**UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU**

**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ**



**Paweł Kiszło**

Rozprawa doktorska

**Przydatność diagnostyczna chemokin RANTES**

**i CCL2 w chorobie niedokrwiennej serca**

**Promotor: dr hab. n. med. Violetta Dymicka-Piekarska**

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej

**Promotor pomocniczy:** **dr n. med. Olga M. Koper-Lenkiewicz**

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej

**Kierownik Zakładu: prof. zw. dr hab. n. med. Halina Kemona**

Białystok 2018

**7.STRESZCZENIE**

Dane Eurostatu z 2010 roku donoszą, iż wciąż wiodącą przyczyną zgonów na świecie są choroby układu krążenia, które najczęściej manifestują się, jako zawał serca lub udar mózgu. Związane jest to ze starzeniem się społeczeństwa oraz wzrostem częstości występowania czynników ryzyka takich jak: otyłość, nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia, cukrzyca typu 2, zespół metaboliczny, mała aktywność fizyczna, palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu.

Do zawału mięśnia sercowego dochodzi głównie na tle miażdżycy tętnic wieńcowych, w wyniku pęknięcia, owrzodzenia lub rozwarstwienia blaszki miażdżycowej. Dotychczasowe badania wykazały, że kluczowym dla rozwoju miażdżycy jest proces zapalny. Natomiast najnowsze badania wskazują, że wśród licznych czynników biorących udział w tym procesie, chemokiny, jako białka należące do rodziny cytokin, aktywnie uczestniczą w różnych etapach formowania się blaszki miażdżycowej. Mają zdolność do adhezji, chemotaksji i aktywacji leukocytów, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Działanie tych cząsteczek zachodzi poprzez pobudzenie specyficznych receptorów powierzchniowych, tzw. receptorów chemokinowych. Spośród licznych chemokin znaczącą, choć nie do końca poznaną rolę w patomechanizmie powstawania ostrych zespołów wieńcowych przypisuje się chemokinom RANTES i CCL2.

Celem badania była ocena przydatności diagnostycznej chemokin RANTES i CCL2, jako wskaźników rozwoju zmian miażdżycowych w chorobie niedokrwiennej serca.

Badania przeprowadzono u 84 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (OZW), podzielonych na dwie podgrupy STEMI i NSTEMI, oraz u 33 chorych ze stabilną chorobą wieńcową (SA, *stable angina*), hospitalizowanych i diagnozowanych w Klinice Kardiologii i Kardiochirurgii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku w latach 2015-2017. Pacjenci z OZW przeszli zabiegi inwazyjne: koronarografię i angioplastykę w ostrej fazie zawału mięśnia sercowego. Grupę kontrolną (K) stanowiło 21 zdrowych osób, pod względem wieku i płci zbliżonych do grupy badanej, bez objawów choroby sercowo-naczyniowej.

Kryteriami włączenia do grupy badanej były takie czynniki jak: 1) wiek pacjenta między 18 a 80 rokiem życia, 2) obecność w koronarografii istotnego zwężenia tętnicy wieńcowej (zwężenie światła naczynia o >50%), 3) ocena funkcji skurczowej lewej komory w przezklatkowym badaniu echokardiograficznym. Rozpoznanie zawału serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI) i bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI) zostało postawione na podstawie najnowszych wytycznych Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Ponadto u wszystkich chorych oceniono wybrane kliniczne i biochemiczne czynniki ryzyka rozwoju i progresji miażdżycy.

Na przeprowadzenie badań zgodę wyraziła Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, uchwała nr N/ST/ZB/17/001/2209.

Stężenie RANTES i CCL2 oceniano ilościowo w osoczu ubogopłytkowym (PPP) za pomocą testu ELISA, przy użyciu zestawów firmy R&D Systems. Materiałem do badań była krew żylna pobierana w momencie przyjęcia do szpitala przed rewaskularyzacją wieńcową. Do oznaczenia chemokin RANTES i CCL2 pobierano 3 ml krwi systemem zamkniętym Monovette (SARSTEDT) do probówek zawierających 3,2% cytrynian sodu jako antykoagulant. Następnie w ciągu 30 minut od pobrania krew do badania stężenia RANTES dwukrotnie odwirowywano, w celu uzyskania osocza ubogopłytkowego (PPP). Krew do badania stężenia CCL2 była poddawana tylko pierwszemu wirowaniu. Próbki natychmiast mrożono w temp. -75°C do czasu wykonywania oznaczeń. Do oznaczenia badań biochemicznych: wysokoczułej troponiny I, hsCRP, cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, cholesterolu HDL, triglicerydów, glukozy i kreatyniny pobierano 5,5 ml krwi do probówek Monovette bez antykoagulantu, na skrzep. Do oznaczenia morfologii pobierano 2,7 ml krwi żylnej do probówek zawierających EDTA-K2 . Powyższe parametry biochemiczne zostały oznaczone rutynowo w momencie przyjęcia pacjenta, za pomocą standardowych metod laboratoryjnych w certyfikowanym laboratorium Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego.

W grupie chorych z OZW mediana stężenia RANTES była prawie 3-krotnie wyższa, natomiast w grupie chorych z SA ponad 3-krotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej i były to różnice wysoce istotne statystycznie (p<0,001). Zarówno w grupie chorych z zawałem STEMI jak i NSTEMI stężenie RANTES było znamiennie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio, p=0,002; p<0,001) (Rycina 11). Analiza statystyczna wykazała także wyższe stężenie RANTES w grupie chorych ze stabilną chorobą wieńcową w porównaniu do chorych z OZW, ale nie były to różnice istotne statystycznie. Stężenie RANTES było wyższe w grupie chorych z zawałem NSTEMI w porównaniu do grupy z STEMI, ale nie były to także różnice istotne statystycznie.

W grupie chorych z OZW jak i z SA mediana stężenia CCL2 była wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej i były to różnice istotne statystycznie (odpowiednio, p=0,018; p=0,016) (Rycina 12). Ponadto stężenie CCL2 zarówno w grupie chorych z zawałem STEMI jak i NSTEMI było wyższe niż w grupie osób zdrowych, ale różnica istotna statystycznie występowała tylko w grupie chorych z zawałem NSTEMI (p=0,017) (Rycina 13). Stężenie CCL2 u chorych z SA było wyższe w porównaniu do chorych z OZW, jednak nie były to różnice istotne statystycznie.

Uzyskane wyniki badań sugerują, iż wzrost stężenia RANTES i CCL2 zarówno u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego jak i stabilną chorobą wieńcową w porównaniu do osób zdrowych może wskazywać na zaangażowanie tych cząsteczek w powstawaniu procesu miażdżycowego. Badane chemokiny są bardziej wskaźnikami przewlekłego procesu zapalnego, co może potwierdzać wyższe stężenie RANTES i CCL2 u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową w porównaniu do pacjentów z zawałem serca. Nie zaobserwowano różnic stężeń RANTES oraz CCL2 pomiędzy pacjentami STEMI i NSTEMI, co może wskazywać, że badane chemokiny nie odzwierciedlają stopnia nasilenia objawów OZW. Obie badane chemokiny nie mogą być również markerami stopnia zaawansowania choroby wieńcowej, ponieważ ich stężenia nie różniły się istotnie statystycznie między chorobą jedno- a wielonaczyniową. W modelu analizy regresji liniowej wieloczynnikowej wykazano, że zmiennymi predykcyjnymi wpływającymi na stężenie RANTES w osoczu była płeć, wartość MPV oraz stężenie CCL2. U pacjentów z chorobą sercowo-naczyniową, zwłaszcza ze stabilną chorobą wieńcową, oznaczanie chemokiny RANTES może być użytecznym wskaźnikiem procesu miażdżycowego i towarzyszącego mu procesu zapalnego, na co wskazują wysoka moc diagnostyczna oraz czułość i swoistość diagnostyczna.

**8.SUMMARY**

In the group of patients with ACS and SA, the median concentration of CCL2 was higher compared to the control group, the differences being statistically significant (p = 0.018, p = 0.016, respectively). In addition, the concentration of CCL2 in both STEMI and NSTEMI infarcts was higher than in the healthy group, but the statistically significant difference was found only in the group of patients with NSTEMI MI (p = 0.017). The concentration of CCL2 in patients with SA was higher compared to patients with ACS. However, the differences were statistically insignificant.

In the group of patients with ACS, the median RANTES concentration was almost 3 times higher, while in the group of patients with SA, it was more than 3 times higher than in the control group. The differences were highly statistically significant (p <0.001). Both in patients with STEMI and NSTEMI infarction, the RANTES concentration was statistically significantly higher compared to the control group (p = 0.002, p <0.001, respectively). Statistical analysis also showed a higher concentration of RANTES in the group of patients with stable coronary disease compared to patients with ACS. However, the differences were not statistically significant. The RANTES concentration was higher in the group of patients with NSTEMI MI compared to the STEMI group, but these were also statistically insignificant differences.

Myocardial infarction occurs mainly as a consequence of coronary atherosclerosis, as a result of rupture, ulceration or stratification of atherosclerotic plaque. Previous studies have shown that the inflammatory process is the key to the development of atherosclerosis. However, the latest research indicates that among many factors involved in this process, chemokines, as proteins belonging to the cytokine family, actively participate in various stages of atherosclerotic plaque formation. They have the ability to adhere, chemotaxis and to activate leukocytes, both in vivo and in vitro. The action of these molecules occurs by stimulating specific surface receptors, the so-called chemokine receptors. Among numerous chemokines, a significant, though not fully understood role, in the pathomechanism of acute coronary syndrome is attributed to the chemokines RANTES and CCL2.

The above biochemical parameters were routinely measured on the patients’ admission, using standard laboratory methods in a certified laboratory of the University Hospital.

The aim of the study was to assess the diagnostic usefulness of RANTES and CCL2 chemokines as indicators of the development of atherosclerotic lesions in ischemic heart disease.

The Eurostat data from 2010 report that the leading cause of death in the world is still cardiovascular disease, which most frequently manifests as heart attack or stroke. This is related to the aging of the population and an increase in the incidence of risk factors such as: obesity, hypertension, hypercholesterolemia, type 2 diabetes, metabolic syndrome, low physical activity, smoking, alcohol abuse.

The obtained results suggest that the increase in RANTES and CCL2 levels in patients with both myocardial infarction and stable coronary disease as compared to healthy people may indicate the involvement of these molecules in the development of the atherosclerotic process. The chemokines tested are rather indicators of the chronic inflammatory process, which may be confirmed by higher levels of RANTES and CCL2 in patients with stable coronary artery disease as compared to patients with myocardial infarction. No differences were observed in RANTES and CCL2 concentrations between STEMI and NSTEMI patients, which may indicate that the chemokines do not reflect the severity of ACS symptoms. Both chemokines tested cannot be markers of the stage of coronary disease, since their levels did not differ significantly between single and multivessel disease. In the multivariate linear regression analysis model, gender, MPV and CCL2 level were shown to be predictive variables affecting RANTES plasma concentration. In patients with cardiovascular disease, especially with stable coronary artery disease, the determination of RANTES chemokine may be a useful indicator of the atherosclerotic process and the accompanying inflammatory process, which is indicated by high diagnostic potential, sensitivity and specificity.

The RANTES and CCL2 were measured in platelet poor plasma (PPP) by using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using R&D Systems kit. The material for examination was venous blood collected at the time of admission to hospital prior to coronary revascularization. To determine RANTES and CCL2, 3 ml blood samples were obtained with a Monovette closed system (SARSTEDT) into tubes containing 3.2% sodium citrate as an anticoagulant. Then, within 30 minutes after collection, the blood for the RANTES concentration was centrifuged twice to obtain platelet-poor plasma. Blood for the CCL2 concentration was only subjected to one centrifugation. The samples were immediately frozen at -75 ° C until the assays. For the determination of biochemical tests: high-sensitive troponin I, hsCRP, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, glucose and creatinine, 5.5 ml blood samples were collected into Monovette tubes without anticoagulant, on a clot. For morphology determination 2,7 ml of venous blood were collected into tubes containing EDTA-K2 .

The study group’s admission criteria were: 1) patient age between 18 and 80 years old, 2) a diagnosed myocardial infarction, 3) performance of coronarography in the acute phase of MI (a sign coronary lesion was definied as lumen stenosis more than 50%). Diagnossis of STEMI and NSTEMI myocardial infarction was based on the latest guidelines of the European Cardiac Society. In addition, selected clinical and biochemical risk factors for development and progression of atherosclerosis were assessed in all patients.

The study was approved by the Bioethics Committee of Medical University of Bialystok, permission number: N/ST/ZB/17/001/2209.

The study was conducted in 84 patients with acute coronary syndrom (ACS), which were divided into two subgroups: STEMI and NSTEMI and in 33 patients with stable angina (SA). The patients were hospitalized at the Department of Cardiology of the Medical University Hospital in Bialystok between 2015-2017. The patients with ACS underwent invasive procedures: coronary aangiography and angioplasty in the acute phase of myocardial infarction (MI). The control group (C) was composed of 21 healthy individuals age and sex matched control, without any cardiovascular disease symptoms.