

Selected endothelial markers in atherosclerotic plaques and plasma of patients undergoing carotid endarterectomy

Ocena wybranych markerów komórek śródbłonna naczyń w blaszkach miażdżycowych tętnic szyjnych i osoczu krwi chorych poddanych endarterektomii

Maria Kotschy¹, Aleksandra Knapik-Bieniek¹, Arkadiusz Migdalski², Daniel Kotschy¹, Arkadiusz Jawień²

¹Department of Pathophysiology, ²Department of General Surgery Collegium Medicum Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz, Poland (Katedra i Zakład Patofizjologii oraz Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy)

Abstract

Background. In spite of many experimental and clinical examinations, the composition of atherosclerotic plaques is not quite known. The aim of our study was to determine the concentration of selected endothelial cell markers: thrombomodulin (TM), endothelin (ET) and selectins E and P (sel E, P) in extracts of carotid bifurcation plaques and in plasma.

Material and methods. Thirty-eight patients (20 symptomatic, 18 asymptomatic) undergoing carotid endarterectomy were enrolled in this study. The concentration of selected endothelial cell factors in extracts of carotid plaques and plasma was measured with enzyme immunoassay (ELISA). The concentration of these factors was calculated per mg of protein (mg/P).

Results. In extracts of carotid plaques, a much higher concentration of TM, ET and sel. E and P was observed than in patient's plasma. The concentration of examined parameters in plaques was uninfluenced by sex, age, arterial hypertension, the degree of arterial stenosis, hyperlipidemia and smoking. Only diabetes increased its level in plaques.

Conclusions: All evaluated factors TM, ET, sel. E and P are the components of the carotid plaque. Its concentrations are much higher in plaques than in plasma. Therefore, they take part in the pathogenesis of carotid plaque formation and arterial stenosis.

Key words: carotid atherosclerotic plaque, endothelial cells markers

Streszczenie

Wstęp. Mimo że przeprowadzono już bardzo wiele badań doświadczalnych i klinicznych, patomechanizm powstawania i skład blaszki miażdżycowej w tętnicach szyjnych nie jest w pełni poznany. Celem pracy była ocena stężenia wybranych markerów czynności śródbłonna naczyń: trombomoduliny (TM), endoteliny (ET) oraz selektyn E i P w wyciągach blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych.

Materiał i metody. Badaniem objęto 38 chorych (20 pacjentów z objawami i 18 osób, u których objawy nie występowały) poddanych endarterektomii szyjnej. W wyciągach blaszek miażdżycowych oraz osoczu krwi chorych oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) stężenie wybranych markerów czynności śródbłonna naczyń, których stężenia przeliczono na 1 mg białka w badanych płynach.

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Prof. dr hab. med. Maria Kotschy, Katedra i Zakład Patofizjologii Collegium Medicum UMK
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85–094 Bydgoszcz, Poland
tel. (+48 52) 585 35 91, fax: (+48 52) 585 35 95
e-mail: kizpatofiz@amb.bydgoszcz.pl

Wyniki. W wyciągach blaszek miażdżycowych stwierdzono wielokrotnie wyższe stężenia TM, ET i selektyn E i P w porównaniu z ich poziomem w osoczu. Na ich stężenie w blaszkach nie miały wpływu: płeć, wiek, stopień zwężenia tętnic, współistniejące nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia oraz palenie tytoniu. Jedynie współistniejąca cukrzyca zwiększała w blaszkach ich stężenie.

Wnioski. W wyciągach blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych stwierdzono obecność dużych stężeń TM, ET i selektyn E i P wielokrotnie przekraczających ich poziom w osoczu. Duże ich stężenie w zmienionej miażdżycowo tętnicy może wskazywać na ich udział w patomechanizmie powstawania blaszek i zwężeniu tętnic.

Słowa kluczowe: blaszki miażdżycowe tętnic szyjnych, markery śródbłonkowe

Introduction

In spite of the fact that vascular endothelial cells, blood coagulation and fibrinolysis play a dominant role in atherosclerotic plaque formation, its composition, especially from carotid arteries, is not quite known. It seems that a better understanding of these processes would perhaps explain the problems of destabilization and embolization of atherosclerotic plaque. In literature, there exist only a few works about the participation of haemostatic factors in unstable and stable atherosclerotic plaques, mainly in patients with acute coronary syndromes [1–3].

Serial angiographic studies of coronary arteries in patients with coronary disease demonstrated that the smooth muscle proliferation causes a rare progression of atheroma [4, 5]. Therefore, the atherosclerotic plaque changes, besides lipids, can be caused through haemostatic factors and inflammatory processes [6]. In 2004, Migdalski et al. observed high concentrations of thrombin-antithrombin complexes (TAT), antithrombin (AT), tissue plasminogen activator (t-PA), its inhibitor (PAI-1) and d-dimers in atherosclerotic plaques from carotid arteries, indicating the participation of blood clotting and fibrinolytic factors in plaque formation. The authors suggest that thrombin generation and fibrinolysis activation can be also the cause of plaque destabilization [7].

The aim of our work was to identify the concentration of thrombomodulin (TM), endothelin (ET) and selectins E and P (sel. E, P), as endothelial cell markers in extracts of atherosclerotic plaques from carotid arteries and in plasma of patients undergoing carotid endarterectomy.

Material and methods

Thirty-eight patients undergoing carotid endarterectomy from February to November 2001 in the Department of Surgery were recruited to the study. At the preoperative time, complete medical history, risk factors and coexisting diseases were recorded. Among the patients were 26 men and 12 women with mean age 67 years. Twenty of them (52.4%) had sympto-

Wstęp

Mimo że komórki śródbłonka naczyń oraz procesy krzepnięcia krwi i fibrylizacji odgrywają zasadniczą rolę w tworzeniu i powikłaniach blaszek miażdżycowych, ich skład, szczególnie tych umiejscowionych w tętnicach szyjnych, wciąż nie jest w pełni poznany. Wydaje się, że lepsze zrozumienie tych procesów mogłoby wyjaśnić przyczyny destabilizacji blaszek miażdżycowych i ich embolizacji. Istnieją tylko nieliczne doniesienia na temat roli niektórych czynników hemostatycznych w tworzeniu stabilnych i niestabilnych blaszek miażdżycowych w tętnicach wieńcowych [1–3]. Seryjne badania angiograficzne tętnic wieńcowych w chorobie niedokrwiennej serca wykazały, że rozrost mięśniówki gładkiej naczyń bardzo rzadko powoduje powiększenie i destabilizację blaszek miażdżycowych [4, 5], a zatem ich zmiany poza lipidami są spowodowane czynnikami układu hemostazy i towarzyszącego im procesu zapalnego [6]. W 2004 roku Migdalski i wsp. wykazali w blaszkach miażdżycowych tętnic szyjnych duże stężenia niektórych parametrów układu hemostazy: kompleksów trombina-antytrombina (TAT), antytrombiny (AT), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), jego inhibitora (PAI-1) oraz d-dimerów, co świadczy o udziale procesu krzepnięcia krwi i fibrylizacji w tworzeniu blaszek miażdżycowych. Autorzy ci sugerują, że zarówno wytwarzanie trombiny, jak i aktywacja procesu fibrylizacji mogą być przyczyną destabilizacji blaszki i powstawaniaatorów tętnicznych [7].

Celem pracy była ocena 4 parametrów czynności komórek śródbłonka naczyń: stężeń trombomoduliny (TM), endoteliny (ET) oraz selektyn E i P w wyciągach blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych oraz w osoczu krwi chorych poddawanych endarterektomii.

Materiał i metody

Badaniem objęto 38 chorych z miażdżycą tętnic szyjnych poddawanych zabiegowi endarterektomii w okresie od lutego do listopada 2001 roku w Klinice Chirurgii Ogólnej Akademii Medycznej w Bydgoszczy. W okre-

matic carotid stenosis and 18 were asymptomatic. Mean carotid stenosis was 75% (range 50–95%). Twenty-five patients (65.8%) had arterial hypertension, 7 had diabetes and 17 (46%) had coronary heart disease. Concomitant peripheral arterial occlusive disease (PAOD) was found in 26 (68.4%) patients. Most subjects were overweight (22), or obese (11). Nineteen patients had hypercholesterolemia and 6 had triglyceridemia. Among 33 smokers, 18 (47.4%) were current and 15 (39.5%) stopped smoking more than one year ago.

Sample preparation

Carotid plaques removed during endarterectomy were carefully washed in saline and stored dry at a temperature of -20°C . Before determinations of examined factors, we prepared extracts with liquid nitrogen. Before operation, the blood was sampled without venous stasis into plastic centrifugation tubes containing 3.8% sodium citrate in proportion 9:1. Platelet free plasma samples (after centrifugation 3000/min — 15min.) were also stored at -20° . In plaque extracts and citrate plasma, endothelial factors: thrombomodulin (TM), endothelin (ET) and selectins E and P (sel. E, sel. P) were tested. The determinations were performed in the Department of Pathophysiology using enzyme immunoassay (ELISA). The following commercial kits were used:

- Thrombomodulin — Imubind Thrombomodulin, American Diagnostica, United States;
- Endothelin — Biomedica, Austria;
- Selectins E and P — Bender Medsystems, Austria.

The protein level was determined in extracts of atherosclerotic plaques and in patients' plasma, and the concentration of endothelial factors was calculated per 1 mg of protein (P).

For statistical evaluation, the program Statistica for Windows by StatSoft was used and Shapiro-Wilkinson tests were performed. The significance of differences among compared group (p) was estimated with Mann-Whitney-U test. The distribution of the values was abnormal. The results were expressed in Mediana (Me), inferior (Q1) and superior (Q3) quartiles. P value ≤ 0.05 was considered as significant. For this research, we obtained the agreement of the Ethics Committee of the Medical University of Bydgoszcz.

Results

The results pertaining to the estimation of thrombomodulin (TM), endothelin (ET) and selectins E and P (sel. E, sel. P) in the citrate plasma and atherosclerotic plaque extracts of patients with carotid stenosis are shown in Tables I–III. In tables I and II, the concentrations of TM, ET and sel E and P in plasma and plaque

się przedoperacyjnym zbierano dokładny wywiad i przeprowadzono badanie przedmiotowe i naczyniowe, kwalifikując pacjentów do grupy osób z objawami oraz grupy pacjentów, u których objawy nie występują. Wśród badanych było 26 mężczyzn i 12 kobiet w wieku 45–80 lat (średnio 67 ± 9 lat). U 20 (52,4%) pacjentów stwierdzono objawowe zwężenie tętnic szyjnych, zaś u 18 — zwężenie bezobjawowe. Średnie zwężenie tętnicy wyniosło 75% (z zakresem wartości 50–95%), u 25 chorych (65,8%) występowało nadciśnienie tętnicze, u 7 (18,4%) — cukrzyca, u 17 (46%) — choroba niedokrwienna serca, natomiast u 26 (68,4%) miażdżycza tętnic kończyn dolnych (PAOD). Nadwagę i otyłość stwierdzono u 33 pacjentów, hipercholesterolemię u 19, a u 6 osób — hipertriglicerydemię. Wśród 33 pacjentów palących tytoń 15 osób paliło aktualnie, a 18 przestało palić przed ponad rokiem.

Przygotowanie materiału

Błazki miażdżycowe usunięte podczas endarterektomii płukano kilkakrotnie w soli fizjologicznej i po wysuszeniu przechowywano w temperaturze -20°C . Następnie sporządzono z nich wyciągi za pomocą ciekłego azotu. Próbkę krwi żyłnej pobierano rano na czczo, przed operacją bez stosowania stazy żyłnej, do plastikowych probówek zawierających 3,8-procentowy cytrynian sodu w proporcji 9:1. Krew cytrynianową wirowano (3000 obr./min przez 15 min), uzyskując osocze ubogopłytkowe, które rozpipetowano po 0,2 ml i zamrażano w temperaturze -20°C do czasu oznaczenia w nich badanych parametrów (nie dłużej niż 3 miesiące). W wyciągach blaszek i osoczu metodami immunoenzymatycznymi (ELISA) oznaczono stężenia:

- trombomoduliny (TM) — zestaw Imubind Thrombomodulin, American Diagnostica, Stany Zjednoczone;
- endoteliny (ET) — Biomedica, Austria;
- selektyn E i P — Bender Medsystems, Austria.

W wyciągach blaszek i osoczu krwi oznaczono stężenie białka przy użyciu kwasu bitychnonionowego. Stężenie badanych czynników w wyciągach blaszek i osoczu krwi przeliczono na 1 mg białka (P).

Do oceny statystycznej użyto programu Statistica for Windows of StatSoft i testu Shapiro-Wilkinsona. Istotność różnic pomiędzy porównywanymi grupami (p) oceniano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a. Ze względu na nieprawidłowy rozkład wyniki wyrażono w medianie (Me) oraz dolnym (Q1) i górnym (Q3) kwartylu. Za istotną statystycznie wartość przyjęto $p \leq 0,05$. Na przeprowadzenie badań wyraziła zgodę Komisja Etyki przy Akademii Medycznej w Bydgoszczy.

extracts were calculated per mg of protein (mg P). The results were expressed as median (Me) and quartiles (Q1, Q2). The tables also contain the significant level of differences between examined groups (P).

Table I contains the comparison of TM, ET and sel. E and P concentrations in patients' plasma and plaque extracts. All determined endothelial factors are present in atherosclerotic carotid plaques in very high concentrations, as compared with the level in patients' plasma ($p < 0.0001$).

The obtained results in plasma and plaque extracts of determined factors were related to some clinical data and coexisting diseases. In patients' plasma, a higher concentration of sel. P was observed in men than in women ($p \leq 0.038$), in persons older than 60 years compared with the younger group ($p \leq 0.035$), and in patients without arterial hypertension than in hyperten-

Wyniki

Wynik badań przeprowadzonych przez autorów niniejszego artykułu, dotyczące oceny stężenia trombo-moduliny, endoteliny oraz selektyn E i P w osoczu krwi i wyciągach blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych pacjentów poddanych endarterektomii, przedstawiono w tabelach I–III.

W tabelach I i II podano stężenia badanych parametrów w osoczu krwi i wyciągach blaszek miażdżycowych w przeliczeniu na 1 mg białka (P). Wyniki przedstawiono w medianach (Me) i kwartylach (Q1, Q3). W tabelach przedstawiono także poziom istotności różnic między badanymi grupami (p).

W tabeli I zawarto porównanie stężeń TM, ET oraz selektyn E i P przeliczonych na 1 mg białka (P) w osoczu krwi i wyciągach blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych. Wszystkie oznaczone czynniki śródbłonkowe występują

Table I. Examined factors in plasma and in carotid plaques

Tabela I. Badane czynniki w osoczu i blaszkach tętnic szyjnych

Parameters Parametry	Units Jednostki	Carotid arteries atherosclerosis Miażdżycza tętnic szyjnych		p
		Plasma Osocze Me (Q1; Q2)	Plaques Blaszki Me (Q1; Q2)	
Thrombomodulin Trombomodulina	ng/mgP	0.05 (0.04; 0.07)	4.43 (2.74; 6.17)	< 0.0001
Endothelin Endotelina	fmol/mgP	0.01 (0,00–0,01)	6.57 (4.34; 8.42)	< 0.0001
Selectin E Selektyna E	ng/mgP	0.54 (0.35; 0.95)	8.09 (5.21; 11.76)	< 0.0001
Selectin P Selektyna P	ng/mgP	3.69 (2.73; 4.34)	17.42 (13.20; 30.73)	< 0.0001

Me — median (mediana); Q1, Q3 — quartels (kwartyle), p — significant level of differences between examined groups (poziom istotności różnic między badanymi grupami)

Table II. Examined factors in carotid plaques of patients with atherosclerosis without diabetes (–) and coexisting diabetes (+)

Tabela II. Badane czynniki w blaszkach chorych z miażdżycą tętnic szyjnych bez cukrzycy (–) i z współistniejącą cukrzycą (+)

Parameters Parametry	Units Jednostki	Carotid arteries atherosclerosis Miażdżycza tętnic szyjnych		p
		Diabetes (+) (7) Cukrzyca (+) M/Me; SD/Q1, Q3	Diabetes (–) (31) Cukrzyca (–) M/Me SD/Q1, Q3	
Thrombomodulin Trombomodulina	ng/mgP	8.21; 4.96; 11.05	4.25; 2.47; 5.84	0.0835
Endothelin Endotelina	fmol/mgP	9.87 ± 4.48	6.32 ± 2.82	0.0151
Selectin E Selektyna E	ng/mgP	13.60 ± 4.09	8.92 ± 5.62	0.0613
Selectin P Selektyna P	ng/mgP	48.75; 38.29; 78.89	15.46; 9.89; 27.77	0.0015

M — mean value (wartość średnia); SD — standard deviation (odchylenie standardowe); Me — median (mediana); Q1, Q3 — quartels (kwartyle); p — significant level of differences between examined groups (poziom istotności różnic między badanymi grupami)

Table III. Correlation coefficients r (p) of analysed parameters in carotid plaques**Tabela III.** Współczynniki korelacji r (p) badanych parametrów w blaszkach tętnic szyjnych

Endothelin Endotelina	0.7174*		
Selectin E Selektyna E	0.5171*	0.6005*	
Selectin P Selektyna P	0.6527*	0.7323*	0.6565
Parameter (parametr)	Thrombomodulin Trombomodulina	Endothelin Endotelina	Selectin E Selektyna E

r (p) — correlation coefficient according to Spearman (współczynnik korelacji według Spearmana); * < 0.05

sive ($p \leq 0.027$). Also in plasma of patients with hypertriglyceridemia, a higher ET concentration was observed ($p \leq 0.049$). In plaques of patients with carotid stenosis, there were no statistically significant differences observed with respect to sex, age, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, the degree of arterial carotid stenosis, coexisting arterial hypertension or smoking. Only in the group of patients with coexisting diabetes were higher concentrations of TM, ET, sel. E and sel. P in plaque extracts noted. The results are illustrated in table II. In plaque extracts of diabetics, statistically significant higher concentrations of ET ($p < 0.0151$) and sel. P ($p < 0.0015$) were observed. Also, the concentrations of TM ($p < 0.0835$) and sel. E ($p < 0.0613$) were higher but without statistical significance. Table III presents a high positive correlation between the concentrations of TM, ET, sel. E and P in plaque extracts. No correlation of these factors was found in plasma.

Discussion

In our study, significantly higher concentrations of TM, ET, sel. E and P were observed in the extracts of carotid atherosclerotic plaques than in plasma of patients with carotid stenosis. TM is an endothelial cell surface receptor for thrombin. Thrombomodulin binding thrombin inhibits the proteolytic effects of thrombin in the clotting of fibrinogen, activation of blood platelets and clotting factors V, VIII and XIII. Thrombomodulin converts thrombin from a procoagulant protein into the activator of protein C, and activated protein C (aPC) has been generated. Thrombomodulin acts as a major anticoagulant through its ability to inactivate various blood haemostatic factors, especially factors Va, VIIIa and plasminogen activator inhibitor type I (PAI-I) inducing increased fibrinolytic activity [8]. Plasma levels of TM have been used as a marker for in vivo endothelial cell injury [9], and were found to be increased in many diseases, especially in is-

w blaszkach miażdżycowych w bardzo wysokich stężeniach w porównaniu z osoczem ($p \leq 0,0001$).

Uzyskane wartości stężenia badanych czynników śródbłonkowych zarówno w osoczu chorych, jak i w blaszkach tętnic szyjnych analizowano także w zależności od niektórych danych klinicznych i współwystępowania dodatkowych chorób. W osoczu chorych stwierdzono istotnie wyższe stężenia selektyny P u mężczyzn w porównaniu z kobietami ($p \leq 0,038$), u osób powyżej 60 rż. niż u młodszych ($p \leq 0,035$) oraz u chorych bez nadciśnienia tętniczego w porównaniu z pacjentami z nadciśnieniem ($p \leq 0,027$). Także w osoczu chorych z triglicerydemią występowały wyższe stężenia ET ($p \leq 0,049$). Natomiast w wyciągach blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniach badanych parametrów w zależności od płci, wieku, hipercholesterolemii, hipertriglicerydemii, stopnia zwężenia tętnic szyjnych, towarzyszącego nadciśnienia tętniczego i palenia tytoniu. Tylko w grupie chorych ze współistniejącą cukrzycą stwierdzono w blaszkach miażdżycowych wyższe stężenia TM, ET oraz selektyn E i P. Wyniki przedstawiono na tabeli II. Różnice statystycznie istotne wykazano tylko w przypadku stężenia ET ($p \leq 0,0151$) i selektyny P ($p \leq 0,015$). Także wyższe były stężenia TM ($p \leq 0,0835$) i selektyny E ($p \leq 0,0613$) w blaszkach chorych na cukrzycę, jednak wartości te nie były istotne statystycznie. W tabeli III przedstawiono statystycznie znamiennej wysoką dodatnią korelację wyrażoną za pomocą współczynnika r Pearsona (r_p). Korelacji takiej nie wykazano w przypadku czynników śródbłonkowych w osoczu chorych.

Dyskusja

W przeprowadzonych przez autorów niniejszego artykułu badaniach stwierdzono obecność oraz istotnie statystycznie wyższe stężenia TM, ET, selektyn E i P w wyciągach blaszek miażdżycowych w porównaniu z osoczem chorych ze zwężeniem tętnic szyjnych. Trombomodulina jest błonowym receptorem komórek śródbłonka naczyń dla wytwarzanej we krwi trombiny. Trombina w kompleksie z TM traci swoje właściwości prokoagulatoryjne, czyli możliwość wykrzepiania fibrynogenu, aktywacji płytek krwi oraz czynników V, VIII i XIII. Kompleks TM-trombina aktywuje osoczowe białko C, które działa jako główny antykoagulant, dzięki swojej zdolności do inaktywacji na drodze proteolitycznej czynników hemostazy Va, VIIIa oraz PAI-I, zmniejszając w ten sposób aktywność koagulatoryjną, a zwiększając fibrynolityczną [8]. Osoczowe stężenie rozpuszczalnej sTM uważa się obecnie za wskaźnik uszkodzenia śródbłonka naczyń *in vivo* [9]. W wielu publikacjach wspomina się o podwyższonym stężeniu sTM występującym w różnych chorobach,

chaemic heart disease [9–12]. The main aim of our study was to confirm the presence of TM in atherosclerotic carotid plaques. In literature, no data on this subject could be found. The concentration of TM in carotid plaques was over 90 times higher than in patients' plasma. The presence of such high levels of TM indicates a potent anticoagulant activity of carotid plaque.

The second endothelial marker determined by us was endothelin (ET). Its concentration in carotid plaques was over 600 higher than in patients' plasma. Endothelin (ET) is a potent vasoconstrictor isolated from cultured porcine aortic endothelial cells in 1988 by Yanagisawa et al [13]. ET was observed in different tissues: lung, kidney, brain, hypophysis, different endocrine glands and placenta [14, 15]. However, vascular endothelium is the best source of ET-1 *in vivo* [13]. The peptid interacts in an autocrine/paracrine manner with A and B-ET receptors found in numerous cells including smooth muscles of arteries and veins, as well as monocytes and fibroblasts [15]. Current studies demonstrate that plasma concentrations of ET in patients with carotid stenosis (3.59 fmol/ml compared to the control value 0.2–0.7 fmol/ml) are much higher than in controls, similar to those in plasma of patients with different forms of coronary heart disease [16–22]. In literature, only Zecher et al. in 1995 described immunoreactivity of endothelin-1 in active coronary atherosclerotic plaques [23]. Our results obtained with other methods (ELISA) in plaques of carotid arteries but not in coronary arteries agree with the observations of Zacher et al [23]. We cannot differentiate if ET in plaques was released from endothelial cells alone or together with its receptors A and B. The presence of ET in carotid plaques in such high concentrations indicates its participation in the process of artery stenosis.

Selectin E (ELAM-1, Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1) and selectin P (GMP-140) Granule Membrane Protein 140 belong to the family of adhesion molecules. Selectins guide non-activated polynuclear cells to the areas of inflammation creating first loose contacts with the endothelial layer. Both selectins are expressed on cytokine-activated endothelial cells and contribute to the adhesion of still resting leucocytes to the endothelium [24–26]. In our study, sel. E in carotid plaques calculated per mg P was over 15 times higher and sel. P over 4 times higher than in plasma. In literature, we found only one study, which demonstrated an increased expression of adhesion molecules (ICAM-1) in symptomatic carotid plaque [27]. But, there are many publications about selectin E in plasma of patients with different diseases, specially with coronary heart disease [24–29]. The mean concentration of sel. E in plasma of patients with carotid stenosis in our study was 49.95 (18.33–94.34) ng/ml, similar

także w chorobie niedokrwiennej serca [9–12]. Głównym celem niniejszych badań było jednak stwierdzenie obecności TM w blaszkach miażdżycowych tętnic szyjnych, ponieważ nie znaleziono takich danych w światowym piśmiennictwie. Stężenie TM w wyciągach blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych było około 90-krotnie większe niż w osoczu. Obecność tak wysokich stężeń TM w blaszkach wskazuje na silną aktywność antykoagulacyjną w zmienionej miażdżycowo tętnicy, mimo że częstym powikłaniem blaszek jest stworzenie zakrzepu przez wytworzoną w nadmiernej ilości trombinę w przypadku miażdżycy.

Stężenie kolejnego badanego przez autorów wskaźnika uszkodzenia komórek śródbłonkowych naczyń — endoteliny — w wyciągach blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych było ponad 600 razy wyższe niż w osoczu tych chorych. Endotelina jest istotnym czynnikiem zwięzającym naczyń, który w 1988 roku wyizolowali z hodowli komórek śródbłonka aorty świni Yanagisawa i wsp. [13]. Obecność ET stwierdzono w różnych narządach: płucach, nerkach, przysadce i innych gruczołach wewnątrzwydzielniczych, a także w łożysku [14, 15]. Uważa się jednak, że najlepszym źródłem ET-1 — jednego z trzech rodzajów ET: ET-1, ET-2, ET-3 *in vivo* jest śródbłonek naczyń. Peptyd ten w sposób auto- i parakryny reaguje ze swoimi receptorami typu A i B występującymi na różnych komórkach, w tym także na komórkach mięśni gładkich oraz monocytach i fibroblastach, znajdujących się w blaszce miażdżycowej [15]. Autorzy wykazali wyższe stężenia ET w osoczu chorych ze zwięzieniem tętnic szyjnych (3,59 fmol/ml) w porównaniu z normami podanymi przez producenta testów (0,2–0,7 fmol/ml), natomiast były one podobne do występujących u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca [16–22]. Jedynie Zecher i wsp. w 1995 roku stwierdzili immunoreaktywność ET-1 w objawowych blaszkach miażdżycowych tętnic wieńcowych [23]. Wyniki niniejszej pracy, uzyskane metodą immunoenzymatyczną w blaszkach z tętnic szyjnych są zgodne z obserwacjami Zechera i wsp. przeprowadzonymi w blaszkach tętnic wieńcowych [23]. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy nie mogli wykazać, czy ET stwierdzona w wyciągach blaszek została uwolniona podczas homogenizacji z komórek śródbłonka w postaci wolnej, czy występowała w kompleksach z receptorami A i B. Obecność ET w tak wysokich stężeniach w blaszkach miażdżycowych wskazuje na jej duży udział w zwięzieniu tętnic szyjnych.

Selectyna E (ELAM-1) i selectyna P (GMP-140) należą do rodziny cząstek adhezyjnych. Selectyny prowadzą nieaktywowane leukocyty wielojądrowe do miejsc zapalnych, tworząc najpierw luźny kontakt z powierzchnią śródbłonka naczyń. Obie selectyny są wytwarzane przez

to the control group — 52.84 ng/ml (23.00–78.20). The concentration of sel. P in patients' plasma was higher — 302.23 ng/ml (53.86–472.73) than in the controls — 190 ng/ml (117–266). The increased concentration of sel. E and sel. P in carotid plaques indicates the activation of vascular endothelial cells and the release of adhesion molecules to the atherosclerotic changes and participation of the selectins in the inflammatory processes occurring in plaques. There were no statistically significant differences in the concentration of endothelial markers in plaques with respect to sex, age, risk factors (arterial hypertension, hyperlipidemia, smoking) and the degree of carotid stenosis. Only coexisting diabetes increases the concentration of TM, ET sel. E and sel. P in extracts of atherosclerotic plaques. Also, significant correlations between examined factors TM, ET, sel. E and sel. P present in carotid atherosclerotic plaques were observed.

Conclusions

1. All evaluated endothelial factors: thrombomodulin, endothelin and selectins E and P are components of carotid atherosclerotic plaques and their concentrations are much higher than in patients' plasma.
2. Diabetes is the most distinct factor that exerts its influence on carotid plaque endothelial profile.
3. High significant correlation coefficients between the level of thrombomodulin, endothelin and selectins E and P in carotid plaques indicate its increased expression during plaque formation.
4. There are no correlations between the endothelial factors in carotid plaques homogenates and blood plasma.

References

1. Loskutoff DJ, van Aken BE, Seiffert D (1995) Abnormalities in the fibrinolytic system of the vascular wall associated with atherosclerosis. *Ann N J Acad Sci*, 748: 177–183.
2. Davies MJ, Hangartner WR et al (1989) Factors influencing the presence or absence of acute coronary thrombin in sudden ischaemic death. *Eur Heart J*, 10: 203–208.
3. Falk E (1989) Morphologic features of unstable atherothrombotic plaque underlying acute coronary syndroms. *Am J Cardiol*, 63: 114E–120E.
4. J Brusckhe AV, Kramer JR Jr, Bal ET et al (1989) The dynamics of progression of coronary atherosclerosis studied in 168 medically treated patients who underwent coronary arteriography three times. *Am Heart J*, 117: 296–305.
5. Yokoya K, Takasu H, Suzuki T et al (1999) Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: a study based on four serial coronary arteriograms per year. *Circulation*, 100: 903–909.
6. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420: 868–874.

aktywowane cytokinami komórki śródbłonna naczyń i przyczyniają się do adhezji nieaktywowanych leukocytów do komórek śródbłonna [24–26]. W badaniach przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy stężenie selektyny E w blaszkach tętnic szyjnych było ponad 15-krotnie wyższe, a selektyny P 4-krotnie wyższe niż w osoczu tych chorych. W piśmiennictwie znaleziono tylko jedną publikację, w której autorzy wykazali zwiększoną ekspresję ICAM-1 (a więc selektyny E) w objawowych blaszkach tętnicy szyjnej [27]. Istnieją natomiast liczne doniesienia o podwyższonym osoczym stężeniu, szczególnie selektyny E, w wielu schorzeniach ze szczególnym uwzględnieniem różnych postaci choroby niedokrwiennej serca [24–29]. W niniejszych badaniach stężenie selektyny E w osoczu chorych ze zwężeniem tętnicy szyjnej wynosiło średnio 49,95 ng/ml (zakres wartości 18,33–94,34 ng/ml) i było podobne jak w grupie kontrolnej — średnio 52,84 ng/ml (zakres 23,00–78,20 ng/ml). Natomiast stężenie selektyny P wynosiło 302,23 ng/ml (53,86–472,73 ng/ml) i było istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej 190 ng/ml (117–266 ng/ml). Podwyższone stężenia selektyn E i P w wyciągach blaszek miażdżycowych wskazują na aktywację śródbłonna naczyń w obrębie blaszek miażdżycowych i uwalnianie cząsteczek adhezyjnych uczestniczących w procesach zapalnych naczyń objętych procesem miażdżycowym. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniach TM, ET oraz selektyn E i P w blaszkach miażdżycowych tętnic szyjnych w zależności od płci, wieku, czynników ryzyka miażdżycy (nadciśnienie tętnicze, lipidy, palenie tytoniu, stopień zwężenia tętnic). Jedynie towarzysząca miażdżycy cukrzyca powodowała zwiększenie w blaszkach miażdżycowych stężeń badanych parametrów śródbłonkowych. Stwierdzono statystycznie istotne wzajemne dodatnie korelacje między badanymi czynnikami TM, ET oraz selektyn E i P w blaszkach miażdżycowych tętnic szyjnych.

Wnioski

1. Badane czynniki śródbłonkowe: trombomodulina, endotelina oraz selektyny E i P są składnikami blaszki miażdżycowej tętnicy szyjnej i ich stężenie w blaszce jest wielokrotnie większe niż w osoczu.
2. Cukrzyca jest jedynym czynnikiem modyfikującym stężenia śródbłonkowych czynników w blaszce miażdżycowej tętnic szyjnych.
3. Wysokie, istotne statystycznie współczynniki korelacji między trombomoduliną, endoteliną oraz selektynami E i P wskazują na zwiększoną ich ekspresję podczas tworzenia blaszki miażdżycowej.
4. Nie stwierdzono korelacji między stężeniami czynników śródbłonkowych w homogenatach blaszek miażdżycowych i osoczu krwi.

7. Migdalski A, Jawień A, Kotschy M, Knapik-Bieniek A (2004) Selected haemostatic factors in carotid bifurcation plaque of patients undergoing carotid endarterectomy. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 27: 172–179.
8. Esman NL (1987) Thrombomodulin. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, 13: 454–463.
9. Cella G, Randi M (1999) Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease. *Lancet*, 1: 354–425.
10. Boffa MC, Karmochkine M (1998) Thrombomodulin an overview and potential implication in vascular disorders. *Lupus*, 7 (Suppl S): 120–125.
11. Wiśniewska E, Wodyńska T, Kotschy M (2001) Thrombomodulin endothelial thrombin receptor in blood of patients with unstable angina pectoris. *Med Sci Monit*, 7: 256–259.
12. Kotschy M, Polaszewska-Muszyńska M, Będowska-Gontarz W, Sikorska Z, Moskal S, Kotschy D (2002) Oszczerwienie trombomodulina, błonowy receptor dla trombiny w cukrzycy typu 2. *Diabetologia Polska*, 9: 126–129.
13. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cell. *Nature*, 332: 411–415.
14. Biomedica (1996) Endothelin next generation. Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Endothelin (1-21) in biological fluids. Biomedica Group, Wien: 23–29.
15. Holm P, Franco-Cereceda A (1996) Tissue concentration of endothelins and functional effects of endothelin — receptor activation in human arteries and veins. *J Thorac Cardiovasc Sur*, 112: 264–272.
16. Donatelli M, Hoffmann E, Collette J et al (1996) Circulating endothelin-1 levels in type 2 diabetic patients with ischaemic heart disease. *Acta Diabetol*, 33: 246–248.
17. Myszka W (2001) Endotelina I w chorobie niedokrwiennej serca. *Pol Mer Lek*, 11: 291–294.
18. Kotschy M, Grabarczyk E, Wodyńska T, Kotschy D (2003) Plasma endothelin in unstable angina pectoris. *Acta Angiol*, 9: 17–23.
19. Gaspadrone A (2001) Endothelin a new marker of rapid coronary stenosis progression in patients with stable angina. *Eur Heart J*, 22: 1519–1529.
20. Ferri C, de Marizio P, Desideri G et al (1997) Plasma endothelin during transient acute myocardial ischaemia in men: effects of coronary revascularisation. *Eur J Clin Invest*, 27: 526–530.
21. Wieczorek J, Fox K, Ludlam C et al (1993) Refractory unstable angina is associated with persistently elevated plasma level of endothelin. *J Am Coll Cardiol*, 21: 271–277.
22. Vojacek J, Kolar J, Lisy O et al (1999) Time course of endothelin I plasma level in patients with acute coronary syndrome. *Cardiology*, 91: 114–118.
23. Zecher A, Goebel H, Schächinger V, Ihling C (1995) Tissue endothelin I immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. *Circulation*, 9: 941–947.
24. Koakkola K, Jalkanen S, Kaunismaki K et al (2000) Vascular adhesion protein-1 intercellular adhesion molecule-1 and P-selectin mediate leukocyte binding to ischaemic heart in humans. *J Am Coll Cardiol*, 36: 122–129.
25. Oishi Y, Wakatsuki T, Nishikado A et al (2000) Circulating adhesion molecules and severity of coronary atherosclerosis. *Coronary Artery Disease*, 11: 77–81.
26. Tenaglia AN, Buda A, Wilkins R et al (1997) Levels of expression of P-selectin, E-selectin and intercellular adhesion molecules in coronary atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 79: 742–748.
27. De Graba TJ, Seren AL, Penix L et al (1998) Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human carotid atherosclerotic plaque. *Stroke*, 29: 1405–1410.
28. Galvani M, Ferrini D, Ottani F et al (2000) Soluble E-selectin is not a marker of instable coronary plaque in serum of patients with ischaemic heart disease. *J Thromb Thrombolysis*, 9: 53–60.
29. Grabarczyk E, Wodyńska T, Paczuski R, Kotschy M (2002) Selektyna E we krwi chorych na niestabilną dusznicę bolesną. *Pol Mer Lek*, 13, 73: 29–31.