ($p<0,001$), gwałtowne zmiany pojawiały się już w pierwszej dobie

po zabiegu i utrzymywały do drugiego dnia po zabiegu, wracając do poziomów zbliżonych do istniejących przed zabiegiem w czwartej, piątej dobie od zabiegu.

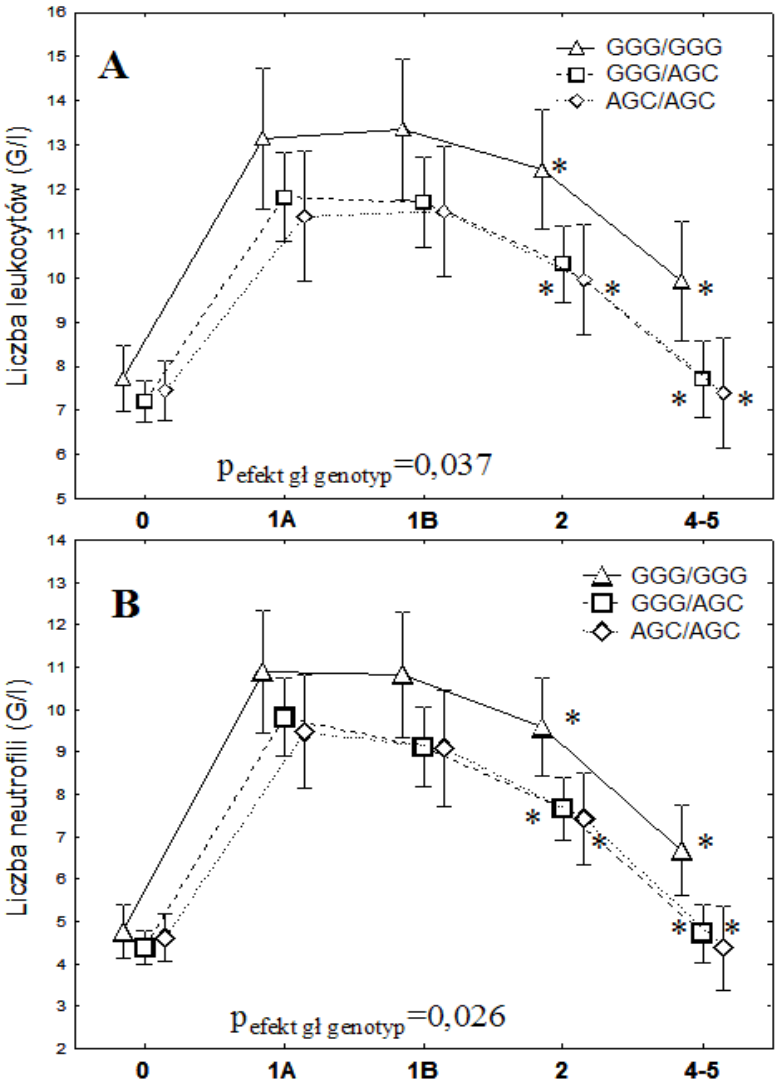
Tabela 4.5.1.1. Zmiany parametrów morfologicznych w okresie okołooperacyjnym, z uwzględnieniem typu zabiegu operacyjnego.

	Typ zabiegu	Przed	1. dzień (godz 6-9)	1. dzień (godz14-17)	2. dzień	4-5. dzień	p
Leukocyty	z KPU	7,1±1,4	10,8±3,4	10,7±2,8	10,4±2,5	7,8±2,2	<0,001
(G/l)	bez KPU	7,7±1,7	12,8±3,4	13±3,8	11,1±3,7	8,3±3,5	<0,001
Neutrofile	z KPU	4,3±1,2	8,9±3,2	8,2±2,6	7,8±2	4,8±1,7	<0,001
(G/l)	bez KPU	4,7±1,4	10,7±3	10,5±3,5	8,4±3,3	5,1±2,7	<0,001
Monocyty	z KPU	0,53±0,14	0,8±0,31	0,93±0,32	0,89±0,33	0,76±0,23	<0,001
(G/l)	bez KPU	0,6±0,22	0,94±0,35	1,04±0,4	0,92±0,35	0,7±0,22	<0,001
Limfocyty	z KPU	2,08±0,66	1,08±0,43	1,52±0,95	1,65±0,66	1,85±0,61	<0,001
(G/l)	bez KPU	2,09±0,89	1,22±0,8	1,51±0,63	1,8±0,84	2,02±0,91	<0,001
Płytki krwi	z KPU	231±54,2	169±42,2	167,9±69,3	151,2±39,8	217,8±73,9	<0,001
(G/l)	bez KPU	249±69,1	212,6±56,7	205,9±56,6	191,8±54,2	238,9±74,7	<0,001

KPU – krążenie pozaustrojowe; dane przedstawione jako średnia±odchylenie standardowe. Test ANOVA Friedmana

Kolejnym krokiem analizy danych było sprawdzenie czy polimorfizm genu IL-6 może mieć związek z dynamiką zmian liczby komórek krwi w okresie okołooperacyjnym.

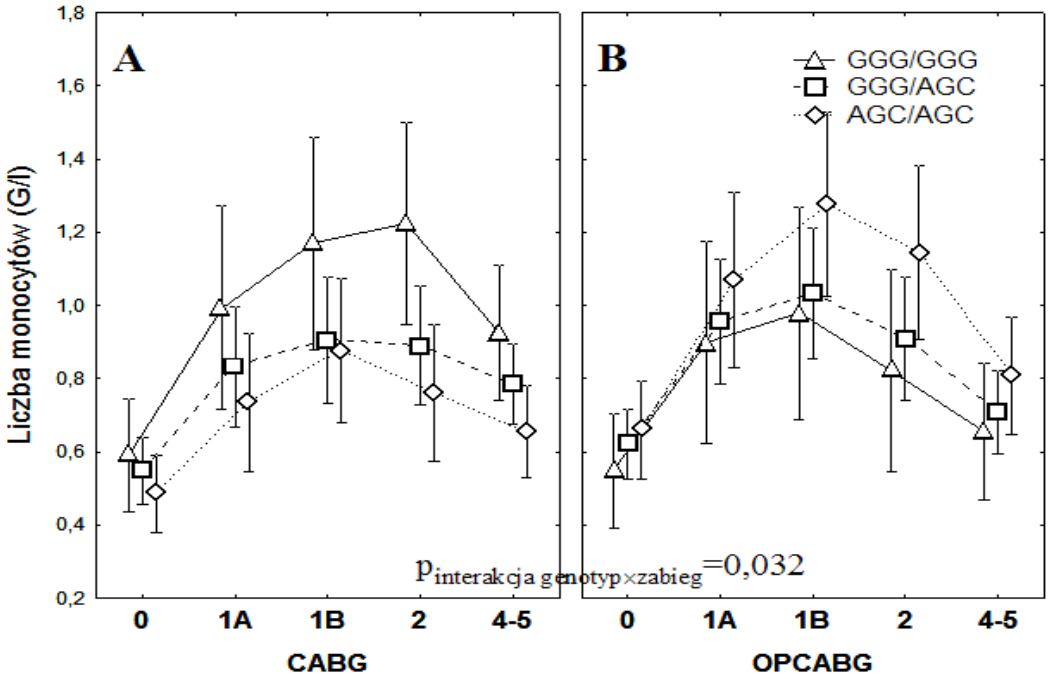
Wpływ genotypu IL-6 na liczbę leukocytów był istotny statystycznie (ANOVA efekt główny $_{genotypu}$ F=3,4 p=0,037), również rodzaj zabiegu wpływał istotnie na liczbę leukocytów (ANOVA efekt główny $_{typu\ zabiegu}$ F=6,3 p=0,014), natomiast efekt interakcji genotypu i typu zabiegu był nieistotny statystycznie (ANOVA efekt interakcji $_{genotyp \times typ\ zabiegu}$ F=1,3 p=0,26), co świadczy o tym, iż wpływ genotypu na liczbę białych krwinek jest niezależny od typu zabiegu. We wszystkich analizach, gdzie wpływ genotypu jest niezależny od typu zabiegu, wpływ genotypu przedstawiano dla wszystkich analizowanych przypadków łącznie. Na rysunku 4.5.1.1. można zaobserwować, iż osoby o genotypie GGG/GGG charakteryzują się wyższą liczbą białych krwinek w przebiegu pooperacyjnym. Różnice osiągają istotność statystyczną w 2. dobie oraz 4-5. dobie po zabiegu (Rys. 4.5.1.1.A.).



Rysunek 4.5.1.1. Liczba białych krwinek (**A**) i neutrofili (**B**) w okresie okołooperacyjnym (0 –- dzień zabiegu, 1A – pierwszy dzień po zabiegu godz. 6-9, 1B – pierwszy dzień po zabiegu godz. 14-17, 2 – drugi dzień po zabiegu, 4-5 – czwarty lub piąty dzień po zabiegu). Dane przedstawione jako średnia i 95% przedział ufności, * - oznacza p<0,05.

Ze względu na to, iż liczba białych krwinek u dorosłych zależy w dużej mierze od liczby neutrofili, analogiczne wyniki uzyskano analizując liczbę neutrofili. Także w tym wypadku wpływy genotypu oraz typu zabiegu były istotne statystycznie, natomiast ich wzajemna interakcja nie (ANOVA efekt główny $_{genotypu}$ F=3,8 p=0,026; efekt główny $_{typu\ zabiegu}$ F=6,2 p=0,015; efekt interakcji $_{genotyp \times typ\ zabiegu}$ F=1,2 p=0,3). Analogicznie liczba neutrofili była wyższa u homozygot GGG/GGG, osiągając istotność statystyczną w 2. oraz 4-5. dobie po zabiegu (Rys. 4.5.1.1.B.). Podobne tendencje jak u osób o genotypie GGG/GGG wykazywała liczba leukocytów i neutrofili u osób o genotypie GGG/GCG.

W przypadku monocytów ani genotyp, ani typ zabiegu nie były samodzielnie istotne, natomiast interakcja tych dwóch czynników uzyskiwała istotność statystyczną, co świadczy o tym, iż typ zabiegu wpływał na efekt, jaki wywierał polimorfizm (ANOVA efekt główny $_{genotypu}$ F=0,28, p=0,75; efekt główny $_{typu\ zabiegu}$ F=0,49, p=0,49; efekt interakcji $_{genotyp \times typ\ zabiegu}$ F=3,6, p=0,033). Zabieg z krążeniem pozaustrojowym wiązał się z wyższą liczbą monocytów dla homozygot GGG/GGG, natomiast zabieg bez krążenia pozaustrojowego – z wyższą liczbą monocytów dla homozygot AGC/AGC (Rys. 4.5.1.2.).



Rysunek 4.5.1.2. Liczba monocytów w okresie okołooperacyjnym z uwzględnieniem typu zabiegu (0 – dzień zabiegu, 1A – pierwszy dzień po zabiegu godz. 6-9, 1B – pierwszy dzień po zabiegu godz. 14-17, 2 – drugi dzień po zabiegu, 4-5 – czwarty lub piąty dzień po zabiegu). Dane przedstawione jako średnia i 95% przedział ufności, * - oznacza p<0,05. CABG – zabieg w krążeniu pozaustrojowym, OPCABG – zabieg bez krążenia pozaustrojowego.

Podsumowanie

Podsumowując, pacjenci z genotypem GGG/GGG, dla którego wykazano wcześniej większą zdolność do produkcji IL-6 zarówno w warunkach indukcji *in vitro*, jak i w odpowiedzi na zabieg operacyjny, charakteryzowali się wyższymi liczbami leukocytów i neutrofili w okresie pooperacyjnym.

4.5.2. Wpływ zabiegu na stężenie cytokin w surowicy krwi

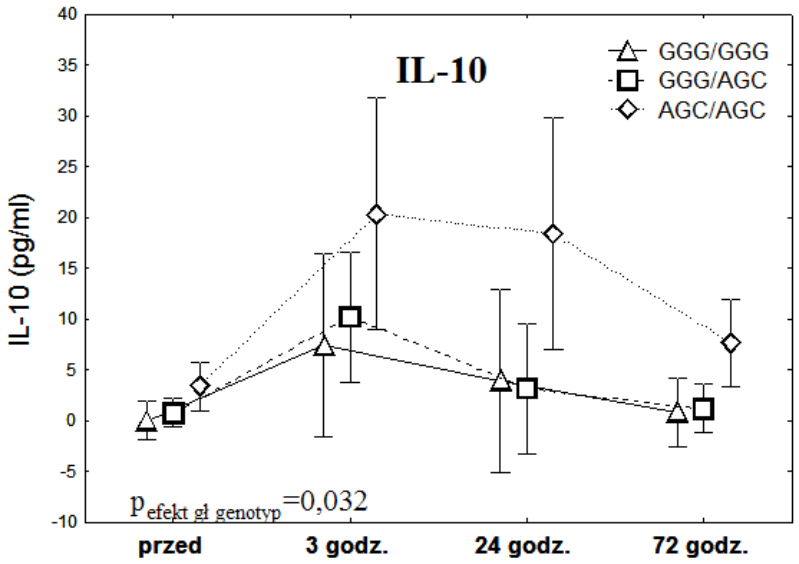
W trakcie reakcji zapalnej dochodzi do wyrzutu zarówno cytokin prozapalnych, jak i antyzapalnych. Traktując zabieg jako bodziec wywołujący odpowiedź organizmu, zbadano wyrzut cytokin w okresie okołooperacyjnym. Analizowano cytokiny Th1 (odpowiedź prozapalna): IFNγ, TNFα i IL-2 oraz cytokiny Th2 (odpowiedź antyzapalna): IL-4, IL-10 i IL-6. Materiał pobierano przed zabiegiem oraz 3, 24 i 72 godziny po zabiegu. Wśród cytokin Th2 zaobserwowano znaczące różnice dla IL-10 oraz IL-6, natomiast wśród cytokin Th1 tylko dla IL-2 nastąpił znaczący wzrost stężenia (Tabela 4.5.2.1.).

Tabela 4.5.2.1. Stężenia cytokin w surowicy krwi w okresie okołooperacyjnym

	przed	**3 godz.**	**24 godz.**	**72h godz.**	**p**
IL-10	1,1±2,7	10,6±12,3	5,7±12,5	2,3±5,2	**<0,0001**
IL-6	1,6±5	227,8±135,6	129±96,8	42,2±25,6	**<0,0001**
IL-4	1,7±3	1,3±2,5	1,2±2,5	1±2,2	0,65
TNFα	1,3±2,1	2,4±3,1	1,1±1,5	1,9±3,4	0,12
IFNγ	1,9±4,2	5,1±11,25	1,5±2,9	2,7±6,2	0,078
IL-2	1±3,8	2,2±9,1	3,2±13,6	2±8,3	**0,034**

Dane przedstawione jako średnia±odchylenie standardowe. Test ANOVA Friedmana

Wpływ polimorfizmu genu IL-6 na poziom IL-6 w surowicy krwi przedstawiono w Rozdziale 4.4.2. Wśród pozostałych cytokin istotny wpływ polimorfizmu genu IL-6 zaobserwowano tylko dla IL-10 – jednej z cytokin, których poziom istotnie zwiększał się w okresie pooperacyjnym. W analizie uwzględniono trzy najczęściej występujące złożone genotypy: GGG/GGG, GGG/AGC oraz AGC/AGC. Poziomy IL-10 były wyższe u osób o genotypie AGC/AGC, efekt był istotny dla genotypu i niezależny od interakcji z czasem (ANOVA efekt główny $_{genotyp}$ F=3,92 p=0,032; efekt interakcji $_{czas \times genotyp}$ F=1,12 p=0,35) (Rys. 4.5.2.1.). Efekt był jeszcze bardziej nasilony przy analizie homozygot AGC/AGC w stosunku do wszystkich pozostałych genotypów.



Rysunek 4.5.2.1. Poziomy IL-10 w surowicy krwi w okresie okołooperacyjnym w kontekście polimorfizmu IL-6. Dane przedstawione jako średnia i 95% przedział ufności średniej.

Podsumowanie

Podsumowując, istotny związek polimorfizmu z poziomem cytokin zaobserwowano dla interleukiny 10 i co ciekawe, osoby o genotypie AGC/AGC, charakteryzujące się niższą produkcją *in vitro* i *in vivo* IL-6, wykazywały się wyższym wyrzutem IL-10 w okresie okołooperacyjnym.

4.5.3. Wpływ zabiegu na markery aktywacji komórek krwi

Zabieg pomostowania tętnic wywołuje reakcję zapalną organizmu, która charakteryzuje się między innymi aktywacją komórek układu immunologicznego. Analizowano intensywność fluorescencji oraz procent komórek pozytywnych dla cząsteczek: CD54 (ICAM-1), CD11a i CD11b. W badaniu skoncentrowano się na monocytach jako populacji komórek, które szybko i efektywnie ulegają aktywacji w odpowiedzi na bodziec. Wykazano znaczące różnice w intensywności fluorescencji dla cząsteczki CD54 oraz różnice w odsetku komórek pozytywnych dla CD54 oraz CD11b ($p<0,01$) (Tabela 4.5.3.1.).

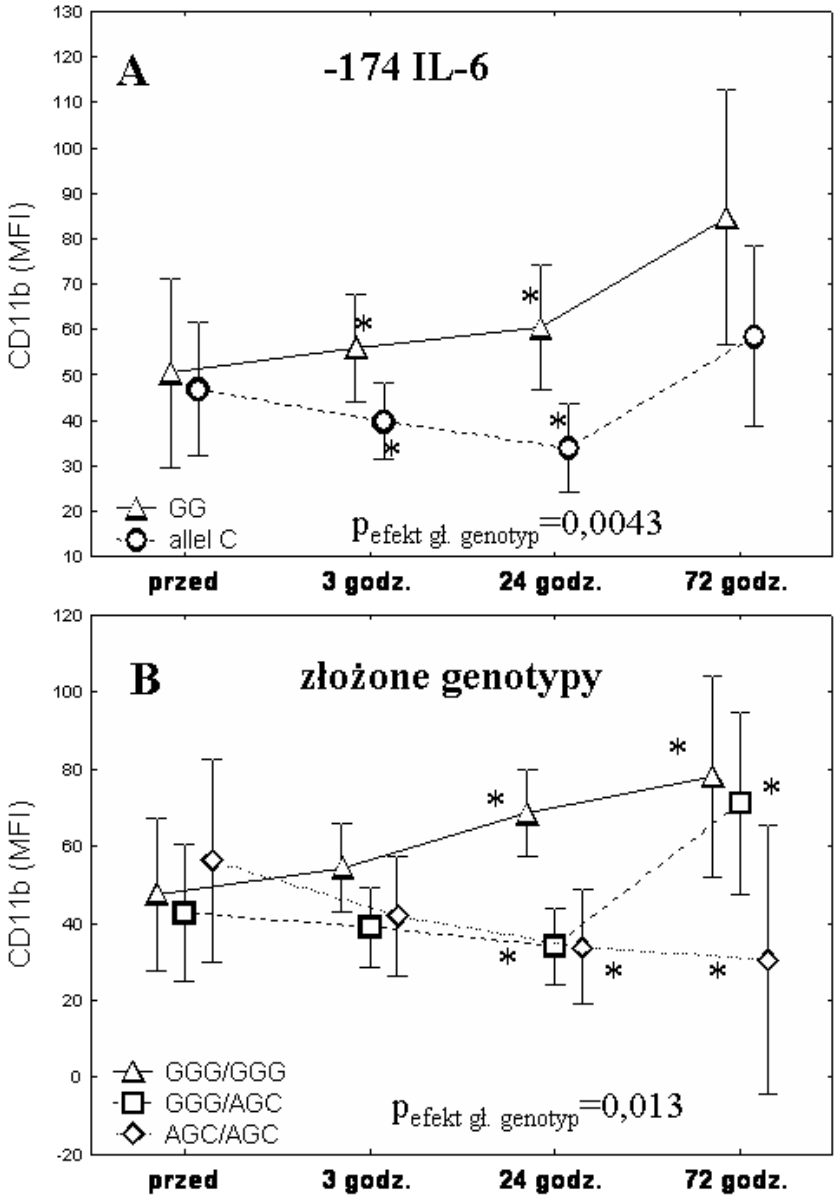
Tabela 4.5.3.1. Średnie intensywności fluorescencji (MFI) oraz odsetek komórek wykazujących ekspresję markerów aktywacji w przebiegu okołooperacyjnym.

	Przed	**3 godz.**	**24 godz.**	**72 godz.**	**p**
% CD54+	96,5±3,3	94,9±3	96,5±3,1	97,6±1,3	**<0,001**
CD54 MFI	40±13	30,8±13,7	39,7±11	47,6±16,5	**<0,001**
% CD11a+	69,6±25,2	65,4±23,6	68,7±22	74,2±20,1	0,47
CD11a MFI	18,1±7,6	14,8±5,8	17±5,7	18,2±7	0,1
% CD11b+	90,5±7,9	95,6±3,9	94,6±6	94,3±5	**0,007**
CD11b MFI	49,7±30,5	44,9±16,2	45,1±21,4	74,1±44,2	0,17
% CD11a+CD11b+	66,3±26,4	65,9±20,3	66,5±21,6	72,9±19,7	0,87

Dane przedstawione jako średnia±odchylenie standardowe. Przedstawiono dane dotyczące ekspresji antygenów na monocytach. Test ANOVA Friedmana

IL-6 może wpływać na ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni leukocytów. Przeanalizowano związek IL-6 z ekspresją CD54 (ICAM-1), CD11a oraz CD11b na powierzchni monocytów. Stwierdzono istnienie dodatniej korelacji między poziomem IL-6 trzy godziny po zabiegu, a więc w punkcie największego mierzonego wyrzutu tej cytokiny a wartością średniej intensywności fluorescencji (MFI) CD11b na monocytach w czasie 3 i 24 godzin od zabiegu (odpowiednio $r=0,73$ przy $p<0,001$ oraz $r=0,51$ przy $p=0,004$).

Analiza związku polimorfizmu genu IL-6 z ekspresją badanych markerów aktywacji wykazała związek tylko z ekspresją CD11b. W analizie pojedynczych polimorfizmów tylko polimorfizm -174 wpływał na poziom ekspresji CD11b – – homozygoty GG charakteryzowały się wyższym MFI CD11b w okresie pooperacyjnym niż posiadacze allelu C (ANOVA efekt główny $_{genotyp}$ $F=10,1$ $p=0,0043$) i efekt ten był niezależny od czasu (efekt interakcji $_{czas\times genotyp}$ $F=0,84$ $p=0,47$) (Rys. 4.5.3.1.A.). Istotność statystyczna dotyczyła okresu 3 i 24 godzin po zabiegu.



Rysunek 4.5.3.1. Średnia intensywność fluorescencji (MFI) cząsteczki CD11b na monocytach w kontekście polimorfizmu -174 IL-6 (**A**) oraz złożonych genotypów IL-6 (**B**). * - p<0,05. Dane przedstawione jako średnia i 95% przedział ufności średniej.

Również analiza poszerzonych genotypów wykazała związek z ekspresją CD11b na monocytach. Wpływ genotypu był istotny statystycznie (ANOVA efekt główny $_{genotyp}$ F=5,25 p=0,013), na granicy istotności był również efekt interakcji czasu i genotypu (efekt interakcji $_{czas \times genotyp}$ F=2,24 p=0,05) (Rys. 4.5.3.1.B.). Analiza post-hoc wykazała istotne różnice dla osób o genotypie GGG/GGG w stosunku do pozostałych grup 24 godziny po zabiegu oraz dla osób o genotypie AGC/AGC w stosunku do pozostałych grup 72 godziny po zabiegu.

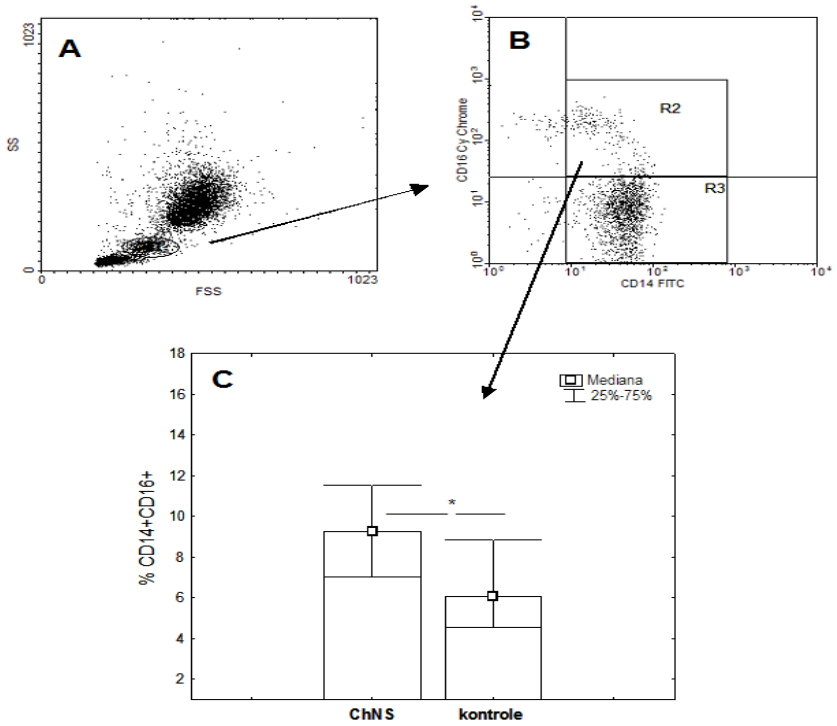
Podsumowanie

Podsumowując, wśród badanych markerów aktywacji tylko ekspresja cząsteczki CD11b na powierzchni monocytów wykazała dodatnią korelację z poziomami IL-6 w surowicy krwi, zaobserwowano również różnice w dynamice zmian ekspresji tej cząsteczki na monocytach w okresie okołooperacyjnym u posiadaczy różnych wariantów allelicznych genu IL-6. Wyższą ekspresją charakteryzowały się osoby o genotypie GGG/GGG, dla których wykazano też wcześniej większą zdolność do produkcji IL-6.

4.5.4. Wpływ zabiegu na fenotyp i stan aktywacji monocytów

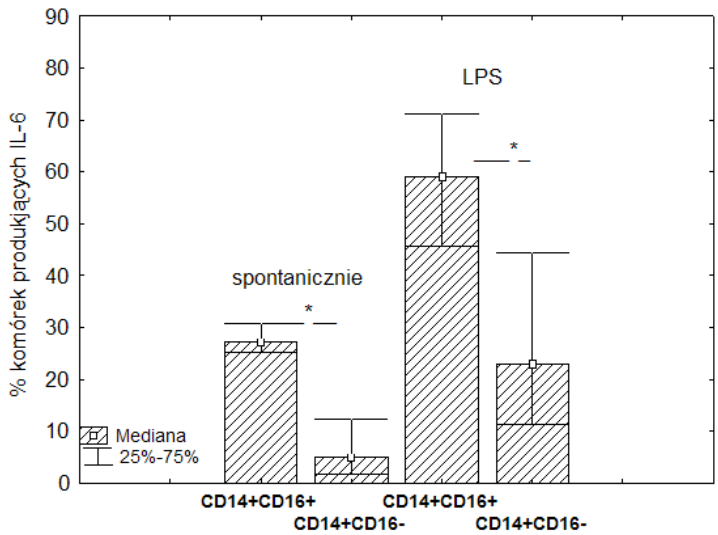
4.5.4.1. Charakterystyka zdolności subpopulacji monocytów do produkcji IL-6

Monocyty stanowią główne źródło IL-6 wśród komórek krwi, pełnią również, jako osiadłe w ścianie naczynia makrofagi, istotną rolę w procesach prowadzących do powstawania i rozwoju blaszek miażdżycowych. Co więcej, krążące monocyty mogą również brać udział w procesach prowadzących do powikłań blaszki miażdżycowej. Uważa się również, iż stan aktywacji i fenotyp monocytów mogą odzwierciedlać stan zapalny toczący się w organizmie. Wśród monocytów znajdujących się w krążeniu opisano dwie główne populacje różniące się ekspresją antygenów powierzchniowych CD14 (receptor LPS) oraz CD16 (FcγRIII). Główna populacja monocytów o fenotypie CD14+CD16- stanowi średnio około 90% wszystkich monocytów, resztę stanowią monocyty CD14+CD16+ uważane za populację monocytów prozapalnych ze względu na opisaną zdolność do produkcji dużych ilości TNFα.



Rysunek 4.5.4.1.1. Porównanie odsetka monocytów CD14+CD16+ wśród krążących monocytów u osób z grupy chorych i z grupy kontrolnej. A) bramkowanie monocytów, B) bramkowanie monocytów CD14+CD16+, C) porównanie odsetka krążących monocytów CD14+CD16+ u osób chorych i grupy kontrolnej. Dane na wykresie przedstawione jako mediana i rozstęp kwartylny. * - p<0,05.

Porównanie odsetka krążących monocytów prozapalnych CD14+CD16+ u pacjentów z grupy chorych i u kontroli wykazało istotnie wyższy poziom tych komórek u chorych (Rys. 4.5.4.1.1.).

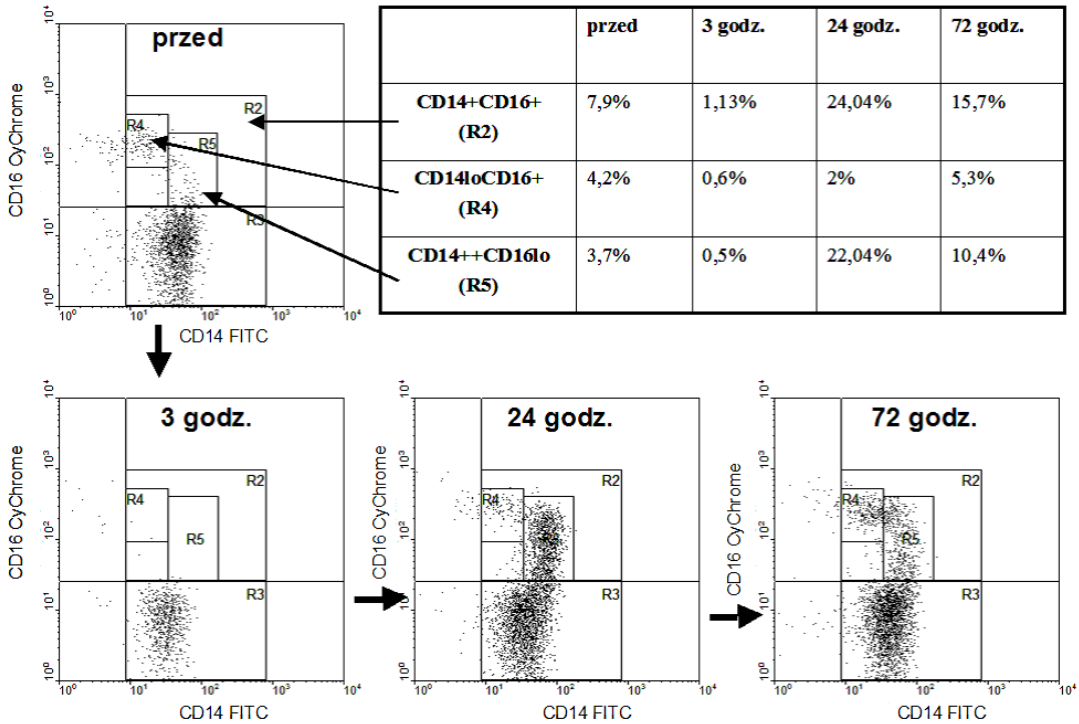


Rysunek 4.5.4.1.2. Porównanie spontanicznej oraz indukowanej LPS-em produkcji wewnątrzplazmatycznej IL-6 przed monocyty CD14+CD16+ i klasyczne monocyty CD14+CD16-. Dane przedstawione jako mediana i rozstęp kwartylny. * - p<0,05.

Analiza produkcji wewnątrzplazmatycznej IL-6 przez subpopulacje monocytów wykazała istotnie wyższą zdolność do produkcji tej cytokiny przez monocyty prozapalne (CD14+CD16+) w porównaniu do subpopulacji CD14+CD16- (Rys. 4.5.4.1.2.). Różnica ta dotyczyła zarówno spontanicznej, jak i indukowanej LPS-em produkcji IL-6.

4.5.4.2. Wpływ zabiegu na skład procentowy subpopulacji monocytów

Kolejny ciąg obserwacji dotyczył dynamicznych zmian w poziomach subpopulacji monocytów w okresie okołooperacyjnym. Rysunek 4.5.4.2.1. przedstawia przykładowe zmiany w procencie krążących komórek dla subpopulacji CD14+CD16+ (bramka R2), CD14loCD16+ (bramka R4) oraz CD14++CD16lo (bramka R5). Subpopulacje CD14loCD16+ i CD14++CD16lo są składowymi subpopulacji CD14+CD16+ wyróżnianymi na podstawie różnic w ekspresji antygenów CD14 i CD16. Zauważyć można charakterystyczny spadek odsetka krążących prozapalnych monocytów w trzeciej godzinie po zabiegu oraz znaczny wzrost 24 godziny po operacji.



	przed	3 godz.	24 godz.	72 godz.
CD14+CD16+ (R2)	7,9%	1,13%	24,04%	15,7%
CD14loCD16+ (R4)	4,2%	0,6%	2%	5,3%
CD14++CD16lo (R5)	3,7%	0,5%	22,04%	10,4%

Rysunek 4.5.4.2.1. Przykład zmian w procencie krążących monocytów CD14+CD16+ (bramka R2), CD14loCD16+ (bramka R4) oraz CD14++CD16lo (bramka R5) w okresie okołooperacyjnym. Tabelka przedstawia procent jaki stanowi dana subpopulacja w całej populacji krążących monocytów u wybranego pacjenta przed zabiegiem oraz 3, 24 i 72 godziny po zabiegu.

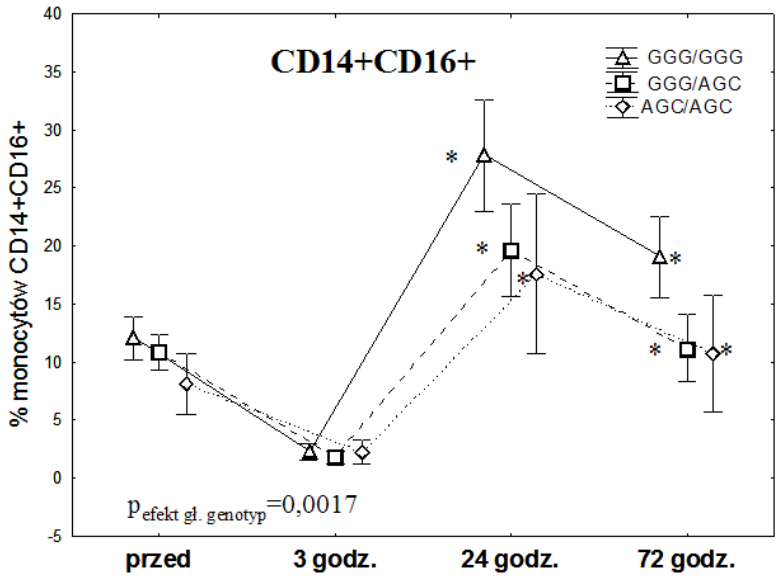
W tabeli 4.5.4.2.1. przedstawiono zmiany w procencie krążących monocytów i ich subpopulacji w okresie okołooperacyjnym. Zarówno zmiany w odsetku krążących monocytów, jak i ich subpopulacji były istotne statystycznie. Odsetek krążących monocytów spadał w 3. godzinie po zabiegu, w 24. godzinie po zabiegu był nieznacznie wyższy niż przed zabiegiem, a 72 godziny po zabiegu powracał do poziomu wyjściowego. W przypadku subpopulacji monocytów zmiany odsetkowe były bardziej nasilone. Odsetek monocytów prozapalnych CD14+CD16+ gwałtownie zmniejszał się 3 godziny po zabiegu, następnie gwałtownie wzrastał 24 godziny po zabiegu, a 72 godziny po zabiegu pozostawał nieznacznie podwyższony. Wśród subpopulacji składających się na monocyty prozapalne: CD14loCD16+ i CD14++CD16lo, subpopulacja CD14++CD16lo wykazywała dynamikę podobną do całej subpopulacji CD14+CD16+ z obserwowanym spadkiem w 3. godzinie i wzrostem w 24. godzinie po zabiegu. Natomiast w przypadku subpopulacji CD14loCD16+ nie wystąpił wzrost odsetka w 24. godzinie od operacji.

Tabela 4.5.4.2.1. Odsetek krążących monocytów oraz subpopulacji monocytów w okresie okołooperacyjnym.

	przed	**3 godz.**	**24 godz.**	**72 godz.**	**p**
% monocytów (CD14+) (jako % leukocytów)	7,05±1,96	6,48±2,14	8,06±2,12	7,06±1,88	**0,005**
% CD14+CD16+ (R2) (jako % monocytów)	10,16±3,34	1,92±1,05	22,81±8,17	13,98±6,2	**<0,0001**
% CD14loCD16+ (R4) (jako % monocytów)	6,04±2,08	0,86±0,38	5,22±4,11	7,78±4,47	**<0,0001**
% CD14++CD16lo (R5) (jako % monocytów)	4,45±2,61	1,05±0,79	17,83±8,36	6,46±4,59	**<0,0001**

Dane przedstawione jako średnia±odchylenie standardowe. Test ANOVA Friedmana

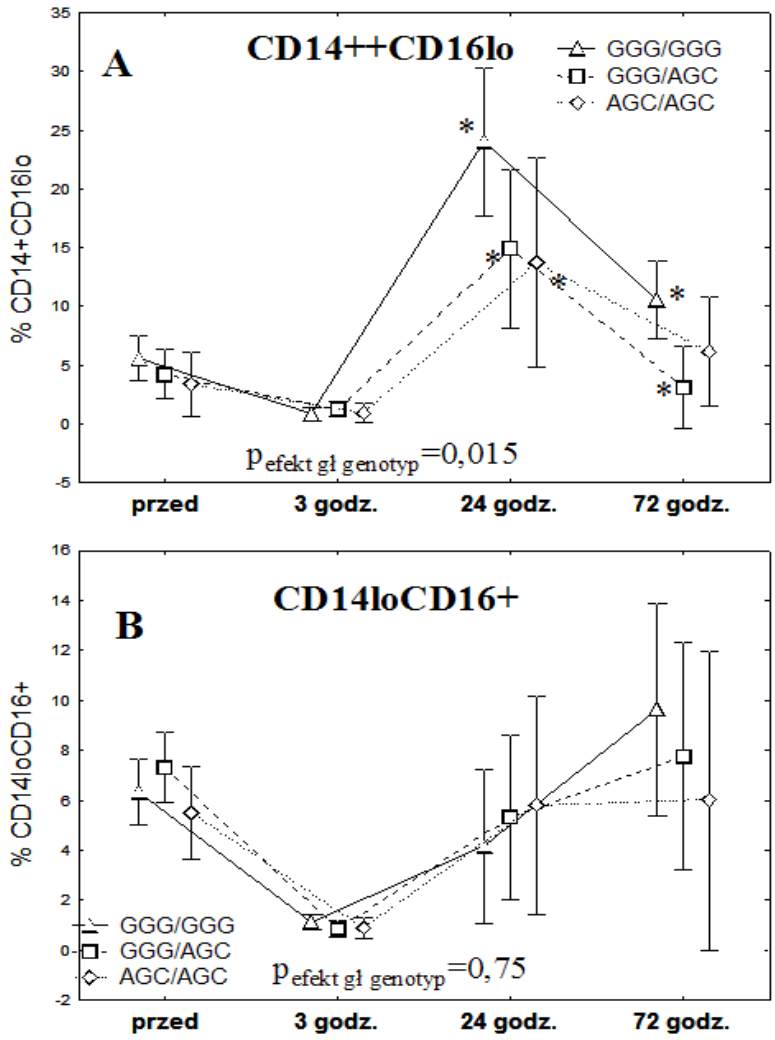
Kolejnym krokiem była analiza związku polimorfizmu genu IL-6 z odsetkowym składem krążących monocytów. Analizowano trzy podstawowe złożone genotypy GGG/GGG, GGG/AGC oraz AGC/AGC.



Rysunek 4.5.4.2.2. Odsetek krążących monocytów CD14+CD16+ w przebiegu okołooperacyjnym w kontekście złożonych genotypów IL-6. Dane przedstawione jako średnia i 95% przedział ufności średniej. * - p<0,05

Odsetek krążących monocytów o charakterze prozapalnym (monocytów CD14+CD16+) różnił się istotnie w zależności od genotypu IL-6 (ANOVA efekt główny $_{genotypu}$ F=8,1 p=0,0017) i efekt ten był zależny od czasu (ANOVA efekt interakcji $_{genotyp \times czas}$ F=3,3 p=0,0059). Zależność wpływu genotypu od czasu wynika z wartości otrzymanych 3 godziny po zabiegu, gdzie wszystkie grupy miały podobne, bliskie zeru wyniki. Przeprowadzono również analizę korelacji stężenia IL-6 w surowicy krwi z odsetkiem krążących monocytów CD14+CD16+. Odsetek monocytów CD14+CD16+ 24 i 72 godziny po zabiegu korelował ze stężeniem IL-6 trzy godziny po zabiegu, a więc w okresie największego obserwowanego wyrzutu IL-6 (r=0,68 p=0,0001 oraz r=0,59 p=0,001).

Genotyp GGG/GGG, charakteryzujący się wysoką produkcją IL-6 po stymulacji LPS-em [Rozdział 4.3.2.] oraz dużym wyrzutem IL-6 w okresie pooperacyjnym [Rozdział 4.4.2.], charakteryzował się również wyższym procentem krążących monocytów CD14+CD16+ w okresie okołooperacyjnym (Rys. 4.5.4.2.2.). Efekt ten był istotny statystycznie 24 i 72 godziny po zabiegu.



Rysunek 4.5.4.2.3. Procent krążących monocytów CD14++CD16lo (**A**) oraz monocytów CD14loCD16+ (**B**) w przebiegu okołooperacyjnym w kontekście złożonych genotypów IL-6. Dane przedstawione jako średnia i 95% przedział ufności średniej. * - p<0,05

Analiza subpopulacji składających się na monocyty prozapalne, czyli CD14++CD16lo (Rys. 4.5.4.2.3.A.) oraz CD14loCD16+ (Rys. 4.5.4.2.3.B.) wykazała istotny wpływ polimorfizmu tylko w przypadku monocytów CD14++CD16lo. Podobnie jak w przypadku całej populacji CD14+CD16+, odsetek krążących monocytów CD14++CD16lo różnił się istotnie w zależności od genotypu IL-6 (ANOVA efekt główny $_{genotypu}$ F=5,47 p=0,015) i efekt ten był zależny od czasu (ANOVA efekt interakcji $_{genotyp \times czas}$ F=2,36 p=0,043). Analogicznie genotyp GGG/GGG charakteryzował się większym odsetkiem krążących monocytów CD14++CD16lo w okresie okołooperacyjnym (Rys. 4.5.4.2.3.A.). Efekt ten był istotny statystycznie 24 i 72 godziny po zabiegu. We wszystkich analizach subpopulacji monocytów komórki osób o genotypie GGG/GCG wykazywały

podobne tendencje jak komórki pochodzące od osób GGG/GGG, jednak ze względu na niewielką liczebność grupy osób tych nie włączano do analizy statystycznej.

Podsumowanie

Podsumowując, dynamika zmian subpopulacji krążących monocytów różniła się między osobami o różnych genotypach IL-6. Osoby o genotypie GGG/GGG charakteryzowały się wyższym odsetkiem monocytów CD14+CD16+ oraz CD14++CD16lo.

4.5.4.3. Wpływ zabiegu na ekspresję cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni monocytów

Kolejne badania dotyczyły analizy ekspresji cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni monocytów. Ekspresja cząsteczki CD14 wyrażona jako średnia intensywność fluorescencji (MFI) mierzona była w całej populacji monocytów oraz jej subpopulacjach: CD14+CD16-, CD14+CD16+, CD14loCD16+ oraz CD14++CD16lo. Ekspresja cząsteczki CD16 mierzona była na komórkach CD14+CD16+, CD14loCD16+ oraz CD14++CD16lo.

Tabela 4.5.4.3.1. przedstawia analizę wpływu zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych na ekspresję cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni różnych subpopulacji monocytów.

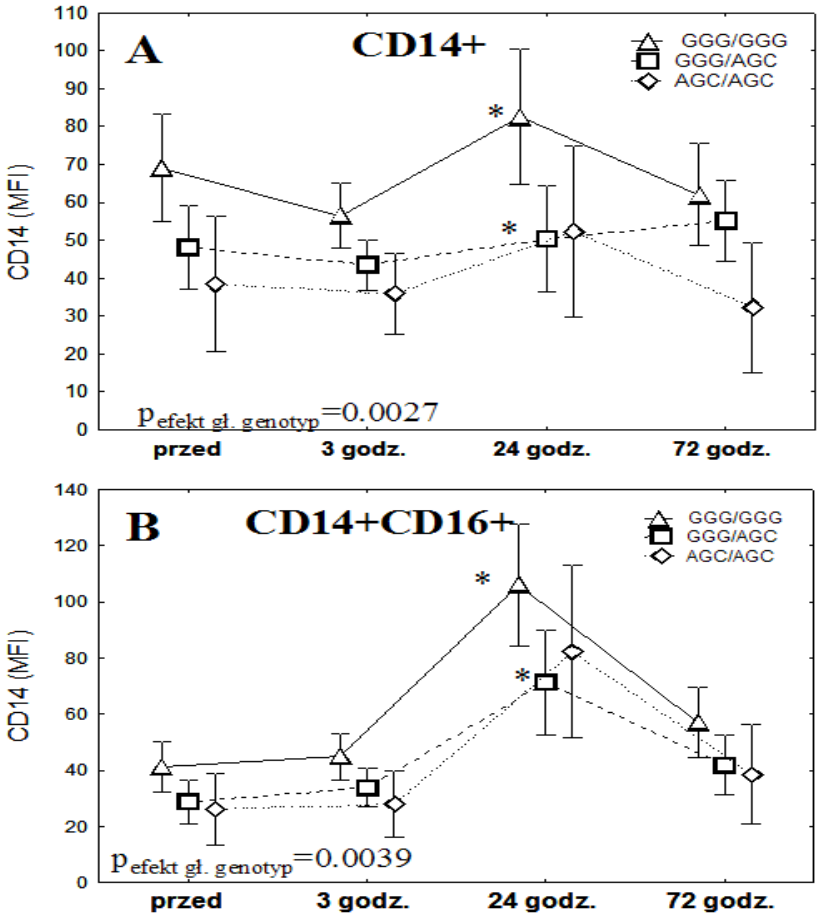
Tabela 4.5.4.3.1. Wpływ zabiegu na ekspresję cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni różnych subpopulacji monocytów.

	przed	**3 godz.**	**24 godz.**	**72 godz.**	**p**
MFI CD14 monocyty	57±33,1	50,1±23	62,4±29,3	60,97±42,8	**0,03**
MFI CD14 CD14+CD16-	61,4±34,6	51,4±23,3	60,4±26,2	64±43,3	**0,015**
MFI CD14 CD14+CD16+	32,3±12,7	38,5±16,7	85,2±35,9	54,4±45,4	**<0,001**
MFI CD16 CD14+CD16+	139,9±80,2	88,6±53,9	107,4±51	159,9±59,7	**<0,001**
MFI CD14 CD14loCD16+	19,4±7	19,3±5	32,6±24	33,4±28,2	**<0,001**
MFI CD16 CD14loCD16+	259,8±172,5	264,6±129,6	284,9±139,9	306,4±132	0,18
MFI CD14 CD14++CD16lo	63,3±33,7	55,8±20,9	94,7±37,1	84,2±51,3	**<0,001**
MFI CD16 CD14++CD16lo	69,5±53	45,6±19,2	87,7±50,1	76,9±47,3	**<0,001**

Analiza wykona testem ANOVA Friedmana. Dane przedstawione jako średnia i odchylenie standardowe.

Zaobserwowano istotny wpływ zabiegu na ekspresję cząsteczki CD14 w analizowanych populacjach, przy czym warto zauważyć, iż efekt ten różnił się w zależności od populacji (Tabela 4.5.4.3.1.). Główna subpopulacja monocytów: CD14+CD16-, a co za tym idzie również cała populacja monocytów (komórki CD14+), charakteryzowała się spadkiem ekspresji CD14 w trzeciej godzinie po zabiegu, następnie komórki powracały do wyjściowego poziomu ekspresji. Odmienny wpływ zabiegu na ekspresję CD14 zaobserwowano w subpopulacji CD14+CD16+ oraz jej składowych CD14loCD16+ i CD14++CD16lo. Tu ekspresja CD14 wyraźnie rosła w 24. godzinie i pozostawała podwyższona aż do 72. godziny po zabiegu. Zabieg pomostowania tętnic wpływał również istotnie na ekspresję cząsteczki CD16 na powierzchni monocytów CD14+CD16+ oraz CD14++CD16lo (spadek w trzeciej godzinie i następujący wzrost ekspresji), natomiast jej ekspresja na powierzchni monocytów CD14loCD16+ nie zmieniała się istotnie w okresie okołooperacyjnym.

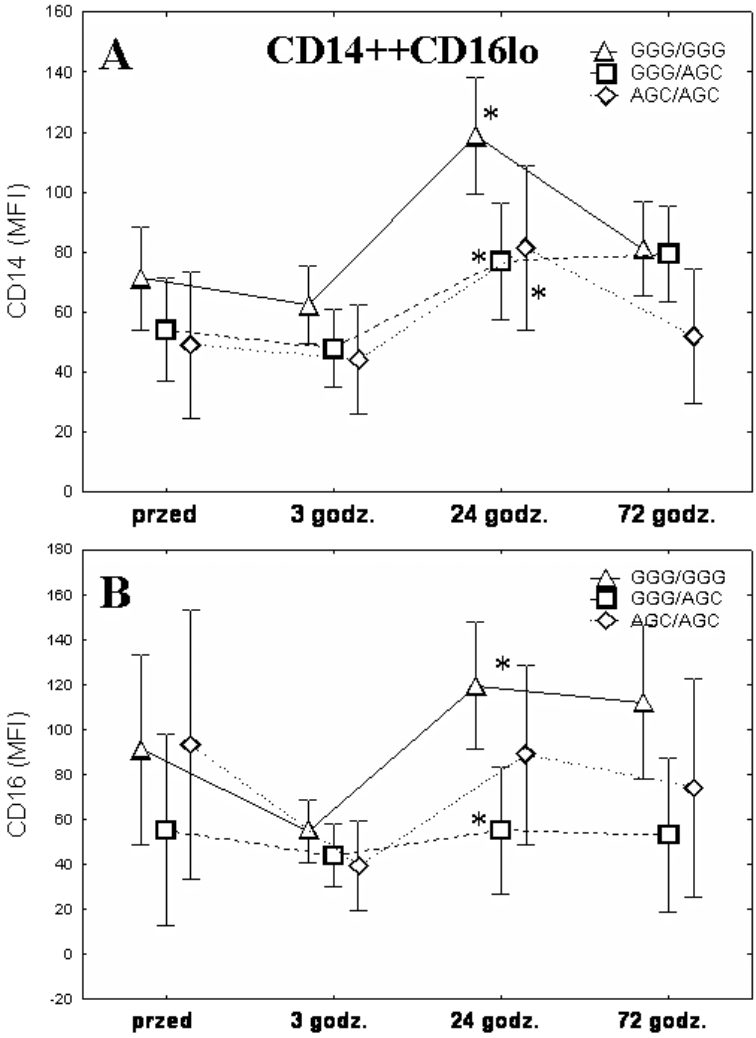
W dalszej kolejności analizowano czy polimorfizm genu IL-6 może mieć związek z ekspresją cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni monocytów. Analizowano trzy najczęściej występujące złożone genotypy: GGG/GGG, GGG/AGC i AGC/AGC. W całej populacji monocytów (wszystkie komórki CD14+) wpływ polimorfizmu IL-6 był istotny statystycznie (ANOVA efekt główny $_{genotypu}$ F=7,7 p=0,0027) i niezależny od czynnika powtarzanych pomiarów ($p_{dla\ interakcji}$=0,17). Generalnie osoby posiadające genotyp GGG/GGG charakteryzowały się wyższą ekspresją CD14 (Rys. 4.5.4.3.1.A.). Dla poszczególnych punktów istotna statystycznie różnica dotyczyła osób o genotypie GGG/GGG i GGG/AGC w 24. godzinie po zabiegu (test NIR p=0,013).



Rysunek 4.5.4.3.1. Wpływ złożonych genotypów IL-6 na ekspresję cząsteczki CD14 na powierzchni komórek CD14+ (cała populacja monocytów) (**A**) oraz monocytów CD14+CD16+ (**B**) w okresie okołooperacyjnym. * - p<0,05. Dane przedstawione jako średnia i 95% przedział ufności średniej.

W populacji monocytów CD14+CD16- nie zaobserwowano związku polimorfizmu z ekspresją cząsteczki CD14. Natomiast w populacji prozapalnych monocytów CD14+CD16+ efekt polimorfizmu był analogiczny do efektów obserwowanych dla całej populacji monocytów – wpływ polimorfizmu był istotny i niezależny od czynnika powtarzanych pomiarów (ANOVA efekt główny $_{genotyp}$ F=7,4 p=0,0039; efekt interakcji $_{czas \times genotyp}$ F=0,9 p=0,47) (Rys. 4.5.4.3.1.B.). Podobnie jak w analizie całej populacji monocytów testy post-hoc wykazały istotną statystycznie różnicę między osobami o genotypie GGG/GGG i GGG/AGC w 24. godzinie po zabiegu (test NIR p=0,027). Ekspresja cząsteczki CD16 na powierzchni monocytów CD14+CD16+ nie różniła się istotnie u osób o różnych złożonych genotypach.

Analiza ekspresji cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni monocytów CD14loCD16+ nie wykazała istotnych różnic między posiadaczami różnych genotypów IL-6, natomiast w przypadku monocytów CD14++CD16lo wykazano istotne różnice zarówno w ekspresji CD14, jak i CD16 (Rys. 4.5.4.3.2.A.).



Rysunek 4.5.4.3.2. Wpływ złożonych genotypów IL-6 na ekspresję cząsteczki CD14 (**A**) oraz cząsteczki CD16 (**B**) na powierzchni monocytów CD14++CD16lo w okresie okołooperacyjnym. * - p<0,05. Dane przedstawione jako średnia i 95% przedział ufności średniej.

Związek między polimorfizmem genu IL-6 a ekspresją CD14 był istotny i niezależny od czasu (ANOVA efekt główny $_{genotyp}$ F=7 p=0,006; efekt interakcji $_{czas \times genotyp}$ F=1,5 p=0,18) (Rys. 4.5.4.3.2.A.). Analiza testami post-hoc wykazała znacząco wyższą ekspresję CD14 u osób o genotypie GGG/GGG w porównaniu do grup GGG/AGC i AGC/AGC 24 godziny po operacji (testy NIR odpowiednio p=0,005 i p=0,03). Podobnie polimorfizm genu IL-6 wpływał również istotnie na ekspresję cząsteczki CD16 na tych komórkach i efekt ten był niezależny od czasu

(ANOVA efekt główny $_{genotyp}$ F=6,6 p=0,007; efekt interakcji $_{czas \times genotyp}$ F=0,9 p=0,49) (Rys. 4.5.4.3.2.B.). Dla poszczególnych punktów istotna statystycznie różnica dotyczyła osób o genotypie GGG/GGG i GGG/AGC w 24 godzinie po zabiegu (test NIR p=0,014).

Podsumowanie

Polimorfizm genu IL-6 pozostawał w związku z ekspresją cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni różnych subpopulacji monocytów. Genotyp GGG/GGG charakteryzował się wyższą ekspresją CD14 na powierzchni monocytów CD14+, CD14+CD16+ oraz CD14++CD16lo. Osoby o tym genotypie wykazywały także ekspresję cząsteczki CD16 na monocytach CD14++CD16lo. Obserwowane różnice w ekspresji były najbardziej widoczne 24 godziny po zabiegu – w okresie, w którym generalnie podwyższona była ekspresja tych cząsteczek oraz obserwowano wyższe odsetki monocytów prozapalnych wśród krążących monocytów.

4.6. Występowanie powikłań okołooperacyjnych, analiza w kontekście polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6

W całej badanej grupie chorych porównano charakterystykę zabiegu operacyjnego, analizując między innymi: liczbę wykonanych pomostów naczyniowych, odsetek zabiegów w krążeniu pozaustrojowym, czas trwania krążenia pozaustrojowego oraz czas od zabiegu do wypisu z oddziału. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic (Tabela 4.6.1.).

Tabela 4.6.1. Charakterystyka zabiegu operacyjnego w aspekcie złożonych genotypów

Złożony genotyp	**GGG/ GGG**	**GGG/ AGC**	**AGC/ AGC**	**GGG/ GCG**	**GCG/ AGC**	**GCG/ GCG**	**p**
N=316	61	141	75	26	9	4	
Liczba pomostów naczyniowych	2,8±0,9	2,6±0,9	2,6±0,9	2,8±0,8	2,8±0,8	2,7±1,2	0,56
Zabieg w KPU, %	45,9	48,9	56,8	50	22,2	100	0,12
Czas trwania KPU, min	72,3±48,6	68,5±43,7	77,5±42	70,3±31,2	48±7,1	98,5±12,2	0,23
Czas pobytu w POP, godziny	32,31±37,7	37,7±32,3	33,9±24,8	34,5±29,3	34±16	28±9,4	0,41
Czas do wypisu, dni	6,4±1,4	6,5±2,6	6,2±1,2	6±0,7	6,4±1,4	6,5±1,3	0,74

KPU – krążenie pozaustrojowe, POP - -oddział pooperacyjny

Zabieg pomostowania tętnic wieńcowych związany jest z ryzykiem pojawienia się powikłań pooperacyjnych. W badanej grupie częstość powikłań wynosiła odpowiednio: migotanie przedsionków w czasie hospitalizacji - 23,86%, okołooperacyjny zawał mięśnia sercowego - 4,81%, reoperacja - 4,49%, zespół małego rzutu - 3,85%, reanimacja - 2,24%, zgon - 1,6%.

Przeprowadzono porównanie częstości występowania poszczególnych powikłań w zależności od posiadanego genotypu IL-6, nie stwierdzono istnienia istotnych statystycznie różnic. Jedynie śmiertelność wewnątrzszpitalna wykazywała tendencję do częstszego występowania w grupie GGG/GGG (GGG2) - 4,92% przy 1,2% dla osób z grupy GGG1 (GGG/X, X oznacza dowolny inny haplotyp) i 0% dla osób z grupy GGG0 (X/X) (p=0,054). Wprowadzono również punkt

końcowy ciężkich powikłań obejmujący: zgon wewnątrzszpitalny, zespół małego rzutu oraz okołooperacyjny zawał mięśnia sercowego. Punkt końcowy ciężkich powikłań wystąpił u 21 osób, co stanowiło 6,73% badanej grupy. Rozkład tej zmiennej nie osiągnął istotności statystycznej dla pojedynczych polimorfizmów, natomiast uwzględnienie złożonych genotypów dało rozkład istotny statystycznie (p=0,032) (Tabela 4.6.2.).

Tabela 4.6.2. Rozkład częstości występowania ciężkich powikłań okołooperacyjnych w kontekście polimorfizmów -174 i -572 IL-6 oraz złożonych genotypów IL-6.

ciężkie powikłania[&]	-174 IL-6	-572 IL-6		haplotyp GGG
GG	9 (10%)	20 (7,33%)	**GGG2**[#]	8 (13,33%)
GC	11 (7,43%)	0 (0%)	**GGG1**	11 (6,67%)
CC	1 (1,35%)	1 (25%)	**GGG0**	2 (2,3%)
	p=0,079	p=0,09		**p=0,032**

[&] - ciężkie powikłania obejmowały: zgon, zespół małego rzutu oraz okołooperacyjny zawał mięśnia sercowego
- liczby 0, 1 i 2 oznaczają ile razy haplotyp GGG występuje u danej osoby

Powikłania takie jak zgon, zespół małego rzutu lub okołooperacyjny zawał mięśnia sercowego wystąpiły u 13,3% osób z grupy GGG2 (genotyp GGG/GGG), natomiast tylko u 2,3% osób z grupy GGG0 i 6,7% osób z grupy GGG1 (p=0,032).

Wykonano również analizę regresji logistycznej wpływu pojedynczych i złożonych polimorfizmów genu IL-6 na ryzyko zgonu bądź wystąpienia ciężkich powikłań, biorąc także pod uwagę fakt, iż wpływ polimorfizmu może się objawiać w sposób addytywny, dominujący bądź recesywny (Tabela 4.6.3.). Ze względu na stwierdzoną w niniejszej pracy wysoką reaktywność osób o genotypie GGG/GGG w analizie występowania powikłań skupiono się na posiadaczach haplotypu GGG. W modelu addytywnym osoby z grupy GGG2 (posiadające dwa haplotypy GGG) kodowano jako 2, osoby z grupy GGG1 (jeden haplotyp GGG, drugi inny) kodowano jako 1, a osoby z grupy GGG0 (oba haplotypy inne niż GGG) kodowano jako 0. W modelu recesywnym kodowano GGG2 jako 1, a GGG1 i GGG0 jako 0. Wreszcie w modelu dominującym przyjęto kodowanie GGG2 i GGG1 jako 1, a GGG0 jako 0. Metodą regresji logistycznej dla każdego z trzech wariantów wpływu polimorfizmu obliczono iloraz szans (OR) wraz z 95% przedziałem ufności oraz poziom p.

Stwierdzono istotny wpływ haplotypu GGG na wystąpienie zgonu bądź punktu końcowego ciężkich powikłań zarówno w modelu addytywnym, jak i w modelu recesywnym (Tabela 4.6.3.). Iloraz szans (OR) dla modelu recesywnego wynosił 2,8 (95% przedział ufności 1,1-7,2) przy poziomie prawdopodobieństwa p=0,029, co oznacza 2,8 razy większe ryzyko wystąpienia punktu końcowego ciężkich powikłań u osób z grupy GGG2 (genotyp GGG/GGG) niż u pozostałych osób. W modelu addytywnym OR 2,4 (1,2-4,8) przy poziomie prawdopodobieństwa p=0,012 także wskazuje na większe prawdopodobieństwo wystąpienia ciężkich powikłań u osób posiadających haplotyp GGG.

Tabela 4.6.3. Wyniki analizy regresji logistycznej wpływu pojedynczych polimorfizmów oraz złożonych genotypów genu IL-6 na ryzyko wystąpienia zgonu lub ciężkich powikłań okołooperacyjnych.

	-174 IL-6	-572 IL-6	haplotyp GGG
zgon			
Poziom p i iloraz szans (OR) dla modelu addytywnego*	p=0,115 OR 3,4 (0,7-16,2)	#	**p=0,04** **OR 5,4 (1,1-26,7)**
Poziom p i iloraz szans (OR) dla modelu dominującego**	#	#	#
Poziom p i iloraz szans (OR) dla modelu recesywnego***	p=0,15 OR 3,7 (0,6-22,8)	#	**p=0,044** **OR 6,5 (1,05-39)**
ciężkie powikłania&			
Poziom p i iloraz szans (OR) dla modelu addytywnego*	**p=0,042** **OR 1,96 (1,02-3,8)**	p=0,56	**p=0,012** **OR 2,4 (1,2-4,8)**
Poziom p i iloraz szans (OR) dla modelu dominującego**	p=0,06 OR 7 (0,9-53,3)	p=0,12	p=0,07 OR 3,9 (0,9-17,3)
Poziom p i iloraz szans (OR) dla modelu recesywnego***	p=0,2 OR 1,8 (0,7-4,3)	p=0,27	**p=0,029** **OR 2,8 (1,1-7,2)**

& - ciężkie powikłania obejmowały: zgon, zespół małego rzutu oraz okołooperacyjny zawał serca
* - poziom p oraz iloraz szans (OR) wraz z 95% przedziałem ufności wyznaczone metodą regresji logistycznej dla modelu addytywnego (GG=2, GC=1 i CC=0 lub GGG2=2, GGG1=1 i GGG0=0)
** - poziom p oraz iloraz szans (OR) wraz z 95% przedziałem ufności wyznaczone metodą regresji logistycznej dla modelu dominującego (GG i GC=1, CC=0 lub GGG2 i GGG1=1 i GGG0=0)
*** - poziom p oraz iloraz szans (OR) wraz z 95% przedziałem ufności wyznaczone metodą regresji logistycznej dla modelu recesywnego (GG=1, GC i CC=0 lub GGG2=1, GGG1 i GGG0=0)
# - wykonanie obliczeń niemożliwe

Wykazano, iż posiadanie haplotypu GGG istotnie zwiększało ryzyko zgonu okołooperacyjnego - OR 5,4 (1,1-26,7) w modelu addytywnym oraz OR 6,5 (1,05-39) w modelu recesywnym. W przypadku pojedynczych polimorfizmów jedynie polimorfizm -174 IL-6 istotnie wpływał na ryzyko wystąpienia punktu końcowego poszerzonych powikłań (OR 1,96 (95%CI 1,02-3,8)), nie wywierał natomiast istotnego wpływu na ryzyko zgonu. Świadczy to o tym, iż oznaczanie

haplotypu IL-6 ma większe znaczenie dla oceny ryzyka niż tylko oznaczanie pojedynczych polimorfizmów.

Uznanym parametrem oceny ryzyka zgonu okołooperacyjnego jest punktacja EuroSCORE. W badanej grupie model uwzględniający tylko wpływ punktacji EuroSCORE na ryzyko zgonu był nieistotny statystycznie (p=0,056) (Tabela 4.6.4, model 1), po uwzględnieniu haplotypu GGG model uzyskał istotność (p=0,015), choć żadna ze zmiennych nie była istotna statystycznie (Tabela 4.6.4, model 2). Analizując punkt końcowy ciężkich powikłań zauważyć można wysoką istotność modelu 1, jak i samej zmiennej. Dopasowanie modelu do danych (ang. goodness of fit) jest dodatkowo poprawione przez dołączenie haplotypu GGG (model 2). Różnica w dopasowaniu miedzy modelem 1 (tylko z EuroSCORE) a modelem 2 (EuroSCORE wraz z haplotypem GGG) jest istotna statystycznie (p=0,0013), co wskazuje, iż dołączenie analizy haplotypu poprawia dopasowanie modelu do danych. Iloraz szans (OR) dla haplotypu wynosił 2,3 (95% przedział ufności 1,14-4,49) przy poziomie prawdopodobieństwa p=0,02, co oznacza 2,3 razy większe ryzyko powikłań u osób posiadających haplotyp GGG.

Tabela 4.6.4. Wyniki analizy regresji logistycznej określenia zdolności predykcyjnej klasyfikacji EuroSCORE oraz haplotypu GGG IL-6 do szacowania ryzyka zgonu lub ciężkich powikłań okołooperacyjnych.

	Model 1 (zm. niezależna EuroSCORE)	Model 2 (zm. niezależne: EuroSCORE i haplotyp GGG)	
		EuroSCORE	haplotyp GGG
zgon			
dla modelu#:	χ^2=3,6 p=0,056	χ^2=8,33 p=0,015	
dla zmiennej##:	p=0,046 OR 1,36 (1-1,85)	p=0,08 OR 1,35 (0,96-1,9)	p=0,055 OR 4,7 (0,97-23,1)
ciężkie powikłania&			
dla modelu#:	χ^2=10,2 p=0,0014	χ^2=14,8 p=0,00061 **(różnica z modelem 1: χ^2=10,3; p=0,0013)**	
dla zmiennej##:	**p=0,0014** **OR 1,3 (1,1-1,54)**	**p=0,0042** **OR 1,28 (1,08-1,5)**	**p=0,02** **OR 2,3 (1,14-4,49)**

& - ciężkie powikłania obejmowały: zgon, zespół małego rzutu oraz okołooperacyjny zawał serca
# - dla modelu podawane χ^2 dobroci dopasowania modelu do danych wraz z poziomem prawdopodobieństwa
- dla zmiennej podawany poziom p oraz iloraz szans (OR) wraz z 95% przedziałem ufności

Podsumowanie:

Analiza ryzyka wystąpienia powikłań pooperacyjnych wykazała, iż posiadanie haplotypu GGG (a w szczególności genotypu GGG/GGG) istotnie zwiększało ryzyko zgonu okołooperacyjnego oraz ryzyko wystąpienia punktu końcowego poszerzonych powikłań pooperacyjnych. Co więcej, uwzględnienie haplotypu GGG wnosiło dodatkową informację do modelu oceny ryzyka zawierającego skalę oceny ryzyka EuroSCORE. Warto zauważyć, iż osoby o genotypie GGG/GGG scharakteryzowano w przedstawianej pracy jako osoby o wysokiej produkcji IL-6 w odpowiedzi na zabieg oraz znacznym nasileniu odpowiedzi zapalnej w okresie pooperacyjnym wyrażonym znaczną leukocytozą, wzrostem ekspresji markerów aktywacji na monocytach oraz zwiększeniem odsetka monocytów prozapalnych wśród krążących monocytów.

5. DYSKUSJA

Prezentowana praca porusza kwestię występowania polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 u chorych z chorobą niedokrwienną serca poddawanych zabiegowi pomostowania tętnic wieńcowych. Badanie obejmowało porównanie częstości występowania trzech polimorfizmów genu IL-6: -174 G\C, -572 G\C i -597 G\A. Porównano częstość występowania analizowanych polimorfizmów w grupie osób chorych oraz dobranej pod względem wieku grupie kontrolnej osób bez choroby niedokrwiennej serca. Allel C -174 IL-6 i allel A -597 występowały stosunkowo często w obu badanych grupach – z około 47% częstością w grupie osób z chorobą niedokrwienną serca oraz około 43% częstością w grupie kontrolnej. Oba allele były również ze sobą sprzężone. Natomiast allel C -572 był allelem rzadkim, występującym z częstością 6,8% w grupie chorych i 9,7% w grupie kontrolnej. Zarówno w grupie osób z chorobą niedokrwienną serca, jak i w grupie kontrolnej rozkłady genotypów dla każdego z polimorfizmów nie odbiegały od rozkładu opisywanego prawem Hardy'ego-Weinberga, co świadczy o tym, iż nie było presji selekcyjnej na któryś z alleli, a analizowane polimorfizmy prawdopodobnie nie wpływają bezpośrednio na ryzyko zachorowania na chorobę wieńcową. Świadczy o tym również wykazany brak różnic między rozkładami genotypów oraz poszczególnych alleli w grupie osób chorych oraz w grupie kontrolnej.

Poza analizą występowania pojedynczych polimorfizmów przeanalizowano również różnice w częstości występowania haplotypów oraz złożonych genotypów genu IL-6. To podejście jest stosunkowo rzadko stosowane w literaturze, mimo iż pozwala uzyskać dokładniejszą informację o wpływie polimorfizmów, uwzględniając ich ewentualne interakcje oraz występujące między nimi sprzężenia. Z tego względu w przedstawianej pracy duży nacisk położono na analizę haplotypów i poszerzonych genotypów. Stwierdzono występowanie trzech podstawowych haplotypów: GGG, AGC i GCG (oznaczanych jako allel występujący kolejno w pozycji -597, -572 i -174). Haplotypy GGG i AGC występowały w obu badanych populacjach często (częstość powyżej 40%), natomiast haplotyp GCG posiadający rzadki allel C -572 występował z częstością poniżej 10%. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych

haplotypów między badanymi grupami, co świadczy o braku wpływu haplotypów genu IL-6 na ryzyko zachorowania na chorobę niedokrwienną.

Złożone lub inaczej poszerzone genotypy IL-6 oznaczają różne kombinacje haplotypów. Zaobserwowano występowanie sześciu podstawowych złożonych genotypów: GGG/GGG, GGG/AGC, AGC/AGC, GGG/GCG, GCG/AGC oraz GCG/GCG. Heterozygoty dwóch podstawowych haplotypów, czyli genotyp GGG/AGC były najczęściej występującą kombinacją haplotypów. Homozygoty GGG/GGG oraz AGC/AGC także były częste w obu populacjach. Natomiast złożone genotypy, w skład których wchodził rzadki haplotyp GCG, charakteryzowały się częstością występowania poniżej 10%. Spośród nich najczęściej spotykanym był genotyp GGG/GCG. Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie występowania złożonych genotypów między grupą chorych a grupą kontrolną. Ponadto w obu grupach rozkłady występowania poszerzonych genotypów były zgodne z rozkładem Hardy'ego-Weinberga. Podobnie jak w przypadku analizy pojedynczych polimorfizmów, haplotypy oraz złożone genotypy IL-6 wydają się nie wpływać na ryzyko zachorowania na chorobę niedokrwienną serca.

W analizowanej grupie pacjentów rozkład czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca nie różnił się istotnie między grupami o różnym genotypie IL-6. Istotne różnice wykazano tylko dla wieku chorych w momencie operacji oraz dla czasu trwania dławicy piersiowej, przy czym chorzy nie różnili się istotnie wiekiem w czasie wystąpienia pierwszych objawów. Różnice dotyczyły głównie osób o genotypie GGG/GGG oraz GCG/AGC, które w odniesieniu do grup GGG/AGC i AGC/AGC charakteryzowały się dłuższym czasem trwania objawowej choroby wieńcowej.

Kolejnym celem niniejszej pracy była ocena wpływu polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 na zdolność monocytów krwi obwodowej do produkcji tej cytokiny. Komórki pochodzące od osób o genotypie GGG/GGG charakteryzowały się wyższą reaktywnością na LPS niż komórki pochodzące od pozostałych osób. Natomiast spontaniczna produkcja cytokiny była najniższa w komórkach pochodzących od osób o genotypie GGG/GCG. Dodatkowo oceniono wpływ jednej ze statyn (lowastatyny) na produkcję IL-6 *in vitro*. Lowastatyna hamowała zdolność monocytów do produkcji IL-6 zarówno spontanicznej,

jak i indukowanej LPS-em, a efekt ten był najsilniej widoczny w przypadku komórek pochodzących od osób o genotypie GGG/GGG oraz GGG/AGC. Monocyty osób o genotypie AGC/AGC praktycznie nie reagowały na lowastatynę, charakteryzowały się także niską reaktywnością na LPS.

W dalszej części pracy oceniono wpływu polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 na przebieg i nasilenie reakcji zapalnej po zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych. Określono zarówno dynamikę zmian stężenia IL-6 w surowicy krwi, jak i dynamikę zmian parametrów morfologicznych, ekspresję markerów aktywacji, zmiany stężeń cytokin, zmiany subpopulacji monocytów. Zabieg pomostowania tętnic wywoływał znaczący wzrost stężenia IL-6 w surowicy. Trzy godziny po zabiegu obserwowany był szczyt stężenia cytokiny w surowicy krwi, a najwyższe stężenia stwierdzono u homozygot GGG/GGG. Reakcja organizmu na zabieg wiązała się również z wysoką leukocytozą, przy czym najwyższe liczby białych krwinek obserwowano u homozygot GGG/GGG, czyli osób, u których stwierdzono również największy wyrzut inteleukiny 6 w odpowiedzi na zabieg. Podobne wyniki uzyskano analizując liczbę neutrofili: homozygoty GGG/GGG charakteryzowały się większą liczbą neutrofili w okresie pooperacyjnym niż pozostali chorzy. Liczba monocytów w okresie pooperacyjnym także była wyższa u osób o genotypie GGG/GGG, z tym, że dotyczyło to wyłącznie osób poddawanych zabiegowi z użyciem krążenia pozaustrojowego.

W mniejszej grupie osób poddanych zabiegowi z użyciem krążenia pozaustrojowego przeprowadzono także bardziej szczegółową analizę wpływu zabiegu na aktywację komórek krwi. Osoby o genotypie GGG/GGG charakteryzowały się w okresie pooperacyjnym wyższą ekspresją markera aktywacji CD11b na powierzchni monocytów, wyższym odsetkiem monocytów prozapalnych CD14+CD16+ i ich subpopulacji CD14+CD16lo oraz wyższą ekspresją cząsteczek CD14 i CD16 na subpopulacjach monocytów.

Dodatkowo przeanalizowano także występowanie ciężkich powikłań okołooperacyjnych, takich jak zgon, okołooperacyjny zawał mięśnia sercowego oraz zespół małego rzutu. Osoby o genotypie GGG/GGG, dla których stwierdzono wcześniej większy wyrzut IL-6 w okresie pooperacyjnym oraz bardziej nasiloną reakcję zapalną, charakteryzowały się także większą częstością występowania ciężkich powikłań.

Jak wynika z uzyskanych w niniejszej pracy wyników, polimorfizm genu IL-6 nie wpływa istotnie na ryzyko choroby niedokrwiennej serca, natomiast może modulować zdolność do wydzielania tej cytokiny i poprzez to wpływać na stan zapalny, co szczególnie ujawnia się w uogólnionej odpowiedzi zapalnej na zabieg operacyjny. Wykazano, iż osoby o genotypie GGG/GGG charakteryzują się większą zdolnością do produkcji IL-6 po silnej stymulacji oraz nasiloną odpowiedzią zapalną na zabieg pomostowania tętnic wieńcowych. Co więcej, osoby te charakteryzują się także większą częstością występowania ciężkich powikłań pooperacyjnych.

5.1. Związek polimorfizmu genu IL-6 z ryzykiem choroby niedokrwiennej serca

Analizowana w niniejszej pracy grupa chorych nie różniła się od populacji kontrolnej pod względem częstości występowania genotypów i alleli genu IL-6. Brak istotnych różnic w rozkładzie dotyczył zarówno pojedynczych polimorfizmów, jak i haplotypów oraz złożonych genotypów. Ponadto w obu grupach rozkłady częstości genotypów były zgodne z rozkładem Hardy'ego-Weinberga, co świadczy o braku presji selekcyjnej na którykolwiek z analizowanych alleli. Można stąd wnioskować, iż polimorfizm IL-6 nie wpływa na ryzyko zachorowania na chorobę niedokrwienną serca. Większość dostępnych danych literaturowych także nie wykazała związku polimorfizmu genu IL-6 z ryzykiem ChNS.

Opublikowano liczne prace badające związek polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 z ryzykiem zachorowania na chorobę niedokrwienną serca, czynnikami ryzyka ChNS oraz powikłaniami tej choroby. Najczęściej badanym polimorfizmem był polimorfizm -174 IL-6, prace uwzględniające pozostałe dwa polimorfizmy analizowane w przedstawianej pracy były nieliczne. Wyniki dużych badań, takich jak badanie LURIC uwzględniające 3304 osoby, nie wykazały związku polimorfizmu -174 IL-6 z ryzykiem choroby wieńcowej i zawału serca[169]. Podobnie w innym badaniu obejmującym 6434 osoby nie wykazano wpływu polimorfizmu -174 IL-6 na ryzyko choroby niedokrwiennej,

choć allel C związany był z wyższym stężeniem CRP[170]. W innej pracy wykazano słaby związek polimorfizmu -174 IL-6 z ryzykiem ChNS, badanie wykonano w 2751-osobowej grupie mężczyzn w średnim wieku, a najwyższe ryzyko stwierdzono dla palaczy o genotypie GC[171], w tej samej pracy stwierdzono również wyższe ciśnienie skurczowe u osób posiadających allel C -174. Stwierdzono również związek allelu C -174 z ryzykiem zawału serca i co ciekawe, allel C był również częstszy u pacjentów, którzy mieli w badaniu angiograficznym znacząco zwężone jedno lub dwa naczynia wieńcowe[172].

W prezentowanej pracy nie wykazano związku polimorfizmu genu IL-6 z ryzykiem zachorowania na chorobę wieńcową. Brak było różnic w częstości występowania poszczególnych alleli i genotypów między grupą osób chorych i grupą kontrolną. Ponadto w obu badanych populacjach rozkłady genotypów dla każdego z analizowanych polimorfizmów nie odbiegały od rozkładu opisywanego prawem Hardy'ego-Weinberga. Cennym wynikiem prezentowanej pracy jest przeprowadzenie analiz dla haplotypów i złożonych genotypów, które były analizowane w tym kontekście tylko w nielicznych badaniach.

Oceniany w niniejszej pracy rozkład częstości genotypów -174 IL-6 był podobny do wyników innych badaczy analizujących zdrowe osoby z populacji polskiej[173]. W cytowanej pracy rozkład genotypów był następujący: GG 28,8%, GC 49,3% i CC 21,9%. Rozkład częstości genotypów -174 IL-6 w wynikach własnych w grupie kontrolnej: GG 34%, GC 45,6%, CC 20,4%; natomiast w grupie osób z chorobą wieńcową: GG 28,9%, GC 47,5%, CC 20,4%. Zauważyć można, iż rozkład genotypów -174 IL-6 u osób z grupy chorych z niniejszej pracy był bardzo zbliżony do rozkładu tego genotypu w populacji osób zdrowych z pracy Kurzawskiego i wsp.[173], co dodatkowo umacnia wniosek o braku różnic w rozkładzie genotypów IL-6 między grupami chorych i zdrowych oraz o braku związku tego polimorfizmu z ryzykiem zachorowania na chorobę niedokrwienną serca.

Porównując rozkłady frekwencji genotypów -174 IL-6 w populacjach osób zdrowych pochodzących z różnych regionów geograficznych, zauważyć można bardzo dużą rozpiętość danych. Wśród osób rasy kaukaskiej rozkład podobny do polskiego występował w populacji niemieckiej[174] i brytyjskiej[175], natomiast bardzo różnił się w populacji włoskiej[176] oraz amerykańskiej[177] gdzie obserwowano znacznie zwiększoną częstość występowania genotypu GG i allelu G. Podobnie wśród przedstawicieli ras innych niż kaukaska, allel C -174 był bardzo rzadki[178 179].

Obserwowane geograficzne różnice mogą wynikać z selekcji środowiskowej specyficznej dla danego regionu, związanej ze zróżnicowaniem narażenia na patogeny zwłaszcza, że również dla innych cytokin wykazano podobne geograficzne zróżnicowanie [180 181 182].

W analizowanej grupie pacjentów rozkład czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca nie różnił się istotnie między grupami o różnym genotypie IL-6. Istotne różnice wykazano tylko dla wieku chorych w momencie operacji oraz czasu trwania dławicy piersiowej, przy czym chorzy nie różnili się istotnie wiekiem w czasie wystąpienia pierwszych objawów. Różnice dotyczyły głównie osób o genotypie GGG/GGG oraz GCG/AGC, które w odniesieniu do grup GGG/AGC i AGC/AGC charakteryzowały się dłuższym czasem trwania objawowej choroby wieńcowej. Warto jednocześnie zauważyć, iż grupa osób o genotypie GGG/GGG wraz ze wszystkimi osobami, które posiadały rzadki haplotyp GCG, charakteryzowała się także wysokim odsetkiem (powyżej 70%) osób z trójnaczyniową chorobą wieńcową. U homozygot AGC/AGC i heterozygot GGG/AGC odsetek ten wynosił odpowiednio 62,2% oraz 58,7% (p=0,01 dla porównania AGC/AGC, GGG/AGC i łączonych pozostałych). Także w pracy Georges i wsp.[172] zauważono częstsze występowanie choroby trójnaczyniowej u osób o genotypie GG -174 IL-6. Zaobserwowany związek może tłumaczyć stwierdzona w niniejszej pracy większa zdolność monocytów pochodzących od osób z genotypem GG -174 IL-6 do produkcji IL-6.

5.2. Wpływ polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 na produkcję IL-6

5.2.1. Spontaniczna oraz stymulowana LPS-em produkcja IL-6

W prezentowanej pracy w kompleksowy sposób zbadano wpływ polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 na produkcję tej cytokiny w warunkach *in vitro*, jak również na wydzielanie tej cytokiny *in vivo*.

Cennym i unikalnym wynikiem pracy było określenie zdolności monocytów do produkcji tej cytokiny wykonane metodą cytometrycznego oznaczania wewnątrzplazmatycznej IL-6. Zaletą zastosowanej metody jest możliwość

stwierdzenia, jaki odsetek komórek produkuje badane białko oraz jakie dokładnie są to komórki. W pracy badano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC), w skład których wchodzą monocyty i limfocyty. Zdolność do produkcji IL-6 w zastosowanym schemacie badawczym krótkiej 5-godzinnej stymulacji wykazywały tylko monocyty, które są uważane za główne źródło IL-6 spośród komórek krwi[183]. Zastosowanie w opisywanych doświadczeniach kohodowli monocytów i limfocytów pozwala na odtworzenie *in vitro* naturalnego modelu wzajemnego oddziaływania monocytów i limfocytów. Badanie obejmowało określenie zdolności do spontanicznej produkcji cytokiny oraz określenie wpływu inkubacji ze statyną na spontaniczną produkcję. Ponadto zbadano zdolność do indukcji IL-6 przez silny czynnik stymulujący – lipopolisacharyd ścian bakteryjnych (LPS) oraz określono wpływ inkubacji ze statyną na indukowaną LPS-em produkcję tej cytokiny.

LPS jest naturalnym czynnikiem stymulującym wydzielanie IL-6 w przebiegu zakażenia bakteryjnego i zastosowanie go pozwala przybliżyć sposób reagowania komórek na prawdziwą infekcję. W prezentowanej pracy porównano zdolność do indukcji IL-6 przez LPS u osób z chorobą niedokrwienną serca oraz u osób w podobnym wieku z grupy kontrolnej bez choroby niedokrwiennej serca. Osoby z grupy chorych charakteryzowały się niższym odsetkiem monocytów zdolnych do produkcji IL-6 po stymulacji LPS-em w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wpływ polimorfizmu genu IL-6 na produkcję cytokiny przez monocyty uwidocznił się zarówno w przypadku spontanicznej, jak i indukowanej LPS-em produkcji. Spontaniczna produkcja była najniższa u osób o złożonym genotypie GGG/GCG, natomiast po indukcji LPS-em najwyższym odsetkiem monocytów IL-6+ charakteryzowały się osoby o genotypie GGG/GGG. Oba genotypy: GGG/GCG oraz GGG/GGG odpowiadają homozygotom GG -174, dla których opisywano większą zdolność do produkcji IL-6 po indukcji IL-1[154]. Również w niniejszej pracy posiadanie genotypu GG -174 IL-6 wiązało się z silniejszą odpowiedzią na LPS. Reaktywność na LPS, wyrażona jako indeks stymulacji, względem kontroli była najniższa w grupie homozygot AGC/AGC (odpowiadających osobom o genotypie CC -174), co wynikało ze stosunkowo niskiego odsetka monocytów produkujących IL-6 w odpowiedzi na LPS.

W prezentowanej pracy komórki izolowane od osób o rzadkim genotypie GGG/GCG charakteryzowały się niższą spontaniczną produkcją IL-6 niż komórki pobrane od pozostałych osób, natomiast reaktywność na stymulację LPS-em wyrażona indeksem stymulacji była wysoka w hodowlach komórek pochodzących od tych osób. Wskazuje to na podobieństwo fenotypowe tych osób do grupy o genotypie GGG/GGG, dla której wykazano wysoką odpowiedź na stymulację LPS-em oraz duże nasilenie reakcji zapalnej po zabiegu pomostowania tętnic. U osób o rzadkim genotypie GGG/GCG także obserwowano duże nasilenie reakcji zapalnej na zabieg. Można wnioskować, iż prawdopodobnie allel C w pozycji -572 nie wpływa istotnie na aktywność promotora.

Dane literaturowe dotyczące związku polimorfizmu z produkcją IL-6 *in vitro* są niejednoznaczne, w pracy Olivieri i wsp.[184] wykazano iż IL-6 wydzielana *in vitro* przez niestymulowane monocyty była wyższa u osób o genotypie GG -174 w porównaniu do posiadaczy allelu C, w innej pracy najwyższa spontaniczna produkcja IL-6 obserwowana była u heterozygot GC[185]. W badaniu *in vitro* z zastosowaniem konstruktów genetycznych promotora IL-6 i genu reporterowego zaobserwowano w komórkach HeLa wyższą aktywność promotora dla allelu G -174, zarówno po aktywacji LPS, jak i IL-1[154]. W innej pracy stopień aktywacji promotora był zależny od haplotypu, haplotyp GGG charakteryzował się większą aktywacją po stymulacji IL-1 w komórkach śródbłonkowych ECV304, natomiast w komórkach HeLa różnice między haplotypami były nieznaczne[151]. W ciekawej pracy z zastosowaniem metody EMSA stwierdzono, iż oligonukleotydy odpowiadające odcinkowi -161 do -181 promotora IL-6 zawierające w pozycji -174 guaninę silniej wiążą białka z ekstraktu jądrowego niż sondy posiadające cytozynę w pozycji -174, co więcej wykazano także, iż badany polimorfizm nie wpływał na wiązanie czynników transkrypcyjnych: NF-κB, NF-IL-6 i AP-1, co sugeruje zaangażowanie jeszcze innych czynników traskrypcyjnych[186].

5.2.2. Wpływ statyn na wydzielanie IL-6

Jednym z czynników o działaniu immunomodulującym może być stosowanie statyn. Statyny są inhibitorami kluczowego enzymu szlaku syntezy cholesterolu -

- reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA), stosowanymi w celu obniżenia stężenia cholesterolu LDL. Poza działaniem hipolipemicznym statyny wpływają również na funkcję śródbłonka, odpowiedź zapalną, stabilność płytki miażdżycowej i tworzenie zakrzepów[187]. Takie plejotropowe działanie statyn wynika z tego, iż hamują one syntezę mewalonianu, który jest prekursorem nie tylko cholesterolu, ale również farnezolu i geranylo-geraniolu, biorących udział w izoprenylacji białek zaangażowanych w sygnalizację wewnątrzkomórkową, takich jak białko Ras czy Rho[188].
Wykazano, iż statyny mogą hamować produkcję cytokin przez monocyty. Simwastatyna hamowała produkcję IL-6, IL-8, MCP-1 przez monocyty pochodzące od osób z hipercholesterolemią[189] i, jak wykazano, efekt ten może być pośredniczony poprzez indukowanie ekspresji białka SOCS-3 - negatywnego regulatora ekspresji cytokin[190]. W badaniach klinicznych wykazano obniżenie stężenia IL-6 w surowicy krwi u pacjentów przyjmujących statyny[191 192].

W przedstawianej pracy wykazano hamujący wpływ lowastatyny na produkcję IL-6 zarówno spontaniczną, jak i indukowaną LPS-em. Co ciekawe, po przeanalizowaniu wpływu polimorfizmu genu na efekt wywierany przez lowastatynę okazało się, iż do istotnego statystycznie obniżenia spontanicznej produkcji IL-6 dochodziło w hodowlach komórek pochodzących od osób o genotypie GGG/GGG i GGG/AGC, natomiast komórki osób o genotypie AGC/AGC tylko w niewielkim stopniu reagowały na statynę. Podobnie po stymulacji LPS-em dodanie lowastatyny do hodowli hamowało produkcję IL-6 w komórkach pochodzących od homozygot GGG/GGG oraz heterozygot GGG/AGC, natomiast w pozostałych grupach efekt działania lowastatyny był nieistotny statystycznie. Te wyniki różnią się od danych literaturowych, w badaniu WOSCOPS stosowanie prawastatyny przez rok skutkowało niższym ryzykiem rozwoju ChNS oraz większym obniżeniem stężenia cholesterolu LDL w surowicy krwi u osób o genotypie CC -174[193], co odpowiada osobom AGC/AGC. Warto zauważyć jednak, iż autorzy nie badali stężenia IL-6 po roku stosowania statyny, a badane stężenia CRP nie wykazały różnic między grupami genotypowymi. Uzyskane wyniki wskazują, iż różne rodzaje statyn mogą w zróżnicowany sposób wpływać na produkcję cytokin w zależności od polimorfizmu odpowiadających genów. Jeśli ta hipoteza okazałaby się prawdziwa określenie polimorfizmu genów

mogłoby w przyszłości prowadzić do indywidualizacji terapii farmakologicznej i pozwalało dobrać najbardziej efektywny lek dla danego pacjenta. Podobny efekt większej wrażliwości ze strony osób o genotypie GG -174 (odpowiadają osobom z grup GGG/GGG i GGG/GCG) na lek zaobserwowano w badaniu oceniającym wpływ leczenia inhibitorami agregacji płytek na stężenia CRP i IL-6 po angioplastyce naczyń wieńcowych[194].

5.2.3. Produkcja IL-6 *in vivo*

Wyniki badań *in vitro* znalazły swoje odzwierciedlenie również w badaniach *in vivo*. Poziom bioaktywnej IL-6 w surowicy krwi chorych istotnie różnił się w zależności od posiadanego wariantu allelicznego. Najniższe stężenie cytokiny w surowicy krwi obserwowano u homozygot AGC/AGC, u których w badaniach *in vitro* stwierdzono najmniejszą reaktywność na LPS. Warto zwrócić uwagę na zastosowaną metodę biologiczną dającą możliwość pomiaru aktywności biologicznej IL-6, co pozwala na ocenę aktywności całego kompleksu cytokina – – rozpuszczalne receptory.

W przedstawianej pracy dla mniejszej grupy pacjentów określono również zmiany stężenia IL-6 w okresie okołooperacyjnym. Zabieg pomostowania tętnic wieńcowych jest zabiegiem wywołującym silną odpowiedź organizmu, której przejawem jest między innymi produkcja IL-6. Zgodnie z doniesieniami innych badaczy[141] zaobserwowano gwałtowny wyrzut IL-6 trzy godziny po operacji, stężenie cytokiny następnie opadało, ale 72 godziny po operacji pozostawało jeszcze podwyższone w stosunku do poziomu wyjściowego przed operacją. Wpływ polimorfizmu genu IL-6 na dynamikę wyrzutu IL-6 był znaczący. Różnica między poszczególnymi genotypami ujawniła się w trzeciej godzinie po zabiegu, czyli w punkcie największego obserwowanego wyrzutu tej cytokiny. Osoby o genotypie GGG/GGG (odpowiadające homozygotom GG -174 IL-6) charakteryzowały się najwyższym stężeniem IL-6. Warto zaznaczyć, iż monocyty od osób o tym genotypie także najsilniej reagowały na bodziec stymulujący w badaniach *in vitro*, wykazując najwyższy odsetek IL-6+ komórek po stymulacji LPS-em. Wynik ten pozostaje w zgodzie z wynikami grupy włoskiej[195], gdzie obserwowano wyższe

stężenia IL-6 24, 48 i 72 godziny po zabiegu u osób o genotypie GG -174, co więcej osoby te pozostawały także dłużej na oddziale intensywnej terapii oraz poddawane były dłuższej hospitalizacji. Z drugiej strony w innej pracy wykazano wyższe stężenia IL-6 6 godzin po zabiegu u osób o genotypie CC -174 oraz u posiadaczy allelu C polimorfizmu -572[196].

5.3. Intensywność reakcji zapalnej na zabieg pomostowania tętnic wieńcowych a polimorfizm genu IL-6

Jednym z celów niniejszej pracy była analiza ostrej reakcji zapalnej wywołanej zabiegiem pomostowania tętnic wieńcowych, jak również określenie związku polimorfizmu genu IL-6 z przebiegiem reakcji zapalnej u badanych pacjentów.

Zmiany w morfologii krwi obwodowej pod wpływem zabiegu są dość dobrze opisane w literaturze. Zgodnie z oczekiwaniami wykazano istotny wpływ zabiegu na parametry morfologii krwi. Niezależnie od typu zabiegu – z krążeniem pozaustrojowym bądź bez – dynamika zmian była podobna: liczba białych krwinek, neutrofili i monocytów wzrastała, natomiast limfocytów i płytek krwi obniżała się po zabiegu.

W prezentowanej pracy zaobserwowano dodatnią korelację między stężeniem IL-6 w surowicy krwi 24 godziny po zabiegu a liczbą leukocytów, neutrofili i monocytów; co więcej, wykazano także związek między polimorfizmem genu IL-6 a wspomnianymi parametrami morfologicznymi. Wykazano większą liczbę leukocytów u pacjentów posiadających złożony genotyp GGG/GGG. Są to ci sami pacjenci, dla których wykazano wyższe stężenia IL-6 w surowicy krwi po zabiegu, jak również wysoką reaktywność monocytów na LPS. Co więcej, wykazano również, iż stężenie IL-6 w surowicy mierzone 24 godziny po zabiegu korelowało z liczbą leukocytów w pierwszym dniu po zabiegu. Podobne wyniki uzyskano analizując liczbę neutrofili: pacjenci o genotypie GGG/GGG charakteryzowali się większym wyrzutem neutrofili po zabiegu, a stężenie IL-6 w pierwszej dobie po zabiegu korelowało z liczbą neutrofili w tym samym okresie. Wyniki te pozostają

w zgodzie z danymi literaturowymi wykazującymi związek między IL-6 a leukocytozą związaną z różnymi stanami klinicznymi[197 198].

W prezentowanej pracy zaobserwowano zwiększone stężenia IL-10 w surowicy krwi w przebiegu pooperacyjnym w porównaniu do stężenia tej cytokiny przed zabiegiem. IL-10 jest cytokiną o silnym działaniu przeciwzapalnym i immunomodulującym. Ma ona zdolność hamowania produkcji cytokin prozapalnych przez makrofagi[199 200] i neutrofile[201]. Wpływa również na różnicowanie się monocytów w makrofagi[202], hamuje ich zdolność do wydzielania wolnych rodników tlenowych[203], ekspresję cząsteczek adhezyjnych[204], zdolność do prezentacji antygenów[205]. Cytokina ta wpływa również na limfocyty Th indukując różnicowanie w kierunku Th2[206] oraz na komórki śródbłonka hamując ekspresję cząsteczek adhezyjnych[207]. Liczne badania wykazały, iż odpowiedź na zabieg operacyjny wiąże się z natychmiastowym wydzieleniem dużych ilości cytokin prozapalnych i następującym po nim bądź równoczesnym wydzieleniem mediatorów antyzapalnych, w tym IL-10. Wykazano, iż głównym źródłem cytokin prozapalnych TNFα, IL-6, IL-8 jest mięsień sercowy[208], natomiast większość IL-10 jest produkowana przez wątrobę[209].
Co ciekawe, kiedy badaną grupę podzielono pod względem polimorfizmu genu IL-6, najwyższe stężenia IL-10 stwierdzono u posiadaczy genotypu AGC/AGC, charakteryzującego się niskimi stężeniami IL-6. Efekt ten, choć nie wydaje się być związany z bezpośrednim hamowaniem wydzielania IL-10 przez IL-6, może przyczyniać się do zaburzenia mechanizmu kompensacji efektu działania cytokin prozapalnych przez IL-10. Zwykle u pacjentów, u których oprócz reakcji zapalnej rozwija się kompensacyjna reakcja przeciwzapalna, okres pooperacyjny przebiega bez powikłań, natomiast u pacjentów, u których odpowiedź przeciwzapalna jest zahamowana, obserwuje się liczne powikłania, w tym zespół niewydolności wielonarządowej[210]. Stwierdzone w niniejszej pracy niskie stężenia IL-10 w połączeniu z wysokimi stężeniami IL-6 u osób o genotypie GGG/GGG mogą przyczyniać się do obserwowanej u tych osób wyższej częstości występowania ciężkich powikłań pooperacyjnych.

5.3.1. Ekspresja markerów aktywacji w okresie okołooperacyjnym

Wzrost ekspresji integryn oraz cząsteczek adhezyjnych na powierzchni monocytów może wpływać na uszkodzenie tkanek poprzez zwiększanie adhezji leukocytów do komórek śródbłonka i ich infiltrację do tkanek. W prezentowanej pracy obserwowano spadek ekspresji CD54 (ICAM-1), CD11a i CD11b na powierzchni monocytów w trzeciej godzinie po zabiegu, w kolejnych badanych punktach ekspresja tych antygenów wzrastała, w przypadku CD54 i CD11b osiągając 72 godziny po zabiegu poziom wyższy od obserwowanego przed zabiegiem. Wcześniejsze prace wykazywały zwiększoną ekspresję CD11b na powierzchni zarówno monocytów, jak i neutrofili i wskazywały na kluczową rolę tej cząsteczki w indukowanej adhezją aktywacji tych komórek po zabiegach wykonywanych w krążeniu pozaustrojowym[211 212]. Zastosowanie aprotyniny pozwoliło na redukcję ekspresji CD11b w trakcie i bezpośrednio po zabiegu i jednocześnie redukowało krwawienie oraz konieczność wykonywania transfuzji preparatów krwi[213 214]. Ostatnio opisano, iż podwyższona ekspresja CD11b na monocytach zwiększa ryzyko wystąpienia migotania przedsionków[215], a podwyższona ekspresja tego antygenu na neutrofilach koreluje z występowaniem pooperacyjnej niewydolności nerek[216]. W prezentowanej pracy ekspresja tego antygenu korelowała ze stężeniem IL-6 w surowicy krwi. Badania Duits'a i wsp. wskazują, że IL-6 może mieć bezpośredni wpływ na ekspresję CD11b na powierzchni monocytów[217]. W pracy tej ekspresja CD11b, jak również CD18 i CD11c na powierzchni komórek linii monocytarnej U937 była zależna od IL-6 w sposób zależny od jej dawki, a przeciwciała przeciwko IL-6 hamowały ten efekt.

W prezentowanej pracy stwierdzono dodatnią korelację między poziomem IL-6 trzy godziny po zabiegu, a więc w punkcie najwyższego obserwowanego wyrzutu tej cytokiny, a ekspresją CD11b na monocytach 3 i 24 godziny po zabiegu. Co więcej, zwiększoną ekspresję CD11b na monocytach obserwowano u posiadaczy genotypu GGG/GGG IL-6, czyli u osób charakteryzujących się większym wyrzutem tej cytokiny do surowicy krwi w okresie okołooperacyjnym, jak również większą zdolnością do indukcji produkcji IL-6 po stymulacji.

5.3.2. Subpopulacje monocytów krwi obwodowej w okresie okołooperacyjnym

Monocyty jako osiadłe w ścianie naczynia makrofagi mogą brać udział w powstawaniu złogów lipidowych i rozwoju blaszek miażdżycowych. Natomiast krążące we krwi monocyty biorą czynny udział w powstawaniu niestabilnej blaszki miażdżycowej i związanych z nią powikłań. Najnowsze dane kliniczne i eksperymentalne wskazują, iż proces zapalny w ścianie naczynia jest kluczowym czynnikiem decydującym o tempie powstawania blaszki miażdżycowej oraz ujawniania się klinicznych objawów choroby[218]. Hipoteza odpowiedzi na uszkodzenie (ang. response-to-injury) zaproponowana przez Ross'a[2] zakłada, iż jakiś czynnik (lub uszkodzenie) inicjuje kaskadę zapalną w ścianie naczynia, w wyniku której dochodzi do akumulacji makrofagów i innych komórek układu immunologicznego. Najnowsze badania wskazują, iż poza napływem monocytów do blaszki miażdżycowej, również zaburzenia w ich recyrkulacji biorą udział w progresji blaszki[219]. Wcześniej wykazano, iż znacząca część krążących monocytów po migracji do tkanek może różnicować się w komórki dendrytyczne, które następnie wędrują do węzłów chłonnych, gdzie biorą udział w prezentacji antygenów limfocytom T[220 221]. Llodra i wsp.[222] stwierdzili, iż balans między komórkami napływającymi do tkanki a opuszczającymi ją może być zaburzony przez niektóre lipidy o właściwościach aterogennych. Co więcej, wykazali oni również, iż opuszczanie blaszki miażdżycowej przez komórki wywodzące się z monocytów jest znacznie zredukowane w warunkach, które promują miażdżycę, takich jak hipercholesterolemia. W omawianej pracy gwałtowna normalizacja poziomów cholesterolu skutkowała regresją blaszki o 50% w ciągu trzech dni i jednocześnie obserwowano zwiększenie liczby opuszczających blaszkę komórek pochodzenia monocytarnego przy zachowanym poziomie napływu nowych monocytów. W powyższej pracy wykazano także, że pochodzące z monocytów komórki dendrytyczne mogą przechodzić z blaszki z powrotem do krwi. W innej pracy tego zespołu wykazano, iż subpopulacja monocytów CD14+CD16+ preferencyjnie różnicuje się w komórki dendrytyczne[223]. Opisane powyżej wyniki badań zwracają uwagę na rolę krążących monocytów oraz ich subpopulacji.

Krążące monocyty podzielono na subpopulacje różniące się ekspresją antygenów CD14 i CD16[224]. Monocyty CD14+CD16+, stanowiące około 10%

wszystkich monocytów, określa się jako monocyty prozapalne ze względu na zdolność do produkcji cytokin prozapalnych, głównie TNFα, przy zahamowanej zdolności do produkcji IL-10[225]. Dodatkowo ta subpopulacja monocytów wykazuje ekspresję antygenów charakterystycznych dla makrofagów, co świadczy o ich dojrzałym fenotypie[226]. Pozostałą pulę monocytów stanowią klasyczne monocyty CD14+CD16-. Podwyższenie odsetka monocytów prozapalnych wśród krążących monocytów obserwowano u pacjentów z sepsą[227], zakażonych wirusem HIV[228], osób dializowanych[229] i pacjentów z astmą[230].

W prezentowanej pracy porównano odsetek krążących monocytów CD14+CD16+ u osób chorych oraz osób z grupy kontrolnej. Znacząco wyższy odsetek monocytów CD14+CD16+ stwierdzono u osób z chorobą niedokrwienną serca, co znalazło potwierdzenie także w pracy Schlitt'a i wsp.[231]. Ważnym stwierdzeniem prezentowanej pracy jest także dowód, iż w subpopulacji monocytów CD14+CD16+ odnotowano znacząco więcej komórek zdolnych do produkcji IL-6, zarówno spontanicznie, jak i po stymulacji LPS-em.

Przeprowadzono również analizę zmian odsetka subpopulacji monocytów w okresie okołooperacyjnym w wydzielonej grupie osób poddanych zabiegowi w krążeniu pozaustrojowym. Odsetek monocytów prozapalnych CD14+CD16+ gwałtownie zmniejszał się 3 godziny po zabiegu, następnie gwałtownie wzrastał 24 godziny po zabiegu, a 72 godziny po zabiegu pozostawał nieznacznie podwyższony. Dynamikę zmian subpopulacji monocytów w odpowiedzi na zabieg analizowano już w literaturze[232], jednak badanie było przeprowadzone tylko na siedmioosobowej grupie pacjentów i badano komórki przed zabiegiem, bezpośrednio po zakończeniu zabiegu i następnie po 24 godzinach. Badacze zaobserwowali spadek odsetka monocytów CD14+CD16+, jednak nie był on tak nasilony jak w prezentowanej pracy 3 godziny po zabiegu. Obserwowany spadek odsetka monocytów CD14+CD16+ w krążeniu może wynikać z aktywacji ich adhezji do komórek śródbłonka i migracji do tkanek. Natomiast obserwowany następnie znaczny wzrost odsetka tych komórek wynika ze zwiększonego wydzielenia nowych monocytów ze szpiku, jak również może po części wynikać z recyrkulacji komórek z powrotem z tkanek do krążenia.

W prezentowanej pracy wyróżniono również subpopulacje składające się na subpopulację CD14+CD16+: CD14loCD16+ i CD14++CD16lo, wśród nich subpopulacja CD14++CD16lo wykazywała dynamikę zmian podobną do zmian całej subpopulacji CD14+CD16+. Istnienie mniejszych subpopulacji składających się na monocyty prozapalne opisywali już inni autorzy[233]. Uważa się, że monocyty CD14loCD16+ są najbardziej dojrzałą subpopulacją krążących monocytów, natomiast monocyty CD14++CD16lo charakteryzują się pośrednim fenotypem między populacjami CD14+CD16- a CD14loCD16+ [233]. Monocyty CD14loCD16+ wykazują się wysoką ekspresją integryn CD11a (LFA-1) i CD49d (VLA-4) oraz cząsteczki CD45RA charakterystycznej dla aktywowanych komórek. Natomiast cechą charakterystyczną dla monocytów CD14++CD16lo jest wysoka ekspresja CD11b (Mac-1). Zróżnicowana ekspresja integryn i markerów aktywacji świadczy nie tylko o różnych stadiach dojrzewania komórek, ale także o zróżnicowanej zdolności do adhezji do komórek śródbłonka. Ekspresja CD11a i CD11b wiąże się ze zdolnością do adhezji do niestymulowanych komórek śródbłonka, natomiast cząsteczka CD49d bierze udział w przyleganiu do komórek śródbłonka aktywowanych cytokinami[234 235]. Sugeruje się, że reakcja zapalna lub odpowiedź immunologiczna inicjuje różnicowanie się monocytów w kierunku komórek o fenotypie CD14loCD16+. Uzyskane w przedstawianej pracy wyniki wydają się potwierdzać tę teorię, przed zabiegiem obserwowano wyższy odsetek monocytów CD14loCD16+ niż komórek CD14++CD16lo, natomiast po zabiegu obserwowano najpierw wzrost odsetka pośredniej populacji monocytów CD14++CD16lo, a potem najbardziej zróżnicowanych komórek CD14loCD16+.

W niniejszej pracy określono również dynamikę zmian ekspresji cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni różnych subpopulacji monocytów. Tak dokładna analiza nie została dotąd opublikowana, jedynie we wspomnianej wcześniej pracy Hiesmayr'a i wsp.[232] stwierdzono spadek ekspresji cząsteczki CD16 po zabiegu. Zaobserwowano istotny wpływ zabiegu na ekspresję cząsteczki CD14 w analizowanych populacjach, przy czym efekt ten różnił się w zależności od populacji monocytów. Główna subpopulacja monocytów (CD14+CD16-) charakteryzowała się spadkiem ekspresji CD14 w trzeciej godzinie po zabiegu, następnie komórki powracały do wyjściowego poziomu ekspresji. Natomiast

w pozostałych subpopulacjach: CD14+CD16+, CD14loCD16+ i CD14++CD16lo ekspresja CD14 wyraźnie rosła w 24. godzinie i pozostawała podwyższona aż do 72. godziny po zabiegu. Taka dynamika zmian może świadczyć o aktywacji monocytów, co znajduje potwierdzenie zarówno w wynikach innych badaczy, jak i własnych wynikach analizy ekspresji markerów aktywacji na powierzchni monocytów.

W literaturze wykazano, iż poziom ekspresji cząsteczki CD14 na monocytach wzrasta po ich aktywacji LPS-em[236], jak również ox-LDL[237 238]. Zauważono też podwyższoną ekspresję tej cząsteczki na monocytach pochodzących od pacjentów z ostrymi epizodami sercowymi w porównaniu do jej ekspresji na komórkach od osób z grupy kontrolnej lub pacjentów ze stabilną dusznicą bolesną[239]. Co więcej, poddanie się przez pacjentów rutynowej terapii farmakologicznej powodowało spadek ekspresji cząsteczki CD14 w ciągu 6 tygodni. Sugeruje się, iż monocyty o podwyższonej ekspresji CD14 mogą być nadreaktywne na stymulację, szczególnie tą pośredniczoną przez CD14.

Ekspresja cząsteczki CD16 na powierzchni monocytów CD14loCD16+ nie zmieniała się istotnie w okresie okołooperacyjnym, natomiast na powierzchni monocytów CD14+CD16+ oraz CD14++CD16lo obserwowano spadek w trzeciej godzinie od zabiegu i następujący wzrost jej ekspresji. Podobną dynamikę zmian ekspresji CD16 na powierzchni monocytów zaobserwowali inni badacze w dziesięcioosobowej grupie pacjentów poddanych zabiegowi pomostowania tętnic wieńcowych z użyciem krążenia pozaustrojowego[240]. Uważa się, iż ekspresja cząsteczki CD16 na monocytach jest fenotypowym wyrazem ich bardziej dojrzałego stadium rozwojowego, jako że monocyty takie przypominają tkankowe makrofagi swoją zdolnością do produkcji TNF-α przy zahamowanej zdolności do produkcji IL-10, a także ekspresją cząsteczek adhezyjnych i markerów aktywacji[226]. Obserwowany spadek ekspresji cząsteczki CD16 w trzeciej godzinie po zabiegu jest wynikiem aktywacji monocytów i ich migracji do tkanek[241], natomiast następujący później wzrost ekspresji wynika prawdopodobnie zarówno z aktywacji dojrzewania monocytów przez cytokiny IL-6[242] i IL-10[243], jak i wyrzutu ze szpiku kostnego nowych monocytów i recyrkulacji monocytów z tkanek.

Bardzo interesującym wynikiem prezentowanej pracy jest zaobserwowana różnica zarówno w odsetku monocytów CD14+CD16+ i CD14++CD16lo, jak i w ekspresji na ich powierzchni cząsteczek CD14 i CD16 w zależności od posiadanego genotypu IL-6. Zauważono, iż wartości omawianych parametrów są wyższe u posiadaczy genotypu GGG/GGG, dla którego opisano większy wyrzut tej cytokiny do surowicy krwi w okresie okołooperacyjnym, jak również większą zdolność do indukcji produkcji IL-6 po stymulacji. Co więcej, stwierdzono również istnienie dodatniej korelacji między stężeniem IL-6 w surowicy krwi 3 godziny po zabiegu (czyli w punkcie najwyższego mierzonego wyrzutu tej cytokiny) a odsetkiem monocytów CD14+CD16+ 24 i 72 godziny po zabiegu. Taki efekt może wynikać zarówno z bezpośredniego wpływu IL-6 na dojrzewanie i aktywację monocytów[244], jak i może być wynikiem pośredniego oddziaływania cytokiny poprzez obserwowane wzmożenie stanu zapalnego i reakcji ostrej fazy. Nie można również wykluczyć, iż zaobserwowana prawidłowość nie ma związku przyczynowo–skutkowego, tym niemniej zastanawiająca jest duża reaktywność u osób o genotypie GGG/GGG obserwowana w okresie pooperacyjnym i wyrażona wysokim stężeniem IL-6 w surowicy krwi, wyższą liczbą leukocytów (w tym neutrofili i monocytów), wyższą ekspresją CD11b na powierzchni monocytów oraz omawianymi wyższymi odsetkami monocytów CD14+CD16+ i CD14++CD16lo, a także wyższą ekspresją na ich powierzchni cząsteczek CD14 i CD16.

W literaturze opisywano już wcześniej związek polimorfizmu z różnicami w odsetkach różnych subpopulacji monocytów. Posiadanie allelu apoE4 związane było z wyższym odsetkiem monocytów CD14loCD16+ zarówno u pacjentów z hipercholesterolemią, jak i u osób z grupy kontrolnej[233]. Co więcej, monocyty pochodzące od osób homozygotycznych pod względem apoE4 wykazywały *in vitro* wyższy wzrost ekspresji CD16 pod wpływem M-CSF w porównaniu do komórek pochodzących od osób apoE3/E3[245].

W prezentowanej pracy wykazano związek polimorfizmu genu IL-6 z subpopulacją CD14++CD16lo. Co ciekawe, dane literaturowe wskazują, iż omawiana subpopulacja może mieć wpływ na patogenezę procesu miażdżycowego, jako że enzymatycznie modyfikowane LDL preferencyjnie wiążą się do komórek z tej subpopulacji i indukują powstawanie z nich komórek piankowatych[246]. Prezentowana praca wiąże się natomiast z rolą tych komórek w odpowiedzi zapalnej. Zaobserwowano znaczny wzrost odsetka tych komórek

wśród monocytów krwi obwodowej oraz ich nasiloną aktywację w okresie pooperacyjnym.

5.4. Występowanie powikłań okołooperacyjnych a polimorfizm genu IL-6

Kliniczne konsekwencje stanu zapalnego wywołanego zabiegiem mogą bardzo różnić się pomiędzy poszczególnymi pacjentami, począwszy od wzrostu stężenia mediatorów stanu zapalnego nie objawiającego się istotnymi zmianami stanu pacjenta aż do pojawienia się objawów niewydolności wielonarządowej, a w pewnych przypadkach nawet do śmierci pacjenta[247]. Poza oczywistym wpływem stanu klinicznego pacjenta przed operacją oraz przebiegu samej operacji na obserwowane osobnicze różnice w intensywności stanu zapalnego i częstości powikłań pooperacyjnych może również wpływać indywidualne zróżnicowanie w zdolności do produkcji markerów stanu zapalnego warunkowane istnieniem polimorfizmów w obrębie genów kodujących te markery. Ze względu na kluczową rolę IL-6 w regulacji stanu zapalnego bardzo istotną rolę wydaje się pełnić polimorfizm genu IL-6.

Związek polimorfizmu genu IL-6 z powikłaniami po zabiegu pomostowania tętnic był już badany wcześniej. Stwierdzono między innymi, iż homozygoty GG -174 IL-6 charakteryzowały się dłuższym okresem hospitalizacji po zabiegu[195]. Kolejna praca tego zespołu wykazała również, iż posiadanie tego genotypu wiązało się z gorszą funkcją nerek i płuc po operacji[248]. Jednocześnie posiadanie genotypu GG -174 IL-6 wiązało się z wyższymi stężeniami IL-6 mierzonymi po zabiegu, a stężenie IL-6 korelowało z parametrami upośledzenia funkcji nerek i płuc. Jeszcze inna praca wykazała związek allelu C -572 IL-6 z uszkodzeniem funkcji nerek po zabiegu pomostowania tętnic[249]. W naszym badaniu wykazano istotne różnice w częstości występowania ciężkich powikłań pooperacyjnych, takich jak zgon, zespół małego rzutu i okołooperacyjny zawał mięśnia sercowego u posiadaczy różnych wariantów polimorficznych genu IL-6. Osoby o genotypie GGG/GGG (w grupie tej znajduje się większość posiadaczy genotypu GG -174 IL-6) charakteryzowały się częstszym występowaniem ciężkich powikłań niż pozostałe

grupy (p=0,032). Wcześniej wykazano, iż osoby o tym genotypie produkują istotnie więcej IL-6 w okresie pooperacyjnym, charakteryzują się wyższym odsetkiem monocytów produkujących IL-6 po stymulacji LPS-em oraz charakteryzują się bardziej nasiloną reakcją zapalną w odpowiedzi na zabieg. Większe nasilenie odpowiedzi zapalnej u osób o genotypie GGG/GGG charakteryzowało się omawianą wcześniej zwiększoną leukocytozą, większą ekspresją cząsteczki CD11b na monocytach, zwiększeniem odsetka monocytów prozapalnych 24 godziny po zabiegu oraz nasileniem ekspresji cząsteczek CD14 i CD16 na powierzchni monocytów.

W przedstawianej pracy metodą regresji logistycznej przeprowadzono również analizę wpływu polimorfizmu genu IL-6 na ryzyko wystąpienia ciężkich powikłań pooperacyjnych. Posiadanie haplotypu GGG wiązało się z ponad dwukrotnie wyższym ryzykiem wystąpienia ciężkich powikłań (OR > 2). Również ryzyko zgonu okołooperacyjnego było znacząco wyższe u posiadaczy haplotypu GGG (OR > 5), jednak wynik ten ze względu na małą liczbę zgonów charakteryzował się bardzo dużą rozpiętością 95% przedziału ufności i musi być interpretowany z dużą ostrożnością. Nasze wyniki wskazują, iż oznaczanie haplotypu regionu promotorowego genu IL-6 mogłoby być dodatkowym wskaźnikiem ryzyka wystąpienia ciężkich powikłań pooperacyjnych. Warto zauważyć, iż oznaczanie haplotypu ma większą siłę predykcyjną niż oznaczanie tylko polimorfizmu -174 IL-6, który jest najczęściej oznaczany u innych autorów (OR 2,4 przy p=0,012 dla haplotypu GGG i OR 1,96 przy p=0,042 dla -174 IL-6).

Uznanym klinicznym wskaźnikiem oceny ryzyka powikłań pooperacyjnych jest klasyfikacja EuroSCORE[250]. W przedstawianej pracy stworzono dwa modele określające ryzyko powikłań: model 1 uwzględniający tylko klasyfikację EuroSCORE oraz model 2 uwzględniający klasyfikację EuroSCORE oraz haplotyp GGG. Wykazano, iż uwzględnienie haplotypu zwiększało dopasowanie modelu do danych zarówno przy analizie ryzyka zgonu, jak i ryzyka ciężkich powikłań pooperacyjnych.

Ogólnoustrojowa reakcja zapalna jest ważnym czynnikiem prowadzącym do powikłań po operacjach kardiochirurgicznych. Uważa się, iż nasilenie tej reakcji w dużym stopniu może zależeć od czynników genetycznych. Określenie wpływu tych czynników mogłoby w przyszłości pozwolić na modyfikacje skal szacowania ryzyka

powikłań pooperacyjnych, jak również na indywidualizowanie terapii immunomodulacyjnych i przeciwzapalnych u pacjentów wysokiego ryzyka. Wyniki przedstawianej pracy wskazują, iż jednym z czynników genetycznych modulujących odpowiedź zapalną na zabieg pomostowania tętnic wieńcowych jest polimorfizm regionu promotorowego genu IL-6. Uzyskane rezultaty sugerują, iż osoby o genotypie GGG/GGG charakteryzujące się wysokimi stężeniami IL-6 w okresie pooperacyjnym oraz dużą reaktywnością na LPS są jednocześnie osobami narażonymi na nadmierną aktywację odpowiedzi zapalnej na zabieg oraz wystąpienie ciężkich powikłań pooperacyjnych.

6. WNIOSKI

WNIOSKI SZCZEGÓŁOWE

1. Polimorfizm regionu promotorowego genu IL-6 nie ma związku z ryzykiem zachorowania na chorobę wieńcową, może natomiast modulować przebieg choroby oraz nasilenie odpowiedzi zapalnej na zabieg pomostowania tętnic wieńcowych.

2. Monocyty pochodzące od osób o genotypie GGG/GGG i GGG/GCG charakteryzują się większą zdolnością do produkcji IL-6 po stymulacji LPS-em.

3. Nasilenie odpowiedzi zapalnej na zabieg wyrażone ilością leukocytów, neutrofili oraz aktywacją komórek zapalnych jest większe u osób o genotypie GGG/GGG.

4. Ciężkie powikłania okołooperacyjne, takie jak: zgon, zespół małego rzutu i okołooperacyjny zawał mięśnia sercowego występują częściej u osób o genotypie GGG/GGG.

WNIOSKI OGÓLNE

Uzyskane wyniki wskazują, iż ciężkie powikłania okołooperacyjne obserwowane w grupie chorych o genotypie GGG/GGG mogą być pochodną większej aktywacji komórek zapalnych oraz wzmożonego stanu zapalnego w tej grupie chorych.

Oznaczanie polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 mogłoby być w przyszłości cennym wskaźnikiem podatności na nadmierną reakcję zapalną po zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych i pozwoliłoby na zindywidualizowanie terapii lekami przeciwzapalnymi, co mogłoby znacznie ograniczyć ryzyko ciężkich powikłań w okresie okołooperacyjnym.

7. STRESZCZENIE PRACY

Liczne prace opublikowane w ostatnich latach udowodniły rolę procesu zapalnego w patogenezie zmian miażdżycowych prowadzących do rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Duże znaczenie przypisano mediatorom stanu zapalnego, w tym interleukinie 6. Uważa się, iż cytokina ta może być zarówno czynnikiem inicjującym rozwój zmian miażdżycowych we wczesnej fazie choroby, jak i podtrzymującym stan zapalny w jej późnej fazie. Badania nad polimorfizmem genu IL-6 wykazały, iż indywidualne zróżnicowanie w zdolności do produkcji IL-6 może być zależne od polimorfizmu regionu promotorowego tego genu.

Celem niniejszej pracy było określenie częstości występowania biallelicznych polimorfizmów genu IL-6 w pozycjach: -174, -572 i -597 w grupie pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i w polskiej populacji osób zdrowych oraz określenie związku polimorfizmu ze zdolnością monocytów do produkcji tej cytokiny i z nasileniem reakcji zapalnej na zabieg pomostowania tętnic wieńcowych.

Badanie obejmowało porównanie częstości występowania trzech polimorfizmów genu IL-6: -174 G\C, -572 G\C i -597 G\A. Porównano częstość występowania analizowanych polimorfizmów w grupie 318 osób chorych z chorobą niedokrwienną serca poddawanych zabiegowi pomostowania tętnic wieńcowych oraz w dobranej pod względem wieku grupie kontrolnej. Nie stwierdzono różnic w częstości występowania alleli i genotypów między badanymi grupami. W obu grupach rozkłady genotypów dla każdego z polimorfizmów nie odbiegały od rozkładu opisywanego prawem Hardy'ego-Weinberga.

Poza analizą występowania pojedynczych polimorfizmów przeanalizowano również różnice w częstości występowania haplotypów oraz złożonych genotypów genu IL-6. Stwierdzono występowanie trzech podstawowych haplotypów: GGG, AGC i GCG (oznaczanych jako allel występujący kolejno w pozycji -597, -572 i -174). Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych haplotypów między badanymi grupami, co świadczy o braku wpływu haplotypów genu IL-6 na ryzyko zachorowania na chorobę niedokrwienną.

Złożone lub inaczej poszerzone genotypy IL-6 oznaczają różne kombinacje haplotypów. Zaobserwowano występowanie sześciu podstawowych złożonych genotypów: GGG/GGG, GGG/AGC, AGC/AGC, GGG/GCG, GCG/AGC

oraz GCG/GCG. Heterozygoty dwóch podstawowych haplotypów, czyli genotyp GGG/AGC, były najczęściej występującą kombinacją haplotypów. Homozygoty GGG/GGG oraz AGC/AGC także były częste w obu populacjach. Natomiast złożone genotypy, w skład których wchodził rzadki haplotyp GCG, charakteryzowały się częstością występowania poniżej 10%. Spośród nich najczęściej spotykanym był genotyp GGG/GCG. Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie występowania złożonych genotypów między grupą chorych a grupą kontrolną. Ponadto w obu grupach rozkłady występowania poszerzonych genotypów były zgodne z rozkładem Hardy'ego-Weinberga. Podobnie jak w przypadku analizy pojedynczych polimorfizmów, haplotypy oraz złożone genotypy IL-6 wydają się nie wpływać na ryzyko zachorowania na chorobę niedokrwienną serca.

W analizowanej grupie pacjentów rozkład czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca nie różnił się istotnie między grupami o różnym genotypie IL-6. Istotne różnice wykazano tylko dla wieku chorych w momencie operacji oraz czasu trwania dławicy piersiowej, przy czym chorzy nie różnili się istotnie wiekiem w czasie wystąpienia pierwszych objawów.

Kolejnym celem niniejszej pracy była ocena wpływu polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 na zdolność monocytów krwi obwodowej do produkcji tej cytokiny. Komórki pochodzące od osób o genotypie GGG/GGG charakteryzowały się wyższą reaktywnością na LPS niż komórki pochodzące od pozostałych osób. Natomiast spontaniczna produkcja cytokiny była najniższa w komórkach pochodzących od osób o genotypie GGG/GCG. Dodatkowo oceniono wpływ jednej ze statyn (lowastatyny) na produkcję IL-6 *in vitro*. Lowastatyna hamowała zdolność monocytów do produkcji IL-6 zarówno spontanicznej, jak i indukowanej LPS-em, a efekt ten był najsilniej widoczny w przypadku komórek pochodzących od osób o genotypie GGG/GGG oraz GGG/AGC. Monocyty osób o genotypie AGC/AGC praktycznie nie reagowały na lowastatynę, charakteryzowały się także niską reaktywnością na LPS.

W dalszej części pracy oceniono wpływu polimorfizmu regionu promotorowego genu IL-6 na przebieg i nasilenie reakcji zapalnej po zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych. Określono zarówno dynamikę zmian stężenia

IL-6 w surowicy krwi, jak i dynamikę zmian parametrów morfologicznych, ekspresję markerów aktywacji, zmiany stężeń cytokin, zmiany subpopulacji monocytów. Zabieg pomostowania tętnic wywoływał znaczący wzrost stężenia IL-6 w surowicy. Trzy godziny po zabiegu obserwowany był szczyt stężenia cytokiny w surowicy krwi, a najwyższe stężenia stwierdzono u homozygot GGG/GGG. Reakcja organizmu na zabieg wiązała się również z wysoką leukocytozą, przy czym najwyższe liczby białych krwinek obserwowano u homozygot GGG/GGG, czyli osób, u których stwierdzono również największy wyrzut inteleukiny 6 w odpowiedzi na zabieg. Podobne wyniki uzyskano analizując liczbę neutrofili: homozygoty GGG/GGG charakteryzowały się większą liczbą neutrofili w okresie pooperacyjnym niż pozostali chorzy. Liczba monocytów w okresie pooperacyjnym także była wyższa u osób o genotypie GGG/GGG, z tym, że dotyczyło to wyłącznie osób poddawanych zabiegowi z użyciem krążenia pozaustrojowego.

W mniejszej grupie osób poddawanych zabiegowi z użyciem krążenia pozaustrojowego przeprowadzono także bardziej szczegółową analizę wpływu zabiegu na aktywację komórek krwi. Osoby o genotypie GGG/GGG charakteryzowały się w okresie pooperacyjnym wyższą ekspresją markera aktywacji CD11b na powierzchni monocytów, wyższym odsetkiem monocytów prozapalnych CD14+CD16+ i ich subpopulacji CD14+CD16lo oraz wyższą ekspresją cząsteczek CD14 i CD16 na subpopulacjach monocytów.

Dodatkowo przeanalizowano także występowanie ciężkich powikłań okołooperacyjnych, takich jak zgon, okołooperacyjny zawał mięśnia sercowego oraz zespół małego rzutu. Osoby o genotypie GGG/GGG, dla których stwierdzono wcześniej większy wyrzut IL-6 w okresie pooperacyjnym oraz bardziej nasiloną reakcję zapalną, charakteryzowały się także większą częstością występowania ciężkich powikłań.

Jak wynika z uzyskanych w niniejszej pracy wyników, polimorfizm genu IL-6 nie wpływa istotnie na ryzyko choroby niedokrwiennej serca, natomiast może modulować zdolność do wydzielania tej cytokiny i poprzez to wpływać na stan zapalny, co szczególnie ujawnia się w uogólnionej odpowiedzi zapalnej na zabieg operacyjny. Wykazano, iż osoby o genotypie GGG/GGG charakteryzują się większą zdolnością do produkcji IL-6 po silnej stymulacji oraz nasiloną odpowiedzią zapalną

na zabieg pomostowania tętnic wieńcowych. Co więcej, osoby te charakteryzują się także większą częstością występowania ciężkich powikłań pooperacyjnych.

Określenie wpływu czynników genetycznych na nasilenie reakcji zapalnej po zabiegu mogłoby w przyszłości pozwolić na modyfikacje skal szacowania ryzyka powikłań pooperacyjnych, jak również na indywidualizowanie terapii immunomodulacyjnych i przeciwzapalnych u pacjentów wysokiego ryzyka. Wyniki przedstawianej pracy wskazują, iż jednym z czynników genetycznych modulujących odpowiedź zapalną na zabieg pomostowania tętnic wieńcowych jest polimorfizm regionu promotorowego genu IL-6. Uzyskane rezultaty sugerują, iż osoby o genotypie GGG/GGG charakteryzujące się wysokimi stężeniami IL-6 w okresie pooperacyjnym oraz dużą reaktywnością na LPS są jednocześnie osobami narażonymi na nadmierną aktywację odpowiedzi zapalnej na zabieg oraz wystąpienie ciężkich powikłań pooperacyjnych.

8. LITERATURA

[1] Raport Światowej Organizacji Zdrowia za rok 2002. Hwww.who.intH

[2] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26.

[3] van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE. Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. Lab Invest. 1989 Aug;61(2):166-70.

[4] Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation. 2001 Jul 17;104(3):365-72.

[5] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation. 1994 May;89(5):2462-78.

[6] Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. J Clin Invest. 2001 May;107(10):1209-10.

[7] Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 May;18(5):842-51.

[8] Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. J Clin Invest. 2001 May;107(10):1255-62.

[9] Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. Mol Cell. 1998 Aug;2(2):275-81.

[10] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. J Clin Invest. 1999 Mar;103(6):773-8.

[11] Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. J Clin Invest. 1999 Oct;104(8):1041-50.

[12] Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jun 15;88(12):5252-6.

[13] Greaves DR, Gordon S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. J Lipid Res. 2005 Jan;46(1):11-20.

[14] Palkama T. Induction of interleukin-1 production by ligands binding to the scavenger receptor in human monocytes and the THP-1 cell line. Immunology. 1991 Nov;74(3):432-8.

[15] Hamilton JA, Myers D, Jessup W, Cochrane F, Byrne R, Whitty G, Moss S. Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM-CSF. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999 Jan;19(1):98-105.

[16] Hamilton JA, Jessup W, Brown AJ, Whitty G. Enhancement of macrophage survival and DNA synthesis by oxidized-low-density-lipoprotein (LDL)-derived lipids and by aggregates of lightly oxidized LDL. Biochem J. 2001 Apr 1;355(Pt 1):207-14.

[17] Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. Physiol Rev. 2003 Oct;83(4):1069-112.

[18] Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. J Atheroscler Thromb. 2003;10(5):267-74.

[19] Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. J Biol Chem. 2001 Nov 9;276(45):42468-76.

[20] Imanishi T, Han DK, Hofstra L, Hano T, Nishio I, Liles WC, Gown AM, Schwartz SM. Apoptosis of vascular smooth muscle cells is induced by Fas ligand derived from monocytes/macrophage. Atherosclerosis. 2002 Mar;161(1):143-51.

[21] Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Gomez-Hernandez A, Arribas A, Ortega L, Tunon J, Egido J. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. Stroke. 2004 Feb;35(2):458-63.

[22] Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. Circulation. 1995 Jun 1;91(11):2844-50.

[23] Lewandowski M. Stan zapalny w ostrym zespole wieńcowym. Czy statyny mogą być lekiem na całe zło? Czynniki ryzyka. 2002;4-2003;1:67-74

[24] Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billinghurst RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. Circulation. 1999 May 18;99(19):2503-9.

[25] Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. Physiol Rev. 2005 Jan;85(1):1-31.

[26] Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb. 1991 Sep-Oct;11(5):1223-30.

[27] Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, Muszynski M, Libby P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Oct;17(10):2200-8.

[28] Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996 Jan;16(1):19-27.

[29] Niemann-Jonsson A, Ares MP, Yan ZQ, Bu DX, Fredrikson GN, Branen L, Porn-Ares I, Nilsson AH, Nilsson J. Increased rate of apoptosis in intimal arterial smooth muscle cells through endogenous activation of TNF receptors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Dec;21(12):1909-14.

[30] Jander S, Sitzer M, Schumann R, Schroeter M, Siebler M, Steinmetz H, Stoll G. Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization. Stroke. 1998 Aug;29(8):1625-30.

[31] van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. Circulation. 1994 Jan;89(1):36-44.

[32] Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. Circulation. 1996 Apr 1;93(7):1354-63.

[33] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 May;20(5):1262-75.

[34] Hueb WA, Soares PR, Almeida De Oliveira S, Arie S, Cardoso RH, Wajsbrot DB, Cesar LA, Jatene AD, Ramires JA. Five-year follow-op of the medicine, angioplasty, or surgery study (MASS): A prospective, randomized trial of medical therapy, balloon angioplasty, or bypass surgery for single proximal left anterior descending coronary artery stenosis. Circulation. 1999 Nov 9;100(19 Suppl):II107-13.

[35] Hueb W, Soares PR, Gersh BJ, Cesar LA, Luz PL, Puig LB, Martinez EM, Oliveira SA, Ramires JA. The medicine, angioplasty, or surgery study (MASS-II): a randomized, controlled clinical trial of three therapeutic strategies for multivessel coronary artery disease: one-year results. J Am Coll Cardiol. 2004 May 19;43(10):1743-51.

[36] Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. Chest. 1997 Sep;112(3):676-92.

[37] Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 2000 Apr;69(4):1198-204.

[38] Biglioli P, Cannata A, Alamanni F, Naliato M, Porqueddu M, Zanobini M, Tremoli E, Parolari A. Biological effects of off-pump vs. on-pump coronary artery surgery: focus on inflammation, hemostasis and oxidative stress. Eur J Cardiothorac Surg. 2003 Aug;24(2):260-9.

[39] Gu YJ, Schoen P, Tigchelaar I, Loef BG, Ebels T, Rankin AJ, van Oeveren W. Increased neutrophil priming and sensitization before commencing cardiopulmonary bypass in cardiac surgical patients. Ann Thorac Surg. 2002 Oct;74(4):1173-9.

[40] Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochem J. 1998 Sep 1;334 (Pt 2):297-314.

[41] Bravo J, Heath JK. Receptor recognition by gp130 cytokines. EMBO J. 2000 Jun 1;19(11):2399-411.

[42] Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. Nature. 1994 Mar 24;368(6469):339-42.

[43] Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. Nature. 1992 Sep 3;359(6390):76-9.

[44] Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. Nature. 1993 Sep 2;365(6441):27-32.

[45] Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to

myocardial and hematological disorders. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jan 9;93(1):407-11

[46] Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Sep;87(18):6934-8.

[47] Ward LD, Howlett GJ, Discolo G, Yasukawa K, Hammacher A, Moritz RL, Simpson RJ. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. J Biol Chem. 1994 Sep 16;269(37):23286-9.

[48] Grotzinger J, Kurapkat G, Wollmer A, Kalai M, Rose-John S. The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. Proteins. 1997 Jan;27(1):96-109.

[49] Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. Science. 1993 Jun 18;260(5115):1808-10.

[50] Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. J Biol Chem. 1996 May 31;271(22):12991-8.

[51] Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Mar 15;90(6):2207-11.

[52] Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, Anderson KC. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. J Immunol. 1997 Sep 1;159(5):2212-21.

[53] Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. Cell. 1989 Aug 11;58(3):573-81.

[54] Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. Blood. 1993 Aug 15;82(4):1120-6.

[55] Muller-Newen G, Kuster A, Hemmann U, Keul R, Horsten U, Martens A, Graeve L, Wijdenes J, Heinrich PC. Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. J Immunol. 1998 Dec 1;161(11):6347-55.

[56] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J. 2003 Aug 15;374(Pt 1):1-20.

[57] Gaillard JP, Liautard J, Klein B, Brochier J. Major role of the soluble interleukin-6/interleukin-6 receptor complex for the proliferation of interleukin-6-dependent human myeloma cell lines. Eur J Immunol. 1997 Dec;27(12):3332-40.

[58] Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. J Bone Miner Res. 1996 Jan;11(1):88-95.

[59] Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. J Immunol. 1992 Apr 1;148(7):2175-80.

[60] Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. Cytokine. 1992 Mar;4(2):96-100.

[61] Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Gunther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. Eur J Immunol. 1993 Feb;23(2):473-80.

[62] Diamant M, Rieneck K, Mechti N, Zhang XG, Svenson M, Bendtzen K, Klein B. Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130. FEBS Lett. 1997 Jul 28;412(2):379-84.

[63] Sehgal PB, Zilberstein A, Ruggieri RM, May LT, Ferguson-Smith A, Slate DL, Revel M, Ruddle FH. Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jul;83(14):5219-22.

[64] Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, Kishimoto T. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. EMBO J. 1987 Oct;6(10):2939-45.

[65] Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature. 1986 Nov 6-12;324(6092):73-6.

[66] Ray A, Tatter SB, May LT, Sehgal PB. Activation of the human "beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6" promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonists. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Sep;85(18):6701-5.

[67] Santhanam U, Ray A, Sehgal PB. Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Sep 1;88(17):7605-9.

[68] Kishimoto T. The biology of interleukin-6. Blood. 1989 Jul;74(1):1-10

[69] Park BL, Lee HS, Kim YJ, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Shin HD. Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. Exp Mol Med. 2003 Apr 30;35(2):76-82.

[70] Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jan 18;91(2):752-6.

[71] Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science. 1995 Oct 13;270(5234):286-90.

[72] Ray A, Prefontaine KE, Ray P. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. J Biol Chem. 1994 Apr 29;269(17):12940-6.

[73] Ray P, Ghosh SK, Zhang DH, Ray A. Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. FEBS Lett. 1997 Jun 2;409(1):79-85.

[74] Vanden Berghe W, De Bosscher K, Boone E, Plaisance S, Haegeman G. The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. J Biol Chem. 1999 Nov 5;274(45):32091-8.

[75] Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. EMBO J. 1999 Sep 15;18(18):4969-80.

[76] Bank U, Kupper B, Reinhold D, Hoffmann T, Ansorge S. Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. FEBS Lett. 1999 Nov 19;461(3):235-40.

[77] Bank U, Kupper B, Ansorge S. Inactivation of interleukin-6 by neutrophil proteases at sites of inflammation. Protective effects of soluble IL-6 receptor chains. Adv Exp Med Biol. 2000;477:431-7.

[78] Castell JV, Geiger T, Gross V, Andus T, Walter E, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-

6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. Eur J Biochem. 1988 Nov 1;177(2):357-61.

[79] Sonne O, Davidsen O, Moller BK, Munck Petersen C. Cellular targets and receptors for interleukin-6. I. In vivo and in vitro uptake of IL-6 in liver and hepatocytes. Eur J Clin Invest. 1990 Aug;20(4):366-76.

[80] Nesbitt JE, Fuller GM. Dynamics of interleukin-6 internalization and degradation in rat hepatocytes. J Biol Chem. 1992 Mar 25;267(9):5739-42.

[81] Jostock T, Mullberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. Eur J Biochem. 2001 Jan;268(1):160-7.

[82] Barton BE. The biological effects of interleukin 6. Med Res Rev. 1996 Jan;16(1):87-109.

[83] Mayer P, Geissler K, Valent P, Ceska M, Bettelheim P, Liehl E. Recombinant human interleukin 6 is a potent inducer of the acute phase response and elevates the blood platelets in nonhuman primates. Exp Hematol. 1991 Aug;19(7):688-96.

[84] Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. J Exp Med. 1988 Feb 1;167(2):332-44.

[85] Tosato G, Pike SE. Interferon-beta 2/interleukin 6 is a co-stimulant for human T lymphocytes. J Immunol. 1988 Sep 1;141(5):1556-62.

[86] Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec;84(24):9035-9.

[87] Leary AG, Ikebuchi K, Hirai Y, Wong GG, Yang YC, Clark SC, Ogawa M. Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. Blood. 1988 Jun;71(6):1759-63.

[88] Asano S, Okano A, Ozawa K, Nakahata T, Ishibashi T, Koike K, Kimura H, Tanioka Y, Shibuya A, Hirano T, et al. In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. Blood. 1990 Apr 15;75(8):1602-5.

[89] Hill RJ, Warren MK, Levin J. Stimulation of thrombopoiesis in mice by human recombinant interleukin 6. J Clin Invest. 1990 Apr;85(4):1242-7.

[90] Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C, Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. Neurosci Lett. 1989 Oct 9;104(3):340-4.

[91] Perlstein RS, Mougey EH, Jackson WE, Neta R. Interleukin-1 and interleukin-6 act synergistically to stimulate the release of adrenocorticotropic hormone in vivo. Lymphokine Cytokine Res. 1991 Apr;10(1-2):141-6.

[92] Perlstein RS, Whitnall MH, Abrams JS, Mougey EH, Neta R. Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. Endocrinology. 1993 Mar;132(3):946-52.

[93] Kharazmi A, Nielsen H, Rechnitzer C, Bendtzen K. Interleukin 6 primes human neutrophil and monocyte oxidative burst response. Immunol Lett. 1989 May;21(2):177-84.

[94] Luger TA, Krutmann J, Kirnbauer R, Urbanski A, Schwarz T, Klappacher G, Kock A, Micksche M, Malejczyk J, Schauer E, et al. IFN-beta 2/IL-6 augments the activity of human natural killer cells. J Immunol. 1989 Aug 15;143(4):1206-9

[95] Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. Trends Immunol. 2003 Jan;24(1):25-9.

[96] Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. Blood. 1990 Jan 1;75(1):40-7.

[97] Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. Blood. 1994 Jan 1;83(1):113-8.

[98] Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. J Clin Endocrinol Metab. 1993 Dec;77(6):1690-4.

[99] Barton BE, Jackson JV. Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. Infect Immun. 1993 Apr;61(4):1496-9.

[100] Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. J Clin Invest. 1998 Jan 15;101(2):311-20.

[101] Bataille R, Jourdan M, Zhang XG, Klein B. Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. J Clin Invest. 1989 Dec;84(6):2008-11.

[102] Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Portier M, Lu ZY, Wijdenes J, Brochier J, Bataille R. Interleukin-6 is the central tumor growth factor in vitro

and in vivo in multiple myeloma. Eur Cytokine Netw. 1990 Oct-Nov;1(4):193-201.

[103] Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, Kurzrock R. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. Blood. 2001 Jan 1;97(1):256-63.

[104] Manolagas SC. The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. Ann N Y Acad Sci. 1998 May 1;840:194-204.

[105] Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, Yolk B, Berger M. Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. FEBS Lett. 1991 Jul 8;285(1):111-4.

[106] Bauer J, Ganter U, Strauss S, Stadtmuller G, Frommberger U, Bauer H, Volk B, Berger M. The participation of interleukin-6 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Res Immunol. 1992 Jul-Aug;143(6):650-7.

[107] Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. Arthritis Rheum. 1988 Jun;31(6):784-8.

[108] Swaak AJ, van Rooyen A, Aarden LA. Interleukin-6 (IL-6) and acute phase proteins in the disease course of patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatol Int. 1989;8(6):263-8.

[109] Loppnow H, Libby P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. J Clin Invest. 1990 Mar;85(3):731-8.

[110] Beasley D. Phorbol ester and interleukin-1 induce interleukin-6 gene expression in vascular smooth muscle cells via independent pathways. J Cardiovasc Pharmacol. 1997 Mar;29(3):323-30.

[111] Zohlnhofer D, Brand K, Schipek K, Pogatsa-Murray G, Schomig A, Neumann FJ. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1beta-dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Feb;20(2):353-9.

[112] Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. Atherosclerosis. 1996 Dec 20;127(2):263-71.

[113] Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T, Kano S, Shimada K. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. Cytokine. 1994 Jan;6(1):87-91.

[114] Ikeda U, Ikeda M, Seino Y, Takahashi M, Kano S, Shimada K. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of genetically hyperlipidemic rabbits. Atherosclerosis. 1992 Feb;92(2-3):213-8

[115] Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1993;423(6):433-42.

[116] Sukovich DA, Kauser K, Shirley FD, DelVecchio V, Halks-Miller M, Rubanyi GM. Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta-estradiol. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 Sep;18(9):1498-505.

[117] Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999 Oct;19(10):2364-7.

[118] Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. Circulation. 2004 Nov 30;110(22):3493-500.

[119] Cochran FR, Finch-Arietta MB. Interleukin-6 can prime THP-1 macrophages for enhanced production of tumor necrosis factor-alpha in response to LPS. Immunopharmacology. 1992 Mar-Apr;23(2):97-103.

[120] Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, Mengozzi M, Cota M, Polentarutti N, Mantovani A, Lazzarin A, Sozzani S, Poli G. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. Blood. 1998 Jan 1;91(1):258-65

[121] Nabata T, Morimoto S, Koh E, Shiraishi T, Ogihara T. Interleukin-6 stimulates c-myc expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. Biochem Int. 1990;20(3):445-53.

[122] Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y, Kano S. Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. Am J Physiol. 1991 May;260(5 Pt 2):H1713-7.

[123] Wang Z, Newman WH. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. J Surg Res. 2003 May 15;111(2):261-6.

[124] Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T, Aviram M. Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Sep;21(9):1464-9.

[125] Liao HS, Matsumoto A, Itakura H, Doi T, Honda M, Kodama T, Geng YJ. Transcriptional inhibition by interleukin-6 of the class A macrophage scavenger receptor in macrophages derived from human peripheral monocytes and the THP-1 monocytic cell line. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999 Aug;19(8):1872-80.

[126] Tappia PS, Troughton KL, Langley-Evans SC, Grimble RF. Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defences. Clin Sci (Lond). 1995 Apr;88(4):485-9

[127] Vallance P, Collier J, Bhagat K. Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link? Lancet. 1997 May 10;349(9062):1391-2.

[128] Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. Life Sci. 2000 Jun 8;67(3):291-300.

[129] Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. JAMA. 2001 Jul 18;286(3):327-34.

[130] Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH Jr, Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. Am J Med. 1999 May;106(5):506-12.

[131] Volpato S, Guralnik JM, Ferrucci L, Balfour J, Chaves P, Fried LP, Harris TB. Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women: the women's health and aging study. Circulation. 2001 Feb 20;103(7):947-53.

[132] Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. Circulation. 2000 Apr 18;101(15):1767-72.

[133] Formato M, Farina M, Spirito R, Maggioni M, Guarino A, Cherchi GM, Biglioli P, Edelstein C, Scanu AM. Evidence for a proinflammatory and proteolytic environment in plaques from endarterectomy segments of human carotid arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Jan;24(1):129-35.

[134] Yamagami H, Kitagawa K, Nagai Y, Hougaku H, Sakaguchi M, Kuwabara K, Kondo K, Masuyama T, Matsumoto M, Hori M. Higher levels of interleukin-6 are associated with lower echogenicity of carotid artery plaques. Stroke. 2004 Mar;35(3):677-81.

[135] Biasucci LM, Liuzzo G, Fantuzzi G, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Ginnetti F, Dinarello CA, Maseri A. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with

increased risk of in-hospital coronary events. Circulation. 1999 Apr 27;99(16):2079-84.

[136] Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, Gallimore JR, Caligiuri G, Vitelli A, Altamura S, Ciliberto G, Rebuzzi AG, Crea F, Pepys MB, Maseri A. Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. Circulation. 1998 Dec 1;98(22):2370-6.

[137] Prondzinsky R, Knupfer A, Loppnow H, Redling F, Lehmann DW, Stabenow I, Witthaut R, Unverzagt S, Radke J, Zerkowski HR, Werdan K. Surgical trauma affects the proinflammatory status after cardiac surgery to a higher degree than cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 2005 Apr;129(4):760-6.

[138] Dybdahl B, Wahba A, Haaverstad R, Kirkeby-Garstad I, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. On-pump versus off-pump coronary artery bypass grafting: more heat-shock protein 70 is released after on-pump surgery. Eur J Cardiothorac Surg. 2004 Jun;25(6):985-92.

[139] Czerny M, Baumer H, Kilo J, Lassnigg A, Hamwi A, Vukovich T, Wolner E, Grimm M. Inflammatory response and myocardial injury following coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. Eur J Cardiothorac Surg. 2000 Jun;17(6):737-42.

[140] Fransen E, Maessen J, Dentener M, Senden N, Geskes G, Buurman W. Systemic inflammation present in patients undergoing CABG without extracorporeal circulation. Chest. 1998 May;113(5):1290-5.

[141] Diegeler A, Doll N, Rauch T, Haberer D, Walther T, Falk V, Gummert J, Autschbach R, Mohr FW. Humoral immune response during coronary artery bypass grafting: A comparison of limited approach, "off-pump" technique, and conventional cardiopulmonary bypass. Circulation. 2000 Nov 7;102(19 Suppl 3):III95-100.

[142] Franke A, Lante W, Fackeldey V, Becker HP, Kurig E, Zoller LG, Weinhold C, Markewitz A. Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know? Eur J Cardiothorac Surg. 2005 Oct;28(4):569-75.

[143] Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, Merrick SH, Keith FM, Bronstein MH, Leung JM, Mangano DT, Greenfield LJ, Rankin JS. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994 Oct;108(4):626-35.

[144] Smith SC Jr, Greenland P, Grundy SM. AHA Conference Proceedings. Prevention conference V: Beyond secondary prevention: Identifying the high-risk patient for primary prevention: executive summary. American Heart Association. Circulation. 2000 Jan 4-11;101(1):111-6.

[145] Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. Circulation. 2004 Sep 28;110(13):1868-73.

[146] Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996 Oct;16(10):1250-5.

[147] O'Malley JP, Maslen CL, Illingworth DR. Angiotensin-converting enzyme DD genotype and cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. Circulation. 1998 May 12;97(18):1780-3.

[148] Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. Atherosclerosis. 1997 Dec;135(2):145-59.

[149] Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. Circulation. 2004 Mar 23;109(11):1359-65.

[150] Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The 4G4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. Thromb Haemost. 1999 Sep;82(3):1121-6.

[151] Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. J Biol Chem. 2000 Jun 16;275(24):18138-44.

[152] Bowcock AM, Ray A, Erlich H, Sehgal PB. Rapid detection and sequencing of alleles in the 3' flanking region of the interleukin-6 gene. Nucleic Acids Res. 1989 Sep 12;17(17):6855-64.

[153] Ray A, LaForge KS, Sehgal PB. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. Mol Cell Biol. 1990 Nov;10(11):5736-46.

[154] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest. 1998 Oct 1;102(7):1369-76.

[155] Liu Y, Bernard HU, Apt D. NFI-B3, a novel transcriptional repressor of the nuclear factor I family, is generated by alternative RNA processing. J Biol Chem. 1997 Apr 18;272(16):10739-45.

[156] Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG. A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. J Interferon Cytokine Res. 2000 Oct;20(10):885-8.

[157] Ogilvie EM, Fife MS, Thompson SD, Twine N, Tsoras M, Moroldo M, Fisher SA, Lewis CM, Prieur AM, Glass DN, Woo P. The -174G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children: a multicenter study using simplex and multiplex juvenile idiopathic arthritis families. Arthritis Rheum. 2003 Nov;48(11):3202-6.

[158] Marshall SE, McLaren AJ, McKinney EF, Bird TG, Haldar NA, Bunce M, Morris PJ, Welsh KI. Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation. Transplantation. 2001 Feb 15;71(3):469-76.

[159] Greisenegger S, Endler G, Haering D, Schillinger M, Lang W, Lalouschek W, Mannhalter C. The (-174) G/C polymorphism in the interleukin-6 gene is associated with the severity of acute cerebrovascular events. Thromb Res. 2003 Jun 1;110(4):181-6.

[160] Lieb W, Pavlik R, Erdmann J, Mayer B, Holmer SR, Fischer M, Baessler A, Hengstenberg C, Loewel H, Doering A, Riegger GA, Schunkert H. No association of interleukin-6 gene polymorphism (-174 G/C) with myocardial infarction or traditional cardiovascular risk factors. Int J Cardiol. 2004 Nov;97(2):205-12.

[161] Antonicelli R, Olivieri F, Bonafe M, Cavallone L, Spazzafumo L, Marchegiani F, Cardelli M, Recanatini A, Testarmata P, Boemi M, Parati G, Franceschi C. The interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphism is associated with a higher risk of death after an acute coronary syndrome in male elderly patients. Int J Cardiol. 2005 Sep 1;103(3):266-71.

[162] Libra M, Signorelli SS, Bevelacqua Y, Navolanic PM, Bevelacqua V, Polesel J, Talamini R, Stivala F, Mazzarino MC, Malaponte G. Analysis of G(-174)C IL-6 polymorphism and plasma concentrations of inflammatory markers in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. J Clin Pathol. 2006 Feb;59(2):211-5.

[163] Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine. 6th edition. 2001.

[164] Roques F, Nashef SA, Michel P, Gauducheau E, de Vincentiis C, Baudet E, Cortina J, David M, Faichney A, Gabrielle F, Gams E, Harjula A, Jones MT, Pintor PP, Salamon R, Thulin L. Risk factors and outcome in European cardiac surgery: analysis of the EuroSCORE multinational database of 19030 patients. Eur J Cardiothorac Surg. 1999 Jun;15(6):816-22

[165] Jakobisiak M, Bruno S, Skierski JS, Darzynkiewicz Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 May 1;88(9):3628-32.

[166] Myśliwska J, Bryl E, Zorena K, Balon J, Foerster J, Myśliwski A. Overactivity of tumor necrosis factor-alpha but not interleukin 6 is associated with low natural killer cytotoxic activity in the elderly. Gerontology. 1997;43(3):158-67.

[167] Myśliwska J, Bryl E, Foerster J, Myśliwski A. Increase of interleukin 6 and decrease of interleukin 2 production during the ageing process are influenced by the health status. Mech Ageing Dev. 1998 Feb 16;100(3):313-28.

[168] Rachoń D, Myśliwska J, Suchecka-Rachoń K, Więckiewicz J, Mysliwski A. Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women. J Endocrinol. 2002 Feb;172(2):387-95.

[169] Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Bohm BO, Wieland H, Marz W. The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin-6, coronary artery disease, and myocardial infarction. J Mol Med. 2002 Aug;80(8):507-13.

[170] Sie MP, Sayed-Tabatabaei FA, Oei HH, Uitterlinden AG, Pols HA, Hofman A, van Duijn CM, Witteman JC. Interleukin 6 -174 g/c promoter polymorphism and risk of coronary heart disease: results from the rotterdam study and a meta-analysis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Jan;26(1):212-7.

[171] Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. Eur Heart J. 2001 Dec;22(24):2243-52.

[172] Georges JL, Loukaci V, Poirier O, Evans A, Luc G, Arveiler D, Ruidavets JB, Cambien F, Tiret L. Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde. J Mol Med. 2001 Jun;79(5-6):300-5.

[173] Kurzawski M, Pawlik A, Czerny B, Domanski L, Rozanski J, Drozdzik M. Frequencies of the common promoter polymorphisms in cytokine genes in a Polish population. Int J Immunogenet. 2005 Oct;32(5):285-91.

[174] Nieters A, Brems S, Becker N. Cross-sectional study on cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cell stimulation and clinical parameters in a random sample of a German population. Hum Genet. 2001 Mar;108(3):241-8.

[175] Donn RP, Barrett JH, Farhan A, Stopford A, Pepper L, Shelley E, Davies N, Ollier WE, Thomson W. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. British Paediatric Rheumatology Study Group. Arthritis Rheum. 2001 Apr;44(4):802-10.

[176] Poli F, Nocco A, Berra S, Scalamogna M, Taioli E, Longhi E, Sirchia G. Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population. Eur J Immunogenet. 2002 Jun;29(3):237-40.

[177] Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. Am J Transplant. 2002 Jul;2(6):560-7.

[178] Lim CS, Zheng S, Kim YS, Ahn C, Han JS, Kim S, Lee JS, Chae DW. The -174 G to C polymorphism of interleukin-6 gene is very rare in koreans. Cytokine. 2002 Jul 7;19(1):52-4.

[179] Zhai R, Liu G, Yang C, Huang C, Wu C, Christiani DC. The G to C polymorphism at -174 of the interleukin-6 gene is rare in a Southern Chinese population. Pharmacogenetics. 2001 Nov;11(8):699-701.

[180] Marshall SE, McLaren AJ, Haldar NA, Bunce M, Morris PJ, Welsh KI. The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation. Transplantation. 2000 Nov 27;70(10):1485-91.

[181] Delaney NL, Esquenazi V, Lucas DP, Zachary AA, Leffell MS. TNF-alpha, TGF-beta, IL-10, IL-6, and INF-gamma alleles among African Americans and Cuban Americans. Report of the ASHI Minority Workshops: Part IV. Hum Immunol. 2004 Dec;65(12):1413-9.

[182] Rady PL, Matalon R, Grady J, Smith EM, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tyring SK, Hughes TK. Comprehensive analysis of genetic polymorphisms in the interleukin-10 promoter: implications for immune regulation in specific ethnic populations. Genet Test. 2004 Summer;8(2):194-203.

[183] Bauer J, Ganter U, Geiger T, Jacobshagen U, Hirano T, Matsuda T, Kishimoto T, Andus T, Acs G, Gerok W, et al. Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. Blood. 1988 Oct;72(4):1134-40.

[184] Olivieri F, Bonafe M, Cavallone L, Giovagnetti S, Marchegiani F, Cardelli M, Mugianesi E, Giampieri C, Moresi R, Stecconi R, Lisa R, Franceschi C. The -174 C/G locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging. Exp Gerontol. 2002 Jan-Mar;37(2-3):309-14.

[185] Rea IM, Ross OA, Armstrong M, McNerlan S, Alexander DH, Curran MD, Middleton D. Interleukin-6-gene C/G 174 polymorphism in nonagenarian and octogenarian subjects in the BELFAST study. Reciprocal effects on IL-6, soluble IL-6 receptor and for IL-10 in serum and monocyte supernatants. Mech Ageing Dev. 2003 Apr;124(4):555-61.

[186] Rivera-Chavez FA, Peters-Hybki DL, Barber RC, O'Keefe GE. Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. Shock. 2003 Sep;20(3):218-23.

[187] Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothroboic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. JAMA 1998; 279:1643-1650

[188] Casey PJ. Protein lipidation in cell signaling. Science. 1995; 268: 221-225

[189] Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Muller MR, Husslein P, Kashanipour A, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Jul 1;22(7):1194-9.

[190] Huang KC, Chen CW, Chen JC, Lin WW. Statins induce suppressor of cytokine signaling-3 in macrophages. FEBS Lett. 2003 Dec 4;555(2):385-9.

[191] Luo Y, Jiang D, Wen D, Yang J, Li L. Changes in serum interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with acute coronary syndrome and their responses to simvastatin. Heart Vessels. 2004 Nov;19(6):257-62.

[192] Sola S, Mir MQ, Rajagopalan S, Helmy T, Tandon N, Khan BV. Statin therapy is associated with improved cardiovascular outcomes and levels of inflammatory markers in patients with heart failure. J Card Fail. 2005 Oct;11(8):607-12.

[193] Basso F, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Humphries SE. Interleukin-6 -174G>C polymorphism and risk of coronary heart disease in West of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Apr 1;22(4):599-604.

[194] Merino A, Gaya A, Segura I, Calvo J, Imizcoz C, Berenguel A, Alegria E. Platelet aggregation inhibition blocks C-reactive protein and interleukin-6 (IL-6) elevation after the coronary angioplasty: effect of the -174 G/C IL-6 gene polymorphism. Am J Cardiol. 2004 Nov 15;94(10):1300-3.

[195] Burzotta F, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Glieca F, Luciani N, Zamparelli R, Schiavello R, Donati MB, Maseri A, Possati G, Andreotti F. Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. Am J Cardiol. 2001 Nov 15;88(10):1125-8.

[196] Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, Lowe GD, Humphries SE. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Sep;21(9):1458-63.

[197] Gogo PB Jr, Schneider DJ, Terrien EF, Watkins MW, Sobel BE, Dauerman HL. Relation of leukocytosis to C-reactive protein and interleukin-6 among patients undergoing percutaneous coronary intervention. Am J Cardiol. 2005 Aug 15;96(4):538-42.

[198] Leng S, Xue QL, Huang Y, Semba R, Chaves P, Bandeen-Roche K, Fried L, Walston J. Total and differential white blood cell counts and their associations with circulating interleukin-6 levels in community-dwelling older women. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2005 Feb;60(2):195-9.

[199] Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. J Exp Med. 1991 Dec 1;174(6):1549-55.

[200] de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med. 1991 Nov 1;174(5):1209-20.

[201] Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. J Exp Med. 1993 Dec 1;178(6):2207-11.

[202] Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. Eur J Immunol. 1998 Jan;28(1):359-69.

[203] 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 Mar;19(3):611-6.

[204] Song S, Ling-Hu H, Roebuck KA, Rabbi MF, Donnelly RP, Finnegan A. Interleukin-10 inhibits interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 gene transcription in human monocytes. Blood. 1997 Jun 15;89(12):4461-9.

[205] de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med. 1991 Oct 1;174(4):915-24.

[206] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med. 1989 Dec 1;170(6):2081-95.

[207] Lindner H, Holler E, Gerbitz A, Johnson JP, Bornkamm GW, Eissner G. Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: interleukin-10 protects against transendothelial migration. Transplantation. 1997 Nov 15;64(9):1370-3.

[208] Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL. Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 1996 Sep;112(3):806-11.

[209] Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, Barvais L, Huynh CH, Deviere J, DeSmet JM, Vincent JL. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. Am Heart J. 1997 Mar;133(3):335-9.

[210] Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 2003 Feb;75(2):S715-20.

[211] Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, Mathew J, Hines R, Smith BR. Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. Blood. 1992 Mar 1;79(5):1201-5.

[212] Mathew JP, Rinder CS, Tracey JB, Auszura LA, O'Connor T, Davis E, Smith BR. Acadesine inhibits neutrophil CD11b up-regulation in vitro and during in vivo cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg. 1995 Mar;109(3):448-56.

[213] Levy JH, Pifarre R, Schaff HV, Horrow JC, Albus R, Spiess B, Rosengart TK, Murray J, Clark RE, Smith P. A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of aprotinin for reducing blood loss and the requirement for donor-blood transfusion in patients undergoing repeat coronary artery bypass grafting. Circulation. 1995 Oct 15;92(8):2236-44.

[214] Alonso A, Whitten CW, Hill GE. Pump prime only aprotinin inhibits cardiopulmonary bypass-induced neutrophil CD11b up-regulation. Ann Thorac Surg. 1999 Feb;67(2):392-5.

[215] Fontes ML, Mathew JP, Rinder HM, Zelterman D, Smith BR, Rinder CS; Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group. Atrial fibrillation after cardiac surgery/cardiopulmonary bypass is associated with monocyte activation. Anesth Analg. 2005 Jul;101(1):17-23

[216] Rinder CS, Fontes M, Mathew JP, Rinder HM, Smith BR; Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. Neutrophil CD11b upregulation during cardiopulmonary bypass is associated with postoperative renal injury. Ann Thorac Surg. 2003 Mar;75(3):899-905.

[217] Duits AJ, Jainandunsing SM, van de Winkel JG, Capel PJ. Selective enhancement of Leu-CAM expression by interleukin 6 during differentiation of human promonocytic U937 cells. Scand J Immunol. 1991;33(2):151-9.

[218] Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. Nat Med. 2002 Nov;8(11):1218-26.

[219] Ludewig B, Laman JD. The in and out of monocytes in atherosclerotic plaques: Balancing inflammation through migration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug 10; 101(32): 11529-11530.

[220] Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. Immunity. 1999 Dec;11(6):753-61.

[221] Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. Science. 1998 Oct 16;282(5388):480-3.

[222] Llodra J, Angeli V, Liu J, Trogan E, Fisher EA, Randolph GJ. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug 10;101(32):11779-84.

[223] Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. J Exp Med. 2002 Aug 19;196(4):517-27

[224] Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Fingerle G, Schlunck T, Pforte A, Blumenstein M, Haas JG. Small (CD14+/CD16+) monocytes and regular monocytes in human blood. Pathobiology. 1991;59(3):127-30.

[225] Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Kieper D, Fingerle G, Schlunck T, Petersmann I, Ellwart J, Blumenstein M, Haas JG. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. Blood. 1992 Jan 15;79(2):503-11.

[226] Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. Eur J Immunol. 1993 Sep;23(9):2053-8.

[227] Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. Blood. 1993 Nov 15;82(10):3170-6.

[228] Pulliam L, Gascon R, Stubblebine M, McGuire D, McGrath MS. Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. Lancet. 1997 Mar 8;349(9053):692-5.

[229] Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. Infect Immun. 1998 Jun;66(6):2782-90.

[230] Rivier A, Pene J, Rabesandratana H, Chanez P, Bousquet J, Campbell AM. Blood monocytes of untreated asthmatics exhibit some features of tissue macrophages. Clin Exp Immunol. 1995 May;100(2):314-8.

[231] Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. Thromb Haemost. 2004 Aug;92(2):419-24.

[232] Hiesmayr MJ, Spittler A, Lassnigg A, Berger R, Laufer G, Kocher A, Artemiou O, Boltz-Nitulescu G, Roth E. Alterations in the number of circulating leucocytes, phenotype of monocyte and cytokine production in patients undergoing cardiothoracic surgery. Clin Exp Immunol. 1999 Feb;115(2):315-23.

[233] Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996 Dec;16(12):1437-47.

[234] Meerschaert J, Furie MB. The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. J Immunol. 1995 Apr 15;154(8):4099-112.

[235] Chuluyan HE, Issekutz AC. VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18-independent transendothelial migration of human monocytes. J Clin Invest. 1993 Dec;92(6):2768-77.

[236] Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. Infect Immun. 1996 May;64(5):1762-9.

[237] Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. Cell. 1998 Apr 17;93(2):241-52.

[238] Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. Cell. 1998 Apr 17;93(2):229-40.

[239] Lee WH, Lee Y, Jeong JO, Lee SY, Choi YH, Park JE. Activation of CD14 on circulating monocytes in patients with acute coronary syndrome. Int J Cardiol. 2001 Sep-Oct;80(2-3):135-42.

[240] Stefanou DC, Asimakopoulos G, Yagnik DR, Haskard DO, Anderson JR, Philippidis P, Landis RC, Taylor KM. Monocyte Fc gamma receptor expression in patients undergoing coronary artery bypass grafting. Ann Thorac Surg. 2004 Mar;77(3):951-5.

[241] Zahler S, Massoudy P, Hartl H, Hahnel C, Meisner H, Becker BF. Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass. Cardiovasc Res. 1999 Mar;41(3):722-30.

[242] Mitani H, Katayama N, Araki H, Ohishi K, Kobayashi K, Suzuki H, Nishii K, Masuya M, Yasukawa K, Minami N, Shiku H. Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. Br J Haematol. 2000 May;109(2):288-95.

[243] Calzada-Wack JC, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW. Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. J Inflamm. 1996;46(2):78-85.

[244] Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. Nat Immunol. 2000 Dec;1(6):510-4.

[245] Stohr J, Schindler G, Rothe G, Schmitz G. Enhanced upregulation of the Fc gamma receptor IIIa (CD16a) during in vitro differentiation of ApoE4/4 monocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 Sep;18(9):1424-32.

[246] Kapinsky M, Torzewski M, Buchler C, Duong CQ, Rothe G, Schmitz G. Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14(high) CD16(+) monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Jun;21(6):1004-10.

[247] Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 1993 Feb;55(2):552-9.

[248] Gaudino M, Di Castelnuovo A, Zamparelli R, Andreotti F, Burzotta F, Iacoviello L, Glieca F, Alessandrini F, Nasso G, Donati MB, Maseri A, Schiavello R, Possati G. Genetic control of postoperative systemic inflammatory reaction and pulmonary and renal complications after coronary artery surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Oct;126(4):1107-12.

[249] Stafford-Smith M, Podgoreanu M, Swaminathan M, Phillips-Bute B, Mathew JP, Hauser EH, Winn MP, Milano C, Nielsen DM, Smith M, Morris R, Newman MF, Schwinn DA; Perioperative Genetics and Safety Outcomes Study (PEGASUS) Investigative Team. Association of genetic polymorphisms with risk of renal injury after coronary bypass graft surgery. Am J Kidney Dis. 2005 Mar;45(3):519-30.

[250] Gogbashian A, Sedrakyan A, Treasure T. EuroSCORE: a systematic review of international performance. Eur J Cardiothorac Surg. 2004 May;25(5):695-700.