Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Magdalena Filip

Określenie wpływu regularnego kontrolowanego wysiłku fizycznego na parametry zapalne we krwi pacjentów z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym.

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Tomasz Guzik
Pracę wykonano w Katedrze Chorób Wewnętrznych i Medycyny
Wsi Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Tomasz Guzik

Kraków, 2015

Składam serdeczne podziękowania,
Panu Profesorowi Tomaszowi Guzikowi
za umożliwienie mi realizacji powyższej pracy,
za pomoc w trakcie wykonywania badań, w ocenie i interpretacji wyników,
a także za kilkuletnią edukację i naukowe wsparcie.
Pragnę również podziękować:
Dr. Jackowi Głodzikowi,
Lek. Andrzejowi Sałakowskiemu,
Lek. Krzysztofowi Rewiukowi,
Dr. Tomaszowi Mikołajczykowi,
Dr. Mateuszowi Siedlińskiemu
oraz całemu zespołowi Laboratorium Medycyny Translacyjnej
za okazaną pomoc w realizacji badań.

Spis treści

I. Wstęp 5

I.1. Wprowadzenie 5

I.2. Nadciśnienie tętnicze 6

I.2.1. Epidemiologia 7

I.2.2. Czynniki ryzyka 8

I.2.3. Główne komponenty patofizjologii rozwoju nadciśnienia tętniczego 12

I.2.4. Prewencja nadciśnienia tętniczego 28

I.3. Wpływ regularnego wysiłku fizycznego na układ krążenia w kontekście nadciśnienia tętniczego. 29

I.4. Wpływ regularnego wysiłku fizycznego na układ odporności 31

II. Cel pracy 33

III. Materiały i metody 34

III.1. Schemat badania oraz grupa badana 34

III.2. Materiał biologiczny 37

III.3. Izolacja leukocytów z krwi obwodowej oraz osocza 38

III.4. Hodowle PBMC 38

III.5. Analiza metodą cytometrii przepływowej 38

III.6. Analiza stężenia cytokin metodą Luminex 45

III.7. Analiza statystyczna 45

IV. Wyniki 46

IV.1. Charakterystyka kliniczna pacjentów. 46

IV.2. Charakterystyka limfocytów T we krwi pacjentów 47

IV.2.1. Subpopulacje limfocytów T 47

IV.2.2. Stopień aktywacji limfocytów T 51

IV.3. Charakterystyka monocytów we krwi pacjentów 59

IV.3.1. Subpopulacje monocytów 59

IV.3.2. Ocena ekspresji markerów adhezji do śródbłonka 60

IV.3.3. Białka dostarczające sygnał kostymulujący limfocytom T, CD40 oraz CD86 63

IV.3.4. Produkcja cytokin przez monocyty 64

IV.4. Limfocyty B oraz komórki NK 66

IV.5. Osoczowe wykładniki stanu zapalnego 69

IV.6. Podsumowanie wyników 69

V. Dyskusja 71

V.1. Charakterystyka limfocytów T krążących we krwi pacjentów poddanych treningowi. 72
V.2. Charakterystyka monocytów krążących we krwi pacjentów poddanych treningowi. 76
V.3. Charakterystyka innych leukocytów krążących we krwi pacjentów poddanych treningowi. 77
V.4. Poziom osoczowych wykładników stanu zapalnego. 78
V.5. Słabe strony badania 78
V.6. Podsumowanie 79
VI. Streszczenie 80
VII. Spis skrótów 85
VIII. Spis rycin 87
IX. Spis tabel 89
X. Literatura 90

I. Wstęp

I.1. Wprowadzenie

Nadciśnienie tętnicze (NT) stanowi we współczesnej populacji światowej istotny problem medyczny i społeczny. W Polsce problem ten dotyczy 32% populacji w wieku 18-79, co oznacza iż 9,5 mln osób cierpi na nadciśnienie tętnicze. Odsetek ten znacznie wzrasta w starszym wieku sięgając ponad 70% populacji po 80 roku życia. Wysokie prawidłowe ciśnienie, stanowiące stan poprzedzający nadciśnienie występuje u 29% osób w Polsce [1]. Jeśli nie dojdzie do zmiany stylu życia w Polsce, częstość występowania nadciśnienia wśród dorosłych Polaków w ciągu najbliższych 25 lat zwiększy się z 32% do ponad 50%, a liczba pacjentów przekroczy 15 mln. Biorąc pod uwagę liczbę osób, których dotyczy problem, całkowite koszty leczenia sięgają 35 mld zł rocznie [2]. Nadciśnienie tętnicze jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w Polsce i na świecie. Dlatego tak ważnym elementem postępowania w nadciśnieniu jest prewencja pierwotna, która polega na wpływie na uwarunkowania środowiskowe, zwłaszcza na styl życia. Jednym z podstawowych zaleceń w prewencji i w leczeniu nadciśnienia tętniczego jest regularna aktywność fizyczna, która może obniżyć ciśnienie nawet o 4-9 mm Hg [3]. Jest to szczególnie istotne w kontekście mechanizmów nadciśnienia tętniczego.

Pomimo wielu lat badań, mechanizmy nadciśnienia tętniczego, poza stosunkowo rzadkimi postaciami nadciśnienia wtórnego, pozostają niejasne. Uważa się, że kluczową rolę w patofizjologii pierwotnego nadciśnienia tętniczego odgrywają między innymi stres oksydacyjny, dysfunkcja śródbłonka [4], zaburzenia w funkcjonowaniu układu współczulnego oraz nerek. Badania ostatnich lat zwracają uwagę na istotną rolę aktywacji układu odporności i przewlekłych stanów zapalnych w nadciśnieniu tętniczym. Stan zapalny bierze udział w patogenezie nadciśnienia tętniczego i jednocześnie jest konsekwencją podwyższonego ciśnienia tętniczego. Zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u chorych z NT potwierdzono istotną rolę układu odporności jako jednej z ważnych przyczyn progresji nadciśnienia tętniczego. Najnowsze badania genetyczne GWAS wskazały na związany z aktywacją układu odporności gen LNK (SH2B3) jako ważny w kontroli nadciśnienia tętniczego [5]. Obecnie wiadomo, że regularny wysiłek fizyczny korzystnie wpływa na funkcję śródbłonka naczyniowego, ale nie wiadomo w jaki sposób może on modulować funkcje komórek układu odpornościowego i czy ten efekt może współuczestniczyć w ochronnym działaniu wysiłku fizycznego na chorych. Wiele

publikacji poruszających problem profilaktyki i niefarmakologicznego leczenia nadciśnienia tętniczego skupia się na bezpośrednim wpływie aktywności fizycznej na śródbłonek naczyniowy i serce [6]. Zaobserwowano, iż trening fizyczny prowadzi do poprawy funkcji śródbłonka naczyniowego w grupie pacjentów z wysokim ciśnieniem tętniczym [7]. Nie należy jednak zapominać, iż regularny wysiłek fizyczny może modyfikować funkcje układu odporności. Zmiana aktywacji limfocytów i monocytów może wpływać na klasyczną odporność i modyfikować przebieg ogólnoustrojowych stanów zapalnych. Może to pośrednio modulować poprawę funkcji śródbłonka naczyniowego obserwowaną w wyniku regularnego wysiłku fizycznego.

Dotychczas nie zbadano czy poprawa funkcji śródbłonka, indukowana treningiem fizycznym, może wiązać się ze zmianą parametrów zapalnych u osób z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym. Wobec tych faktów wydaje się zasadnym poszukiwanie takich związków, tym bardziej, że mogą one przyczynić się do lepszego zrozumienia patogenezy nadciśnienia tętniczego i ochronnych mechanizmów regularnego wysiłku fizycznego. Stanowić to może potencjalnie ważny kierunek profilaktyczny i terapeutyczny, który pozwoli w przyszłości na ograniczenie powikłań i obniżenie kosztów leczenia, a także na poprawę stanu i jakości życia pacjentów.

I.2. Nadciśnienie tętnicze

Ciśnienie tętnicze krwi jest bardzo zmiennym parametrem, nawet w ciągu jednej doby [8]. W 2013 roku zostały opublikowane uaktualnione wytyczne European Society of Hypertension – European Society of Cardiology (ESH – ESC), między innymi dotyczące klasyfikacji nadciśnienia tętniczego (Tabela 1) [9]. Wyodrębniono w niej trzy rodzaje prawidłowego ciśnienia krwi, w tym ciśnienie wysokie prawidłowe obejmujące zakres 130-139 mmHg dla skurczowego oraz/lub 85-89 mmHg dla rozkurczowego ciśnienia. Wyodrębnione zostały cztery różne, stopnie zaawansowania NT. Nadciśnienie tętnicze jest zatem definiowane jako stan, w którym ciśnienie rozkurczowe osiąga 140 mm Hg oraz/lub rozkurczowe 90 mmHg.

Tabela 1. Klasyfikacja oraz definicja poziomów ciśnienia krwi wg ESH-ESC z 2013 roku [9].

Kategoria	Skurczowe (mmHg)		Rozkurczowe (mmHg)
Ciśnienie optymalne	<120	oraz	<80
Ciśnienie prawidłowe	120-129	oraz/lub	80-84
Ciśnienie wysokie prawidłowe	130-139	oraz/lub	85-89
Nadciśnienie – stopień 1 (łagodny)	140-159	oraz/lub	90-99
Nadciśnienie – stopień 2 (umiarkowane)	160-179	oraz/lub	100-109
Nadciśnienie – stopień 3 (ciężkie)	≥180	oraz/lub	≥110
Nadciśnienie izolowane skurczowe	≥140	oraz	<90

Nadciśnienie tętnicze możemy podzielić na pierwotne oraz wtórne [10]. Nadciśnienie pierwotne definiowane jest jako takie, w którym nie występują przyczyny nadciśnienia wtórnego, jak np. choroby nerek, niewydolność nerek, guz chromochłonny, hiperaldosteronizm. Przyjmuje się, że ok 90-95% osób chorych na NT, cierpi na nadciśnienie pierwotne. U pozostałych osób nadciśnienie ma charakter wtórny, czyli jest zdiagnozowana pierwotna przyczyna wystąpienia nadciśnienia.

I.2.1. Epidemiologia

Nadciśnienie tętnicze jest chorobą rozwijającą się, początkowo bezobjawowo. Pacjent zgłasza się do lekarza najczęściej, dopiero wtedy gdy wystąpią objawy takie jak bóle głowy, zadyszka, zawał czy udar mózgu. Jak wynika z raportu PBS wykonanego na zlecenie grupy Polpharma, 17% badanych kontrolowało swoje ciśnienie w ciągu ostatniego tygodnia, a tylko 16% w ciągu ostatniego roku. 41% badanych mierzyło ciśnienie ponad rok wcześniej lub więcej, ale aż 9% ankietowanych nie pamięta czy, lub nigdy nie badało poziomu ciśnienia [11]. Patrząc na te dane nietrudno zrozumieć tak wysoki odsetek zachorowalności na nadciśnienie, które dotyczy ok. 30 – 45% populacji ogólnej, a wartość ta intensywnie wzrasta z wiekiem [9]. W Polsce problem ten dotyczy 32% populacji w wieku 18-79 i ponad 70% populacji po 80 roku życia. Wysokie prawidłowe ciśnienie, stanowiące stan poprzedzający nadciśnienie występuje u 29% osób [1]. Ryzyko zgonu osoby z nadciśnieniem (bez towarzyszących innych czynników ryzyka) jest 2-krotnie wyższe u kobiet i 3-krotnie wyższe u mężczyzn w porównaniu do osób bez nadciśnienia. Wystarczy jednak, że oprócz nadciśnienia u danej osoby wystąpi

jeszcze 6 innych czynników ryzyka (T. Chol/HDL-C>5,0; TG>200 mg/dl; palenie papierosów; BMI>30,0; obecne objawy choroby niedokrwiennej serca; dodatni wywiad rodzinny dotyczący chorób układu krążenia), a ryzyko zgonu wzrośnie odpowiednio 15- i 14-krotnie w stosunku do osób bez nadciśnienia i innych czynników ryzyka [12].

I.2.2. Czynniki ryzyka

Nie są znane przyczyny nadciśnienia pierwotnego, można jednak wyodrębnić szereg czynników ryzyka, które mogą podwyższać ciśnienie. Do najważniejszych należą: otyłość, insulinooporność, wysokie spożycie alkoholu, wysokie spożycie soli, starzenie się, siedzący styl życia, stres, niskie spożycie potasu oraz wapnia [10].

I.2.2.1. Styl życia i brak regularnej aktywności fizycznej

Regularna aktywność fizyczna jest szeroko uznaną formą prewencji nadciśnienia i innych chorób układu krążenia [13]. Występujący coraz częściej siedzący styl życia, nawet jeśli współtowarzyszy mu regularny wysiłek, może wywierać szkodliwe działanie na nasze ciśnienie. Spędzanie 2 lub więcej godzin przed telewizorem/komputerem dziennie, powoduje 2-krotny wzrost ryzyka wystąpienia insulinooporności [14], która prowadzi do nadciśnienia. Natomiast osoby, które poświęcają 1 godzinę tygodniowo na intensywny wysiłek i oglądają telewizję mniej niż 2 godziny dziennie mają niższe ciśnienie o 2,7 mmHg w przypadku kobiet i 3,6 mmHg w przypadku mężczyzn od tych, którzy nie deklarują żadnego regularnego intensywnego wysiłku i spędzają przed telewizorem ponad 4 godziny dziennie [15]. Jest to ważny aspekt, gdyż wiele osób ma siedzący tryb pracy, więc przed komputerem spędza średnio 8 godzin dziennie. Aby uniknąć wzrostu ciśnienia, wystarczy co 20 minut zrobić 2 minutową przerwę na mało lub średnio intensywny spacer [16]. Wysiłek fizyczny i związany z tym wzrost wydolności wysiłkowej zmniejsza śmiertelność u osób starszych z nadciśnieniem tętniczym nawet o 48% [17]. Regularny wysiłek fizyczny poprawia funkcje śródbłonka u chorych z cukrzycą typu 1 i zmniejsza śmiertelność spowodowaną chorobami sercowo-naczyniowymi [18]. Dysfunkcja śródbłonka jest jedną z głównych przyczyn nadciśnienia tętniczego oraz innych chorób sercowo-naczyniowych [19]. Zaobserwowano, iż regularny wysiłek fizyczny jest skuteczną strategią w prewencji oraz leczeniu chorób układu krążenia przez poprawę funkcji śródbłonka [20]. Wyniki z badań na zwierzęcym modelu nadciśnienia wykazały ochronne działanie wysiłku fizycznego na funkcje śródbłonka między innymi przez wzrost ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenku azotu

[21]. Mała aktywność fizyczna, wraz z paleniem papierosów i niewłaściwą dietą jest jednym z najważniejszych czynników prognostycznych występowania chorób serca [22].

I.2.2.2. Otyłość

Otyłość, szczególnie otyłość brzuszna jest głównym czynnikiem ryzyka w nadciśnieniu. Jak wynika z badania Framingham prowadzonego od 1948 roku i polegającego na wieloletniej obserwacji wpływu zmian wagi na takie czynniki jak poziom cholesterolu, ciśnienie tętnicze, glukoza czy kwas moczowy, wzrost wagi o 10% jest powiązany ze wzrostem ciśnienia o 6,5 mmHg [23]. Inne badania pokazały, iż wpływ wskaźnika masy ciała (ang. *body mass index, BMI*) i wskaźnika brzusznej lokalizacji tkanki tłuszczowej (ang. *waist/hip ratio, WHR*) na wartość ciśnienia tętniczego jest niezależny od płci, wieku, wywiadu rodzinnego i leczenia przeciwnadciśnieniowego [24]. Wykazano, że od wartości BMI≥18,5 kg/m^2, wraz ze wzrostem tego parametru wzrasta istotnie częstość występowania nadciśnienia i stopień jego zaawansowania [25]. Nadciśnienie tętnicze występuje 6 razy częściej u osób otyłych niż u szczupłych mężczyzn i kobiet [26]. Nie znany jest dokładny mechanizm za pomocą którego otyłość podwyższa ciśnienie tętnicze, ale wiadomo, że podwyższone BMI jest powiązane ze wzrostem objętości osocza oraz rzutu serca. Obydwie te zmiany mogą być odwrócone przez zrzucenie wagi, co wiąże się z obniżeniem ciśnienia [27].

I.2.2.3. Insulinooporność

Relacja pomiędzy insulinoopornością i występowaniem nadciśnienia pierwotnego jest bardzo złożona. Wiadomo, że insulina zwiększa retencję sodu w nerkach [28]–[30]. Jest ona również związana ze wzrostem aktywności układu współczulnego [31] oraz stymulacją wzrostu komórek mięśniówki *in vitro* [32]. Podwyższony poziom insuliny został zaobserwowany częściej u pacjentów z nadciśnieniem pierwotnym [33]–[35] i wysokim prawidłowym [36] niż u pacjentów z ciśnieniem optymalnym/prawidłowym. Wspólnym czynnikiem ryzyka łączącym insulinooporność z nadciśnieniem jest otyłość [37]. Zdania na temat zależności pomiędzy interakcją nadciśnienia z insulinoopornością a otyłością są jednak podzielone. Część badaczy uważa, iż insulinooporność i otyłość są niezależnymi czynnikami ryzyka nadciśnienia [38], pozostali uważają, że są one ze sobą ściśle powiązane [39]–[42].

I.2.2.4. Wysokie spożycie soli

Od dawna, wysokie spożycie soli jest kojarzone ze wzrostem ciśnienia tętniczego. Jak wykazały badania, nawet niewielkie obniżenie spożycia soli przez cztery lub więcej tygodni powoduje znaczący spadek ciśnienia zarówno w grupie z nadciśnieniem jak i ciśnieniem prawidłowym [43]. Inne badania pokazują, że średnie ciśnienie skurczowe oraz rozkurczowe wzrasta wraz ze wzrostem stosunku sodu w moczu do kreatyniny [44]. Obecne rekomendacje aby obniżyć spożycie soli z 9-12 do 5-6g/dzień, zgodnie z badaniami powinny wywrzeć korzystny efekt na ciśnienie krwi, a w przyszłości doprowadzić nawet do zmniejszenia tej granicy do 3g/dzień [43].

I.2.2.5. Niskie spożycie potasu oraz wapnia

Nadciśnienie tętnicze, oprócz wysokiego spożycia soli zawierającej sód może być również spowodowane zbyt niskim spożyciem potasu oraz wapnia. Stosunek ilości spożywanego sodu do ilości spożywanego potasu może mieć większe znaczenie, niż każdy z tych czynników osobno [45]. Obniżenie stosunku spożycia sodu do spożycia potasu skutkowało obniżeniem ciśnienia [46]. Badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych pokazały, iż stosowanie specjalnie zrównoważonej diety (ang. *Dietary Approaches to Stop Hypertension, DASH*) zawierającej między innymi zwiększoną ilość potasu, magnezu oraz wapnia spowodowało obniżenie ciśnienia tętniczego niezależnie od poziomu przyjmowanego sodu. Największy spadek ciśnienia odnotowano w grupie osób stosujących dietę DASH oraz spożywających sód w niewielkich ilościach [47]. Dowodów na działanie wapnia oraz potasu dostarczają również inne badania, gdzie wykazano że wzrost spożycia wapnia wiąże się z obniżeniem ciśnienia, zarówno skurczowego jak i rozkurczowego [48], natomiast zwiększenie spożycia potasu nie tylko obniżało ciśnienie, ale również zmniejszało ryzyko wystąpienia zawału o 24% [49].

I.2.2.6. Wysokie spożycie alkoholu

Dzienne, średnie spożycie alkoholu w postaci czerwonego wina ma działanie protekcyjne pod względem występowania nadciśnienia i innych objawów zespołu metabolicznego [50]. W przeciwieństwie do tego, spożywanie alkoholu w nadmiernych ilościach jest uznawane za istotny czynnik ryzyka wystąpienia nadciśnienia. Jak udowodniono, w grupie osób nadużywających alkoholu nadciśnienie występowało 4-krotnie częściej w porównaniu do osób niepijących. Zauważono również, że u osób, które kiedyś nadużywały alkoholu poziom ciśnienia był podobny do tych, które w ogóle nie piją alkoholu, co oznacza, że wpływ alkoholu jest odwracalny [51]. Ostatnie badania dowiodły, iż spożycie czerwonego wina w wysokiej dawce 200-300 ml/dzień (146-218 g alkoholu/tydzień) zwiększa zarówno skurczowe jak i rozkurczowe ciśnienie krwi u kobiet w wieku przed menopauzalnym [52], co jest w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi zarówno kobiet jak i mężczyzn [53].

I.2.2.7. Wiek

Częstość występowania nadciśnienia tętniczego wzrasta wraz z wiekiem. Jest to związane ze zmianami, jakie zachodzą w ścianie naczyń krwionośnych pod wpływem starzenia. Głównie ze wzrostem sztywności ścian naczyń [54]. Jest ono spowodowane nagromadzeniem się złogów wapniowych, zmianami w komórkach mięśni gładkich w warstwie środkowej ściany naczynia oraz jakościowymi i ilościowymi zmianami kolagenu [55]. Z polskich badań NATPOL III PLUS wynika, iż w młodszej populacji nadciśnienie tętnicze, bez podziału na płeć średnio występowało u 7,2%, w grupie 40-59 lat już u 34,1%, natomiast w grupie powyżej 59 roku życia aż u 57,5% badanych [56]. Podobne wyniki pokazują również badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych, gdzie wartości te dla powyższych grup wynoszą odpowiednio: 7,3%, 32,6% oraz 66,3% w grupie powyżej 59 roku życia [57]. Częstość występowania nadciśnienia wzrasta prawie 2-krotnie u osób powyżej 59 roku życia w porównaniu do osób młodszych.

I.2.2.8. Stres

Wraz ze wzrostem rozwoju cywilizacyjnego zwiększyła się zapadalność na pierwotne nadciśnienie tętnicze, spowodowane coraz szybszym tempem życia i dużą ilością nowych bodźców stresowych. Stres psychiczny, często związany ze środowiskiem pracy lub problemami osobistymi jest istotnym czynnikiem ryzyka w rozwoju nadciśnienia. Jak wykazały badania przeprowadzone na urzędnikach państwowych,

podniesione ciśnienie w reakcji na stres ma późniejszy udział w rozwoju nadciśnienia [58]. W innym badaniu zaobserwowano związek pomiędzy natężeniem pracy a nadciśnieniem. Wyniki były jednak istotne tylko dla grupy mężczyzn [59]. Natomiast badania przeprowadzone w Finlandii wśród pracowników jednej z firm wykazały, iż wysokie natężenie pracy oraz niskie wynagrodzenie, brak uznania i małe szanse na rozwój zawodowy ponad 2-krotnie zwiększały umieralność z powodu chorób sercowo-naczyniowych [60].

I.2.3. Główne komponenty patofizjologii rozwoju nadciśnienia tętniczego

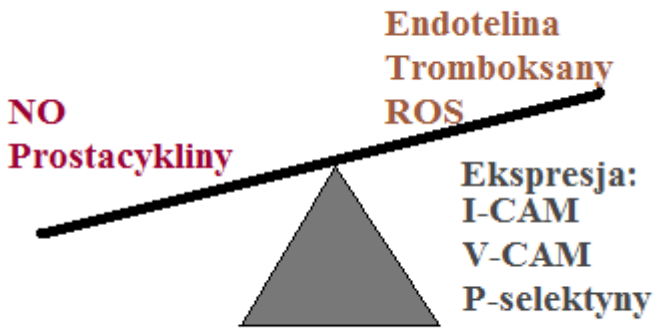
Nadciśnienie tętnicze to bardzo złożona choroba, której patomechanizm nie został jeszcze do końca wyjaśniony. Istnieje kilka głównych procesów patologicznych, które współistniejąc ze sobą prowadzą do rozwoju nadciśnienia tętniczego. Należą do nich:

1. Dysfunkcja śródbłonka.
2. Zaburzenie pracy nerek.
3. Zaburzenie w sygnalizacji ośrodkowego układu nerwowego.
4. Stres oksydacyjny.
5. Stany zapalne w obrębie narządów docelowych (nerek, naczyń krwionośnych).

I.2.3.1. Dysfunkcja śródbłonka

Śródbłonek naczyniowy jest największym organem wewnątrzwydzielniczym człowieka, umiejscowionym pomiędzy krwią a ścianą naczynia i tkankami. Komórki śródbłonka należą do wyspecjalizowanych nabłonków płaskich tworzących jednowarstwową spolaryzowaną wyściółkę wewnętrznej ściany naczyń krwionośnych. Od strony światła naczynia powierzchnia tych komórek jest najczęściej gładka, z nielicznymi utworzonymi przez błony plazmatyczne, mikrokosmkami limitującymi połączenia międzykomórkowe [61]. Do podstawowych funkcji śródbłonka należy utrzymanie homeostazy układu krążenia i całego organizmu. Odgrywa on również kluczową rolę w utrzymywaniu odpowiedniego napięcia i struktury ścian naczyń krwionośnych, a zaburzenia w jego pracy wiążą się z rozwojem miażdżycy, nadciśnienia tętniczego, cukrzycy oraz przewlekłej niewydolności nerek [62]. Śródbłonek zarówno anatomicznie jak i czynnościowo jest kluczowym miejscem, gdzie mają początek patologiczne procesy dotyczące ściany naczyniowej. Komórki śródbłonka uwalniają

dwie grupy substancji o przeciwstawnych właściwościach. Do pierwszej grupy należą związki naczyniorozszerzające takie, jak prostacyklina i tlenek azotu oraz szereg innych substancji określanych ogólnie jako śródbłonkowe czynniki rozszerzające naczynia (ang. *Endothelium-derived relaxing factors, EDRF*). Do drugiej grupy należą czynniki powodujące skurcz mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych, znane pod nazwą śródbłonkowe czynniki zwężające naczynia (ang. *Endothelium-derived contracting factors, EDCF*). Do tej grupy zaliczają się między innymi endotelina, tromboksany i wolne rodniki tlenowe (ang. *Reactive Oxygen Species, ROS*) [63]. Do dysfunkcji śródbłonka dochodzi, gdy zachwianiu ulega równowaga tych dwóch grup na korzyść EDCF (*Rycina* 1). Mechanizmy te obejmują również nasilenie ekspresji molekuł adhezyjnych (ICAM−1,VCAM−1, P−selektyny) [62] oraz zmianę konfiguracji powierzchni błony od strony światła naczynia mającej odzwierciedlenie w powstawaniu mikrokosmków [61].



Rycina 1. Schemat przedstawiający zachwianie równowagi związków powodujących rozkurcz oraz skurcz naczynia w wyniku dysfunkcji śródbłonka.

W wyniku tego dochodzi do zwiększenia powierzchni stycznej z elementami morfotycznymi krwi oraz między innymi do wzmożonej aktywacji płytek krwi. Następnie dochodzi do rozszczelnienia złączy międzykomórkowych i powstania kanałów, poprzez które przedostają się monocyty i limfocyty ze światła do wnętrza naczynia oraz tkanek okołonaczyniowych [64], [65]. Tak rzęski śródbłonka odgrywają szereg funkcji ochronnych w homeostazie naczyń krwionośnych.

Jedną z najistotniejszych molekuł regulujących ochronne działania śródbłonka jest produkowany przez jego komórki tlenek azotu (NO) i właśnie zależna od NO rozkurczowa funkcja naczyń uważana jest za podstawowy wykładnik funkcji śródbłonka [66]. Tlenek azotu w śródbłonku syntetyzowany jest z L-argininy w reakcji katalizowanej

przez śródbłonkową izoformę syntazy tlenku azotu (ang. *Endothelial Nitric Oxide Synthase, e-NOS*). Jest on produkowany w warunkach fizjologicznych, ale jego produkcja może być zwiększona pod wpływem agonistów receptora lub sił ścinających działających na ścianę naczynia. NO aktywuje cyklazę guanylową przez co zwiększa stężenie cGMP w komórkach mięśni gładkich naczyń, co prowadzi do ich rozszerzenia [67]. Tlenek azotu jest głównym czynnikiem równoważącym skurcz naczyń wywoływany przez współczulny układ nerwowy [68] oraz układ renina-angiotensyna-aldosteron [69]. Dodatkowo NO ma działanie antyproliferacyjne, polegające na zmniejszeniu mitogenezy komórek mięśni gładkich, hamuje agregację płytek krwi oraz zapobiega utlenianiu lipidów [63]. Zmniejszona biodostępność tlenku azotu, prowadzi do zwiększenia ekspresji VCAM-1, jak również liganda CD40 i tym samym umożliwia adhezję zaktywowanych limfocytów T i monocytów do ściany naczynia, co rozpoczyna reakcję zapalną w ścianie naczynia [70], [71].

Ze względu na liczne naczynioochronne działania NO, obniżenie jego biodostępności jest ważne w patogenezie wielu schorzeń. Istnieje kilka niezależnych mechanizmów obniżenia biodostępności NO. Kluczowym czynnikiem regulującym jest dostępność substratu, środowisko reakcji, poziom aktywności eNOS oraz regulująca je dostępność kofaktora eNOS – tetrahydrobiopteryny (BH4) (a w szczególności utlenianie do BH2) oraz działania kompetycyjnych inhobitorów, np. ADMA (ang. *Asymmetric Dimethyloarginine*) [62]. Wiele z powyższych mechanizmów wykazuje zmiany w NT. U chorych z nadciśnieniem tętniczym zaobserwowano zmniejszenie biodostępności NO [72], które może być następstwem zmniejszonej jego syntezy w wyniku uszkodzenia komórek śródbłonka, na przykład przez wolne rodniki [19]. Inną przyczyną zmniejszenia dostępności NO jest działanie asymetrycznej dimetyloargininy ADMA, której stężenie dodatnio koreluje z wiekiem, średnim ciśnieniem tętniczym i poziomem glukozy [73]. Ponadto NO może być unieczynniony przez uwalniany w nadmiarze w nadciśnieniu anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$) [74]. Przed szkodliwym oddziaływaniem wolnych rodników chronią enzymatyczne związki antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa SOD (*Super Oxide Dismutase*) i peroksydaza glutationowa GPx (*Glutathione Peroxidase*) [75]oraz nieenzymatyczne, z których kluczową rolę odgrywa glutation GSH (*γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycine*) [76]. Jednak w nadciśnieniu tętniczym mechanizmy te mogą być upośledzone, co manifestuje się związkiem stresu oksydacyjnego z nadciśnieniem.

I.2.3.2. Zaburzenie pracy nerek

Związki pomiędzy nadciśnieniem tętniczym a nerkami są znane i akceptowane od dawna, ponieważ to właśnie one odgrywają zasadniczą rolę w regulacji ciśnienia tętniczego krwi. Nadciśnienie spowodowane zaburzeniem pracy nerek, czyli tak zwane nerkowopochodne występuje u ok 5% chorych na NT. Może być one spowodowane chorobą nerek (miąższowonerkowe) lub zwężeniem tętnicy nerkowej (naczyniowonerkowe) [77]. Nerki, w odróżnieniu od współczulnego układu nerwowego odpowiedzialne są za długotrwałe zmiany ciśnienia zachodzące w ciągu dnia, tygodnia czy lat. Dzieje się to głównie poprzez regulację gospodarki sodowej organizmu w nerkach. Gdy dochodzi do wzrostu ciśnienia, powinno się zwiększyć wydalanie sodu i wody z organizmu do momentu, aż ciśnienie powróci do normalnego poziomu [78]. Do nadciśnienia dochodzi gdy mechanizmy te ulegają zaburzeniu. Choroby nerek, takie jak ostre i przewlekłe zapalenie kłębuszków nerkowych i nefropatia cukrzycowa wywołują nadciśnienie miąższowonerkowe, między innymi przez upośledzenie wydalania sodu i wody przez nerki oraz wzrost produkcji substancji obkurczających naczynia, takich jak angiotensyna II i endotelina 1, przy jednoczesnym zmniejszeniu poziomu substancji rozkurczających, np. NO. Natomiast choroby naczyń nerek (np. miażdżyca, zator, tętniak tętnicy nerkowej) mogą spowodować nadciśnienie naczyniowonerkowe na skutek niedokrwienia nerki z następczym nadmiernym wydzielaniem reniny [77]. W nadciśnieniu nerkowopochodnym istotne znaczenie odgrywa ilość sodu przyjmowanego z dietą. U części pacjentów z NT, wzrost ciśnienia jest wrażliwy na zmiany stężenia sodu w diecie (ang. *salt sensitivity*). Pacjenci ci różnią się poziomem wydalania sodu z organizmu od chorych niewrażliwych na sól. Najczęściej nadciśnienie wywołane wrażliwością na sól określa się jako 10% wzrost ciśnienia krwi podczas wysokiego spożycia soli w porównaniu do niskiego spożycia soli [79].

I.2.3.3. Zaburzenie sygnalizacji ośrodkowego układu nerwowego

Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) może być kluczowym miejscem działania czynników pro-nadciśnieniowych. Co więcej, mechanizmy te mogą stanowić wspólny mianownik dla szeregu elementów patogenezy NT. OUN reguluje bowiem funkcje naczyń, nerek a także układu odporności. Układ współczulny jest podstawowym mechanizmem krótkotrwałej regulacji ciśnienia tętniczego. Jego pobudzenie prowadzi do przyspieszenia akcji serca i skurczu naczyń oporowych, przez co zapobiega nadmiernemu

spadkowi ciśnienia. Jego pobudzenie może wpływać na długookresową regulację ciśnienia. Układ współczulny może zwiększać aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron poprzez zwiększanie sekrecji reniny. Może również prowadzić do przerostu mięśnia sercowego czy zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej dla sodu oraz zmniejszać wrażliwość baroreceptorów [80].

Noradrenalina produkowana przez układ współczulny jest neurotransmiterem w organach limfatycznych. Organy te są unerwione przez zakończenia nerwowe noradrenergiczne, cholinergiczne i peptydergiczne. Najczęściej z nich występują zazwojowe włókna noradrenergiczne. Zakończenia nerwowe mogą tworzyć ścisłe połączenia przypominające synapsę z limfocytami oraz makrofagami, na powierzchni których znajdują się receptory adrenergiczne, peptydergiczne oraz opioidowe. Noradrenalina wiąże się z receptorami β_2-adrenergicznymi, przez co aktywuje kaskadę kinaz. Bezpośrednim tego efektem w limfocytach T jest zahamowanie proliferacji w odpowiedzi na bodziec oraz wytwarzania IL-12 i IFNγ. Jednocześnie aktywacji ulegają limfocyty Th2, o czym świadczyć może zwiększona produkcja cytokin IL-4, IL-5, IL-6 oraz IL-10. W makrofagach pod wpływem działania noradrenaliny dochodzi do zmniejszenia produkcji IL-6, natomiast w limfocytach B w zależności od czynnika stymulującego dochodzi albo do zahamowania albo wzmocnienia ich proliferacji [81]. Współczesne badania wykazały, iż stres oksydacyjny w narządach okołokomorowych mózgu, a szczególnie w narządach podsklepieniowych jest zaangażowany w aktywację limfocytów T. Są to jedne z nielicznych obszarów mózgu, w których naczynia włosowate mają strukturę okienkową, przez co bariera krew-mózg jest niekompletna i niefunkcjonalna. Dzięki temu mogą tam działać czynniki krążące we krwi, jak np. angiotensyna II. Dodatkowo, ROS produkowane przez neurony narządów okołokomorowych biorą udział w rozwoju nadciśnienia, między innymi przez aktywację wydzielania przekaźników układu współczulnego. Myszy z wyciszonym genem zewnątrzkomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej w mózgu, charakteryzowały się podwyższonym ciśnieniem tętniczym krwi o około 20 mmHg. Zwierzęta te były bardziej wrażliwe na niskie dawki Ang II. Zaobserwowano, iż wyciszenie genu SOD doprowadziło do zwiększonego odsetka zaktywowanych limfocytów T oraz naczyniowego stanu zapalnego związanego z infuzją angiotensyny II. Analizy tętna oraz zmienności ciśnienia pozwoliły wysnuć wniosek, iż powyższe obserwacje związane były z aktywacją i przekaźnikami układu współczulnego [82].

I.2.3.4. Stres oksydacyjny

Głównymi elementami odpowiadającymi za powstawanie stresu oksydacyjnego są produkowane w nadmiarze reaktywne formy tlenu oraz azotu (ang. *Reactive Nitrogen Species, RNS*). Do grupy ROS zaliczane są cząsteczki zawierające atom tlenu z niesparowanym elektronem, np. anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$ oraz hydroksylowy $^{\bullet}OH$, jak również cząsteczki o wysokiej reaktywności, ale nie posiadające niesparowanego elektronu, np. nadtlenek wodoru H_2O_2. Do tej grupy zaliczyć można również produkty powstałe w czasie reakcji ROS z elementami strukturalnymi komórki. Do RNS należą natomiast takie cząsteczki jak np. nadtlenoazotyn ($ONOO^{\bullet}$), powstający w reakcji $O_2^{\bullet-}$ z NO [83]. Zarówno ROS jak i RNS produkowane są podczas prawidłowego metabolizmu komórki i mogą wywierać korzystne jak i szkodliwe działanie na nią. Reaktywne formy tlenu są zaangażowane między innymi w podstawowe mechanizmy układu odpornościowego w walce z drobnoustrojami na drodze fagocytozy dzięki ich właściwościom toksycznym [81]. Reaktywne formy tlenu oraz azotu są zaangażowane w regulację wzrostu, starzenia się i śmierci komórki oraz służą jako cząsteczki sygnałowe w wielu procesach. Mogą one powstawać na skutek wyciekania elektronów z mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów podczas produkcji ATP, jednakże ilości te są niewielkie [83]. Wysoki poziom glukozy oraz wolnych kwasów tłuszczowych może doprowadzić do zaburzenia pracy mitochondriów i w konsekwencji do zwiększonej, szkodliwej produkcji wolnych rodników w komórce [84]. W rezultacie, utlenieniu mogą ulec białka [85], lipidy [86], [87] i kwasy nukleinowe [88], które mają kluczowe znaczenie dla komórki. Uszkodzenie ich pod wpływem wolnych rodników może prowadzić do upośledzenia funkcji a nawet śmierci komórki [83], dlatego organizmy żywe wykształciły mechanizmy unieczynniające wolne rodniki przez enzymy antyoksydacyjne: dysmutazę ponadtlenkową, katalazę, reduktazę glutationową, peroksydazę glutationową i tioredoksyny [74].

W komórkach śródbłonka, głównym źródłem ROS są oksydazy NADPH (ang. *NADPH oxiadase, NOX*), oksydaza ksantynowa, mitochondria oraz rozprzężona śródbłonkowa syntaza tlenku azotu, np. w przypadku braku substratu lub kofaktora – BH4 [89]. Wśród tych enzymów szczególnie ważne są oksydazy NADPH oraz rozprzężona syntaza NO. Oksydazy NADPH typowo zbudowane są z pięciu podjednostek: dwóch podjednostek błonowych, p22phox (ang. *phox-phagocyte oxiadse*) i podjednostki katalitycznej gp91phox (znanej również jako NOX2) oraz podjednostek cytoplazmatycznych (np. p47phox, p67phox, p40phox) [90]. Pod wpływem sygnału

stymulującego, podjednostki znajdujące się w cytozolu formują kompleks i łączą się z podjednostkami ulokowanymi w błonie, formując aktywną oksydazę. U ssaków, do grupy tej zalicza się siedem typów: Nox1-5 oraz Duox1-2 [91]. W śródbłonku zidentyfikowano Nox1, Nox2, Nox4 oraz Nox5 [89]. Zwiększona aktywność Nox1 w naczyniach została zaobserwowana w modelu chorób sercowo-naczyniowych takich jak nadciśnienie, miażdżyca, cukrzyca czy hipercholesterolemia [89], [92]. Nox2 wywiera wpływ na funkcje śródbłonka i biologię tlenku azotu ludzi, co zostało potwierdzone u pacjentów z przewlekłą chorobą ziarniniakową, która charakteryzuje się mutacją genu Nox2. U pacjentów tych zaobserwowano zwiększoną biodostępność tlenku azotu oraz zwiększoną relaksację naczyń [93]. Kolejna z tej rodziny oksydaz, Nox4, nie potrzebuje do swojej aktywacji pozostałych podjednostek. Jest ona aktywna konstytutywnie i produkuje głównie H_2O_2. Rola jej w śródbłonku jest niejasna, gdyż wywiera ona zarówno działanie negatywne w stanach chorobowych jak nadciśnienie i miażdżyca, jak również pozytywne w ochronie np. przed przerostem i rozszerzeniem serca pod wpływem nadmiernych, przewlekłych obciążeń [89]. Oksydaza Nox5, nie występuje u gryzoni. Jest niezależna od pozostałych podjednostek, a jej aktywność jest regulowana przez stężenie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia Ca^{2+} [94]. Zwiększona aktywność Nox5 została zaobserwowana u pacjentów z chorobą wieńcową [95]. Wzrost ekspresji Nox5 wiąże się ze wzrostem produkcji NO w komórkach śródbłonka. [96].

Drugim, ważnym źródłem ROS w kontekście śródbłonka jest eNOS, która w fizjologicznych warunkach, w obecności L-argniny i tetrahydrobiopteryny, produkuje NO. BH4 jest kluczowym kofaktorem eNOS i podstawowa aktywność eNOS koreluje z ilością BH4. Jest ona odpowiedzialna za stabilizację formowanych dimerów NOS, koniecznych dla jej funkcjonalnej aktywności [97], więc gdy spada biodostępność BH4, w NOS zachodzą zmiany strukturalne i dochodzi do rozprzężenia molekularnego. Skutkuje to zmienioną aktywność katalityczną. Następnie zniszczeniu ulega połączenie z L-argininą i enzym rozpoczyna produkcję $O_2^{\bullet-}$ oraz H_2O_2 zamiast NO [97]. Dostępność tetrahydrobiopteryny jest regulowana przez stres oksydacyjny, między innymi przez utlenianie do nieaktywnej formy BH2 [98]. W warunkach stanu zapalnego biosynteza BH4 jest podwyższona [99]. Również spadek dostępności substratu w postaci L-argininy został połączony z rozprzężeniem eNOS i obniżoną produkcją NO. U pacjentów z nadciśnieniem oraz pacjentów bez nadciśnienia, ale z uwarunkowaniami genetycznymi predysponującymi do rozwoju nadciśnienia pierwotnego wykazano upośledzony transport L-argininy [100].

I.2.3.5. Stan zapalny w nadciśnieniu tętniczym

I.2.3.5.1. Mechanizmy stanu zapalnego w naczyniach krwionośnych

Reakcja zapalna, będąca odpowiedzią organizmu na uszkodzenie tkanek pod wpływem bodźców fizycznych, chemicznych oraz biologicznych, jest kluczowym mechanizmem obronnym organizmu. Jednakże, nieopanowana i przewlekła leży u podstaw chorób cywilizacyjnych, zarówno sercowo-naczyniowych, jak i nowotworów [83]. Reakcja zapalna ma charakter złożony i wieloetapowy. Bardzo ważne jest zwiększenie przepuszczalności naczyń [61], [65]. Do wędrówki limfocytów w stronę tkanki nielimfatycznej, w której toczy się stan zapalny, dochodzi po aktywacji limfocytu na drodze klasycznej prezentacji antygenów. Kluczową rolę w tym procesie odgrywają cząsteczki adhezyjne na powierzchni śródbłonka i chemokiny uwalniane przez tkanki objęte stanem zapalnym oraz specyficzne receptory na powierzchni leukocytów [81]. Po marginalizacji i przyleganiu leukocytów do powierzchni śródbłonka naczynia, przyczepiają się one do selektyn i zaczynają toczyć. W kolejnym etapie, pod wpływem chemokin dochodzi do aktywacji komórki i zmiany jej kształtu z okrągłego na płaski, ściśle przylegający do ściany naczynia. Dzięki temu oraz dzięki zwiększonej przepuszczalności między komórkami śródbłonka, leukocyt może się przedostać przez barierę śródbłonka do miejsca reakcji zapalnej na drodze diapedezy [83]. Innym aspektem jest pojawienie się odpowiedzi typu humoralnego z występującymi mediatorami stanu zapalnego, takimi jak histamina, białko C-reaktywne (CRP), białka dopełniacza, interleukiny (IL), prostaglandyna czy tromboksan, odpowiedzi typu hemostatycznego, obejmującej między innymi agregację płytek i tworzenie skrzepu, jak również udział odpowiedzi immunologicznej typu swoistego i nieswoistego [101]. Wszystkie te procesy mają na celu szybkie ograniczenie reakcji zapalnej, wyeliminowanie czynnika zapalnego i naprawę tkanki. W sytuacji gdy czynnik zapalny nie zostanie wyeliminowany, będzie on trwale stymulował układ odpornościowy doprowadzając do przewlekłego stanu zapalnego. W takim przypadku dochodzi równocześnie do uszkodzenia i naprawy tkanki, w której toczy się reakcja zapalna. Stan taki został udowodniony między innymi w zapaleniu przyzębia [102], alergicznych stanach zapalnych [103] i zakażeniu *Helicobacter pylori* [104].

Pogląd, iż miażdżyca jest procesem zapalnym jest powszechnie akceptowany, ale udział reakcji zapalnej w nadciśnieniu tętniczym nie jest jasny. Do niedawana aktywacja układu odpornościowego u pacjentów z nadciśnieniem traktowana była jako jego

następstwo i powikłanie leżące u podstaw uszkodzeń narządowych obserwowanych w tym schorzeniu [105]. Pomimo tego, iż obecne wyniki badań przeprowadzonych zarówno na ludziach jak i zwierzęcych modelach nadciśnienia dowodzą protekcyjnego wpływu hamowania aktywacji układu odporności w osłabianiu nadciśnienia, mechanizmy te ciągle wymagają lepszego zrozumienia i wytłumaczenia. Jasne jest natomiast, iż reakcje zapalne uczestniczą zarówno w inicjacji nadciśnienia tętniczego jak i w modulowaniu rozwoju jego następstw. W naczyniach krwionośnych, mechanizmem zależnym od aktywacji reakcji zapalnej jest miażdżyca, której NT jest istotnym czynnikiem ryzyka.

I.2.3.5.2. Rola układu odpornościowego w nadciśnieniu tętniczym

Klasycznie, główny układ zgodności tkankowej na komórkach prezentujących antygen (ang. *antigen-presenting cells, APC*) prezentuje peptydy receptorom limfocytów T (TCR). Aby limfocyt naiwny uległ aktywacji, oprócz tego sygnału musi otrzymać drugi sygnał od cząsteczki kostymulującej. Najważniejszą rolę w przekazaniu tego sygnału odgrywają interakcje receptorów CD28, ICOS1, CD2 na powierzchni limfocytu T z cząsteczkami CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), ICOS-L, CD58 oraz CD48 na komórkach APC. Jeśli limfocyt naiwny nie otrzyma drugiego sygnału, to nie zostanie aktywowany i wejdzie w stan anergii, czyli utraci możliwość aktywacji po rozpoznaniu antygenu w przyszłości. Limfocyty będące w stanie aktywacji oraz limfocyty pamięci potrzebują tylko pierwszego sygnału do rozpoczęcia proliferacji [81]. Klasyczny szlak aktywacji z udziałem drugiego sygnału, przez cząsteczki kostymulujące CD28/B7 jest konieczny do rozwoju nadciśnienia. W mysim modelu nadciśnienia indukowanego angiotensyną II lub solą DOCA zablokowanie ścieżki kostymulacji zależnej od B7 skutkowało obniżonym wzrostem ciśnienia w porównaniu do myszy kontrolnych. Aktywacja krążących limfocytów T, poziom cytokin produkowanych przez limfocyty T i akumulacja limfocytów T w naczyniach tych myszy były obniżone [106]. W innych badaniach przeprowadzonych na szczurach Dahl/Salt Sensitive (Dahl/SS) rozwijających nadciśnienie przy wysokim spożyciu soli, wykazano, iż u szczurów, w których łańcuch ξ, wchodzący w skład TCR był usunięty, nadciśnienie tętnicze oraz uszkodzenia nerek były zahamowane [107]. Powyższe dane dowodzą istotnej roli zarówno receptorów limfocytów T jak i interakcji CD28/B7 w aktywacji limfocytów T w patogenezie nadciśnienia.

Biorąc pod uwagę ważną rolę układu odporności w patogenezie nadciśnienia, zasadne wydaje się pytanie o mechanizmy tej aktywacji. Wiele danych wskazuje na

znaczenie tworzenia neoantygenów. Są to cząsteczki powstające na wskutek działania różnych procesów, takich jak modyfikacje białek, lipidów i kwasów nukleinowych pod wpływem utleniania [82].

I.2.3.5.3. Rola limfocytów T w nadciśnieniu tętniczym

Jest wiele czynników stanu zapalnego, biorących udział w rozwoju nadciśnienia, lecz największe zainteresowanie skupia się na roli limfocytów T. Udział limfocytów T w nadciśnieniu tętniczym został wykazany w modelu zwierzęcym nadciśnienia tętniczego zależnego od angiotensyny II [108]. Badania u ludzi również wykazały istotne zmiany subpopulacji limfocytów T w NT. Pierwsze badania prowadzone były już w latach 60-tych ubiegłego stulecia, kiedy Grollman i współpracownicy zademonstrowali hamujący wpływ immunosupresji na rozwój nadciśnienia w modelu zawału nerki oraz wyindukowali nadciśnienie u normotensyjnych szczurów przez przeszczep limfocytów od szczurów z zawałem nerki [109]. W modelach spontanicznego nadciśnienia, niedobór limfocytów T spowodowany usunięciem grasicy, powoduje obniżenie ciśnienia tętniczego krwi [110]. Obecnie, zrozumienie różnicowania limfocytów T oraz funkcji ich poszczególnych subpopulacji w patogenezie nadciśnienia tętniczego jest bardzo dynamicznie rozwijającym się polem nauki.

Limfocyty cytotoksyczne (CD8+), zabijają komórki poprzez rozpoznanie obcych cząsteczek MHC (główny układ zgodności tkankowej, ang. *major histocompatibility complex*) klasy I lub antygenów połączonych z własnymi cząsteczkami MHC klasy I. Mechanizm zabijania wiąże się z indukcją apoptozy zależnej od perforyny, granzymów i granulizyny z ziaren cytolitycznych lub od interakcji cząsteczek nadrodziny TNF w błonie komórki efektorowej i cząsteczek z nadrodziny TNF-R w błonie komórki docelowej [81]. Limfocyty CD4+ (Th, pomocnicze) dzielą się na kolejne podtypy, do których należą: Th1, Th2, Th17 oraz Treg (regulatorowe, supresorowe). Limfocyty pomocnicze wspomagają odpowiedź typu humoralnego i komórkowego, zarówno poprzez kontakt bezpośredni jak i wydzielane cytokiny. Biorą one udział w aktywacji, proliferacji i różnicowaniu limfocytów B, prekursorów limfocytów T cytotoksycznych oraz pobudzają makrofagi. Rozpoznają one antygen połączony z cząsteczkami MHC klasy II. Limfocyty pomocnicze Th1 wytwarzają IL-2 oraz IFN γ i biorą istotny udział we wspomaganiu odpowiedzi typu komórkowego. Limfocyty Th2 wydzielają interleukiny 4, 5, 10 i 13 będące czynnikami wzrostu i różnicowania limfocytów B, przez co wspomagają odpowiedź humoralną. Limfocyty Th17 są subpopulacją wydzielającą

głównie IL-17A, IL-17F oraz IL-6 i stymulują szybki rozwój reakcji zapalnej w miejscu wniknięcia drobnoustrojów, grzybów i pasożytów. Są one również zaangażowane w rozwój niektórych chorób autoimmunizacyjnych i alergicznych [81]. Ostatnia grupa limfocytów T CD4+, to limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+FOXP3+. Są one zabezpieczeniem organizmu przed autoagresją limfocytów rozpoznających własne antygeny i są zdolne do hamowania wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej [81], [111]. Oprócz limfocytów T wykazujących ekspresję CD4 lub CD8, występuje nietypowa subpopulacja limfocytów T CD4-CD8- (ang. *double negative, DN,* podwójnie ujemne), charakteryzująca się występowaniem na swojej powierzchni receptorów TCR głównie typu γδ, a nie jak pozostałe limfocyty, αβ. Limfocyty T DN są populacją heterogenną. Uczestniczą w odpowiedzi przeciwzakaźnej i przeciwnowotworowej. Mogą zabijać komórki zakażone przez mikroorganizmy oraz komórki nowotworowe i uczestniczyć w regulacji odpowiedzi immunologicznej przez wydzielanie cytokin, np. IFNγ i IL-17. Są również zaangażowane w funkcje regulatorowe [81]

Limfocyty T CD8+ wywierają szkodliwe działanie w rozwoju nadciśnienia. Krążące limfocyty T cytotoksyczne od pacjentów z nadciśnieniem wykazały wyższą ekspresję cząsteczek efektorowych takich jak granzym i perforyna odpowiedzialnych za indukowanie apoptozy w komórkach docelowych oraz wyższy poziom cytokin prozapalnych IFNγ i TNFα. Dodatkowo, ilość starzejących się limfocytów CD8+ oznaczonych za pomocą markerów starzenia takich jak CD57+ lub CD28null również była wyższa u pacjentów nadciśnieniowych [112]. Badania na modelu nadciśnienia indukowanego angiotensyną II przeprowadzane na myszach dzikich (ang. *wild type, WT*), $CD8^{-/-}$ oraz $CD4^{-/-}$ wykazały udział limfocytów T CD8+ w rozwoju nadciśnienia. Podczas gdy myszy WT oraz $CD4^{-/-}$ rozwijały nadciśnienie po infuzji AngII, to u myszy $CD8^{-/-}$ wzrost ten był znacznie osłabiony. Taka sama reakcja nastąpiła przy nadciśnieniu wywołanym octanem deoksykortykosteronu (ang. *deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt*) [113]. Niezależnie od proponowanej powyżej dominującej roli limfocytów CD8+ w patogenezie nadciśnienia, wpływ limfocytów CD4+ również został udokumentowany. Zaobserwowano, iż u kobiet, u których zdiagnozowane zostało nadciśnienie ciążowe, występuje podwyższony odsetek krążących we krwi oraz łożyskowych limfocytów T CD4+. Limfocyty CD4+ są źródłem stresu oksydacyjnego u tych kobiet w porównaniu do kobiet z normalnym przebiegiem ciąży [114]. Większy odsetek limfocytów CD4+CD28null zaobserwowano u pacjentów z miażdżycą oraz po zawale serca. Wyższy odsetek tej subpopulacji występuje w niestabilnych blaszkach miażdżycowych w

porównaniu do stabilnych [115]. W badaniach skupiających się na subpopulacji limfocytów Th17 w nadciśnieniu tętniczym płucnym wykazano wyższe stężenie IL-17 w porównaniu do kontroli, co sugeruje udział tych limfocytów w patogenezie nadciśnienia [116]. Badania na mysim modelu $IL17^{-/-}$ wytłumaczyły częściowo udział IL17 w patogenezie nadciśnienia. Po infuzji angiotensyny II myszy $IL17^{-/-}$ reagowały podobnie jak myszy dzikie, początkowym wzrostem ciśnienia. Po 7 dniach ciśnienie tętnicze spadało. Obecna u WT infiltracja limfocytów T, dysfunkcja śródbłonka i stres oksydacyjny były zahamowane u myszy $IL17^{-/-}$. Może to sugerować, iż IL17 jest konieczna do utrzymania nadciśnienia tętniczego [117]. Nie wszystkie limfocyty T promują rozwój nadciśnienia tętniczego. Subpopulacja limfocytów CD4+, limfocyty Treg działają odmiennie od pozostałych. W modelu spontanicznego nadciśnienia u szczurów (ang. *Spontaneously hypertensive rats, SHR*) zaobserwowano spadek ilości komórek CD4+CD25+Foxp3+ wraz z wiekiem, przed rozwojem nadciśnienia. Indukcja limfocytów Treg u szczurów z podwyższonym ciśnieniem opóźniła rozwój nadciśnienia [118]. W innym modelu, dzięki przeszczepom komórek T regulatorowych wykazano ich protekcyjny wpływ przed rozwojem nadciśnienia tętniczego zależnego od angiotensyny II [119]. Najmniej typowa subpopulacja limfocytów T, CD4-CD8- jest zaangażowana w patogenezę nadciśnienia. Wykazano, że w mysim modelu nadciśnienia indukowanego Ang II, aż 30% limfocytów T naciekających tkankę okołonaczyniową stanowią limfocyty DN, podczas gdy w krwioobiegu stanowią one tylko około 5 % limfocytów T [108].

W obliczu współczesnych badań wydaje się, że o ile rola poszczególnych subpopulacji limfocytów T wymaga jeszcze badań, to sam ich udział w patogenezie i utrzymaniu nadciśnienia jest dobrze udokumentowany. Mechanizmy, na drodze których dochodzi do aktywacji limfocytów T, wymagają wyjaśnienia.

I.2.3.5.4. Rola limfocytów B i przeciwciał w nadciśnieniu tętniczym

W odpowiedzi typu humoralnego kluczową rolę odgrywają wolne przeciwciała obecne we krwi, limfie i płynach tkankowych, a także przeciwciała cytofilne, ulokowane na powierzchni komórek za pomocą receptora dla fragmentu Fc. Są one produkowane przez limfocyty B, które pod wpływem antygenu i kooperacji z limfocytami Th ulegają różnicowaniu w komórki plazmatyczne, których celem jest wytwarzanie i wydzielanie przeciwciał. Przeciwciała odgrywają istotną rolę w nabytej odpowiedzi immunologicznej dzięki ich zdolności do wiązania antygenów będących toksycznymi substancjami lub białkami pochodzącymi od patogenów i ich neutralizowania dzięki samemu związaniu lub jeśli antygen jest przyczepiony do komórki, zniszczeniu całej komórki np. na drodze fagocytozy [81], [120]. W fizjologicznych warunkach przeciwciała łączą się z obcymi cząsteczkami, ale w pewnych warunkach mogą rozpoznawać własne cząsteczki, co leżu u podstaw chorób autoimmunizacyjnych. Jedną z takich reakcji jest tworzenie nieimmunogennych przeciwciał działających jak agoniści receptorów i stymulujących je, na drodze podobnej do ich prawidłowych ligandów [120].

U pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym zaobserwowano podwyższony poziom przeciwciał IgG oraz IgM [121], [122]. Badania ostatnich lat ujawniły grupę cząsteczek, przeciwko którym są one skierowane. Do grupy tej należą między innymi: receptor angiotensyny II typ-1 (AT_1R), receptor α i β-1 adrenergiczny, zależne od potencjału kanały wapniowe typu L oraz białka szoku cieplnego. Receptor dla angiotensyny II odgrywa kluczową rolę w regulacji ciśnienia tętniczego. Jego obecność wykryto na powierzchni limfocytów T i limfocytów NK (ang. *natural killer cells*), przez co wykazano związek pomiędzy odpowiedzią immunologiczną a Ang II [123]. Ang II nasila proliferację limfocytów T *in vivo* i *in vitro*, a efekty te są blokowane przez sartany, antagonistów receptora AT_1 [124]. Z kolei makrofagi i komórki dendrytyczne są źródłem Ang II, która działa lokalnie i nasila aktywację limfocytów T. Inkubacja limfocytów T z Ang II w obecności klasycznych czynników aktywujących (anty-CD4 lub komórki dendrytyczne) nasila ich proliferacje i aktywację. W ciągu kilkunastu godzin dochodzi do stymulacji produkcji TNF-α [108]. Podwyższony poziom tej cytokiny stwierdzono u osób z nadciśnieniem. Najnowsze badania wskazują na istnienie w limfocytach T endogennego układu renina-angiotensyna, który moduluje czynności komórek T, przez aktywowanie oksydazy NADPH i produkcję nadtlenków, które stymulują produkcję TNF-α [125]. Angiotensyna II działając na limfocyty zwiększa również ekspresję CCR5, który jest receptorem dla chemokiny RANTES. Chemokina ta jest czynnikiem

stymulującym migrację limfocytów do przestrzeni okołonaczyniowej, a jej produkcja wzrasta w nadciśnieniu tętniczym pod wpływem Ang II. Limfocyty, znajdujące się w przestrzeni okołonaczyniowej, nerce lub mózgu uwalniają cytokiny TNF-α i IFN-γ, które są przyczyną dysfunkcji śródbłonka i nerek [108]. Również przeciwciała agonistyczne do receptora AT_1 (AT_1-AAs) mogą aktywować kaskadę cytokin prozapalnych biorących udział w patogenezie nadciśnienia ciążowego [126]. Przeciwciała AT_1-AAs zostały wykryte u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [127].

Oprócz limfocytów T w patogenezę nadciśnienia zaangażowane są również inne leukocyty. Limfocyty B produkują przeciwciała biorące udział w rozwoju nadciśnienia. Jednakże jak wykazały pionierskie badania nad udziałem limfocytów T i B w rozwoju nadciśnienia, to limfocyty T, a nie B były kluczowe w patogenezie nadciśnienia [108]. Wytłumaczyć to można mechanizmem działania limfocytów B. O ile limfocytom T do aktywacji wystarczy prezentacja antygenu, np. przez komórki dendrytyczne i kostymulacja, to w przypadku limfocytów B do ich aktywacji konieczna jest interakcja z limfocytami Th, co w przypadku ich braku nie jest możliwe [120]. Nowsze badania wykazały, iż transfer limfocytów Th od myszy z nadciśnieniem ciążowym do myszy z prawidłowym przebiegiem ciąży indukował produkcję AT_1-AAs oraz wzrost ciśnienia, co było osłabione w przypadku czynnika niszczącego limfocyty B [128].

I.2.3.5.5. Rola monocytów i makrofagów w nadciśnieniu tętniczym

Wszystkie opisane powyżej mechanizmy zaangażowane są w odpowiedź swoistą, czyli nabytą. W patogenezie nadciśnienia tętniczego bierze udział również odpowiedź nieswoista, czyli wrodzona. Klasycznie uznaje się, że mechanizmy te rozwinęły się filogenetycznie wcześniej niż swoiste, są mniej precyzyjne, lecz reagują szybko i są pierwszą linią obrony organizmu [81]. Odpowiedź nieswoista jest zależna od komórek efektorowych, które inicjują odpowiedź gospodarza i stan zapalny na drodze bezpośredniej lub pośredniej. Do pierwszej zalicza się fagocytozę przez komórki żerne, wydzielanie cytokin i chemokin oraz aktywację białek dopełniacza. Druga polega na aktywacji odpowiedzi swoistej przez prezentację antygenów limfocytom T. Do komórek efektorowych odpowiedzi nieswoistej zaliczyć można monocyty/makrofagi, zdolne do fagocytozy i wydzielania cytokin, komórki dendrytyczne, zdolne do prezentacji antygenów limfocytom T i wydzielania cytokin oraz komórki NK (ang. *natural killer*), zdolne do spontanicznego zabicia komórek nowotworowych i zakażonych przez wirusy

[81], [129]. Dzięki chemokinom i cząsteczkom adhezyjnym komórki odpowiedzi nieswoistej lokują się w obszarze zranienia, stanu zapalnego czy infekcji.

Monocyty krwi obwodowej są populacją heterogenną i mogą być podzielone na podstawie różnorodnych funkcji. U ludzi możemy rozpoznać trzy subpopulacje. Na podstawie ekspresji markerów CD14 i CD16 wyróżniamy monocyty klasyczne $CD14^{high}CD16-$ oraz monocyty wykazujące ekspresję cząsteczki CD16, ale różniące się poziomem ekspresji CD14: pośrednie $CD14^{high}CD16+$ oraz nieklasyczne $CD14^{dim}CD16+$ [130]. Klasyczne monocyty stanowią około 90% wszystkich monocytów krwi i specjalizują się w fagocytozie, produkcji wolnych rodników i wydzielaniu cytokin zapalnych w odpowiedzi na ligandy zewnątrzkomórkowego receptora TLR (ang. *Toll-like receptor*). Monocyty pośrednie stanowią około 5% populacji monocytów krwi i przypominają zaktywowane komórki. Wykazują wysoką ekspresję antygenu HLA-DR (MHC klasy II) oraz podwyższony poziom wewnątrz-cytoplazmatycznych cytokin prozapalnych, np. TNF. Monocyty nieklasyczne, stanowiące około 5% monocytów, nie generują wolnych rodników, są słabymi komórkami żernymi, preferencyjnie pobierającymi utleniony LDL, lecz wydzielają znaczne ilości cytokin zapalnych takich jak TNF czy IL-1β przez stymulację LPS zależną od TLR lub wirusy i kwasy nukleinowe [131]. Mają one również większą wydajność utrzymywania proliferacji limfocytów i interakcji z komórkami śródbłonka. U pacjentów starzejących się lub z przewlekłym stanem zapalnym odsetek monocytów klasycznych spada, natomiast rośnie odsetek monocytów wykazujących ekspresję CD16. Efekt ten może tłumaczyć większy odsetek pacjentów z chorobami zapalnymi i miażdżycą w starszym wieku [132]. Monocyty CD16+ są głównym źródłem TNF we krwi. Stymulacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej przez LPS powodowała 3-krotnie większą produkcję TNF przez monocyty CD16+ w porównaniu do monocytów klasycznych. Po usunięciu tej subpopulacji monocytów, produkcja TNF drastycznie spadła [133]. Monocyty nieklasyczne są związane z wieloma chorobami, w których stan zapalny odgrywa istotną rolę, jak np. reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca czy miażdżyca [134]. Wysoki odsetek monocytów $CD14^{dim}CD16+$ jest związany z wyższym wskaźnikiem masy BMI oraz zwiększoną grubością kompleksu intima-media u osób zdrowych. U pacjentów z chorobą wieńcową odsetek monocytów nieklasycznych oraz wszystkich CD16+ był wyższy w porównaniu do osób zdrowych. Ilość monocytów CD16+ była także powiązana z niestabilnością wieńcowej blaszki miażdżycowej [135]. Oprócz powyższych markerów, na powierzchni monocytów ekspresji ulega szereg

innych cząsteczek. Zalicza się do nich między innymi CD11b oraz CD11c, które są obecne na większości monocytów i zmniejszają szybkość rolowania monocytów po śródbłonku oraz są odpowiedzialne za mocne przyleganie monocytów do jego komórek. CD11b bierze również udział w migracji monocytów przez warstwę śródbłonka dzięki interakcji z cząsteczką adhezyjną ICAM-1 na komórkach śródbłonka. Podwyższoną ekspresję CD11c zaobserwowano na powierzchni monocytów krążących w krwi między macicą i łożyskiem u pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w porównaniu do pacjentek z prawidłowym przebiegiem ciąży [136]. Podwyższona ekspresja tego markera widoczna była również u noworodków matek z ciążowym nadciśnieniem [137]. Wyniki te wskazują na aktywację monocytów w nadciśnieniu ciążowym. Rola CD11b w nadciśnieniu nie jest do końca jasna. Wiadomo, iż podczas blokowania receptora AT_1 przez jego inhibitor (telmisartan) dochodzi do zmniejszenia przylegania monocytów do ścian śródbłonka, przy jednoczesnym wzroście ekspresji CD11b [138].

W patogenezie nadciśnienia biorą również udział komórki NK. Poza limfocytami T, komórki NK są głównym źródłem IFNγ, który odgrywa istotną rolę w aktywacji monocytów i makrofagów w rozwoju miażdżycy. Z drugiej strony, monocyty/makrofagi produkujące IL-12 lub IL-18 mogą aktywować komórki NK [139]. Zahamowanie funkcji komórek NK przez przeciwciało monoklonalne NK1.1 osłabiło dysfunkcję śródbłonka indukowaną angiotensyną II. Wiąże się to ze zmniejszoną produkcją IFNγ, który jest istotny przy uszkodzeniu naczyń zależnym od AngII [140]. Wskazuje to na istotną rolę komórek NK w regulacji rozwoju nadciśnienia.

I.2.3.5.6. Podsumowanie roli zapalnych mechanizmów nadciśnienia tętniczego

Stan zapalny uważany początkowo za następstwo nadciśnienia tętniczego i powód rozwoju powikłań NT, odgrywa kluczową rolę w jego patogenezie. W mechanizmie tym zaangażowana jest głównie odporność komórkowa z limfocytami T na czele. Reakcja ta jest bardzo złożona i wieloczynnikowa ze względu na skomplikowaną regulację aktywacji i funkcji limfocytów T. Limfocyty T do pełnej aktywności potrzebują pozostałych czynników układu odpornościowego. Interakcja pomiędzy wszystkimi elementami reakcji swoistej i nieswoistej jest kluczowym czynnikiem w mechanizmach patogenezy nadciśnienia tętniczego. Współczesne badania pozwalają coraz lepiej określić rolę poszczególnych subpopulacji limfocytów T i monocytów w nadciśnieniu tętniczym, lecz dokładne mechanizmy, na drodze których układ odpornościowy przyczynia się do rozwoju tego schorzenia nadal wymagają szczegółowego poznania i zrozumienia.

I.2.4. Prewencja nadciśnienia tętniczego

Ze względu na bardzo duży odsetek osób z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym oraz z nadciśnieniem tętniczym, wszelkie działania aby obniżyć wartość ciśnienia są niezmiernie ważne. Prewencja nadciśnienia dotyczy głównie unikania czynników ryzyka. Wiele aspektów prewencji nadciśnienia odnosi się do stylu życia i diety, a wszystkie one są tak naprawdę ze sobą ściśle związane. Podsumowując powyższe badania i wyniki, jednym z ważnych czynników prewencji rozwoju nadciśnienia tętniczego jest utrzymywanie prawidłowej masy ciała i wskaźnika BMI <25 [24], [25]. Istotnym elementem prewencji jest prawidłowa dieta, składająca się z dużej ilości warzyw, owoców i kwasów nienasyconych (np. dieta DASH) będąca źródłem wapnia, magnezu i potasu oraz wielu cennych witamin [47] oraz obniżenie spożycia soli do 5-6 g/dzień [43] i konsumpcji alkoholu poniżej 146 g/tydzień [51]. Modyfikacje obejmują również styl życia. Dotyczy to zarówno aktywności fizycznej jak i poziomu stresu. Stres i rodzaj wykonywanej pracy, są czynnikami, które często trudno zmienić. Natomiast styl życia jaki prowadzimy w czasie wolnym jest czynnikiem, na który mam istotny wpływ. Zamiana czasu spędzonego przed telewizorem czy komputerem na czas spędzony aktywnie, może skutecznie obniżyć ciśnienie tętnicze [15]. Przestrzeganie prawidłowej diety i aktywny styl życia, przy wykluczeniu predyspozycji genetycznych, powinno zapobiec innym czynnikom ryzyka, np. otyłości i insulinooporności. Jedynym czynnikiem ryzyka, niezależnym od naszej woli jest starzenie się organizmu, jednakże postępowanie zgodnie z powyższymi zaleceniami powinno, jeśli nie wyeliminować ryzyko, to przynajmniej opóźnić wystąpienie nadciśnienia oraz poprawić jakość życia.

I.3. Wpływ regularnego wysiłku fizycznego na układ krążenia w kontekście nadciśnienia tętniczego.

Wysiłek fizyczny jest jedną z kluczowych interwencji niefarmakologicznych zalecanych u chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi, przez co może obniżać skutki uboczne leczenia farmakologicznego oraz jego koszty. Rozważane są obecnie różne mechanizmy korzystnego działania systematycznego wysiłku fizycznego w nadciśnieniu tętniczym. Wysiłek fizyczny poprawia funkcje śródbłonka poprzez zwiększenie biodostępności NO i hamowanie stresu oksydacyjnego. Regularna aktywność fizyczna prowadzi do zwiększonej aktywności eNOS [141]. Zwierzęcy model nadciśnienia pozwolił wykazać korzystny wpływ regularnego wysiłku fizycznego na zależną od insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1) relaksację naczyń, między innymi przez wzrost ekspresji i aktywności eNOS [21]. Wysiłek fizyczny zwiększa ekspresję receptora Mas, przez co poprawia rozkurczający wpływ angiotensyny (1-7) [142]. Jednym z mechanizmów poprawy funkcji śródbłonka poprzez regularny wysiłek fizyczny jest redukcja stężenia asymetrycznej dimetyloargininy [143]. Podwyższone stężenie ADMA zaobserwowano u chorych z nadciśnieniem tętniczym [144] oraz u ludzi zdrowych, u których stwierdzono pogrubienie kompleksu intima-media w tętnicach szyjnych wewnętrznych (ang. *internal carotid intimal-media thickness, ICA IMT*) [145]. Zwiększony poziom ADMA zaobserwowano również u pacjentów z nowo rozpoznanym, dotychczas nie leczonym farmakologicznie nadciśnieniem tętniczym. Pacjenci ci charakteryzowali się obniżoną produkcją NO [146]. Rola ADMA w patogenezie nadciśnienia tętniczego nie jest w pełni wyjaśniona, natomiast wdrożenie leczenia redukującego stężenie ADMA może mieć ważne następstwa kliniczno-terapeutyczne.

Trening aerobowy powoduje obniżenie ciśnienia oraz tętna, zwiększenie średnicy tętnicy wieńcowej i przepływu krwi, wzrost poziomu dostępnego NO [147] oraz zmiany metaboliczne mające wpływ na ciśnienie krwi, jak np. zmniejszenie poziomu trójglicerydów czy LDL w osoczu i zwiększeniu wrażliwości tkanek na insulinę [148]. Pacjenci z zaburzoną tolerancją glukozy poddani regularnemu treningowi charakteryzowali się zwiększoną wrażliwością tkanek na insulinę. Ponieważ insulinooporność jest jednym z czynników ryzyka rozwoju nadciśnienia, zwiększenie wrażliwości na insulinę jest bardzo ważnym aspektem działania wysiłku fizycznego w kontekście prewencji i leczenia NT [149]. Korzystne działanie treningu może być

spowodowane zmniejszeniem aktywności współczulnego układu nerwowego i rzutu serca, polepszeniem angiogenezy i obniżeniem oporu naczyń obwodowych [147]. Trening aerobowy w połączeniu z wytrzymałościowym poprawia funkcje śródbłonka nawet u osób zdrowych, niecierpiących na nadciśnienie tętnicze [150]. Regularny wysiłek fizyczny redukuje sztywnienie tętnic i poprawia ich funkcje między innymi przez lepszą produkcję NO oraz niższe stężenie, powodującej skurcz, endoteliny 1 [151].

Poprawa funkcji śródbłonka pod wpływem wysiłku fizycznego może być spowodowana wzrostem ilości progenitorowych komórek śródbłonka i zwiększeniem jego zdolności do regeneracji. Badania na modelu zwierzęcym wykazały zwiększoną ilość krążących we krwi progenitorowych komórek śródłonka po wysiłku [152]. Wyniki te zostały potwierdzone w badaniach u ludzi, które wykazały stymulujący wpływ wysiłku fizycznego na komórki progenitorowe [153]. Mechanizm, na drodze którego wysiłek fizyczny wpływa na komórki progenitorowe śródbłonka wymaga jednak dalszego zbadania.

Pozytywny wpływ wysiłku fizycznego zależy od okresu przez jaki jest stosowany, częstotliwości, intensywności oraz długości sesji treningowych. Meta-analizy badań zajmujących się wpływem wysiłku fizycznego na nadciśnienie wykazały, iż najbardziej skuteczny jest trening aerobowy od umiarkowanej do energicznej intensywności, z 40-minutowymi sesjami przeprowadzanymi 3 do 4 razy na tydzień przez okres co najmniej 12-tygodniowy. Taka aktywność może obniżyć ciśnienie nawet do 5 mmHg [154].

Wpływ wysiłku fizycznego na układ krążenia i choroby sercowo-naczyniowe opiera się na działaniu wielokierunkowym i bardzo złożonym, gdyż wywiera efekt zarówno na poziomie komórek śródbłonka i mięśni gładkich, jak również na poziomie mechanizmów sygnałowych (np. przez działanie insuliny i endoteliny 1).

I.4. Wpływ regularnego wysiłku fizycznego na układ odporności

O ile wykazano bezpośredni wpływ regularnego wysiłku fizycznego na śródbłonek w nadciśnieniu tętniczym to mało jest badań na temat jego zależności z układem odpornościowym, a w szczególności z limfocytami T, które odgrywają istotną rolę w patogenezie tej choroby. Regularny, umiarkowany wysiłek fizyczny ma działanie przeciwzapalne w populacji zdrowej oraz u pacjentów z chorobami przewlekłymi [155]. Wysiłek fizyczny powoduje spadek stężenia białka C-reaktywnego [156], [157]. Dokładny mechanizm tego działania nie został jeszcze poznany. Możliwe, że jest on wywołany pośrednio przez spadek ciśnienia i poziomu trójglicerydów, które mają wpływ na poziom CRP [158]. Aktywność fizyczna powoduje zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej, która jest jednym z głównych źródeł IL-6 stymulującej wątrobową produkcję CRP [159]. W przeciwieństwie do umiarkowanego wysiłku fizycznego, siłowy wysiłek fizyczny powoduje wzrost czynników prozapalnych. CRP wzrasta po zakończeniu siłowego treningu i wraca do prawidłowego poziomu około 48 godzin później [160], [161]. Ciekawą cytokiną, która prawdopodobnie odpowiada za przeciwzapalny wpływ wysiłku fizycznego jest prozapalna interleukina 6. Stężenie IL-6 wzrasta nawet 100-krotnie pod wpływem siłowego wysiłku fizycznego i spada do normalnego poziomu po wysiłku [162]. Podobny efekt nie zachodzi dla innych cytokin prozapalnych, np. TNF-α i IL-1β [163], wzrasta natomiast poziom cytokin przeciwzapalnych, między innymi IL-10 [164]. Siedzący tryb życia został powiązany z wysokim poziomem IL-6 i CRP u osób z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 2. Wydłużenie czasu poświęcanego na wysiłek fizyczny spowodowało wzrost poziomu adiponektyny u mężczyzn i spadek poziomu CRP i sICAM u kobiet [165].

Pojedyncze publikacje skupiają się na roli jednorazowych wysiłków fizycznych w regulacji poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego. Wystarczy 20 minutowy wysiłek dynamiczny na ergometrze rowerowym (przy 80% maksymalnej mocy tlenowej - VO2max), aby wywołać wzrost liczby różnych typów leukocytów we krwi u mężczyzn. Wartości te wzrosły w stosunku do wartości spoczynkowych dla monocytów, granulocytów, komórek NK, limfocytów T i B [166]. Inne badania wykazały wzrost monocytów $CD14^{dim}$ CD16+ po wysiłkach beztlenowych [167]. Badania nad umiarkowanym treningiem fizycznym ujawniły wzrost odpowiedzi typu komórkowego nawet po 30 minutach treningu [168], natomiast trening ten stosowany długofalowo może

odwrócić zależne od wieku osłabienie odpowiedzi typu komórkowego u osób starszych [169]. Inna badania przeprowadzone na populacji osób starszych wykazały brak wpływu regularnego wysiłku fizycznego na układ odporności po 12 tygodniach oraz niewielki wpływ przy regularnym, długoterminowym stosowaniu [170]. Maksymalny wysiłek fizyczny wpływa na dystrybucję limfocytów naiwnych i starzejących się w zależności od wcześniejszego poziomu treningu i płci. Największy odsetek limfocytów CD4+ starzejących się oraz najmniejszy odsetek limfocytów CD4+ naiwnych zaobserwowano u mężczyzn, którzy nie prowadzili regularnej aktywności fizycznej [171].

Regularny wysiłek fizyczny korzystnie wpływa na normalizację ciśnienia tętniczego krwi poprzez wiele mechanizmów, z których kluczową i finalną rolę odgrywa śródbłonek. Modulacja funkcji śródbłonka spowodowana regularnym wysiłkiem fizycznym poprzez pośrednie działanie na układ odpornościowy może okazać się ważnym mechanizmem normalizacji ciśnienia tętniczego. Korzystny wpływ wysiłku fizycznego na układ krążenia i funkcje śródbłonka jest powszechnie akceptowany, lecz na podstawie badań przeprowadzonych dotychczas, trudno określić czy w ten mechanizm zaangażowana jest odpowiedź układu odpornościowego. Ponieważ wysokie prawidłowe ciśnienie tętnicze występuje często w populacji ogólnej, a osoby z takim ciśnieniem cechują się większym ryzykiem progresji do utrwalonego nadciśnienia, przybliżenie mechanizmu działania wysiłku fizycznego u tych osób może pozwolić na zastosowanie skuteczniejszej interwencji profilaktycznej i przyczynić się do poprawy stanu zdrowia społeczeństwa.

II. Cel pracy

Celem pracy było poznanie jaki jest wpływ regularnego wysiłku fizycznego na charakterystykę leukocytów krwi obwodowej u osób z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym.

W szczególności będziemy poszukiwać odpowiedzi na pytania:

I. Czy regularny wysiłek fizyczny wpływa na funkcje układu odpornościowego przez wpływ na subpopulacje limfocytów T i monocytów krwi obwodowej?

II. Czy istnieje związek między wpływem wysiłku fizycznego na parametry zapalne krwi a wpływem na ciśnienie tętnicze pacjentów z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi?

Powyższe cele zostały osiągnięte poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

a) Oznaczenie wpływu wysiłku fizycznego na populacje limfocytów T u pacjentów z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym.

b) Określenie wpływu regularnego wysiłku fizycznego na poziom aktywacji subpopulacji limfocytów T CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8- (DN) oraz produkcji przez nie cytokin takich jak IL-4, IL-17, TNFα oraz IFNγ.

c) Zbadanie wpływu wysiłku fizycznego na rozkład subpopulacji monocytów : CD14+, CD14+CD16+, CD14dimCD16+ oraz markerów CD11b oraz CD11c na ich powierzchni.

d) Określenie wpływu regularnego wysiłku fizycznego na produkcję cytokin zapalnych przez komórki mononuklearne krwi obwodowej (PBMC) (TNF-α, IL-1, IL-6,IL-10, TGF-β).

e) Oznaczenie wpływu regularnego wysiłku fizycznego na poziom osoczowych wykładników stanów zapalnych takich jak IL-1, IL-6, IL-10 oraz TNF-α.

III. Materiały i metody

III.1. Schemat badania oraz grupa badana

Badanie przeprowadzone było przy współpracy Wydziału Rehabilitacji Ruchowej Akademii Wychowania Fizycznego w Krakowie, Katedry Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi oraz Katedry Chorób Wewnętrznych i Gerontologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie i uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Krakowie (Nr 71/KBL/OIL/2010 z dnia 10 lipca 2010 r).

Pacjentów do badania rekrutowano za pomocą lokalnych mediów: telewizji, radio, gazety, portali społecznościowych oraz strony internetowej: http://nadcisnienie.awf.krakow.pl/. Do badania włączono 38 pacjentów, z czego ukończyło 26. Do badania włączone zostały osoby zdrowe w wieku 30-55 lat charakteryzujące się występowaniem wysokiego prawidłowego ciśnienia tętniczego w spoczynku (ciśnienie skurczowe w granicach 130-139 mm Hg i/lub rozkurczowe w granicach 85-89 mm Hg) stwierdzonego co najmniej w dwóch pomiarach podczas dwóch różnych wizyt u lekarza. Warunkiem koniecznym było również wyrażenie pisemnej świadomej zgody pacjenta na udział w badaniu oraz współpraca z osobami przeprowadzającymi badanie. Natomiast kryteriami wyłączającymi osoby z badania było występowanie chorób sercowo-naczyniowych, przewlekłych chorób zapalnych, choroby narządu ruchu uniemożliwiającej trening fizyczny na rowerze stacjonarnym, chorób nowotworowych w ciągu ostatnich 5 lat przed rozpoczęciem badania, schorzeń hematologicznych i niedoborów immunologicznych, ciężkich przewlekłych chorób (płuc, nerek, wątroby), ostrych stanów zapalnych, stosowanie antybiotykoterapii w ciągu w okresie krótszym niż 1 miesiąc do rozpoczęcia badania oraz leków przeciwzapalnych w okresie krótszym niż 2 miesiące do rozpoczęcia badania, zażywanie leków obniżających ciśnienie tętnicze krwi. Do badania nie włączano również osób ze znaczną niedowagą (BMI<18,5) lub otyłością (BMI>35), jak również osób regularnie uprawiających sport.

Przed przystąpieniem do treningu u każdego, wstępnie zakwalifikowanego pacjenta, zweryfikowane zostało ciśnienie tętnicze za pomocą 24-godzinnego pomiaru metodą ABPM (ambulatory blood pressure monitoring) przy pomocy aparatu *SpaceLabs 90217 Ultralite*, posiadającego atest Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia

Tętniczego. Ciśnienie tętnicze rozkurczowe w granicach 85-89 mm Hg i/lub skurczowe 130-139 mm Hg kwalifikowało do dalszych badań. W kolejnym etapie przeprowadzona została elektrokardiograficzna maksymalna próba wysiłkowa ograniczona objawami z użyciem cyklometru rowerowego. Jest to podstawowe badanie kwalifikujące pacjenta do programu regularnych ćwiczeń fizycznych, pozwalając określić maksymalne i treningowe obciążenia, a także umożliwia oszacowanie ryzyka zdarzeń sercowych. W badaniu tym oznaczona została szczytowa wartość tętna (*peak heart rate)*, która posłużyła do obliczenia obciążeń treningowych.

Po przeprowadzeniu powyższych procedur, zakwalifikowane osoby zostały poddane regularnemu wysiłkowi fizycznemu stanowiącemu pierwszą część badania. Program treningu opracowano na podstawie współczesnych zasad rehabilitacji kardiologicznej, zgodnie z zasadami EMB, tak aby trening optymalnie wpływał na układ krążenia [172]. Próby wysiłkowe oraz treningi odbywały się na cyklometrach CRG 200 pracujących w systemie AsTER Rehabilitacja Beta System (Aspel SA, Zabierzów, Polska). W zaplanowanym treningu uwzględnione zostały następujące aspekty:

Tok sesji treningowej

Trening składał się z jednostek określonych jako sesje treningowe. Każda sesja składała się z rozgrzewki (5-10 minut), ćwiczeń właściwych (20-40 minut, główna część treningu) oraz ćwiczeń uspokajających (5-10 minut, okres wyciszenia).

Objętość treningu

Trening prowadzony był systematycznie, trzy razy w tygodniu. Program treningowy składał się z 36 sesji treningowych i trwał 3 miesiące.

Wybór wysiłku

Ćwiczenia właściwe, trenujące wytrzymałość anaerobową, oparte były na ćwiczeniach dynamicznych na cyklometrze rowerowym. Ćwiczenia wolne i rozciągające stosowane były podczas rozgrzewki, a relaksacyjne w części uspakajającej.

Intensywność wysiłku

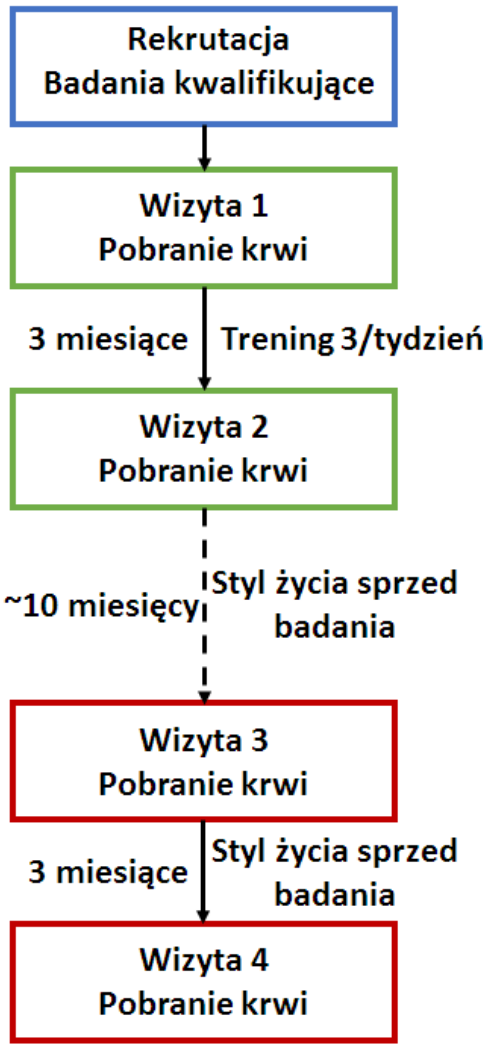
Intensywność ćwiczeń wytrzymałościowych aerobowych oparta była na wielkości rezerwy rytmu serca HRR (heart rate reserve), czyli różnicy pomiędzy szczytowym tętnem określonym w próbie wysiłkowej a tętnem spoczynkowym. Intensywność ćwiczeń, powodujących wzrost częstości pracy serca mieszczącej się w zakresach treningowych w zakresie od 60% do 85% HRR określana była przez monitorowanie tętna podczas treningu. Zalecane było utrzymanie tętna treningowego przez 30 minut.

Dodatkowym kryterium określającym intensywność ćwiczeń było odczuwane przez badanych obciążenie wysiłkiem (zmęczenie) RPE (rating of perceived exertion), które powinno wynosić 14-16 punktów wg Borga (w początkowym okresie treningu 11-13 punktów).

Monitorowanie treningu fizycznego

Monitorowanie treningu odbywało się poprzez pomiar częstości akcji serca oraz ciśnienia tętniczego krwi.

Po przeprowadzeniu części pierwszej – treningowej oraz po około 10 miesięcznej przerwie każdy pacjent przystąpił do części drugiej – kontrolnej. Polegała ona na tym, aby pacjent przez 3 miesiące prowadził normalny tryb życia, taki jak przed rozpoczęciem części treningowej (*Rycina 2*). Zastosowanie części kontrolnej pozwoliło nam wykluczyć wpływ czasu na badane parametry.



Rycina 2. Schemat przedstawiający plan badania. Wizyty 1 oraz 2 odpowiadają okresowi aktywności fizycznej, natomiast wizyty 3 i 4 okresowi kontrolnemu, czyli takiemu, w którym pacjenci prowadzą styl życia sprzed rozpoczęcia badania.

III.2. Materiał biologiczny

Od pacjentów pobrano 4 próbki krwi odpowiadające 4 badanym punktom: przed rozpoczęciem i po zakończeniu części treningowej (wizyta 1 i 2) oraz przed rozpoczęciem i po zakończeniu części kontrolnej (wizyta 3 i 4). Krew pobierana była do probówek typu BD Vacutainer z EDTA oraz przechowywana w temperaturze 4°C do momentu rozpoczęcia izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*) oraz oddzielenia osocza. Powyższe czynności oraz dalsze procedury wykonywane były w dniu pobrania materiału.

III.3. Izolacja leukocytów z krwi obwodowej oraz osocza

Z pobranej krwi po wirowaniu (400g, 10min, 20°C) zebrane zostało osocze i poddane kolejnemu wirowaniu w celu usunięcia płytek krwi (2000g, 15 min, 4°C), a następnie zamrożone w -20°C i przechowywane przez dłuższy okres w -80°C do momentu rozpoczęcia dalszych pomiarów. Do pozostałych elementów morfotycznych dodany został PBS i po wymieszaniu zostały one naniesione na medium do izolacji limfocytów (LSM 1077, PAA) umożliwiające izolację PBMC za pomocą wirowania w gradiencie gęstości (400g, 30 min, 20°C). Wyizolowane komórki przepłukano PBS (Gibco) z dodatkiem 1% FBS (Gibco) (400g, 6 min, 4°C), po czym liczono je za pomocą komory Fuchsa – Rosenthal'a z użyciem płynu Turk'a (lodowaty CH_3COOH, 1% roztwór fioletu goryczki, H_2O) w rozcieńczeniu 1:10 i przygotowano zawiesiny do barwienia o stężeniu 500 tys/100µl.

III.4. Hodowle PBMC

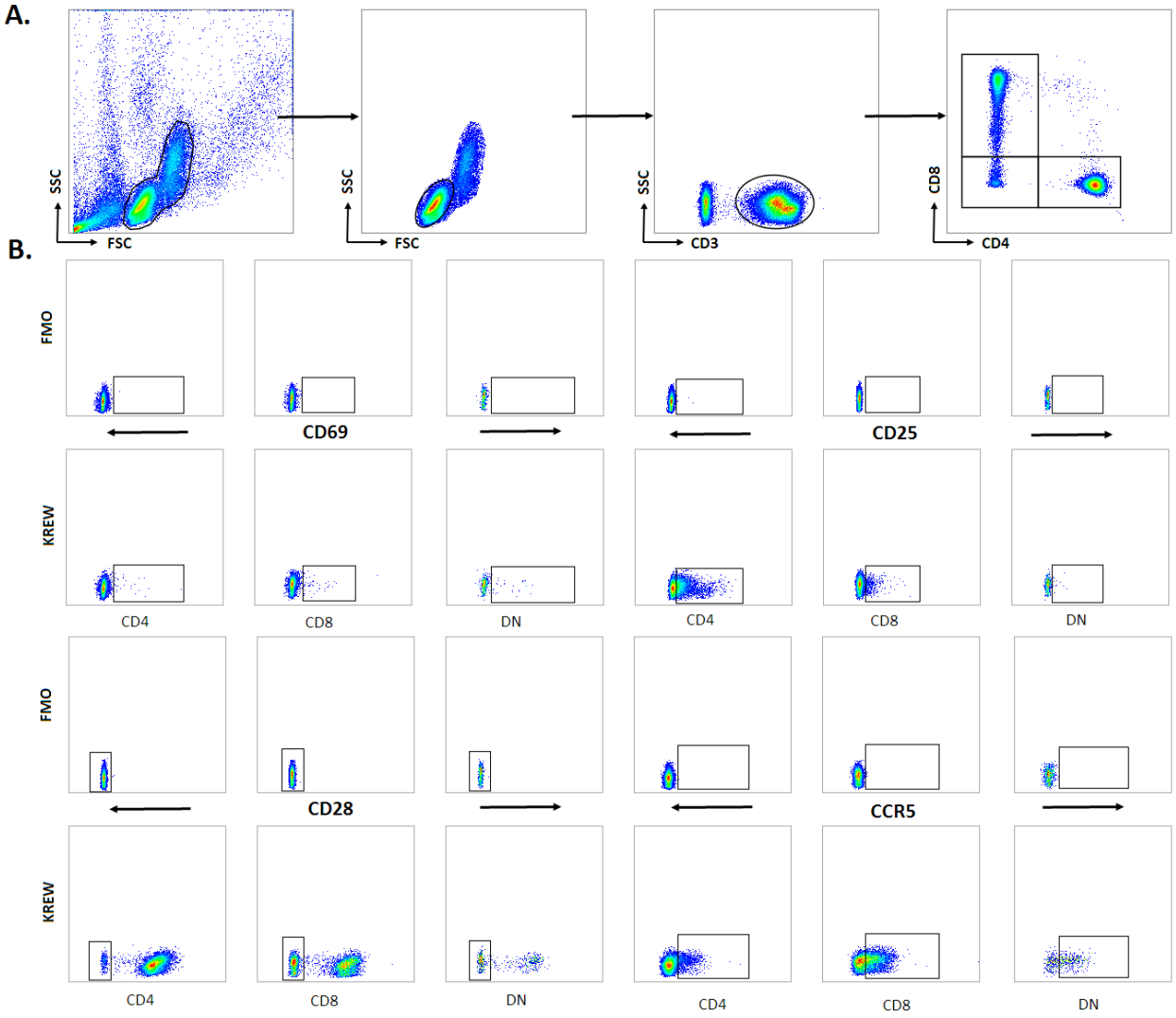
W celu oznaczenia cytokin produkowanych przez monocyty, z wyizolowanych PBMC zakładane były 18 – godzinne hodowle komórkowe. 100 tys komórek zwieszonych było w 200 µl czystego medium RPMI (Gibco) zawierającym 10% FBS oraz Gentamycynę z Glutaminą (Sigma-Aldrich) lub z dodatkiem LPS (L 2654, *E. coli* 026:B6, Sigma-Aldrich) w stężeniu 1 ng/ml. Stymulacja LPS działa głównie na monocyty. Po 18 godzinach nadsącz komórkowy został zebrany i odwirowany w celu usunięcia komórek (1000g, 7 min, 4°C), a następnie zamrożony w -20°C i przechowywany w -80°C do momentu rozpoczęcia dalszych pomiarów.

III.5. Analiza metodą cytometrii przepływowej

Komórki wyizolowane z krwi obwodowej wybarwiono przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko markerom powierzchniowym limfocytów oraz przeciwko cytokinom przez nie produkowanym, w stężeniach opracowanych we wcześniejszych doświadczeniach w oparciu o rekomendacje producenta. W przypadku markerów powierzchniowych zastosowano następujące stężenia (µl przeciwciała : µl zawiesiny komórek PBMC): gotowy mix przeciwciał (anty-CD45RO PE, anty-CD45RA FITC, anty-CD3 PerCP, anty-CD4 APC) (15:100), anty-CD8 APC-H7 (3:100), anty-CCR7 PE-Cy7 (5:100), anty-TCRγδ PE (15:100), anty-TCRαβ FITC (10:100), anty-CD3 PerCP (10:100), anty-CD4 APC (10:100), anty-CCR5 PE-Cy7 (5:100), anty-CD16 PE

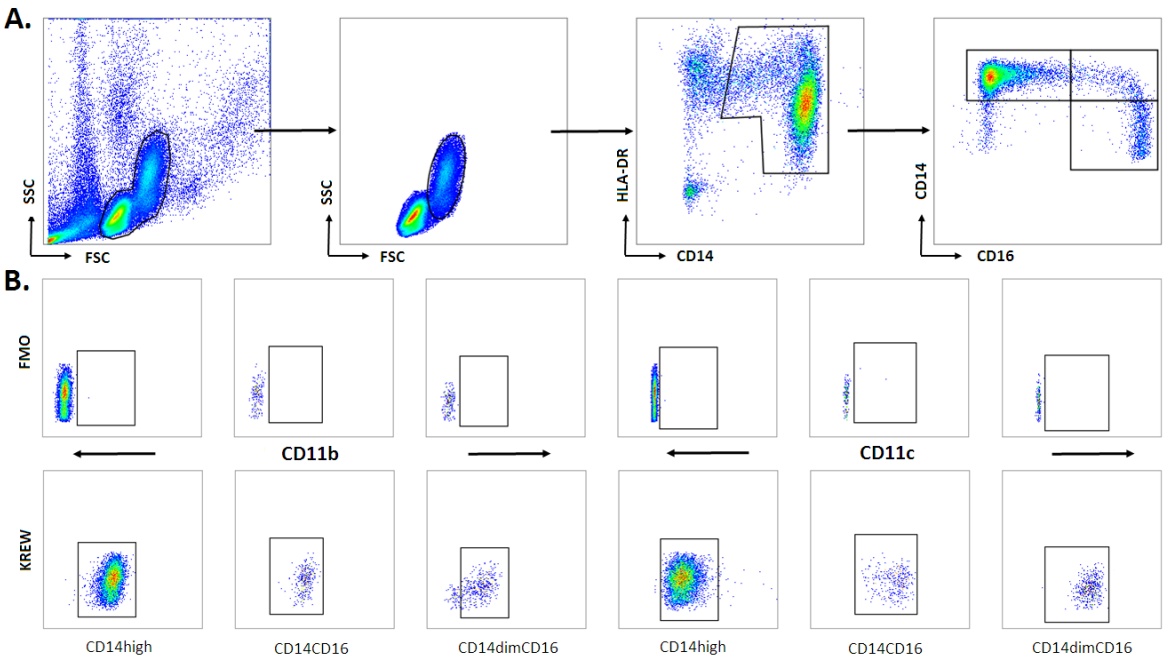
(12:100), anty-CD45RA FITC (10:100), anty-CD11c APC (15:100), anty-HLA-DR PE-Cy7 (3:100), anty-CD14 APC-H7 (3:100), anty-CD11b PB (2:100), anty-CD25 PE (10:100), anty-CD69 FITC (10:100), anty-CD28 APC (10:100), anty-CD4 PE-Cy7 (3:100), anty-CD40 FITC (10:100), anty-CD86 APC (15:100), anty-CD19 APC-H7 (3:100), anty-CD56 (3:100) (BD Biosciences). Komórki barwione były przez 20 minut, w 4°C, w ciemności, a następnie reakcję blokowano przez dodanie PBS z 1% FBS i odwirowanie (400g, 6 min, 4°C). W przypadku oznaczania produkcji cytokin przez subpopulcje limfocytów, z wyizolowanych komórek zakładane były 4-godzinne hodowle (1 mln komórek/1ml RPMI, 10%FBS, GG) z dodatkiem odczynnika (2 µl : 1000 µl zawiesiny komókowej) (Leukocyte Activation Coctail with BD Golgi Plug, BD Biosciences) aktywującego produkcję cytokin przez limfocyty T, przy jednoczesnym hamowaniu transportu białek wewnątrzkomórkowych, co umożliwiło detekcję skumulowanych w komórkach cytokin. Po hodowli, reakcja była blokowana przez dodanie PBS z 1% FBS oraz odwirowanie. Następnie komórki były barwione przeciwciałami na markery powierzchniowe (anty-CD3 PerCP, anty-CD4 APC, anty-CD8 APC-H7) w stężeniach i warunkach jak wyżej. Po odwirowaniu komórki były zawieszane w Fixation/Permeabilization Buffer (BD Biosciences), aby umożliwić wyznakowanie cytokin zlokalizowanych wewnątrz komórek. Próbki inkubowane były przez 20 minut, w 4°C, w ciemności, a następnie po dokładnym zworteksowaniu zostały podzielone na 3 części do dalszych barwień, przepłukane Perm/Wash Buffer (BD Biosciences) i odwirowane. Następnie komórki zostały wybarwione przeciwciałami przeciwko cytokinom lub jako kontrole izotypowe w stężeniach (µl przeciwciała : µl zawiesiny komórek PBMC): IgG_1K FITC (10:100), IgG_1K PE (0,6:100), IFNγ FITC (0,5:100), IL-17 PE (10:100), TNFα FITC (0,5:100), IL-4 PE (10:100) (BD Biosciences). Komórki barwione były jak powyżej. Następnie reakcja blokowana była przez dodanie Perm/Wash Buffer i odwirowanie. Wyznakowane komórki analizowano metodą cytometrii przepływowej przy użyciu FACSCantoII oraz FACSVerse (BD Biosciences), a następnie otrzymane dane przy użyciu oprogramowania FlowJo (Tree Star, Inc). Strategię brakowania przedstawiono poniżej (*Rycina 3, Rycina 4*). Analizę rozpoczęto przez bramkowanie komórek PBMC wyznaczonych w osiach SSC/FSC, a następnie wyodrębniono odpowiednio populację limfocytów i monocytów. Z limfocytów wyodrębniono populację komórek CD3+ limfocytów T. Następnie limfocyty T (CD3+) rozdzielono na subpopulacje na podstawie ekspresji markerów CD4 i CD8 (*Rycina 3*, A). Poszczególne subpopulacje limfocytów T, tj. CD4+, CD8+ oraz CD3+CD4-CD8-

(podwójnie ujemne, DN-double negative) analizowano pod względem obecności markerów. Wzięto pod uwagę wczesny marker aktywacji (CD69), późny marker aktywacji (CD25), cząsteczkę kostymulującą limfocytów T (CD28), receptor dla chemokiny RANTES (CCR5). Punkt odcięcia dla poszczególnych markerów wyznaczano stosując technikę FMO (ang. *Fluorescence Minus One*) (*Rycina 3,* B). Wszystkie limfocyty T, jak również poszczególne populacje zanalizowano również pod względem obecności receptorów określających stopień ich dojrzałości i funkcji. Populacja limfocytów CD3 pozytywnych została zanalizowana pod kątem występowania markerów CD45RA oraz CD45RO. Na tej podstawie została wyznaczona populacja limfocytów T naiwnych jako CD45RA+CD45RO- oraz pamięci jako CD45RA-CD45RO+. Poszczególne subpopulacje komórek CD4+, CD8+ oraz DN ocenione zostały pod względem obecności markerów CD45RA, CD45RO oraz CCR7. Komórki naiwne oznaczone zostały jako CD45RA+CCR7+, centralne pamięci – CD45RA- CCR7+, efektorowe – CD45RA-, CCR7- oraz CD45RA efektorowe – CD45RA+CCR7-. Limfocyty T CD4 pozytywne, CD8 pozytywne jak również podwójnie ujemne, zostały również zanalizowane pod względem obecności receptorów TCRαβ i TCRγδ.



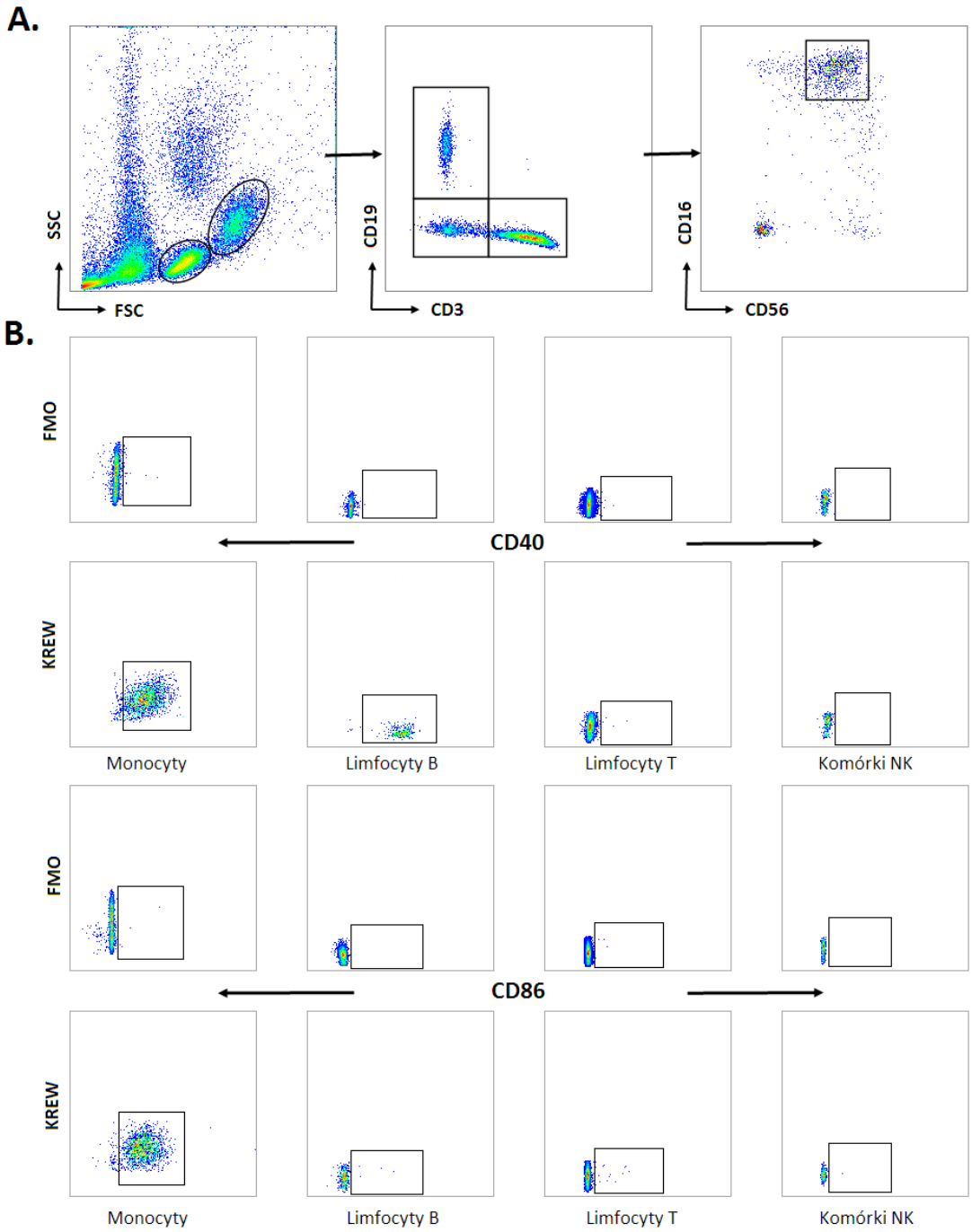
Rycina 3. Strategia bramkowania w analizie limfocytów T z krwi obwodowej (A). Strategia bramkowania komórek CD69+, CD25+, CD28null oraz CCR5 na limfocytach T CD4+, CD8+ oraz DN (CD3+CD4-CD8-) wyizolowanych z krwi obwodowej. Punkty odcięcia wyznaczono metodą FMO (B).

Z populacji monocytów wyznaczono populację HLA-DR i CD14 pozytywną, następnie z tej populacji wyznaczono subpopulacje monocytów, CD14high, CD14CD16 oraz CD14dimCD16 (*Rycina 4,* A). W poszczególnych subpopulacjach oznaczona została ekspresja markerów adhezji do ścian śródbłonka CD11b oraz CD11c. Punkt odcięcia dla poszczególnych markerów wyznaczano stosując technikę FMO (*Rycina 4,* B).



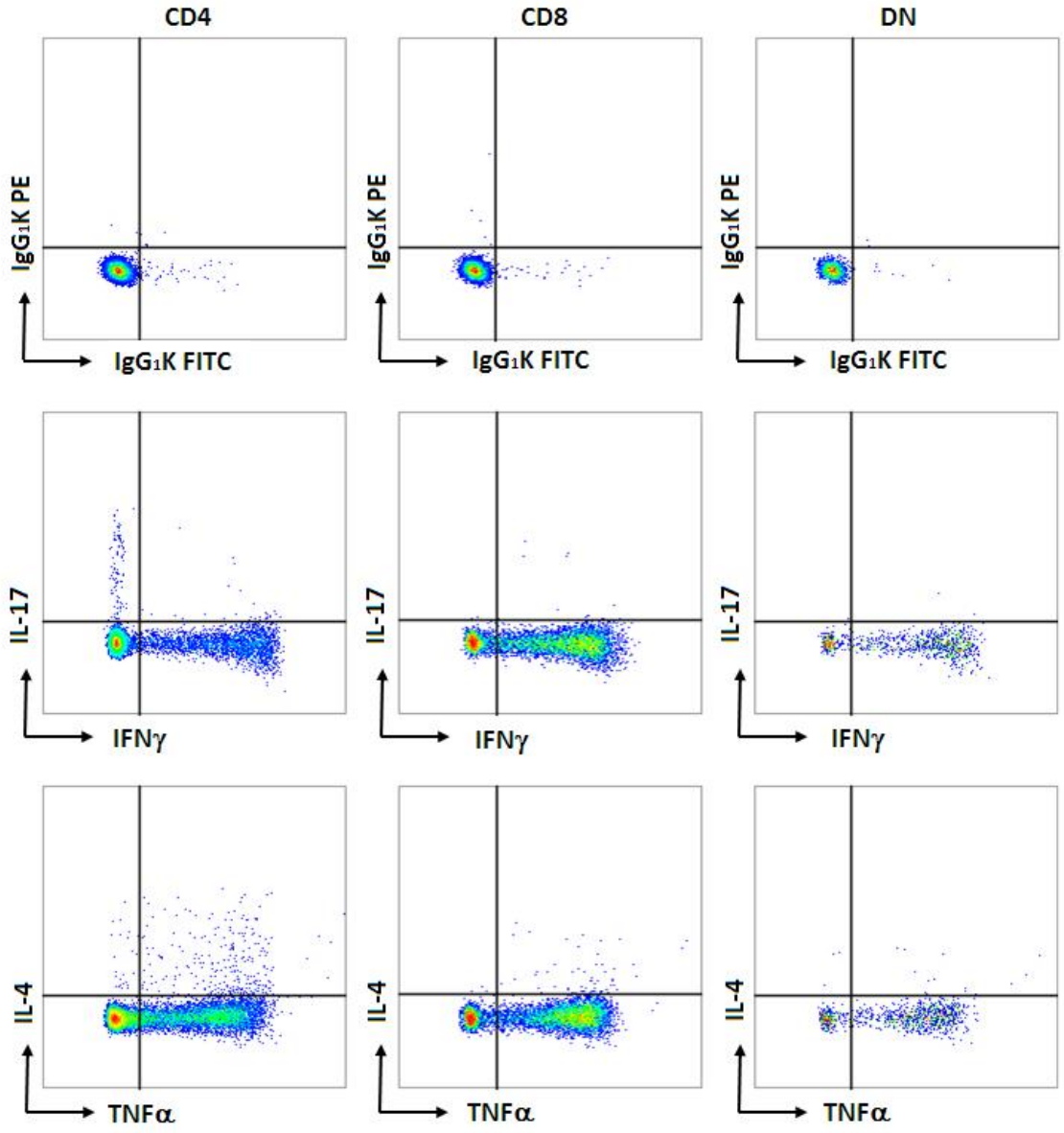
Rycina 4. Strategia bramkowania w analizie monocytów wyizolowanych z krwi obwodowej (A). Strategia bramkowania komórek CD11b + oraz CD11c+ na monocytach CD14high, CD14CD16 oraz CD14dimCD16 wyizolowanych z krwi obwodowej. Punkty odcięcia wyznaczone metodą FMO (B).

Dodatkowo z komórek PBMC zostały wyodrębnione populacje limfocytów B, limfocytów T, komórek NK oraz monocytów. Po wyznaczeniu limfocytów na osiach SSC/FSC limfocyty T zostały zanalizowane na podstawie obecności na powierzchni cząsteczki CD3, limfocyty B cząsteczki CD19, natomiast komórki NK zostały wyodrębnione z populacji komórek CD3-CD19- na podstawie obecności markerów CD16 i CD56 (*Rycina 5*, A). Powyższe populacje zostały zanalizowane pod kątem ekspresji markerów CD40 oraz CD86. Są to cząsteczki biorące udział odpowiednio w aktywacji limfocytów B oraz T. Punkt odcięcia dla poszczególnych markerów wyznaczano stosując technikę FMO (*Rycina 5*, B).



Rycina 5. Strategia bramkowania populacji monocytów, limfocytów B, lifocytów T oraz komórek NK wyizolowanych z krwi obwodowej (A). Strategia bramkowania markerów CD40 oraz CD86 na monocytach, limfocytach B, limfocytach T oraz komórkach NK. Punkty odcięcia wyznaczone metodą FMO (B).

Analizę produkcji cytokin rozpoczęto od zbramkowania populacji limfocytów T zgodnie ze strategią przedstawioną powyżej (*Rycina 3*, A). Następnie poszczególne populacje limfocytów T, tj. CD4+, CD8+ oraz DN zostały zanalizowane pod kątem produkcji cytokin: IFNγ, TNFα, IL-17 oraz IL-4. Punkty odcięcia wyznaczone zostały na podstawie kontroli izotypowej (*Rycina 6*).



Rycina 6. Strategia bramkowania sobpopulacji limfocytów T produkujących IL-17, IFNγ, IL-4 oraz TNFα. Punkty odcięcia wyznaczone na podstawie kontroli izotypowej (IgG1K PE/IgG1K FITC).

III.6. Analiza stężenia cytokin metodą Luminex

W osoczu wyizolowanym z próbek krwi oraz nadsączu z hodowli monocytów stymulowanych LPS zbadane zostały poziomy cytokin za pomocą metody Luminex. W osoczu oraz nadsączu oznaczone zostały cytokiny IL-10, IL-1β, IL-6 oraz TNFα. Dodatkowo w nadsączu oznaczony został poziom TGFβ (MilliplexMAP Kit, Magnetic, Merck Millipore). Analizy dokonano przy użyciu FLEXMAP3D System (Merck Millipore) w Zakładzie Biotechnologii Medycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

III.7. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu IBM SPSS Statistic 23.0. Wykresy sporządzono przy użyciu Microsoft Excel 2013. Przy użyciu testu Shapiro-Wilka sprawdzona została normalność rozkładu dla poszczególnych grup. W przypadku braku rozkładu normalnego, dane poddawane były transformacji w postaci logarytmowania lub podniesienia do kwadratu w celu uzyskania rozkładu normalnego. Istotność zbadano za pomocą procedury dwuczynnikowej z powtarzanymi pomiarami (ang. *Two-Way repeated measures ANOVA*). W teście tym brane były pod uwagę dwa czynniki: trening oraz kontrola, czyli brak treningu. Każdemu czynnikowi odpowiadały dwa poziomy. Dla aktywności były to trening i kontrola, dla czasu wizyty przed rozpoczęciem aktywności oraz po jej zakończeniu. Program badał trzy aspekty. Różnicę pomiędzy rodzajami aktywności, różnicę pomiędzy wizytami oraz najważniejszy, interakcję tych dwóch czynników, czyli jak rodzaje aktywności zachowują się w czasie. Następnie wartości „p" dla wszystkich badanych populacji zostały poddane poprawce FDR (ang. *False Discovery Rate*). Dla poszczególnych zmiennych wyznaczona została charakterystyka obejmująca średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe, które zostały przedstawione na wykresach.

IV. Wyniki

IV.1. Charakterystyka kliniczna pacjentów.

Do badania włączono 26 pacjentów: 19 mężczyzn (73%) i 7 kobiet (27%), którzy poddali się procedurze badania (*Tabela 2*). Średnia wieku grupy w momencie przystąpienia do badania wynosiła 48 lat, z czego najmłodszy pacjent miał 34 a najstarszy 55 lat. Najczęstszym potencjalnym czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego był wynik badania FMD (ang. *Flow Mediated Dilatation*) poniżej 7% [173], [174], wartości uznawanej za dolną granicę normy dla osób zdrowych. U 18 osób (78%, n=23) FMD wykazywało obecność dysfunkcji śródbłonka. Spośród klasycznych czynników ryzyka, u 72% stwierdzono występowanie nadwagi, definiowanej jako BMI > 25 kg/m^2. U 25 pacjentów przeprowadzono również pomiar grubości kompleksu błona wewnętrzna – błona środkowa tętnicy szyjnej (IMT), aby ocenić poziom rozwoju miażdżycy. Żaden pacjent nie przekroczył górnej granicy normy wynoszącej 0,9 mm [174]. Żadna z osób biorących udział w badaniu nie paliła w tym czasie papierosów. Biorąc pod uwagę charakter badania oraz kryteria włączenia i wyłączenia, wszyscy pacjenci charakteryzowali się wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi, zwiększającym ryzyko rozwoju nadciśnienia. Podczas rekrutacji z badania wykluczone były osoby, u których stwierdzono cukrzycę. Żaden z pacjentów nie stosował przewlekle leków mających wpływ na układ odpornościowy i funkcję śródbłonka.

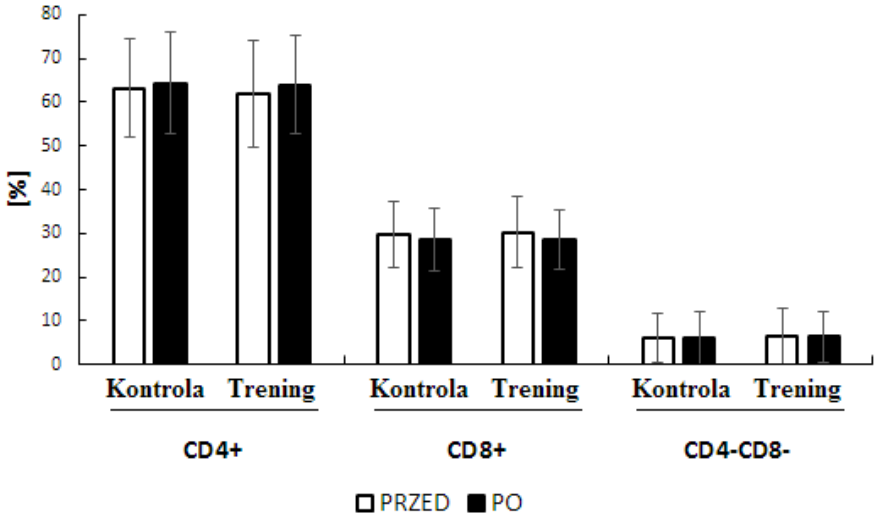
Tabela 2. Charakterystyka kliniczna pacjentów zrekrutowanych do badania.

Pacjenci biorący udział w całej procedurze badania (n=26, dla FMD n=23)	
Wiek (lata; średnia±SD)	47,6±6,6
Płeć (M:K)	19:7
Czynniki ryzyka miażdżycy:	**n (%)**
Palenie papierosów	0 (0%)
BMI>25kg/m^2	18 (72%)
FMD<7%	18 (78%)
IMT>1mm	0 (0%)
Ciśnienie krwi (mmHg; średnia±SD)	
Skurczowe	124±10,8
Rozkurczowe	96,7±10,5
Przewlekłe przyjmowanie leków	0 (0%)

IV.2. Charakterystyka limfocytów T we krwi pacjentów

IV.2.1. Subpopulacje limfocytów T

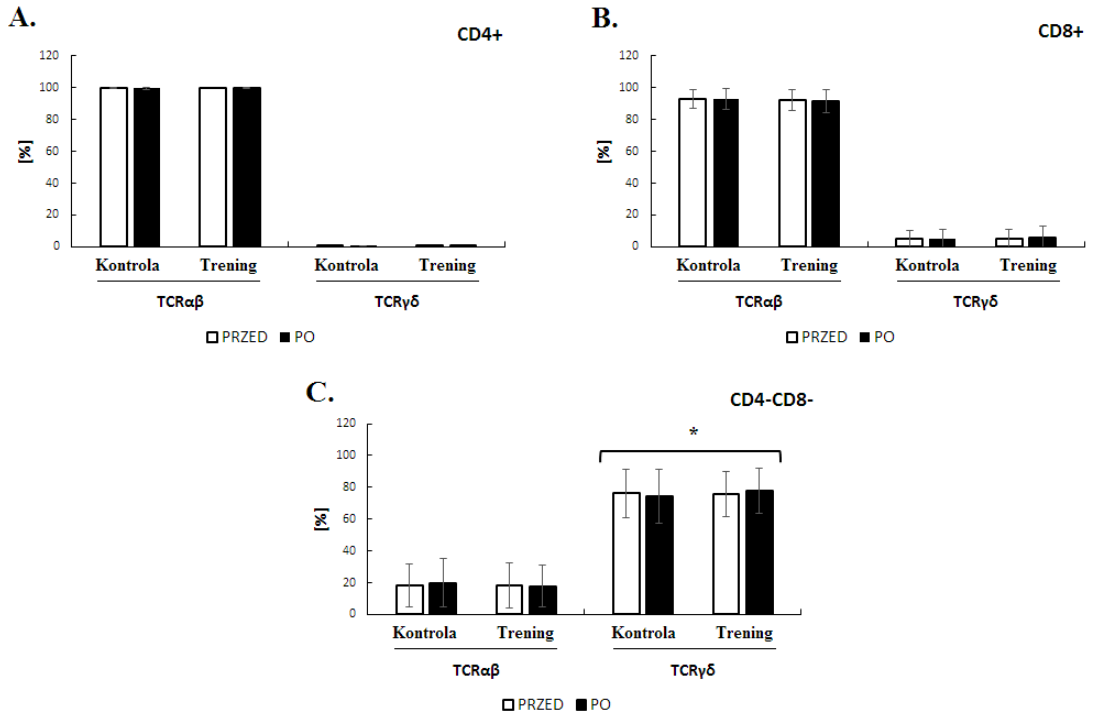
Dominującą subpopulacją limfocytów T we krwi były limfocyty CD4+, średnia wartość procentowa dla poszczególnych wizyt wynosiła odpowiednio (średnia ± odchylenie standardowe), przed okresem kontrolnym: 63,10±11,27%; po okresie kontrolnym: 64,37±1,59%, przed treningiem: 61,98±12,25%; po treningu: 63,90±11,23%; (*Rycina* 7). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi wizytami. Średnie procentowe wartości dla subpopulacji limfocytów T CD8+ były ponad dwukrotnie niższe i wynosiły, przed okresem kontrolnym: 29,68±7,56%; po okresie kontrolnym: 28,58±7,06%; przed treningiem: 30,27±8,04%; po treningu: 28,52±6,89%. Również w przypadku tej subpopulacji, analizy nie wykazały zmian istotnych statystycznie. Najmniej liczną subpopulacją były limfocyty T podwójnie ujemne (CD3+CD4-CD8-), dla których średnie wartości procentowe wynosiły dla poszczególnych wizyt odpowiednio, w okresie kontrolnym 6,12±5,52% vs 6,01±6,01%; pod wpływem treningu 6,58±6,42% vs 6,35±5,76%.



Rycina 7. Wykres przedstawiający procentowy rozkład średnich wartości (±SD) poszczególnych subpopulacji limfocytów T, CD4+, CD8+ oraz CD3+CD4-CD8-, n=26, NS.

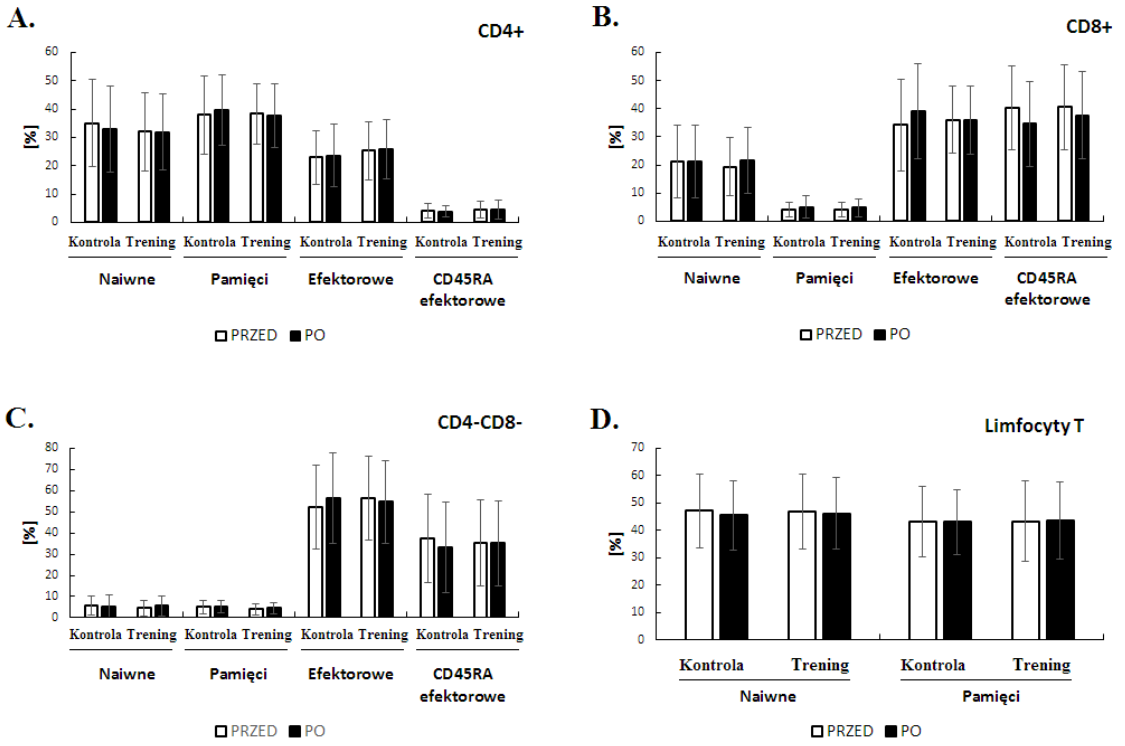
Dla dokładniejszej charakteryzacji limfocytów T we krwi pacjentów zbadano ekspresję podtypów receptorów na limfocytach T, TCRαβ oraz TCRγδ, na subpopulacjach limfocytów CD4 i CD8 pozytywnych, jak również limfocytach T podwójnie ujemnych (*Rycina 8*). Dla limfocytów CD4+TCRαβ otrzymano następujące wyniki średniej ± odchylenie standardowe, przed okresem kontrolnym: 99,73±0,24%; po

okresie kontrolnym: 99,68±0,57%; przed treningiem: 99,78±0,12%; po treningu: 99,70±0,19%. Limfocyty CD4+TCRγδ we wszystkich wizytach nie przekroczyły 0,5%. Wyniki nie różniły się znacząco. Podobny rozkład zaobserwowany został dla limfocytów CD8+ TCRαβ. Podczas wizyty przed okresem kontrolnym zaobserwowano: 92,92±5,99%; po okresie kontrolnym: 92,76±6,72%. przed treningiem: 92,16±6,42%; po treningu: 91,50±7,22%. Populacja CD8+ TCRγδ wynosiła średnio 5% podczas poszczególnych wizyt. Również tutaj nie została zaobserwowana różnica istotna statystycznie. Dla populacji limfocytów CD3+CD4-CD8- odsetek komórek TCRαβ dla poszczególnych wizyt wynosił kolejno, przed okresem kontrolnym: 18,19±13,28%; po okresie kontrolnym: 19,89±15,34%; przed treningiem: 18,42±14,09%; po treningu: 17,74±13,19%. Dla tej subpopulacji wyniki nie różniły się znacząco. Natomiast dla populacji limfocytów CD3+CD4-CD8- TCR γδ osiągnięto wynik istotny statystycznie dla interakcji *trening*kontrola* po poprawce FDR, p=0,035. Wartości dla poszczególnych wizyt przedstawiają się następująco, przed okresem kontrolnym: 76,28±15,11%; po okresie kontrolnym: 74,31±16,87%; przed treningiem: 75,55±14,28%; po treningu: 77,70±14,26%.



*Rycina 8. Wykresy przedstawiające procentowy rozkład średnich wartości rozkładu podtypów receptorów TCRαβ oraz TCRγδ na poszczególnych subpopulacjach limfocytów T, CD4+ (A., NS), CD8+ (B., NS) oraz CD4-CD8- (C.), n=26. Dla limfocytów CD4-CD8- zaobserwowana została istotna interakcja trening*kontrola dla receptora TCRγδ, p=0,035.*

Limfocyty analizowano również pod względem ich typowych subpopulacji (*Rycina 9*). Zestawienie zawierające średnie ± odchylenie standardowe dla limfocytów CD4 i CD8 pozytywnych oraz CD3+CD4-CD8- znajduje się w tabeli (*Tabela 3*). Analizowano również całą populację limfocytów T i wyodrębniono dwie subpopulacje, limfocyty naiwne, których wartości dla poszczególnych wizyt wynoszą, przed okresem kontrolnym: 46,96±13,65%; po okresie kontrolnym: 45,35±12,72%; przed treningiem: 46,60±13,72%; po treningu: 45,99±13,09%; oraz limfocyty pamięci, dla których wyniki wynoszą odpowiednio, przed okresem kontrolnym: 43,00±12,81%; po okresie kontrolnym: 42,90±11,83%, przed treningiem: 43,15±14,68%; po treningu: 43,57±14,18% (*Rycina 9*, D.). W powyższych wynikach nie zaobserwowano różnic.



Rycina 9. Wykresy przedstawiające subpopulacje limfocytów T. Dla limfocytów T CD4+ (A.), CD8+ (B.) oraz CD3+CD4-CD8- (C.) wyznaczone zostały subpopulacje komórek naiwnych, pamięci, efektorowych oraz CD45RA efektorowych, natomiast dla całej populacji limfocytów T (D.) wyznaczone zostały subpopulacje limfocytów naiwnych oraz pamięci, n=26, NS.

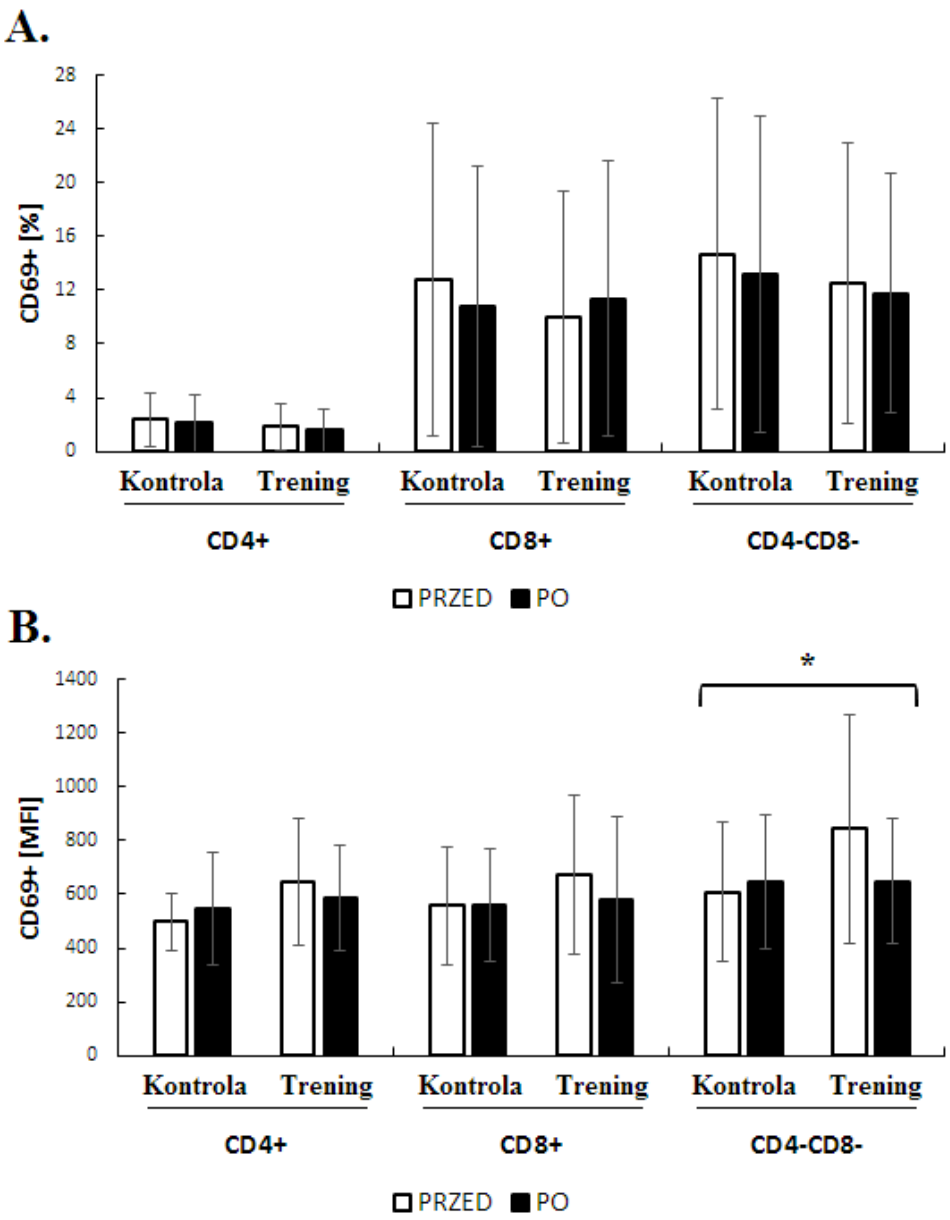
Tabela 3. Rozkład subpopulacji limfocytów T, n=26, NS.

		Kontrola		Trening	
	Subpopulacja limfocytów	**Przed**	**Po**	**Przed**	**Po**
CD4+ [%]	***Naiwne***	34,99±15,36	32,87±15,31	31,93±13,69	31,91±13,60
	Pamięci	37,94±13,73	39,60±12,29	38,32±10,72	37,58±11,22
	Efektorowe	22,94±9,40	23,63±11,04	25,30±10,22	25,89±10,43
	CD45RA efektorowe	4,12±2,51	3,89±1,98	4,44±3,03	4,61±3,34
CD8+ [%]	***Naiwne***	21,22±12,89	21,18±12,90	19,37±10,38	21,60±11,58
	Pamięci	4,18±2,63	5,10±3,79	4,12±2,67	4,87±3,16
	Efektorowe	34,17±16,34	39,20±16,88	35,98±11,89	35,91±12,07
	CD45RA efektorowe	40,46±14,91	34,53±15,06	40,42±15,27	37,63±15,45
CD3+CD4-CD8- [%]	***Naiwne***	5,63±4,51	5,49±5,54	4,62±3,78	5,68±4,64
	Pamięci	5,02±3,36	5,24±3,09	3,95±2,50	4,60±2,72
	Efektorowe	51,99±19,64	56,13±21,35	56,14±19,67	54,58±19,55
	CD45RA efektorowe	37,37±20,99	33,15±21,08	35,29±20,36	35,12±20,10

IV.2.2. Stopień aktywacji limfocytów T

IV.2.2.1. Ocena stopnia aktywacji limfocytów T z krwi obwodowej pod względem markera wczesnej aktywacji CD69.

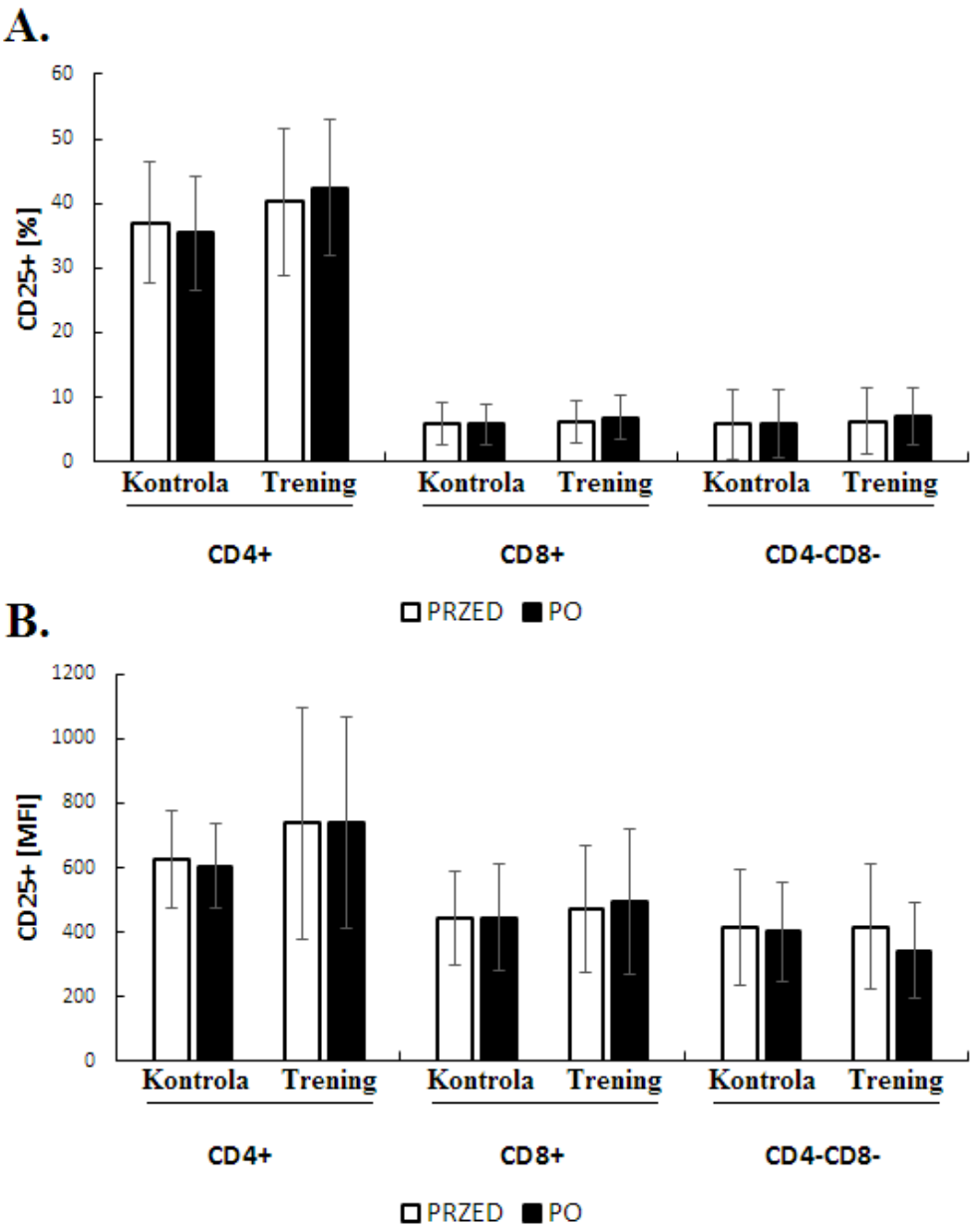
Poszczególne subpopulacje limfocytów T poddane zostały analizie pod względem średniej wartości komórek wykazujących ekspresję markera wczesnej aktywacji (*Rycina 10,* A) oraz pod względem ilości markera na powierzchni komórek CD69 pozytywnych (*Rycina 10,* B). Średnia wartość procentowa ± odchylenie standardowe limfocytów CD4+CD69+ dla poszczególnych wizyt wynosiła, przed okresem kontrolnym: 2,37±1,96%, po okresie kontrolnym: 2,10±2,13%; przed treningiem: 1,84±1,75%; po treningu: 1,58±1,57%. Dla subpopulacji limfocytów CD8+ wartości te były prawie 6 razy wyższe i wynosiły, przed okresem kontrolnym: 12,73±11,63%; po okresie kontrolnym: 10,83±10,43%; przed treningiem: 10,00±9,38%; po treningu: 11,35±10,26%. Najwięcej komórek wykazujących ekspresję zaobserwowano w populacji limfocytów T podwójnie ujemnych. Dla tej populacji wyniki wynoszą odpowiednio, w okresie kontrolnym: 14,67±11,58% vs 13,21±11,74%; pod wpływem treningu 12,55±10,41% vs 11,73±8,91%. Żadne z powyższych wyników nie różniły się. W przypadku ilości markera na powierzchni komórek wykazujących jego ekspresję różnice pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami nie były już tak duże. Dla komórek CD4+CD69+ średnie wartości MFI (ang. *Mean Fluorescence Intesity*) ± odchylenie standardowe wynosiły odpowiednio, przed okresem kontrolnym: 497,83±106,62; po okresie kontrolnym: 549,08±208,73; przed treningiem: 643,29±235,69; po treningu: 585,29±194,93. Dla komórek CD8+CD69+ ekspresja markera była bardzo zbliżona i wynosiła, przed okresem kontrolnym: 556,63±221,01; po okresie kontrolnym: 560,58±209,53; przed treningiem: 673,21±297,96; po treningu: 580,17±309,33. Wyniki te nie różniły się znacząco. Najwyższa ekspresja CD69+ zaobserwowana została na limfocytach CD3+CD4-CD8-. Zaobserwowano tu również istotną statystycznie interakcję *trening*kontrola* po poprawce FDR, gdzie p=0,035. Wartości dla tej populacji wynoszą odpowiednio, przed okresem kontrolnym: 606,88±259,09; po okresie kontrolnym: 646,25±250,99; przed treningiem: 843,13±426,52 oraz po treningu: 648,50±231,23.



Rycina 10. Odsetek limfocytów CD4+CD69+, CD8+CD69+ oraz CD3+CD4-CD8-CD69+ (A) wyizolowanych z krwi pacjentów podczas kolejnych wizyt (NS) oraz Mean Fluorescence Intensity (MFI) dla tych subpopulacji limfocytów. Dla CD4+CD69+ oraz CD8+CD69+, NS, dla CD3+CD4-CD8-CD69+, p=0,035 (B).

IV.2.2.2. Ocena stopnia aktywacji limfocytów T z krwi obwodowej na podstawie ekspresji receptora dla IL-2 (CD25).

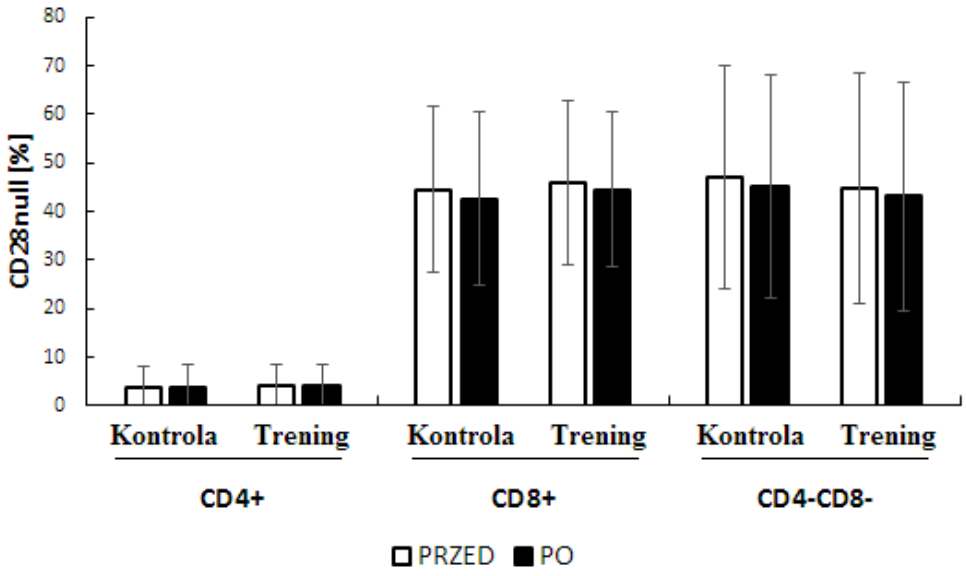
Analizie poddana została również ekspresja receptora dla IL-2, traktowanego niekiedy jako późny marker aktywacji. Marker ten nie występuje na limfocytach naiwnych i tylko w niewielkim stopniu występuje na limfocytach pamięci. Jest on również jednym z dwóch markerów limfocytów T regulatorowych. Średnia wartość procentowa ± odchylenie standardowe (*Rycina 11*, A) limfocytów CD4+CD25+ wynosiła, przed okresem kontrolnym: 37,00±9,37%; po okresie kontrolnym: 35,43±8,88%; przed treningiem: 40,22±11,49%; po treningu: 42,40±10,48%. Wartości te były ponad sześć razy niższe w przypadku komórek CD8+CD25+ oraz CD3+CD4-CD8-CD25+. Dla pierwszej subpopulacji wynosiły odpowiednio, przed okresem kontrolnym: 5,85±3,36%; po okresie kontrolnym: 5,78±3,13%; przed treningiem: 6,12±3,31%; po treningu: 6,83±3,37%. Natomiast dla limfocytów podwójnie ujemnych CD25+ wartości te wynosiły, w okresie kontrolnym: 5,73±5,40% vs 5,85±5,25% oraz pod wpływem treningu: 6,29±5,00% vs 7,02±4,48%. Powyższe wyniki nie różniły się znacząco, podobnie jak wartości MFI dla poszczególnych subpopulacji (*Rycina 11*, B). Dla limfocytów CD4+CD25+ wynosiły one, przed okresem kontrolnym: 626,29±150,41; po okresie kontrolnym: 605,29±131,99; przed treningiem: 737,21±385,05; po treningu: 739,00±325,51. W przypadku limfocytów CD8+CD25+ ekspresja była niższa i wynosiła, przed okresem kontrolnym: 442,42±144,15; po okresie kontrolnym: 446,00±166,94; przed treningiem: 473,33±197,15; po treningu: 495,46±224,78, natomiast dla subpopulacji limfocytów T podwójnie ujemnych CD25+ wartości te wynosiły, w okresie kontrolnym: 415,13±179,27 vs 400,61±151,60 oraz pod wpływem treningu 417,17±191,29 vs 342,83±145,99.



Rycina 11. Odsetek limfocytów CD4+CD25+, CD8+CD25+ oraz CD3+CD4-CD8-CD25+ (A) wyizolowanych z krwi pacjentów podczas kolejnych wizyt oraz Mean Fluorescence Intensity (MFI) dla tych subpopulacji limfocytów (B), n=24, NS.

IV.2.2.3. Limfocyty T CD28null

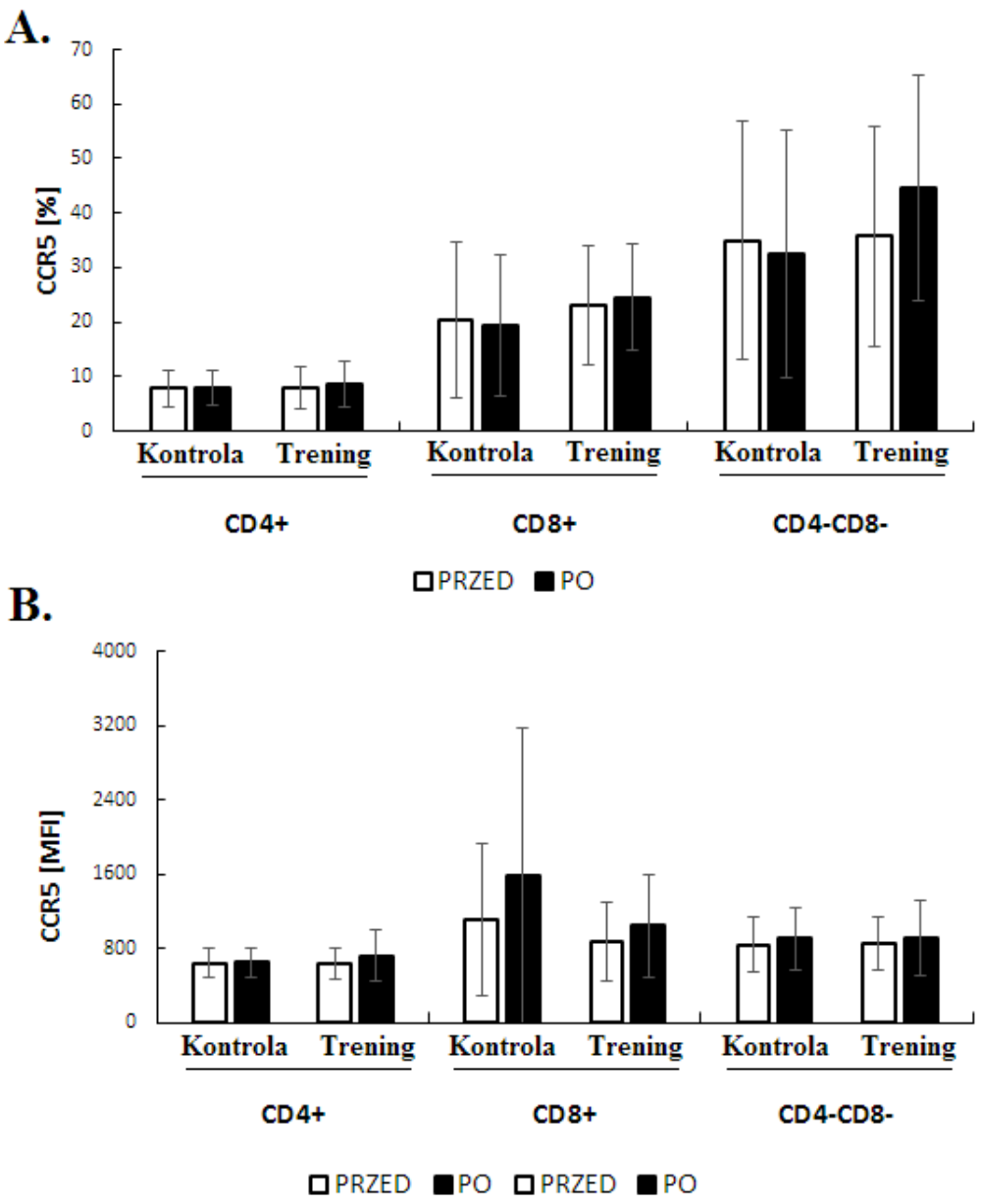
Wyizolowane z krwi pacjentów limfocyty T analizowano pod kątem obecności lub braku cząsteczki CD28 (*Rycina 12*). Dla subpopulacji CD4+CD28null średnia wartość procentowa ± odchylenie standardowe dla kolejnych pomiarów wynosiła, przed okresem kontrolnym: 3,74±4,17%; po okresie kontrolnym: 3,88±4,55%; przed treningiem: 4,11±4,27 oraz po treningu: 4,00±4,47%. Dla subpopulacji limfocytów CD8+CD28null wartości były wyższe i wynosiły odpowiednio, przed okresem kontrolnym: 44,51±17,02%; po okresie kontrolnym: 42,63±17,87; przed treningiem: 45,73±16,91%; po treningu: 44,44±15,97%. Dla populacji limfocytów CD3+ CD4-CD8- CD28null wartości te były podobne i wynosiły, w okresie kontrolnym 47,02±23,01% vs 44,99±22,99% oraz pod wpływem treningu: 44,72±23,88% vs 43,06±23,40%. Żadne z powyższych wyników nie różniły się.



Rycina 12. Odsetek limfocytów CD4+CD28null, CD8+CD28null oraz CD3+CD4-CD8-CD28null wyizolowanych z krwi obwodowej, n=24, NS.

IV.2.2.4. Receptor dla chemokiny RANTES, CCR5

Chemokina RANTES jest jedną z kluczowych chemokin odpowiedzialnych za aktywację, chemotaksję, adhezję limfocytów T oraz ich migrację poprzez śródbłonek do miejsca zapalenia. Wykazuje więc działanie prozapalne. Dlatego, kolejnym etapem było zbadanie ekspresji CCR5, receptora dla chemokiny RANTES na subpopulacjach limfocytów T. Średnie wartości procentowe ± odchylenie standardowe (*Rycina 13,* A) dla limfocytów CD4+CCR5+ wynosiły, przed okresem kontrolnym: 7,80±3,28%; po okresie kontrolnym: 7,94±3,05%; przed treningiem: 8,02±3,94%; po treningu: 8,56±4,13%. Dla subpopulacji limfocytów CD8+CCR5+ wartości te były wyższe i wynosiły, przed okresem kontrolnym: 20,39±14,20%; po okresie kontrolnym: 19,43±13,05%; przed treningiem: 23,07±10,86% oraz po treningu: 24,59±9,81%. Najwyższy odsetek komórek CCR5 pozytywnych zaobserwowano w populacji limfocytów CD3+CD4-CD8-. Wartości te wynosiły odpowiednio, dla okresu kontrolnego: 35,01±21,77% vs 32,51±22,64% oraz pod wpływem treningu: 35,75±20,09% vs 44,62±20,71%. Powyższe wyniki, jak również wyniki dla MFI nie różniły się znacząco. Ilość receptora na powierzchni komórek wyrażona jako średnia z MFI ± odchylenie standardowe (*Rycina 13,* B) dla komórek CD4+CCR5+ prezentowała się następująco, przed okresem kontrolnym: 638,58±159,84; po okresie kontrolnym: 650,92±158,12; przed treningiem: 636,54±172,12; po treningu: 719,92±280,43. Na komórkach CD8+CCR5+ ekspresja była wyższa i wynosiła, przed okresem kontrolnym: 1107,39±823,95; po okresie kontrolnym: 1576,19±1598,36; przed treningiem: 871,81±429,25; po treningu: 1039,54±550,58. Natomiast na limfocytach T podwójnie ujemnych CCR5+ średnia ekspresja receptora wynosiła, dla okresu kontrolnego: 840,42±294,06 vs 902,08±330,13; pod wpływem treningu: 847,12±292,59 vs 916,35±408,16.



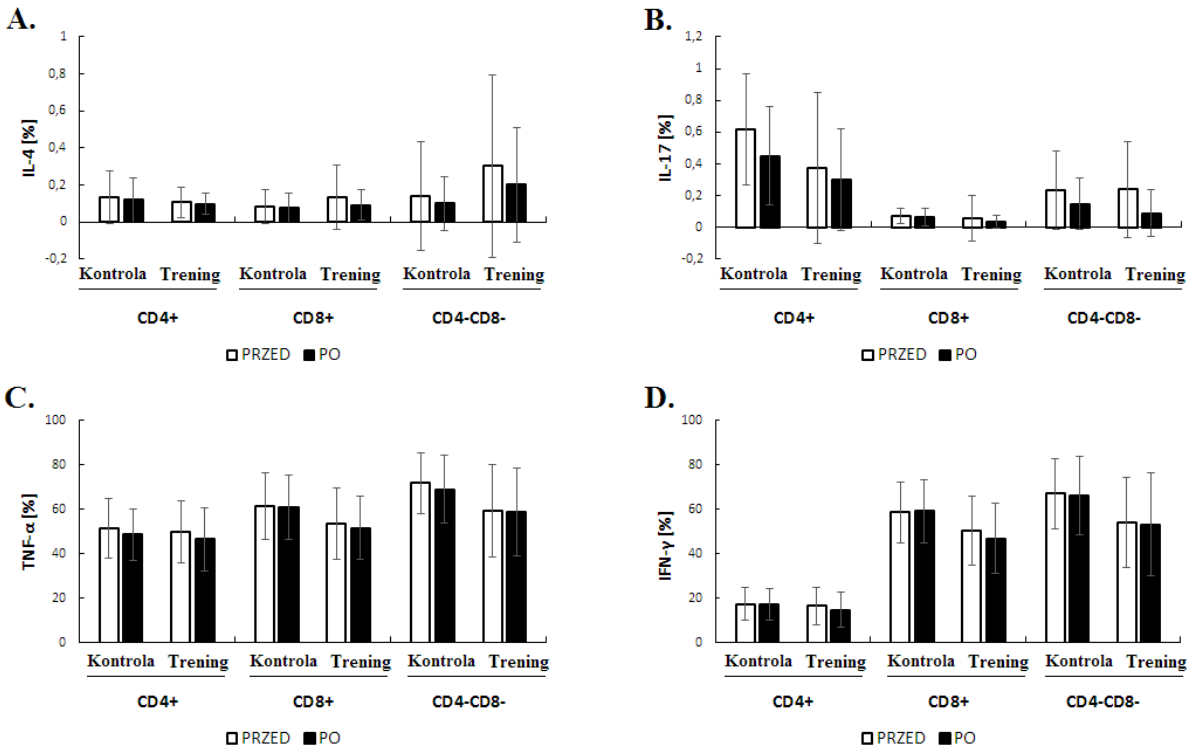
Rycina 13. Odsetek limfocytów CD4+CCR5+, CD8+CCR5+ oraz CD3+CD4-CD8-CCR5+ (A) wyizolowanych z krwi pacjentów podczas kolejnych wizyt oraz Mean Fluorescence Intensity (MFI) dla tych subpopulacji limfocytów (B), n=26, NS

IV.2.2.5. Produkcja cytokin przez limfocyty

W celu lepszej charakterystyki wpływu regularnego wysiłku fizycznego na poszczególne subpopulacje limfocytów oraz stan układu immunologicznego określona została zdolność limfocytów T CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8- do produkcji cytokin takich jak IL-4, IL-17, TNF-α oraz IFN-γ. Średnie wartości ± odchylenie standardowe dla tych subpopulacji przedstawione zostały w tabeli (Tabela 4) oraz na wykresie (*Rycina* 14). Żadne z tych wyników nie różniły się znacząco.

Tabela 4. Średnia wartość procentowa subpopulacji limfocytów T (± odchylenie standardowe) zdolnych do produkcji poszczególnych cytokin, IL-4, IL-17, TNF-α oraz IFN-γ, n=26, NS.

		Kontrola		**Trening**	
	Cytokina	**Przed**	**Po**	**Przed**	**Po**
CD4+ [%]	***IL-4***	0,14±0,14	0,12±0,12	0,11±0,08	0,10±0,06
	IL-17	0,62±0,35	0,45±0,31	0,37±0,47	0,30±0,32
	TNF-α	51,31±13,54	48,67±11,56	49,69±13,87	46,48±14,29
	IFN-γ	17,38±7,25	17,21±6,93	16,53±8,32	14,75±7,79
CD8+ [%]	***IL-4***	0,08±0,09	0,08±0,08	0,14±0,17	0,09±0,08
	IL-17	0,07±0,05	0,07±0,05	0,06±0,14	0,04±0,04
	TNF-α	61,35±15,03	60,91±14,29	53,47±16,25	51,43±14,16
	IFN-γ	58,47±13,91	59,17±14,20	50,15±15,44	46,84±15,61
CD3+CD4-CD8- [%]	***IL-4***	0,14±0,29	0,10±0,15	0,30±0,49	0,20±0,31
	IL-17	0,23±0,25	0,15±0,16	0,24±0,30	0,09±0,15
	TNF-α	71,71±13,55	68,85±15,22	59,32±20,62	58,75±19,67
	IFN-γ	66,99±15,85	65,95±17,56	53,95±20,43	53,02±23,13



Rycina 14. Odsetek limfocytów T (± odchylenie standardowe) zdolnych do produkcji poszczególnych cytokin, IL-4, IL-17, TNF-α oraz IFN-γ, n=26, NS.

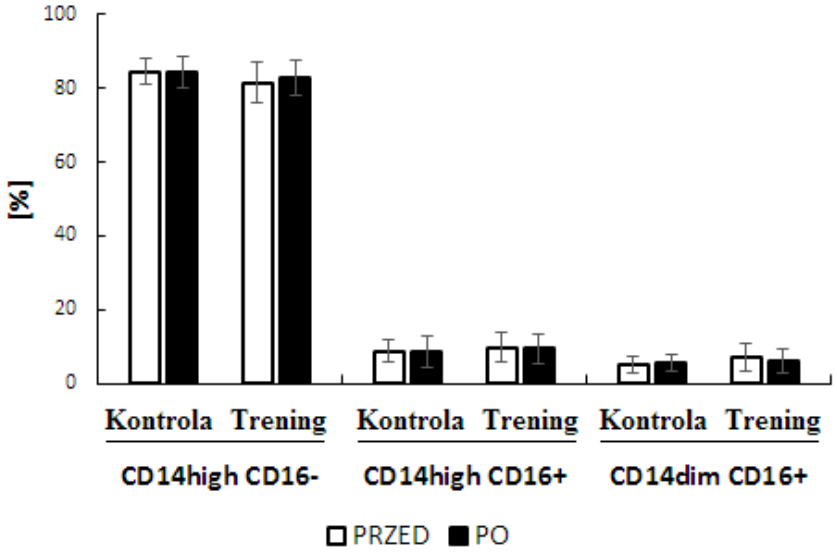
IV.3. Charakterystyka monocytów we krwi pacjentów

IV.3.1. Subpopulacje monocytów

Podwyższone ciśnienie i dysfunkcja śródbłonka, jak również aktywacja limfocytów T mogą być powiązane z aktywacją monocytów. Szczególnie ważne w zapaleniu są subpopulacje monocytów CD14highCD16+ oraz CD14dimCD16+, dlatego pierwsza analiza dotyczyła wpływu wysiłku fizycznego na rozkład subpopulacji monocytów pod względem ekspresji markera CD14 oraz CD16 (*Rycina 15*).

Dominującą subpopulacją monocytów były monocyty CD14high CD16-. Średnia wartość procentowa ± odchylenie standardowe dla poszczególnych wizyt wynosiła, przed okresem kontrolnym: 84,40±3,58%; po okresie kontrolnym: 84,21±4,32%; przed treningiem: 81,43±5,51%; po treningu: 83,00±4,72%. Kolejną co do wielkości subpopulacją były monocyty CD14high CD16+. Wartości średniej dla poszczególnych wizyt wynosiły, przed okresem kontrolnym: 8,74±3,00%; po okresie kontrolnym: 8,68±4,15%; przed treningiem: 9,82±3,97%; po treningu: 9,45±4,20%. Dla subpopulacji monocytów, uznawanej jako nieklasyczna, CD14dim CD16+ wartości te w poszczególnych pomiarach wynosiły odpowiednio, dla okresu kontrolnego: 5,31±2,35%

vs 5,56±2,38%; pod wpływem wysiłku: 7,18±3,60% vs 6,07±3,19%. Żadne z powyższych wyników nie różniły się.



Rycina 15.Wykres przedstawiający procentowy rozkład średnich wartości (±SD) poszczególnych subpopulacji monocytów, CD14high CD16-, CD14high CD16+, CD14dim CD16+, n=26, NS.

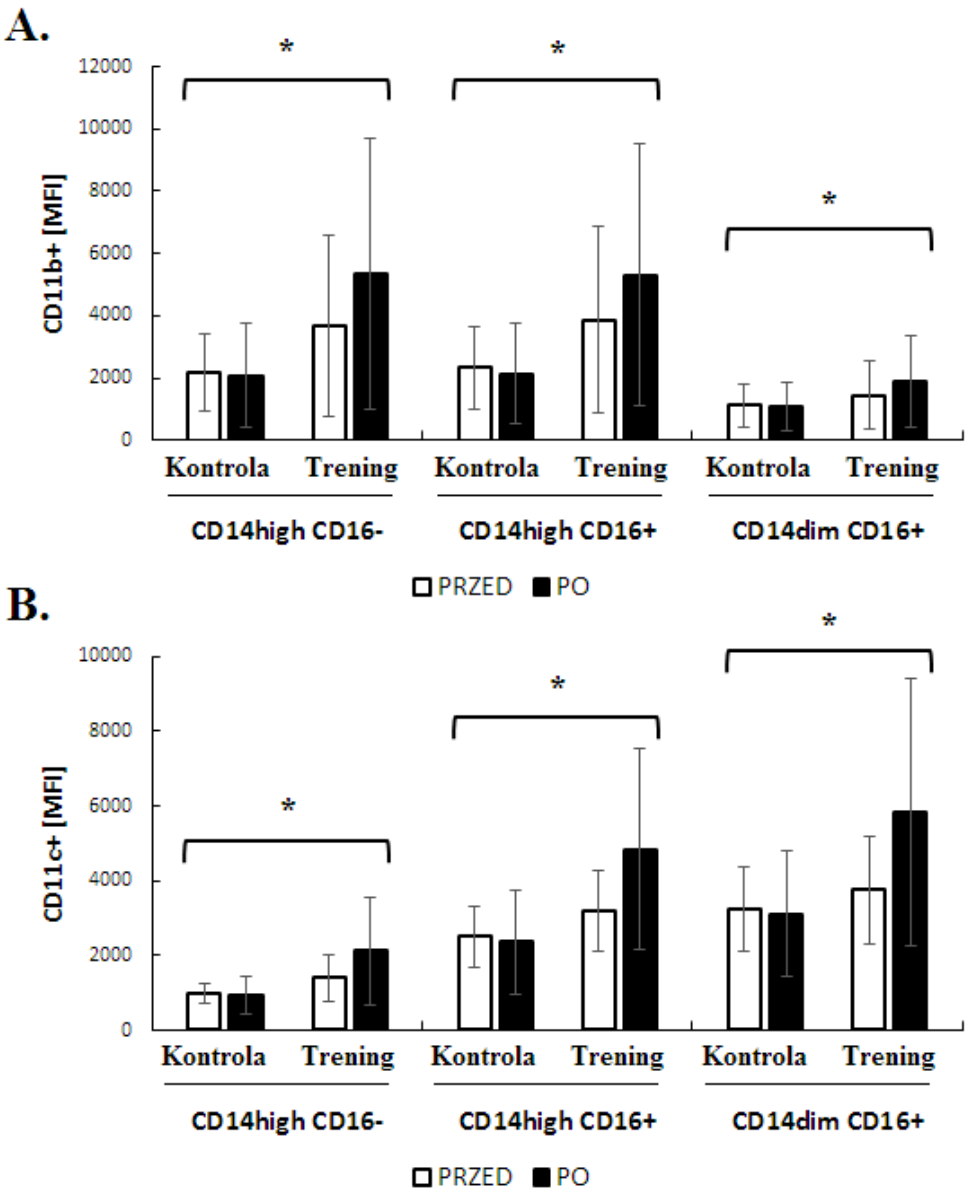
IV.3.2. Ocena ekspresji markerów adhezji do śródbłonka

Następnie ocenie poddana została ekspresja integryn CD11b oraz CD11c mających wpływ na migrację i adhezję monocytów do ściany naczynia oraz na proces aterogenezy. Średnie wartości procentowe ± odchylenie standardowe dla monocytów wykazujących ekspresję CD11b oraz CD11c przedstawione są w tabeli poniżej (*Tabela* 5). Zgodnie z oczekiwaniami monocyty CD11b oraz CD11c były populacją dominującą.

Tabela 5. Ekspresja markerów adhezji w poszczególnych subpopulacjach monocytów, CD14high CD16-, CD14high CD16+, CD14dim CD16+, n=26, NS.

		Kontrola		Trening	
	Marker	**Przed**	**Po**	**Przed**	**Po**
$CD14^{high}$ CD16- [%]	***CD11b***	99,81±0,20	99,83±0,15	99,79±0,30	99,81±0,15
	CD11c	99,86±0,13	99,86±0,15	99,92±0,13	99,91±0,12
$CD14^{high}$ CD16+ [%]	***CD11b***	99,45±0,55	99,35±0,55	99,54±0,70	99,68±0,25
	CD11c	99,78±0,17	99,75±0,47	99,89±0,12	99,88±0,13
$CD14^{dim}$ $CD16_{+}$ [%]	***CD11b***	88,47±12,06	88,35±9,97	88,42±9,58	86,97±9,23
	CD11c	99,17±0,77	98,93±0,86	99,36±0,59	99,20±0,77

Odsetek monocytów wykazujących ekspresję markerów adhezji nie różnił się pomiędzy wizytami, natomiast ekspresja markerów, zarówno CD11b (*Rycina* 16, A) jak i CD11c (*Rycina* 16, B), określana jako MFI ± odchylenie standardowe różniła się znacząco we wszystkich subpopulacjach monocytów. Dla monocytów klasycznych CD14high CD16- CD11b+ wartości dla poszczególnych wizyt wynosiły kolejno, przed okresem kontrolnym: 2170,20±1222,17; po okresie kontrolnym: 2072,30±1658,15; przed treningiem: 3686,70±2921,07; po treningu: 5336,30±4362,93; p=0,015. Dla subpopulacji monocytów CD14high CD16+ CD11b+ wyniki wynosiły, przed okresem kontrolnym: 2340,20±1330,30; po okresie kontrolnym: 2139,20±1636,08; przed treningiem: 3856,70±3004,80 oraz po treningu: 5303,65±4200,77; p=0,008. Dla subpopulacji monocytów CD14dim CD16+ CD11b+ wartości wynosiły, dla okresu kontrolnego: 1111,95±706,57 vs 1073,30±757,87; pod wpływem treningu: 1444,35±1084,01 vs 1897,25±1486,34; p=0,035. W przypadku ekspresji markera CD11c wartości dla subpopulacji CD14high CD16- CD11c+ wynosiły, przed okresem kontrolnym: 994,12±266,98; po okresie kontrolnym: 921,54±497,28; przed treningiem: 1396,77±633,52; po treningu: 2119,89±1444,01; p=0,035. Dla subpopulacji monocytów CD14high CD16+ CD11c+ wartości wynosiły odpowiednio, przed okresem kontrolnym: 2514,19±822,29; po okresie kontrolnym: 2353,89±1381,04; przed treningiem: 3204,39±1079,12 oraz po treningu: 4847,54±2691,37; p=0,035. Ekspresja markera była najwyższa dla subpopulacji CD14dim CD16+ CD11c+ i wynosiła, dla okresu kontrolnego: 3239,58±1135,25 vs 3119,19±1672,74; pod wpływem treningu: 3754,35±1438,61 vs 5835,19±3559,47; p=0,051.



Rycina 16. Ekspresja markerów adhezji na monocytach wyrażona jako MFI ± odchylenie standardowe. Ekspresja CD11b (A) na monocytach CD14high CD16- CD11b+, p=0,015; CD14high CD16+ CD11b+, p= 0,008; CD14dim CD16+ CD11b+, p=0,035, n=20. Ekspresja markera CD11c (B) na monocytach CD14high CD16- CD11c+, p=0,035; CD14high CD16+ CD11c+, p=0,035; CD14dim CD16+ CD11c+, p=0,051, n=26.

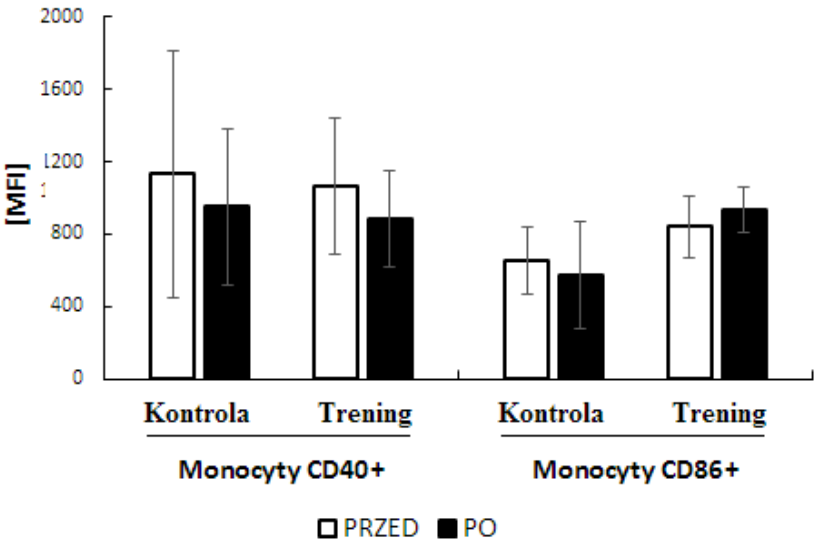
IV.3.3. Białka dostarczające sygnał kostymulujący limfocytom T, CD40 oraz CD86

Monocyty, jako komórki fagocytujące są komórkami prezentującymi antygen. Białkami występującymi na komórkach prezentujących antygen są między innymi CD40 oraz CD86, które są cząsteczkami niezbędnymi do ich aktywacji, jak również dostarczającymi sygnał kostymulujący limfocytom T. Analiza ekspresji tych markerów pozwoli lepiej scharakteryzować wpływ wysiłku fizycznego na populację monocytów. Średnie wartości procentowe ± odchylenie standardowe dla monocytów wykazujących ekspresję białek CD40 i CD86 zostały zamieszczone w tabeli (Tabela 6). Zarówno te wartości jak i wartości MFI dla CD40 i CD86 (*Rycina* 17) nie różniły się.

Tabela 6. Średnia procentowa wartość ekspresji białek kostymulujących (± odchylenie standardowe), CD40 oraz CD86 na monocytach, n=14, NS.

	Kontrola		**Trening**	
Monocyty	**Przed**	**Po**	**Przed**	**Po**
CD40+ [%]	97,84±1,00	96,96±1,58	96,81±1,63	96,76±1,44
CD86+ [%]	92,21±3,49	92,63±4,87	91,33±6,89	89,71±6,49

Dla cząsteczki CD40 wartości MFI wynosiły, przed okresem kontrolnym: 1132,50±680,41; po okresie kontrolnym: 950,21±434,02; przed treningiem: 1063,43±376,22; po treningu: 887,00±263,37. Ekspresji białka CD86 w kolejnych wizytach odpowiadały następujące wartości, dla okresu kontrolnego: 657,07±183,95 vs 571,86±297,53; pod wpływem treningu: 842,57±170,11 vs 931,93±125,85.

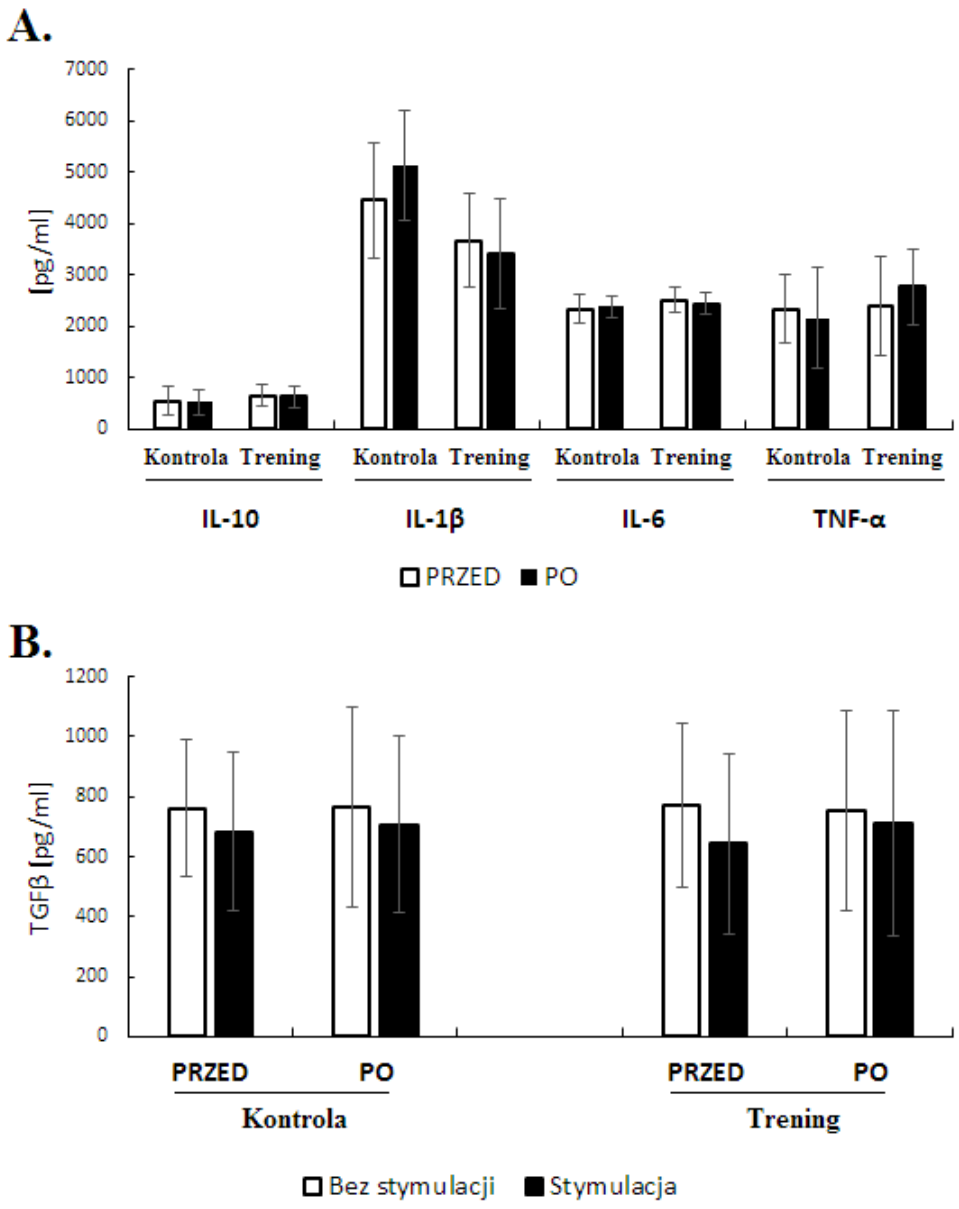


Rycina 17. Ekspresja białek kostymulujących, CD40 i CD86 na monocytach. MFI ± odchylenie standardowe, n=14, NS.

IV.3.4. Produkcja cytokin przez monocyty

Aby określić wpływ wysiłku fizycznego na zdolność produkcji cytokin pro- oraz przeciwzapalnych, takich jak IL-10, IL-1β, IL-6, TNF-α oraz TGF-β, przez monocyty, wyizolowane PBMC stymulowane były LPS. Dla kontroli w tym samym czasie hodowane były PBMC w czystym medium, aby możliwe było odjęcie podstawowej produkcji cytokin przez wszystkie PBMC. Wszystkie wyniki, oprócz tych dla TGF-β, podawane są jako średnia z różnicy stężenia cytokiny po stymulacji oraz bez stymulacji ± odchylenie standardowe [pg/ml] (*Rycina* 18, A). W przypadku TGF-β podane zostały wartości poziomu cytokiny bez stymulacji oraz po stymulacji niezależnie, ponieważ poziom TGF-β bez stymulacji był wysoki, a sama stymulacja nie spowodowała wzrostu jego produkcji (*Rycina* 18, B). Stężenie IL-10 dla poszczególnych wizyt wynosiło odpowiednio, przed okresem kontrolnym: 546,86±269,45; po okresie kontrolnym: 525,44±246,62; przed treningiem: 652,77±214,68; po treningu: 623,21±217,80. Dla IL-1β wartości wynosiły, przed okresem kontrolnym: 4450,78±1121,73; po okresie kontrolnym: 5127,65±1059,67; przed treningiem: 3668,15±909,90; po treningu: 3405,75±1057,41. Stężenie IL-6 dla kolejnych wizyt wynosiło, przed okresem kontrolnym: 2335,81±274,38; po okresie kontrolnym: 2375,20±227,39; przed treningiem: 2513,82±236,06; po treningu: 2442,68±198,17. TNF-α produkowany był w stężeniu, przed okresem kontrolnym: 2335,22±672,57; po okresie kontrolnym: 2150,59±979,56; przed treningiem: 2389,16±951,86; po treningu: 2767,83±726,90. W

przypadku TGF-β wartości stężeń dla kontroli vs stymulacji LPS wynosiły, przed okresem kontrolnym: 761,10±227,18 vs 683,80±267,18; po okresie kontrolnym: 767,30±333,30 vs 706,30±293,85; przed treningiem: 770,00±274,83 vs 644,50±300,70 oraz po treningu: 752,90±335,79 vs 709,40±376,65. Żadne z powyższych wyników nie różniły się znacząco.

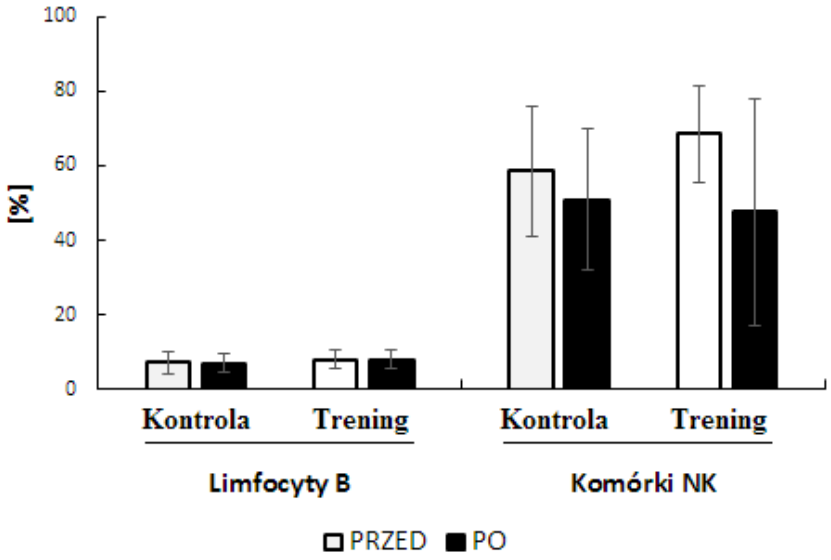


Rycina 18. Produkcja cytokin przeciw- oraz prozapalnych przez monocyty po stymulacji LPS. Stężenie IL-10, IL-1β, IL-6 oraz TNF-α po odjęciu produkcji podstawowej wszystkich komórek PBMC, n=12 (A) oraz produkcja TGF-β podstawowa wszystkich PBMC oraz monocytów po stymulacji LPS (B), n=10, NS.

IV.4. Limfocyty B oraz komórki NK

Aby poszerzyć nasze obserwacje na temat efektu jaki wywiera wysiłek fizyczny na układ immunologiczny w naszej grupie pacjentów postanowiliśmy zanalizować również limfocyty B oraz komórki NK (*Rycina* 19).

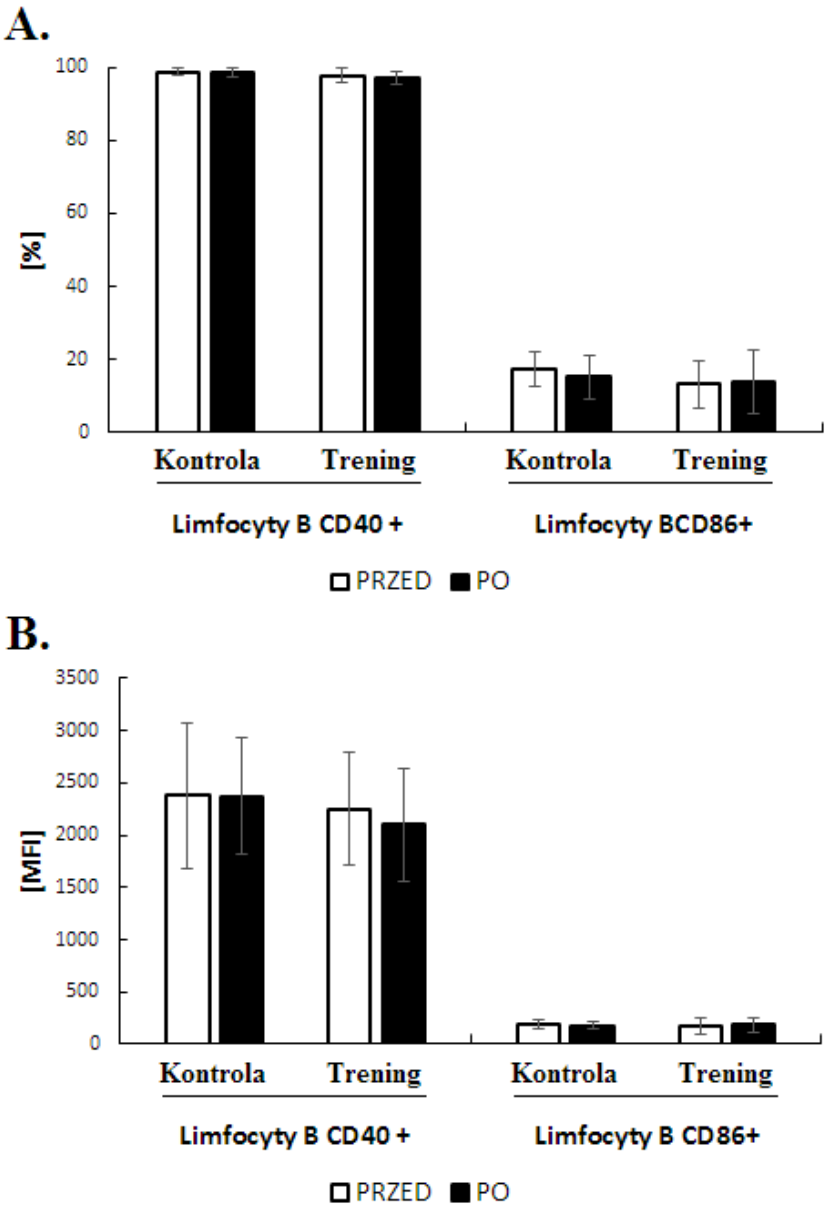
Średnie wartości procentowe ± odchylenie standardowe dla limfocytów B wynosiły odpowiednio, przed okresem kontrolnym: 7,33±3,00%; po okresie kontrolnym: 7,07±2,37%; przed treningiem: 8,10±2,41%; po treningu: 8,05±2,52%. Dla komórek NK, zaprezentowane wartości są średnimi procentowymi populacji komórek CD19-CD3- , z tego powodu są wyższe niż wartości dla limfocytów B. Takie zbramkowanie pozwoliło precyzyjniej określić komórki NK. Wartości dla poszczególnych wizyt prezentowały się następująco, przed okresem kontrolnym: 58,47±17,44%; po okresie kontrolnym: 50,91±18,97%; przed treningiem: 68,61±13,00% oraz po treningu: 47,54±30,17%. Powyższe wartości nie różniły się znacząco.



Rycina 19. Odestek limfocytów B z PBMC oraz komórek NK z populacji komórek CD19-CD3-, n=14, NS.

Dodatkowo, jako że limfocyty B zaliczają się do grupy komórek prezentujących antygen, zanalizowano na ich powierzchni ekspresję cząsteczek kostymulujących, CD40 oaz CD86 (Rycina 20). Limfocyty B wykazujące ekspresję CD40 były subpopulacją dominującą. Średnie wartości procentowe ± odchylenie standardowe dla poszczególnych wizyt wynosiły odpowiednio, przed okresem kontrolnym: 98,67±0,92%; po okresie kontrolnym: 98,43±1,25%, przed treningiem: 97,69±1,93; po treningu: 97,19±1,72%.

Komórki nie różniły się pod względem ekspresji markera na powierzchni komórki. Wartości MFI ± odchylenie standardowe wynosiły, przed okresem kontrolnym: 2376,50±690,82; po okresie kontrolnym: 2370,43±555,77; przed treningiem: 2249,50±539,01; po treningu: 2097,57±538,65. Zdecydowanie mniejszy odsetek limfocytów B był CD86+. Wartości średnie ± odchylenie standardowe dla poszczególnych wizyt wynosiły, przed okresem kontrolnym: 17,38±4,58%; po okresie kontrolnym: 15,34±5,95%; przed treningiem: 13,29±6,45%; po treningu: 13,88±8,48%. Poziom ekspresji CD86 na limfocytach B CD86+ nie był wysoki w porównaniu do monocytów CD86+. Wartości MFI ± odchylenie standardowe dla poszczególnych wizyt wynosiły, przed okresem kontrolnym: 191,79±45,96; po okresie kontrolnym: 178,86±29,31; przed treningiem: 178,39±76,27 oraz po treningu: 181,82±67,77. Sprawdzono również ekspresję powyższych markerów na komórkach NK oraz limfocytach T, które nie są wyspecjalizowanymi komórkami prezentującymi antygen. Zgodnie z oczekiwaniami wartości te były bardzo niskie i wynosiły ok. 2% dla CD86 na obydwu populacjach. W przypadku CD40, ekspresję tej cząsteczki wykazywało średnio ok. 2% komórek NK, natomiast aż ok. 11% limfocytów T.



Rycina 20. Średnia procentowa wartość ± odchylenie standardowe limfocytów B wykazujących ekspresję cząsteczek kostymulujących, CD40 oraz CD86 (A). Poziom ekspresji CD40 oraz CD86 na limfocytach B wyrażone jako MFI ± odchylenie standardowe, n=14, NS.

IV.5. Osoczowe wykładniki stanu zapalnego

W osoczu zbadane zostały stężenia cytokin pro- i przeciwzapalnych. Stężenia wybranych cytokin ± odchylenie standardowe zostały przedstawione w tabeli poniżej. Żadne z wyników nie różniły się znacząco.

Tabela 7. Stężenia cytokin IL-10, IL-1β, IL-6 oraz TNF-α w osoczu pacjentów podczas poszczególnych wizyt, n=13, NS.

	Kontrola		**Trening**	
Cytokina	**Przed**	**Po**	**Przed**	**Po**
IL-10 [pg/ml]	1,97±0,47	2,28±1,45	1,96±1,63	2,13±1,52
IL-1β [pg/ml]	0,47±0,27	0,48±0,31	0,45±0,26	0,42±0,18
IL-6 [pg/ml]	0,41±0,19	0,41±0,25	0,56±0,37	0,65±0,78
TNF-α [pg/ml]	1,15±0,71	1,07±0,69	1,25±1,10	1,23±0,76

IV.6. Podsumowanie wyników

1. Nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu wysiłku fizycznego na dojrzałość oraz funkcje efektorowe poszczególnych subpopulacji limfocytów T.
2. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w procentowej wartości limfocytów CD4+CD69+, CD8+CD69+ oraz CD4-CD8-CD69+ pomiędzy okresem kontrolnym a treningiem. Zaobserwowano jednak zmniejszoną ekspresję markera CD69 na limfocytach DN po okresie regularnego wysiłku i poziom ten utrzymuje się również w okresie kontrolnym.
3. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w procentowej wartości limfocytów CD4+CD25+, CD8+CD25+ oraz CD4-CD8-CD25+ pomiędzy okresem kontrolnym oraz treningiem. Nie wykazano również wpływu regularnego wysiłku fizycznego na poziom ekspresji markera CD25 w poszczególnych subpopulacjach limfocytów T.
4. Wysiłek fizyczny nie miał wpływu na odsetek limfocytów CD4+CD28null, CD8+CD28null oraz DN CD28null.

5. Nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetku komórek CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8- wykazujących ekspresję receptora dla chemokiny RANTES oraz w poziomie ekspresji tego markera w okresie kontrolnym oraz w okresie treningu.
6. Wysiłek fizyczny nie wpłynął istotnie na produkcję IL-4, IL-17, TNFα oraz IFNγ przez poszczególne populacje limfocytów T.
7. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w odsetku poszczególnych subpopulacji monocytów: CD14highCD16-, CD14highCD16+, CD14dimCD16+.
8. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ekspresji CD11b i CD11c na powierzchni monocytów wszystkich populacji pod wpływem treningu. Efekt ten nie występował w okresie kontrolnym.
9. Nie wykazano istotnego statystycznie wpływu regularnego treningu na odsetek monocytów wykazujących ekspresję cząsteczek kostymulujących CD40 oraz CD86 oraz na poziom ekspresji tych markerów.
10. Regularny wysiłek fizyczny nie zmienił istotnie poziomu cytokin pro- i przeciwzapalnych takich jak IL-1β, IL-4, IL-10, TGFβ oraz TNFα przez monocyty pod wpływem stymulacji LPS w porównaniu do okresu kontrolnego.
11. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w odsetku innych leukocytów, takich jak limfocyty B oraz komórki NK pod wpływem treningu w porównaniu do okresu kontrolnego. Również zmiany odsetka limfocytów B wykazujących ekspresję CD40 i CD86 oraz poziom ekspresji tych markerów nie uległy zmianie.
12. W osoczu pobranym z krwi pacjentów nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomie cytokin IL-1β, IL-6, IL-10 oraz TNFα pomiędzy okresem kontrolnym a treningiem.

V. Dyskusja

Biorąc pod uwagę istotny wpływ limfocytów T oraz innych czynników układu immunologicznego w patogenezie nadciśnienia tętniczego [108] oraz korzystny efekt regularnego wysiłku fizycznego w obniżaniu ciśnienia [154], zasadne wydaje się przypuszczenie, iż wysiłek fizyczny powinien wywierać bezpośredni wpływ na układ odpornościowy i przez to pośrednio obniżać ciśnienie tętnicze krwi. Wyniki prezentowanej pracy wskazują na słaby wpływ regulatorowy wysiłku fizycznego na aktywację układu odpornościowego w kontekście prewencji nadciśnienia. U pacjentów z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi, nie zaobserwowaliśmy istotnych zmian w odsetku podstawowych subpopulacji limfocytów T. Regularny, 12-tygodniowy wysiłek fizyczny nie wpłynął również na stopień ich aktywacji mierzony za pomocą ekspresji markerów aktywacji (CD69, CD25, CCR5). W grupie pacjentów z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi regularny trening spowodował wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych na monocytach, bez innych zmian w populacjach leukocytów.

Niewiele jest badań analizujących wpływ wysiłku fizycznego na komórki układu odpornościowego w kontekście nadciśnienia. Są jednak liczne doniesienia na temat roli wysiłku fizycznego u osób starszych. W populacji tej, odsetek nadciśnienia jest najwyższy. Wyniki tych badań nie są jednak jednoznaczne.

Nieman i współpracownicy zaobserwowali wzrost aktywności komórek NK oraz poprawę funkcji limfocytów T u kobiet, które regularnie brały udział w zawodach sportowych przez minimum 5 lat w porównaniu do kobiet prowadzących siedzący tryb życia. [170]. W grupie mężczyzn biegających rekreacyjnie przez około 17 lat, nie wykazano wzrostu aktywności komórek NK, ani zmian w ilości komórek poszczególnych populacji układu odpornościowego w porównaniu do mężczyzn nietrenujących. Aktywność fizyczna skutkowała jednak większą proliferacją limfocytów T w odpowiedzi na mitogeny (fitohemaglutynina, mitogen szkarłatki) oraz wyższą produkcją cytokin IL-2, IL-4 i IFN-γ [175]. Wykazano również, że regularny wysiłek fizyczny powoduje lepszą odpowiedź limfocytów CD25+ na skutek stymulacji anty-CD3 [176]. Powyższe badania, są badaniami przekrojowymi i ukazują efekt od kilku- do kilkunastoletniego, regularnego treningu na układ odpornościowy osób starszych. Wprowadzenie 12-tygodniowego wysiłku fizycznego nie poprawiło funkcji układu odpornościowego u kobiet nietrenujących [170]. Podobne wyniki uzyskano porównując efekt 6-miesięcznego, regularnego aerobowego treningu z regularnymi ćwiczeniami relaksacyjnymi. Nie

zaobserwowano wpływu regularnej aktywności fizycznej na odsetek poszczególnych populacji leukocytów. Również podstawowe subpopulacje limfocytów T nie uległy zmianie. U obydwu grup zauważono niewielki wzrost proliferacji limfocytów T pod wpływem stymulacji konkanawaliną A lub fitohemaglutyniną [177]. Treningi siłowe trwające 8-12 tygodni nie wywołały zmian w subpopulacjach limfocytów oraz produkcji cytokin [178], [179].

Z powyższych badań wynika, że regularny wysiłek fizyczny stosowany długoterminowo w niewielkim stopniu poprawia funkcje układu odpornościowego u osób starszych. Korzystny wpływ wysiłku zaobserwowano głównie w pomiarach proliferacji limfocytów T i aktywności komórek NK *in vitro*. Wyniki naszych badań pokrywają się z obserwacjami dotyczącymi wpływu wysiłku fizycznego na poszczególne populacje leukocytów. Słabą stroną badań przeprowadzanych z udziałem ludzi jest brak kontroli badacza nad aktywnością i stylem życia uczestników poza badaniem, różny status społeczno-ekonomiczny, praca. Są to czynniki, które nawet pomimo najlepszego dopasowania grupy badanej i kontrolnej, mogą zaburzyć wyniki. W naszych badaniach staraliśmy się wyeliminować to ryzyko przez zastosowanie pomiarów sparowanych, przez co każdy uczestnik brał udział w treningu oraz okresie kontrolnym. Najlepszym modelem umożliwiającym przeprowadzenie badań w jednolitych warunkach, jest model zwierzęcy, nad którym badacz ma całkowitą kontrolę. Badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały ochronny wpływ wysiłku fizycznego na parametry układu odpornościowego, które ulegają osłabieniu wraz z wiekiem. Zaobserwowano między innymi korzystny efekt na funkcje makrofagów, limfocytów i komórek NK [180] oraz wyższą proliferację limfocytów T w odpowiedzi na mitogeny [181].

V.1. Charakterystyka limfocytów T krążących we krwi pacjentów poddanych treningowi.

Limfocyty T pomocnicze, CD4+ są dominującą subpopulacją limfocytów T we krwi badanych pacjentów i stanowią ponad 60% wszystkich limfocytów T. Jest ich ponad 2-krotnie więcej niż limfocytów CD8+, co jest w zgodzie z literaturą, w której podaje się, iż stosunek limfocytów T CD4+/CD8+ powinien wynosić >1 [182] lub według innego źródła, waha się od 1-2,9 w zależności od wieku [81]. Niska wartość tego wskaźnika mogłaby znaczyć o występowaniu np. fizycznego czynnika stresującego, który prowadzi do odwrócenia tego stosunku. Stan taki obserwujemy np. u pacjentów z zawałem serca

[183]. Wartości zaobserwowane w powyższym badaniu są prawidłowe i nie zmieniają się pod wpływem regularnego wysiłku.

Nasze wyniki pokazują, że wyizolowane z krwi limfocyty T, CD4+ charakteryzują się ponad 99%, a komórki CD8+ około 92% ekspresją TCRαβ, natomiast wśród limfocytów DN dominuje ekspresja TCRγδ wynosząc 74-78% w zależności o wizyty, przy ekspresji TCRαβ około 18-20%. O ile ekspresja TCRαβ na komórkach CD4+ i CD8+ jest oczywista [184], o tyle ekspresja tego typu TCR na limfocytach podwójnie ujemnych może świadczyć o toczącym się stanie zapalnym, gdyż wykazano ich działanie prozapalne. W zdrowym organizmie rozkład limfocytów DN powinien wynosić około 75% TCRγδ oraz 25% TCRαβ i równowaga ta jest bardzo potrzebna, ponieważ limfocyty DN wykazujące ekspresję TCRγδ działają przeciwstawnie do tych wykazujących ekspresję TCRαβ, między innymi poprzez wydzielanie przeciwzapalnej IL-10 [185]. Pacjenci z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi, którzy brali udział w badaniu, charakteryzowali się prawidłowym rozkładem tych limfocytów podczas każdej wizyty.

Stały rozkład odsetka komórek pod względem dojrzałości i funkcjonowania (limfocyty naiwne, efektorowe, pamięci, efektorowe CD45RA) podczas okresu ćwiczeń oraz w okresie kontrolnym może świadczyć o tym, iż nie doszło do nadmiernej aktywacji układu immunologicznego przez antygeny. Stan ten potwierdza niewielki i niezmienny podczas wizyt odsetek limfocytów T wykazujących ekspresję CD69, markera wczesnej aktywacji. Zaznaczyć jednak trzeba, iż limfocyty T CD4+ wykazywały prawie 6-krotnie mniejszy odsetek komórek wykazujących ekspresję CD69 niż limfocyty T CD8+ lub CD4-CD8-. Wyższy odsetek limfocytów T CD8+ CD69+ od limfocytów CD4+CD69+ jest w zgodzie z badaniami innych chorób układu krążenia [186], jednakże poziom różnicy w obecnej pracy jest wyższy. Może to świadczyć o udziale CD8+CD69+ w rozwoju nadciśnienia, ale jest to parametr na, który wysiłek fizyczny nie miał wpływu w naszym badaniu. Ekspresja CD69 na limfocytach T jest odpowiedzialna za interakcje komórka-komórka z monocytami i makrofagami prowadząc do produkcji IL-1β [187], więc być może u pacjentów z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym, ta interakcja jest wzmożona. W badaniach przeprowadzonych na mysim modelu nadciśnienia indukowanego Ang II, pokazano aktywację limfocytów T. Zaobserwowano między innymi większy odsetek limfocytów wykazujących ekspresję CD69 [108]. U pacjentów cierpiących na przewlekłą chorobę nerek nie zaobserwowano wpływu wysiłku fizycznego na odsetek limfocytów T CD69+, ale 6-miesięczny regularny trening

spowodował obniżenie aktywności limfocytów T przez spadek ekspresji CD69 na limfocytach CD4+CD69+ oraz CD8+CD69+ stymulowanych gronkowcową enterotoksyną B [188]. W naszym badaniu poziom ekspresji CD69 na limfocytach CD4+CD69+ i CDC8+CD69+ był podobny i nie uległ istotnej zmianie w czasie, natomiast najwyższa ekspresja została zaobserwowana na limfocytach DN i wysiłek fizyczny spowodował jej obniżenie do poziomu, który utrzymał się podczas kolejnych wizyt kontrolnych. Cząsteczka CD69 ulega ekspresji na limfocytach T po zaktywowaniu przez komórki dendrytyczne. CD69 poprzez tworzenie kompleksu blokuje receptor $S1P_1$ i dzięki temu doprowadza do zatrzymania limfocytu w węźle na czas potrzeby do pobudzenia proliferacji i różnicowania w komórki efektorowe [81]. Działa jak kostymulator proliferacji na dojrzałych limfocytach [189], więc obniżenie jego ekspresji może świadczyć o wyeliminowaniu lub obniżeniu poziomu antygenu, na który reagują limfocyty DN lub osłabieniu interakcji z monocytami.

Ponadto zaobserwowaliśmy, iż wysiłek fizyczny nie wpłynął na odsetek komórek wykazujących ekspresję markera późnej aktywacji – CD25 w poszczególnych subpopulacjach limfocytów T. Również poziom ekspresji nie uległ zmianie podczas poszczególnych wizyt. Limfocyty T CD4+ charakteryzowały się najwyższym odsetkiem komórek CD25+ oraz najwyższym poziomem jego ekspresji. Jest to ważne, ponieważ komórki CD4+CD25+ wykazujące ekspresję FoxP3 są niewielką subpopulacją limfocytów T CD4+ o działaniu regulatorowym (Treg). Protekcyjne działanie Treg wykazano między innymi u myszy z nadciśnieniem płucnym wywołanym niedotlenieniem poprzez zwiększenie produkcji cytokin przeciwzapalnych [190]. Obniżony poziom Treg zaobserwowano u pacjentek z nadciśnieniem ciążowym przy jednoczesnym podwyższonym poziomie cytokin prozapalnych [191], co również dowodzi ważnej roli limfocytów T CD4+CD25+FoxP3 w rozwoju nadciśnienia. W populacji starszych kobiet prowadzących aktywny tryb życia zaobserwowano wzrost ekspresji CD25 na limfocytach T CD25+ w porównaniu do kobiet niećwiczących [176]. Różnica pomiędzy obserwacjami u starszych kobiet a naszymi wynikami może być spowodowana długością trwania regularnego wysiłku fizycznego. Powyższa praca opiera się na regularnej aktywności fizycznej trwającej przynamniej 15 lat, natomiast w naszym badaniu uczestnicy uczęszczali na sesje treningowe tylko przez 12 tygodni.

Ważnym aspektem w charakterystyce limfocytów T jest ekspresja CD28 na ich powierzchni. Cząsteczka ta jest zaangażowana w przekaz sygnału kostymulującego, koniecznego do aktywacji limfocytów, przez połączenie z obecnymi na powierzchni

komórek APC CD80/CD86 [81]. Zwiększony odsetek limfocytów T CD28null powiązany jest z procesem starzenia się oraz niektórymi chorobami, w których ważną rolę odgrywa zaburzenie funkcji układu odpornościowego, jak np.: zakażenie wirusem HIV [192], przewlekłe choroby nerek [193], reumatoidalne zapalenia stawów [194]. Populacja limfocytów T CD4+CD28null odgrywa istotną rolę w chorobach sercowo-naczyniowych przyczyniając się do niestabilności blaszki miażdżycowej [195].

Wysiłek fizyczny nie wpłynął na odsetek limfocytów T CD28null w żadnej populacji limfocytów T. Odsetek ten był ponad 10-krotnie wyższy w przypadku limfocytów T CD8+ i DN w porównaniu do CD4+. Taka rozbieżność subpopulacji limfocytów T CD4+ i CD8+ w utracie ekspresji CD28 tłumaczy ich odmienna reakcja na starzenie się, prawdopodobnie z powodu odmiennych funkcji tych subpopulacji [196]. Badania przeprowadzone w populacji osób starszych, u których odsetek limfocytów T CD28null wzrasta, wykazały wyższy odsetek tych komórek u osób słabszych, mniej aktywnych fizycznie, w porównaniu do osób bardziej aktywnych [197]. Spielmann i współpracownicy również zaobserwowali niższy poziom odsetka limfocytów T CD28null u mężczyzn w średnim wieku (54±3,6 lata) z wysoką wydolnością fizyczną w porównaniu do mężczyzn z niską wydolnością. Podobnych wyników nie zaobserwowali u młodych mężczyzn (23,4±3 lata) [198]. W naszym badaniu wszyscy pacjenci byli w średnim wieku (47,6±6,6 lat), jednakże wysiłek fizyczny nie wpłynął u nich na poziom limfocytów T CD28null.

Oprócz procesu aktywacji limfocytów T, bardzo ważna jest ich prawidłowa migracja do miejsca zapalenia . Główną rolę odgrywają tu chemokiny. Pośród chemokin biorących udział w patofizjologii nadciśnienia znajduje się między innymi chemokina RANTES i jej receptor CCR5 [199]. Zaobserwowano, iż u szczurów SHR z cukrzycą, podanie leku na cholesterol obniżyło ciśnienie tętnicze oraz poziom RANTES, co może wskazywać na powiązanie nadciśnienia z RANTES/CCR5 [200]. Co więcej, u pacjentów z nadciśnieniem płucnym zaobserwowano podwyższony poziom CCR5 i wykazano, iż aktywacja CCR5 w komórkach mięśniówki gładkiej tętnicy płucnej oraz makrofagach płucnych jest konieczna w rozwoju tego schorzenia [201]. U pacjentów z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym nie zaobserwowano wpływu wysiłku fizycznego na odsetek limfocytów T wykazujących ekspresję CCR5, ani na poziom ekspresji tego receptora w poszczególnych subpopulacjach limfocytów T. Najwyższy odsetek komórek CCR5+ zaobserwowano w subpopulacji limfocytów T DN, natomiast poziom ekspresji był zbliżony we wszystkich subpopulacjach limfocytów T. Jest to zastanawiające,

ponieważ w innym badaniu wykazano obniżenie ekspresji RANTES i CCR5 pod wpływem treningu w tkance tłuszczowej otyłych osób [202]. Może być to spowodowane odmiennym działaniem wysiłku fizycznego na aktywację limfocytów T we krwi i w tkance tłuszczowej.

Udział układu odpornościowego w patogenezie nadciśnienia, polega między innymi na wydzielaniu przez zaktywowane limfocyty T oraz monocyty/makrofagi cytokin, które wpływają na naczynia i funkcje nerek. Zidentyfikowano kilka cytokin, które odgrywają ważną rolę w nadciśnieniu, do których należą: IL-17, IFNγ, TNFα, IL-6, IL-10 [203]. W naszych badaniach postanowiliśmy sprawdzić profil subpopulacji limfocytów T pod względem trzech pierwszych cytokin oraz IL-4, będącej markerem chorób sercowo-naczyniowych [204]. Również w tym przypadku wysiłek fizyczny nie wpłynął na aktywację leukocytów i produkowane przez nie cytokiny. Badania przeprowadzone na grupach pacjentów z niewydolnością serca i przewlekłą obturacyjną chorobą płuc nie osiągnęły jasnych wyników wpływu ostrego wysiłku na poziom IL-6 oraz IFNγ. Przewlekły wysiłek obniża ekspresję receptora TLR, którego aktywacja wpływa na produkcję cytokin takich jak IL-1β, IL-6 i TNFα, przez co moduluje odpowiedź zapalną [205]. W naszych badaniach nie analizowaliśmy ekspresji TLR, natomiast nie zaobserwowaliśmy zmian w produkcji cytokin.

V.2. Charakterystyka monocytów krążących we krwi pacjentów poddanych treningowi.

Dominującą subpopulacją monocytów były monocyty klasyczne stanowiące ok. 81-84% wszystkich monocytów, monocyty pośrednie 8,5-10%, a nieklasyczne 5,5-7% wszystkich monocytów. Jest to w zgodzie z dostępną literaturą [131]. Wysiłek fizyczny nie wpłynął na rozkład poszczególnych subpopulacji. Dostępna literatura wskazuje na 2-3-krotny wzrost odsetka monocytów CD14+ [206] oraz nieklasycznych pod wpływem beztlenowego wysiłku fizycznego [167]. Nie ma jednak danych na temat działania długotrwałego, regularnego wysiłku fizycznego na monocyty u pacjentów z nadciśnieniem lub wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi. U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek nie zaobserwowano wpływu regularnego wysiłku fizycznego na odsetek monocytów [188].

Regularny wysiłek fizyczny nie wywołał zmian w odsetku poszczególnych subpopulacji monocytów, lecz spowodował wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych,

CD11b i CD11c, na ich powierzchni. CD11c jest zaangażowane w rozwój nadciśnienia ciążowego[136], [137], natomiast rola CD11b w nadciśnieniu nie jest do końca jasna. Wiadomo, iż podczas blokowania receptora AT_1 dochodzi do zmniejszenia przylegania monocytów do ścian śródbłonka, przy jednoczesny wzroście ekspresji CD11b [138]. Powyższe zmiany w monocytach pacjentów z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi trudno wyjaśnić, ponieważ nie towarzyszą im zmiany produkcji cytokin pro- i przeciwzapalnych przez monocyty, takich jak IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-10 i TGF-β oraz zmiany ekspresji cząsteczek kostymulujących limfocyty T, takich jak CD40 oraz CD86. Wykazano, że regularny wysiłek fizyczny obniża aktywację monocytów poprzez zmniejszenie ekspresji CD86 na monocytach CD14+ [188]. Obecnie nie ma w literaturze informacji na temat wpływu długofalowego regularnego wysiłku fizycznego na profil poszczególnych subpopulacji monocytów, zarówno u osób z nadciśnieniem tętniczym jak i z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi. Większość badań nad rolą wysiłku fizycznego w regulacji układu odpornościowego skupia się na treningach beztlenowych.

V.3. Charakterystyka innych leukocytów krążących we krwi pacjentów poddanych treningowi.

Aby scharakteryzować dokładniej wpływ wysiłku fizycznego na leukocyty pacjentów z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi, postanowiliśmy zanalizować limfocyty B i komórki NK. W naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy istotnego wpływu regularnego wysiłku fizycznego na odsetek limfocytów B i komórek NK oraz na ekspresję cząsteczek kostymulujących, CD40 oraz CD86, na powierzchni limfocytów B. Dane w literaturze na ten temat są niejasne. Wykazano wzrost odsetka komórek NK, lecz wśród tej populacji spadł odsetek komórek $CD56^{high}$ i komórki NK miały upośledzoną odpowiedź na stymulację IL-2 [207]. Inne badania wskazują na spadek proliferacji limfocytów B oraz hamowanie komórek NK pod wpływem intensywnego wysiłku [208]. W grupie pacjentów cierpiących na przewlekłą chorobę nerek nie wykazano natomiast wpływu zarówno beztlenowego, jak i regularnego wysiłku fizycznego na odsetek limfocytów B i komórek NK [188]. Badania w populacji osób starszych są niejasne. Niektóre z nich wskazują na wzrost aktywności komórek NK pod wpływem długotrwałego regularnego wysiłku fizycznego [170], inne natomiast pokazują brak wpływu regularnych ćwiczeń na ich aktywność [175].

V.4. Poziom osoczowych wykładników stanu zapalnego.

W osoczu wyizolowanym z krwi pacjentów zanalizowane zostały cytokiny pro- i przeciwzapalne w celu oceny ogólnego wpływu wysiłku fizycznego na aktywację układu odpornościowego. Nie zaobserwowano istotnego wpływu w przypadku żadnej z czterech cytokin: IL-1β, IL-6, IL-10 oraz TNFα. Wyniki uzyskane na szczurach spontanicznie rozwijających nadciśnienie, wykazały odmienny efekt. Długotrwały wysiłek fizyczny obniżył poziom cytokin zapalnych IL-1β, IL-6 oraz spowodował wzrost produkcji IL-10 [209]. W badaniach u ludzi również zaobserwowano przeciwzapalny wpływ regularnego wysiłku fizycznego. Po 6 miesiącach regularnych ćwiczeń wykazano tendencję spadkową stężenia IL-6 i tendencję wzrostową stężenia IL-10 oraz spadek stosunku IL-6 do IL-10 [188]. Brak wpływu wysiłku fizycznego na poziom cytokin w naszym badaniu może być spowodowany 2-krotnie krótszym okresem treningowym w porównaniu do powyższego badania oraz różnymi grupami pod względem objawów klinicznych: pacjenci z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym vs pacjenci z przewlekłą chorobą nerek.

V.5. Słabe strony badania

Słabą stroną badania jest mała liczba pacjentów biorących w nim udział. Zebranie dużej grupy badawczej przy takiego typu badaniu jest trudne ze względu na to, że są to tak naprawdę ludzie zdrowi, którzy nie wymagają leczenia, przez co dotarcie do nich jest dużo trudniejsze. Kolejną kwestią jest to, iż w większości, są to osoby aktywne zawodowo, i muszą dostosować terminy treningów do swoich obowiązków zawodowych i rodzinnych. Istotny jest również fakt, że pacjenci, pomimo kryteriów włączenia i wyłączenia, są bardzo heterogenną grupą pod względem pracy, diety, stresu, rzeczywistej aktywności fizycznej (długość czasu spędzona przed telewizorem/komputerem, sposób przemieszczania się do pracy i z powrotem itd.). Wszystkie te czynniki mogą wpływać zarówno na funkcje śródbłonka, stres oksydacyjny jak i układ odpornościowy, przez co pojawiają się duże rozbieżności w wynikach. Przez zastosowanie pomiarów sparowanych zmniejszyliśmy wpływ innych czynników na wyniki w okresie kontrolnym i treningowym, jednakże nie wyeliminowało to heterogenności grupy.

V.6. Podsumowanie

Wyniki naszych badań nie potwierdziły istotnego wpływu wysiłku fizycznego na parametry zapalne w kontekście prewencji nadciśnienia. Zaobserwowane zmiany w ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni monocytów nie korelują z innymi parametrami związanymi z aktywacją układu odpornościowego. Ważną rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego odgrywa stan zapalny toczący się w tkankach okołonaczyniowych. Ochronny wpływ wysiłku fizycznego na funkcje śródbłonka może być wywierany pośrednio przez wpływ na okołonaczyniowy stan zapalny [147]. Ważnym aspektem jest również to, że prawie wszystkie badania z tematyki nadciśnienia przeprowadzane są na zwierzęcych modelach nadciśnienia lub na próbkach pacjentów z nadciśnieniem. Niewiele jest jednak badań, które skupiają się na populacji pacjentów zdrowych z ciśnieniem tętniczym w górnym zakresie normy. Możliwe, że zmiany, które u nich zachodzą, czego skutkiem jest podwyższone ciśnienie, nie obejmują jeszcze istotnych zmian w układzie odpornościowym i wysiłek fizyczny poprawia parametry kliniczne tych osób, działając na inne mechanizmy.

Powyższe badania pokazały niewielki regulujący wpływ wysiłku fizycznego na parametry zapalne osób z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi i nie wskazują iż modulowanie tego mechanizmu, stanowi istotny element poprawy funkcji śródbłonka i obniżenia ciśnienia tętniczego krwi pod wpływem wysiłku fizycznego u osób zagrożonych rozwojem nadciśnienia tętniczego, z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym.

VI. Streszczenie

Nadciśnienie tętnicze stanowi we współczesnej populacji światowej istotny problem medyczny i społeczny. W Polsce dotyczy on 32% populacji w wieku 18-79 i wzrasta wraz z wiekiem sięgając ponad 70% populacji po 80 roku życia. Wysokie prawidłowe ciśnienie, stanowiące stan poprzedzający nadciśnienie występuje u 29% osób w Polsce. Osoby z takim ciśnieniem cechują się większym ryzykiem progresji do utrwalonego nadciśnienia. Głównymi czynnikami ryzyka rozwoju nadciśnienia są otyłość, nieaktywny tryb życia, insulinooporność, stres, dieta bogata w sól, a uboga w źródło potasu i wapnia, nadużywanie alkoholu. Patomechanizm nadciśnienia tętniczego jest skomplikowany i wciąż nie do końca poznany. Poza rzadkimi przypadkami wtórnego nadciśnienia tętniczego, w którym zdiagnozowana jest pierwotna przyczyna jego rozwoju, przyczyny pierwotnego nadciśnienia tętniczego nie są znane. Przyjmuje się, że główne komponenty patofizjologii nadciśnienia tętniczego to: dysfunkcja śródbłonka, zaburzenie pracy nerek, zaburzenie w sygnalizacji ośrodkowego układu nerwowego, stres oksydacyjny i stan zapalny w obrębie narządów docelowych (nerek, naczyń krwionośnych). Kluczowym elementem jest dysfunkcja śródbłonka, na którą największy wpływ wywierają stres oksydacyjny i stan zapalny.

W ostatnich latach wykazano, że stan zapalny, uznawany wcześniej za następstwo nadciśnienia tętniczego, jest czynnikiem, który przyczynia się do jego progresji. Zaobserwowano również, że regularny wysiłek fizyczny o średniej intensywności poprawia funkcje śródbłonka i obniża ciśnienie tętnicze krwi. Może to być skuteczna terapia leczenia lub prewencji nadciśnienia tętniczego, szczególnie w grupie ryzyka, do jakiej należą osoby z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi. Nie są znane dokładne mechanizmy, na drodze których wysiłek fizyczny wywiera korzystny wpływ na układ krążenia i funkcje śródbłonka.

Celem projektu było poznanie jaki jest wpływ regularnego wysiłku fizycznego na charakterystykę leukocytów krwi obwodowej u osób z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym.

Ze względu na szeroko udokumentowaną rolę limfocytów T w rozwoju nadciśnienia, w prezentowanej pracy skupiono się przede wszystkim na charakterystyce tej populacji oraz populacji monocytów.

Do badania zrekrutowano 26 pacjentów w wieku 30-55 lat z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi w spoczynku (ciśnienie skurczowe 130-139 mm

Hg i/lub rozkurczowe 85-89 mm Hg). Z badania wykluczone zostały osoby cierpiące na schorzenia lub przyjmujące leki, które mogą wpływać na funkcje śródbłonka i układ odpornościowy. Osoby zakwalifikowane do badania poddane zostały 3-miesięcznemu treningowi na cyklometrach rowerowych. Zajęcia odbywały się 3 razy w tygodniu. Każda sesja trwała około 40-60 min i składała się z rozgrzewki, ćwiczeń właściwych i ćwiczeń uspokajających. Około 10 miesięcy po zakończeniu okresu treningowego, pacjenci zostali poproszeni o przystąpienie do okresu kontrolnego, w którym prowadzili normalny tryb życia, bez regularnego, kontrolowanego wysiłku fizycznego. Przed każdym okresem (treningowym i kontrolnym) oraz po ich zakończeniu pobrane zostały próbki krwi. Z krwi izolowano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej i analizowano je za pomocą cytometrii przepływowej. Ocenie poddano podstawowe subpopulacje limfocytów T, markery aktywacji oraz ich zdolność do produkcji cytokin. Zbadano również wpływ wysiłku fizycznego na subpopulacje monocytów, ekspresję cząsteczek adhezji i produkcję cytokin (metodą Luminex).

Wyniki wskazują, iż 3-miesięczny, regularny wysiłek fizyczny nie wpłynął na skład podstawowych subpopulacji limfocytów T, monocytów, limfocytów B i komórek NK. Nie zaobserwowano zmian w ekspresji markerów aktywacji na powierzchni limfocytów T CD4+ oraz CD8+. Wysiłek fizyczny spowodował spadek ekspresji markera wczesnej aktywacji w populacji limfocytów T podwójnie ujemnych, w okresie kontrolnym: 606,88±259,09 vs 646,25±250,99; pod wpływem treningu 843,13±426,52 vs 648,50±231,23; p=0,035. Trening nie wpłynął na zdolność limfocytów T do produkcji cytokin. We wszystkich subpopulacjach monocytów zaobserwowano wzrost ekspresji markerów adhezji CD11 b i CD11c. Dla monocytów klasycznych CD14high CD16- CD11b+ wartości dla okresu kontrolnego: 2170,20±1222,17 vs 2072,30±1658,15; pod wpływem treningu: 3686,70±2921,07 vs 5336,30±4362,93; p=0,015. Dla subpopulacji monocytów CD14high CD16+ CD11b+ wyniki wynosiły, dla okresu kontrolnego: 2340,20±1330,30 vs 2139,20±1636,08; pod wpływem treningu: 3856,70±3004,80 vs 5303,65±4200,77; p=0,008. Dla subpopulacji monocytów CD14dim CD16+ CD11b+ wartości wynosiły, dla okresu kontrolnego: 1111,95±706,57 vs 1073,30±757,87; pod wpływem treningu: 1444,35±1084,01 vs 1897,25±1486,34; p=0,035. W przypadku ekspresji markera CD11c wartości dla subpopulacji CD14high CD16- CD11c+ wynosiły, w okresie kontrolnym: 994,12±266,98 vs 921,54±497,28; pod wpływem treningu: 1396,77±633,52 vs 2119,89±1444,01; p=0,035. Dla subpopulacji monocytów CD14high CD16+ CD11c+ wartości wynosiły, dla okresu kontrolnego: 2514,19±822,29 vs

2353,89±1381,04; pod wpływem treningu: 3204,39±1079,12 vs 4847,54±2691,37; p=0,035. Ekspresja markera była najwyższa dla subpopulacji CD14dim CD16+ CD11c+ i wynosiła, dla okresu kontrolnego: 3239,58±1135,25 vs 3119,19±1672,74; pod wpływem treningu: 3754,35±1438,61 vs 5835,19±3559,47; p=0,051. Nie zaobserwowano wpływu wysiłku fizycznego na produkcję cytokin przez monocyty oraz na poziom osoczowych markerów stanu zapalnego.

Wnioski: Regularny wysiłek fizyczny nie wykazuje istotnego wpływu na badane parametry układu odpornościowego u osób z wysokim prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi.

Abstract

Hypertension is in the contemporary world's population, important medical and social problem. In Poland, it relates to 32% of the population aged 18-79 and increases with age, reaching 70% of the population over 80 years of age. Prehypertension, occurs in 29% of people in Poland. People with such level of blood pressure are characterized by a greater risk of progression to hypertension. The main risk factors for hypertension include obesity, inactive lifestyle, insulin resistance, stress, diet high in salt and low in potassium and calcium source, alcohol abuse. Pathomechanism of hypertension is complex and still not fully understood. Except in rare cases of secondary hypertension, which is diagnosed with primary cause of its development, the cause of essential hypertension is not known. It is assumed that the main components of the pathophysiology of hypertension is: endothelial dysfunction, impaired renal functions, impaired signaling in the central nervous system, oxidative stress and inflammation of the target organs (kidneys, blood vessels). A key element is endothelial dysfunction, on which oxidative stress and inflammation exert the greatest impact.

In recent years it has been shown that inflammation, previously regarded as a consequence of hypertension, is a factor which contributes to its progression. It was also observed that regular moderate physical activity improves endothelial function and reduces blood pressure. This may be an effective therapy for treating or preventing hypertension, especially in high risk group that includes prehypertensive patients. Possible mechanisms by which the exercise has a positive effect on the cardiovascular system and endothelial function are not fully understood.

The aim of this project was to find out what is the impact of regular exercise on the characteristics of peripheral blood leukocytes in prehypertensive subjects.

Due to the widely documented role of T cells in the development of hypertension, in the present study we focused mostly on the characteristics of that population and the populations of monocytes.

To this study we recruited 26 patients, prehypertensive at rest (systolic blood pressure 130-139 mmHg and / or diastolic 85-89 mm Hg), aged 30-55 years. We excluded those suffering from diseases or taking medication that may affect the endothelial function and the immune system. Patients eligible for the study were subjected to the 3-month training on cyclometers. Classes were held 3 times a week. Each session lasted about 40-60 minutes and consisted of warm-up, main exercises and calm-down exercises. About 10 months after the end of the training period, patients were asked to join the control period, in which they led a normal life, without regular, supervised exercise. Before each period (training and control) and after their completion blood samples were collected. Peripheral blood mononuclear cells were isolated and analyzed by flow cytometry. We evaluated the basic subpopulations of T cell, activation markers and their ability to produce cytokines. Influence of physical exercise on subsets of monocytes, the expression of adhesion molecules and cytokine production (by Luminex) was also examined.

This results indicate that three months, regular exercise did not affect the basic subpopulation of T cells, monocytes, B cells and NK cells. There were no changes in the expression of activation markers on the surface of CD4 + and CD8 + T lymphocytes. Physical activity caused a decline in expression of the early activation marker in a population of double negative T cells, in the control period: 606.88 ± 259.09 vs 646.25 ± 250.99; under the influence of a workout 843.13 ± 426.52 vs 648.50 ± 231.23; $p = 0.035$. Training did not affect the ability of T cells to produce cytokines. In all subpopulations of monocytes we showed an increase in expression of markers of monocyte adhesion CD11b and CD11c. Classical monocyte CD14high CD16- CD11b+ values for the control period were: 2170.20 ± 1222.17 vs 2072.30 ± 1658.15; under the influence of training: 3686.70 ± 2921.07 vs 5336.30 ± 4362.93; $p = 0.015$. For the subpopulation of CD16 + CD14high CD11b + monocytes the results were, for the control period: 2340.20 ± 1330.30 vs 2139.20 ± 1636.08; under the influence of training: 3856.70 ± 3004.80 vs 5303.65 ± 4200.77; $p = 0.008$. For the subpopulation of CD16 + CD14dim CD11b + monocytes values were, for the control period: 1111.95 ± 706.57 vs 1073.30 ± 757.87; under the influence of training: 1444.35 ± 1084.01 vs 1897.25 ± 1486.34; $p = 0.035$. When comparing the expression of CD11c we observed: for subpopulation of CD16-

CD14high CD11c+, in the control period: 994.12 ± 266.98 vs 921.54 ± 497.28; under the influence of training: 1396.77 ± 633.52 vs 2119.89 ± 1444.01; p = 0.035. For the subpopulation of CD16 + CD14high CD11c + values were, for the control period: 2514.19 ± 822.29 vs 2353.89 ± 1381.04; under the influence of training: 3204.39 ± 1079.12 vs 4847.54 ± 2691.37; p = 0.035. Expression of CD11c was the highest for CD14dim CD16 + CD11c + subpopulation and was, for the control period: 3239.58 ± 1135.25 vs 3119.19 ± 1672.74; under the influence of training: 3754.35 ± 1438.61 vs 5835.19 ± 3559.47; p = 0.051. There was no effect of physical exercise on cytokine production by monocytes and plasma levels of inflammatory markers. Conclusion: Regular physical activity does not have a significant modulatory effect on immune function in prehypertensive patients.

VII. Spis skrótów

ADMA – asymetryczna dimetyloarginina
Ang. – język angielski
Ang II – angiotensyna II
APC – komórki prezentujące antygen
ATP – Adenozyno-5′-trifosforan
AT_1R – receptor angiotensyny II typ-1
AT_1-AAs – przeciwciała agonistyczne do receptora AT_1
BH2 – dihydrobiopteryna
BH4 – tetrahydrobiopteryna
BMI – wskaźnik masy ciała
cGMP – cykliczny guanozyno -3',5'- monofosforan
CRP- białko C reaktywne
CCR5 – receptor C-C chemokin typu 5
CD – kompleks różnicowania
DASH – Dieta wskazana w prewencji i leczeniu nadciśnienia
DN – limfocyt T podwójnie ujemny (CD4-CD8-)
EDRF –śródbłonkowe czynniki rozszerzające naczynia
EDCF –, śródbłonkowe czynniki zwężające naczynia
ESH – ESC – European Society of Hypertension – European Society of Cardiology
FBS – fetal bovine serum
FMO – barwienie bez przeciwciała, dla którego chcemy wyznaczyć punkt odcięcia
GPx – peroksydaza glutationowa
GSH – glutation
GWAS – całościowe badanie genomu w celu identyfikacji polimorfizmów
H_2O_2 – nadtlenek wodoru
ICA IMT – grubość kompleksu intima-media w tętnicach szyjnych wewnętrznych
ICAM−1,VCAM−1- cząsteczki adhezyjne na powierzchnie śródbłonka
IL – interleukina
IFN – interferon
LDL – lipoproteina niskiej gęstości
LPS – lipopolisacharyd
MHC – główny układ zgodności tkankowej
MFI – średnia intensywność fluorescencji
NADPH – zredukowana forma fosforanu dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego
NK, komórki – komórki układu odporności, tzw. naturalni zabójcy NO – tlenek azotu
NOS –syntaza tlenku azotu
NOX – oksydaza NADPH
NS – nieistotne statystycznie
NT – nadciśnienie tętnicze
$O_2^{\circ-}$ - anionorodnik ponadtlenkowy
$^{\circ}OH$ – anionorodnik hydroksylowy
$ONOO^{\circ}$ - nadtlenoazotyn
OUN – ośrodkowy układ nerwowy
PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

RANTES – chemokina sytenetyzowana przez limfocyty T
RNS – reaktywne formy azotu
ROS –Reaktywne formy tleny
SOD – dysmutaza ponadtlenkowa
TCR – receptor limfocytu T
Th – limfocyt T pomocniczy
TLR – Toll-like receptor
TNF – czynnik martwicy nowotworów
Treg – limfocyt T regulatorowy
S1P1 – sfingozyno-1-fosforan
WT – mysz dzika
vs – kontra

VIII. Spis rycin

Rycina 1. Schemat przedstawiający zachwianie równowagi związków powodujących rozkurcz oraz skurcz naczynia w wyniku dysfunkcji śródbłonka.

Rycina 2. Schemat przedstawiający plan badania. Wizyty 1 oraz 2 odpowiadają okresowi aktywności fizycznej, natomiast wizyty 3 i 4 okresowi kontrolnemu, czyli takiemu, w którym pacjenci prowadzą styl życia sprzed rozpoczęcia badania.

Rycina 3. Strategia bramkowania w analizie limfocytów T z krwi obwodowej (A). Strategia bramkowania komórek CD69+, CD25+, CD28null oraz CCR5 na limfocytach T CD4+, CD8+ oraz DN (CD3+CD4-CD8-) wyizolowanych z krwi obwodowej. Punkty odcięcia wyznaczono metodą FMO (B).

Rycina 4. Strategia bramkowania w analizie monocytów wyizolowanych z krwi obwodowej (A). Strategia bramkowania komórek CD11b + oraz CD11c+ na monocytach CD14high, CD14CD16 oraz CD14dimCD16 wyizolowanych z krwi obwodowej. Punkty odcięcia wyznaczone metodą FMO (B).

Rycina 5. Strategia bramkowania populacji monocytów, limfocytów B, lifocytów T oraz komórek NK wyizolowanych z krwi obwodowej (A). Strategia bramkowania markerów CD40 oraz CD86 na monocytach, limfocytach B, limfocytach T oraz komórkach NK. Punkty odcięcia wyznaczone metodą FMO (B).

Rycina 6. Strategia bramkowania sobpopulacji limfocytów T produkujących IL-17, IFNγ, IL-4 oraz TNFα. Punkty odcięcia wyznaczone na podstawie kontroli izotypowej (IgG1K PE/IgG1K FITC).

Rycina 7. Wykres przedstawiający procentowy rozkład średnich wartości (±SD) poszczególnych subpopulacji limfocytów T, CD4+, CD8+ oraz CD3+CD4-CD8-, n=26, NS.

Rycina 8. Wykresy przedstawiające procentowy rozkład średnich wartości rozkładu podtypów receptorów TCRαβ oraz TCRγδ na poszczególnych subpopulacjach limfocytów T, CD4+ (A., NS), CD8+ (B., NS) oraz CD4-CD8- (C.), n=26. Dla limfocytów CD4-CD8- zaobserwowana została istotna interakcja trening*kontrola dla receptora TCRγδ, p=0,035.

Rycina 9. Wykresy przedstawiające subpopulacje limfocytów T. Dla limfocytów T CD4+ (A.), CD8+ (B.) oraz CD3+CD4-CD8- (C.) wyznaczone zostały subpopulacje komórek naiwnych, pamięci, efektorowych oraz CD45RA efektorowych, natomiast dla całej populacji limfocytów T (D.) wyznaczone zostały subpopulacje limfocytów naiwnych oraz pamięci, n=26, NS.

Rycina 10. Odsetek limfocytów CD4+CD69+, CD8+CD69+ oraz CD3+CD4-CD8-CD69+ (A) wyizolowanych z krwi pacjentów podczas kolejnych wizyt (NS) oraz Mean Fluorescence Intensity (MFI) dla tych subpopulacji limfocytów. Dla CD4+CD69+ oraz CD8+CD69+, NS, dla CD3+CD4-CD8-CD69+, p=0,035 (B).

Rycina 11. Odsetek limfocytów CD4+CD25+, CD8+CD25+ oraz CD3+CD4-CD8-CD25+ (A) wyizolowanych z krwi pacjentów podczas kolejnych wizyt oraz

Mean Fluorescence Intensity (MFI) dla tych subpopulacji limfocytów (B), n=24, NS.
Rycina 12. Odsetek limfocytów CD4+CD28null, CD8+CD28null oraz CD3+CD4-CD8-CD28null wyizolowanych z krwi obwodowej, n=24, NS.
Rycina 13. Odsetek limfocytów CD4+CCR5+, CD8+CCR5+ oraz CD3+CD4-CD8-CCR5+ (A) wyizolowanych z krwi pacjentów podczas kolejnych wizyt oraz Mean Fluorescence Intensity (MFI) dla tych subpopulacji limfocytów (B), n=26, NS
Rycina 14. Odsetek limfocytów T (± odchylenie standardowe) zdolnych do produkcji poszczególnych cytokin, IL-4, IL-17, TNF-α oraz IFN-γ, n=26, NS.
Rycina 15. Wykres przedstawiający procentowy rozkład średnich wartości (±SD) poszczególnych subpopulacji monocytów, CD14high CD16-, CD14high CD16+, CD14dim CD16+, n=26, NS.
Rycina 16. Ekspresja markerów adhezji na monocytach wyrażona jako MFI ± odchylenie standardowe. Ekspresja CD11b (A) na monocytach CD14high CD16- CD11b+, p=0,015; CD14high CD16+ CD11b+, p= 0,008; CD14dim CD16+ CD11b+, p=0,035, n=20. Ekspresja markera CD11c (B) na monocytach CD14high CD16- CD11c+, p=0,035; CD14high CD16+ CD11c+, p=0,035; CD14dim CD16+ CD11c+, p=0,051, n=26.
Rycina 17. Ekspresja białek kostymulujących, CD40 i CD86 na monocytach. MFI ± odchylenie standardowe, n=14, NS.
Rycina 18. Produkcja cytokin przeciw- oraz prozapalnych przez monocyty po stymulacji LPS. Stężenie IL-10, IL-1β, IL-6 oraz TNF-α po odjęciu produkcji podstawowej wszystkich komórek PBMC, n=12 (A) oraz produkcja TGF-β podstawowa wszystkich PBMC oraz monocytów po stymulacji LPS (B), n=10, NS.
Rycina 19. Odestek limfocytów B z PBMC oraz komórek NK z populacji komórek CD19-CD3-, n=14, NS.
Rycina 20. Średnia procentowa wartość ± odchylenie standardowe limfocytów B wykazujących ekspresję cząsteczek kostymulujących, CD40 oraz CD86 (A). Poziom ekspresji CD40 oraz CD86 na limfocytach B wyrażone jako MFI ± odchylenie standardowe, n=14, NS.

IX. Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja oraz definicja poziomów ciśnienia krwi wg ESH-ESC z 2013 roku [8].
Tabela 2. Charakterystyka kliniczna pacjentów zrekrutowanych do badania.
Tabela 3. Rozkład subpopulacji limfocytów T pod względem dojrzałości i zróżnicowania, n=26, NS.
Tabela 4. Średnia wartość procentowa subpopulacji limfocytów T (± odchylenie standardowe) zdolnych do produkcji poszczególnych cytokin, IL-4, IL-17, TNF-α oraz IFN-γ, n=26, NS.
Tabela 5. Ekspresja markerów adhezji w poszczególnych subpopulacjach mnocytów, CD14high CD16, CD14high CD16+, CD14dim CD16+, n=26, NS.
Tabela 6. Średnia procentowa wartość ekspresji białek kostymulujących (± odchylenie standardowe), CD40 oraz CD86 na monocytach, n=14, NS.
Tabela 7. Stężenia cytokin IL-10, IL-1β, IL-6 oraz TNF-α w osoczu pacjentów podczas poszczególnych wizyt, n=13, NS.

X. Literatura

[1] "Jaki jest stan zdrowia Polakow-wedlug NATPOL 2011," *www.termedia.pl*, Sep. 2011.

[2] A. Paczkowska, W. Bryl, K. Hoffmann, E. Nowakowska, D. Koligat, K. Kus, T. Zaprutko, and P. Ratajczak, "Analiza kosztów leczenia nadciśnienia tętniczego w Polsce.," *Now. Lek.*, vol. 81, no. 2, pp. 145–151, 2012.

[3] "Jak obniżyć ciśnienie tętnicze." Oficajlny Serwis Polsiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego, www.nadcisnienietetnicze.pl.

[4] Ł. Klima, K. Kawecka-Jaszcz, K. Stolarz-Skrzypek, J. Menne, K. Fijorek, A. Olszanecka, W. Wojciechowska, G. Bilo, and D. Czarnecka, "Structure and function of large arteries in hypertension in relation to oxidative stress markers," *Kardiol. Pol.*, vol. 71, no. 9, pp. 917–923, 2013.

[5] T. Huan, T. Esko, M. J. Peters, L. C. Pilling, K. Schramm, C. Schurmann, B. H. Chen, C. Liu, R. Joehanes, A. D. Johnson, C. Yao, S. Ying, P. Courchesne, L. Milani, N. Raghavachari, R. Wang, P. Liu, E. Reinmaa, A. Dehghan, A. Hofman, A. G. Uitterlinden, D. G. Hernandez, S. Bandinelli, A. Singleton, D. Melzer, A. Metspalu, M. Carstensen, H. Grallert, C. Herder, T. Meitinger, A. Peters, M. Roden, M. Waldenberger, M. Dörr, S. B. Felix, T. Zeller, R. Vasan, C. J. O'Donnell, P. J. Munson, X. Yang, H. Prokisch, U. Völker, J. B. J. van Meurs, L. Ferrucci, D. Levy, and International Consortium for Blood Pressure GWAS (ICBP), "A Meta-analysis of Gene Expression Signatures of Blood Pressure and Hypertension," *PLoS Genet*, vol. 11, no. 3, p. e1005035, Mar. 2015.

[6] L. Bryniarski, K. Kawecka-Jaszcz, B. Bacior, J. Grodecki, and M. Rajzer, "Effect of exercise rehabilitation on heart rate variability in hypertensives after myocardial infarction," *J. Hypertens.*, vol. 15, no. 12 Pt 2, pp. 1739–1743, Dec. 1997.

[7] D. T. Beck, J. S. Martin, D. P. Casey, and R. W. Braith, "Exercise training improves endothelial function in resistance arteries of young prehypertensives," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 28, no. 5, pp. 303–309, May 2014.

[8] G. Parati, M. Di Rienzo, L. Ulian, C. Santucciu, A. Girard, J. L. Elghozi, and G. Mancia, "Clinical relevance blood pressure variability," *J. Hypertens. Suppl. Off. J. Int. Soc. Hypertens.*, vol. 16, no. 3, pp. S25–33, Aug. 1998.

[9] G. Mancia, R. Fagard, K. Narkiewicz, J. Redón, A. Zanchetti, M. Böhm, T. Christiaens, R. Cifkova, G. De Backer, A. Dominiczak, M. Galderisi, D. E. Grobbee, T. Jaarsma, P. Kirchhof, S. E. Kjeldsen, S. Laurent, A. J. Manolis, P. M. Nilsson, L. M. Ruilope, R. E. Schmieder, P. A. Sirnes, P. Sleight, M. Viigimaa, B. Waeber, F. Zannad, and Task Force Members, "2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)," *J. Hypertens.*, vol. 31, no. 7, pp. 1281–1357, Jul. 2013.

[10] O. A. Carretero and S. Oparil, "Essential Hypertension Part I: Definition and Etiology," *Circulation*, vol. 101, no. 3, pp. 329–335, Jan. 2000.

[11] Grupa Polpharma, "Profilaktyka nadciśnienia oraz zdrowego trybu życia dla serca wśród Polaków," stycze-2014.

[12] S. Rywik, "Epidemiologia nadciśnienia tętniczego," *Przew. Lek.*, vol. 12, no. 4, pp. 54–57, 2001.

[13] P. K. Whelton, "Primary Prevention of Hypertension<SUBTITLE>Clinical and Public Health Advisory From the National High Blood Pressure Education Program</SUBTITLE>," *JAMA*, vol. 288, no. 15, p. 1882, Oct. 2002.

[14] L. L. Hardy, E. Denney-Wilson, A. P. Thrift, A. D. Okely, and L. A. Baur, "Screen Time and Metabolic Risk Factors Among Adolescents," *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, vol. 164, no. 7, Jul. 2010.

[15] R. W. Jakes, N. E. Day, K.-T. Khaw, R. Luben, S. Oakes, A. Welch, S. Bingham, and N. J. Wareham, "Television viewing and low participation in vigorous recreation are

independently associated with obesity and markers of cardiovascular disease risk: EPIC-Norfolk population-based study," *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 57, no. 9, pp. 1089–1096, 2003.
[16] R. N. Larsen, B. A. Kingwell, P. Sethi, E. Cerin, N. Owen, and D. W. Dunstan, "Breaking up prolonged sitting reduces resting blood pressure in overweight/obese adults," *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 24, no. 9, pp. 976–982, Sep. 2014.
[17] C. Faselis, M. Doumas, A. Pittaras, P. Narayan, J. Myers, A. Tsimploulis, and P. Kokkinos, "Exercise capacity and all-cause mortality in male veterans with hypertension aged ≥70 years," *Hypertension*, vol. 64, no. 1, pp. 30–35, Jul. 2014.
[18] G. Fuchsjäger-Mayrl, J. Pleiner, G. F. Wiesinger, A. E. Sieder, M. Quittan, M. J. Nuhr, C. Francesconi, H.-P. Seit, M. Francesconi, L. Schmetterer, and M. Wolzt, "Exercise Training Improves Vascular Endothelial Function in Patients with Type 1 Diabetes," *Diabetes Care*, vol. 25, no. 10, pp. 1795–1801, Oct. 2002.
[19] S. John and R. E. Schmieder, "Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences," *J. Hypertens.*, vol. 18, no. 4, pp. 363–374, Apr. 2000.
[20] L. A. B. Leoni, A. R. Fukushima, L. Y. Rocha, L. B. M. M. Maifrino, and B. Rodrigues, "Physical activity on endothelial and erectile dysfunction: a literature review," *Aging Male*, vol. 17, no. 3, pp. 125–130, Wrzesie 2014.
[21] Y.-Y. Lin, S.-D. Lee, C.-T. Su, T.-L. Cheng, and A.-L. Yang, "Long-term treadmill training ameliorates endothelium-dependent vasorelaxation mediated by insulin and insulin-like growth factor-1 in hypertension," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 119, no. 6, pp. 663–669, Sep. 2015.
[22] A. Menotti, P. E. Puddu, G. Maiani, and G. Catasta, "Lifestyle behaviour and lifetime incidence of heart diseases," *Int. J. Cardiol.*, vol. 201, pp. 293–299, Dec. 2015.
[23] F. W. Ashley and W. B. Kannel, "Relation of weight change to changes in atherogenic traits: the Framingham Study," *J. Chronic Dis.*, vol. 27, no. 3, pp. 103–114, Mar. 1974.
[24] B. Wizner, K. Stolarz, A. Adamkiewicz-Piejko, J. Życzkowska, K. Kawecka-Jaszcz, and T. Grodzicki, "Wpływ interakcji wskaźników antropometrycznych i palenia tytoniu na ciśnienie tętnicze krwi w 24-godzinnej rejestracji," *Arter. Hypertens.*, vol. 6, no. 3, pp. 179–186, 2002.
[25] L. Szczepaniak-Chicheł, M. Mastej, J. Jóźwiak, W. Lukas, W. Piwowarska, E. Konduracka, A. Rutz-Danielczak, and A. Tykarski, "Występowanie nadciśnienia tętniczego w zależności od masy ciała w populacji polskiej - badanie LIPIDOGRAM 2004," *Arter. Hypertens.*, vol. 11, no. 3, pp. 195–204, 2007.
[26] P. Poirier, T. D. Giles, G. A. Bray, Y. Hong, J. S. Stern, F. X. Pi-Sunyer, and R. H. Eckel, "Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss An Update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease From the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism," *Circulation*, vol. 113, no. 6, pp. 898–918, Feb. 2006.
[27] E. Reisin, R. Abel, M. Modan, D. S. Silverberg, H. E. Eliahou, and B. Modan, "Effect of weight loss without salt restriction on the reduction of blood pressure in overweight hypertensive patients," *N. Engl. J. Med.*, vol. 298, no. 1, pp. 1–6, Jan. 1978.
[28] R. A. DeFronzo, C. R. Cooke, R. Andres, G. R. Faloona, and P. J. Davis, "The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man.," *J. Clin. Invest.*, vol. 55, no. 4, pp. 845–855, Apr. 1975.
[29] R. O. Gans, L. vd Toorn, H. J. Bilo, J. J. Nauta, R. J. Heine, and A. J. Donker, "Renal and cardiovascular effects of exogenous insulin in healthy volunteers," *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, vol. 80, no. 3, pp. 219–225, Mar. 1991.
[30] A. K. Gupta, R. V. Clark, and K. A. Kirchner, "Effects of insulin on renal sodium excretion," *Hypertension*, vol. 19, no. 1 Suppl, pp. I78–82, Jan. 1992.
[31] L. Landsberg, "Hyperinsulinemia: possible role in obesity-induced hypertension," *Hypertension*, vol. 19, no. 1 Suppl, pp. I61–66, Jan. 1992.
[32] R. W. Stout, E. L. Bierman, and R. Ross, "Effect of insulin on the proliferation of cultured primate arterial smooth muscle cells.," *Circ. Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 319–327, Feb. 1975.

[33] M. Modan, H. Halkin, S. Almog, A. Lusky, A. Eshkol, M. Shefi, A. Shitrit, and Z. Fuchs, "Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance," *J. Clin. Invest.*, vol. 75, no. 3, pp. 809–817, Mar. 1985.
[34] E. Ferrannini, G. Buzzigoli, R. Bonadonna, M. A. Giorico, M. Oleggini, L. Graziadei, R. Pedrinelli, L. Brandi, and S. Bevilacqua, "Insulin resistance in essential hypertension," *N. Engl. J. Med.*, vol. 317, no. 6, pp. 350–357, Aug. 1987.
[35] E. Ferrannini, S. M. Haffner, and M. P. Stern, "Essential hypertension: an insulin-resistant state," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 15 Suppl 5, pp. S18–25, 1990.
[36] B. Falkner, S. Hulman, and H. Kushner, "Insulin-stimulated glucose utilization and borderline hypertension in young adult blacks.," *Hypertension*, vol. 22, no. 1, pp. 18–25, Jul. 1993.
[37] J. Steinberger and S. R. Daniels, "Obesity, Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Children An American Heart Association Scientific Statement From the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and the Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism)," *Circulation*, vol. 107, no. 10, pp. 1448–1453, Mar. 2003.
[38] P. Nilsson, L. Lindholm, and B. Scherstén, "Hyperinsulinaemia and other metabolic disturbances in well-controlled hypertensive men and women: an epidemiological study of the Dalby population," *J. Hypertens.*, vol. 8, no. 10, pp. 953–959, Oct. 1990.
[39] R. A. DeFronzo and E. Ferrannini, "Insulin Resistance: A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease," *Diabetes Care*, vol. 14, no. 3, pp. 173–194, Mar. 1991.
[40] R. Stamler, J. Stamler, W. F. Riedlinger, G. Algera, and R. H. Roberts, "Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans," *JAMA*, vol. 240, no. 15, pp. 1607–1610, Oct. 1978.
[41] S. Macmohan, J. Cutler, E. Brittain, and M. Higgins, "Obesity and hypertension: epidemiological and clinical issues," *Eur. Heart J.*, vol. 8, no. suppl B, pp. 57–70, May 1987.
[42] A. R. Dyer and P. Elliott, "The INTERSALT study: relations of body mass index to blood pressure. INTERSALT Co-operative Research Group," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 3, no. 5, pp. 299–308, Oct. 1989.
[43] F. J. He, J. Li, and G. A. MacGregor, "Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials," *The BMJ*, vol. 346, p. f1325, Apr. 2013.
[44] K.-T. Khaw, S. Bingham, A. Welch, R. Luben, E. O'Brien, N. Wareham, and N. Day, "Blood pressure and urinary sodium in men and women: the Norfolk Cohort of the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC-Norfolk)," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 80, no. 5, pp. 1397–1403, Nov. 2004.
[45] V. Perez and E. T. Chang, "Sodium-to-Potassium Ratio and Blood Pressure, Hypertension, and Related Factors," *Adv. Nutr. Int. Rev. J.*, vol. 5, no. 6, pp. 712–741, Nov. 2014.
[46] C. A. Nowson and T. O. Morgan, "Change in blood pressure in relation to change in nutrients effected by manipulation of dietary sodium and potassium," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 15, no. 3, pp. 225–242, Mar. 1988.
[47] F. M. Sacks, L. P. Svetkey, W. M. Vollmer, L. J. Appel, G. A. Bray, D. Harsha, E. Obarzanek, P. R. Conlin, E. R. Miller, D. G. Simons-Morton, N. Karanja, P. H. Lin, and DASH-Sodium Collaborative Research Group, "Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group," *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, no. 1, pp. 3–10, Jan. 2001.
[48] G. Cormick, A. Ciapponi, M. L. Cafferata, and J. M. Belizán, "Calcium supplementation for prevention of primary hypertension," in *Cochrane Database of Systematic Reviews*, The Cochrane Collaboration, Ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

[49] N. J. Aburto, S. Hanson, H. Gutierrez, L. Hooper, P. Elliott, and F. P. Cappuccio, “Effect of increased potassium intake on cardiovascular risk factors and disease: systematic review and meta-analyses,” *The BMJ*, vol. 346, p. f1378, Apr. 2013.
[50] A. Tresserra-Rimbau, A. Medina-Remón, R. M. Lamuela-Raventós, M. Bulló, J. Salas-Salvadó, D. Corella, M. Fitó, A. Gea, E. Gómez-Gracia, J. Lapetra, F. Arós, M. Fiol, E. Ros, L. Serra-Majem, X. Pintó, M. A. Muñoz, R. Estruch, and on behalf of the PREDIMED Study Investigators, “Moderate red wine consumption is associated with a lower prevalence of the metabolic syndrome in the PREDIMED population,” *Br. J. Nutr.*, vol. 113, no. S2, pp. S121–S130, Apr. 2015.
[51] P. D. Arkwright, L. J. Beilin, I. Rouse, B. K. Armstrong, and R. Vandongen, “Effects of alcohol use and other aspects of lifestyle on blood pressure levels and prevalence of hypertension in a working population.,” *Circulation*, vol. 66, no. 1, pp. 60–66, Jul. 1982.
[52] T. A. Mori, V. Burke, L. J. Beilin, and I. B. Puddey, “Randomized Controlled Intervention of the Effects of Alcohol on Blood Pressure in Premenopausal Women,” *Hypertension*, p. HYPERTENSIONAHA.115.05773, Jun. 2015.
[53] A. L. Klatsky, G. D. Friedman, A. B. Siegelaub, and M. J. Gerard, “Alcohol consumption and blood pressure Kaiser-Permanente Multiphasic Health Examination data.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 296, no. 21, pp. 1194–200, May 1977.
[54] Z. Sun, “Aging, Arterial Stiffness, and Hypertension,” *Hypertension*, vol. 65, no. 2, pp. 252–256, Feb. 2015.
[55] I. Gorczyca-Michta and B. Wożakowska-Kapłon, “Leczenie nadciśnienia tętniczego u osób w podeszłym wieku,” *Folia Cardiol.*, vol. 4, no. 5, pp. 279–284, 2009.
[56] T. Zdrojewski, P. Bandosz, P. Szpakowski, R. Konarski, A. Maniakowski, E. Wołkiewicz, Z. Jakubowski, W. Łysiak-Szydłowska, S. Bautembach, and B. Wyrzykowski, “Rozpowszechnienie głównych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego w Polsce. Wyniki badania NATPOL Plus.,” *Kardiol. Pol.*, vol. 61, no. supl. 4, pp. 1–26.
[57] K. L. Ong, B. M. Y. Cheung, Y. B. Man, C. P. Lau, and K. S. L. Lam, “Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension Among United States Adults 1999–2004,” *Hypertension*, vol. 49, no. 1, pp. 69–75, Jan. 2007.
[58] D. Carroll, G. Smith, M. Shipley, A. Steptoe, E. Brunner, and M. Marmot, “Blood pressure reactions to acute psychological stress and future blood pressure status: a 10-year follow-up of men in the Whitehall II study.,” *Psychosom Med*, vol. 65, no. 5, pp. 737–43, Oct. 2001.
[59] A. Tsutsumi, “Association between job strain and prevalence of hypertension: a cross sectional analysis in a Japanese working population with a wide range of occupations: the Jichi Medical School cohort study,” *Occup. Environ. Med.*, vol. 58, no. 6, pp. 367–373, Jun. 2001.
[60] M. Kivimäki, P. Leino-Arjas, R. Luukkonen, H. Riihimäi, J. Vahtera, and J. Kirjonen, “Work stress and risk of cardiovascular mortality: prospective cohort study of industrial employees,” *BMJ*, vol. 325, no. 7369, p. 857, Oct. 2002.
[61] M. Walski and M. Frontczak-Baniewicz, “Cechy ultrastrukturalne prawidłowego i dysfunkcyjnego śródbłonka naczyń krwionośnych.,” *Pol. Arch. Med. Wewnętrznej*, vol. 117, no. Suppl. 1, pp. 46–49, 2007.
[62] A. Doroszko, R. Andrzejak, and A. Szuba, “Dysfunkcja śródbłonka i ADMA w patogenezie nadciśnienia tętniczego,” *Arter. Hypertens.*, vol. 12, no. 3, pp. 224–237, 2008.
[63] A. Januszewicz, “Śródbłonek - cel leczenia nadciśnienia tętniczego.,” *Med. Prakt.*
[64] M. Walski, S. Chłopicki, R. Celary-Walska, and M. Frontczak-Baniewicz, “Ultrastructural alterations of endothelium covering advanced atherosclerotic plaque in human carotid artery visualised by scanning electron microscope.,” *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 53, no. 4, pp. 713–723, 2002.
[65] P. Libby, “Inflammation and Atherosclerosis,” *Circulation*, vol. 105, no. 9, pp. 1135–1143, Mar. 2002.
[66] P. M. Vanhouette, “Endothelial dysfunction and atherosclerosis.,” *Eur. Heart J.*, vol. 18, no. Suppl. E, pp. 19–29, Nov. 1997.

[67] U. Förstermann, E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, and H. Kleinert, "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions," *Hypertension*, vol. 23, no. 6 Pt 2, pp. 1121–1131, Jun. 1994.
[68] J. Wyss, "The role of the sympathetic nervous system in hypertension.," *Curr. Opin. Nephrol. Hyppertension*, vol. 2, no. 2, pp. 265–73.
[69] A. R. Aroor, V. G. DeMarco, G. Jia, Z. Sun, R. Nistala, G. A. Meininger, and J. R. Sowers, "The Role of Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System in the Development of Endothelial Dysfunction and Arterial Stiffness," *Front. Endocrinol.*, vol. 4, 2013.
[70] B. V. Khan, D. G. Harrison, M. T. Olbrych, R. W. Alexander, and R. M. Medford, "Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 17, pp. 9114–9119, Aug. 1996.
[71] P. E. Szmitko, "New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation: Part I," *Circulation*, vol. 108, no. 16, pp. 1917–1923, Oct. 2003.
[72] K. Node, M. Kitakaze, H. Yoshikawa, H. Kosaka, and M. Hori, "Reduced Plasma Concentrations of Nitrogen Oxide in Individuals With Essential Hypertension," *Hypertension*, vol. 30, no. 3, pp. 405–408, Sep. 1997.
[73] H. Miyazaki, H. Matsuoka, J. P. Cooke, M. Usui, S. Ueda, S. Okuda, and T. Imaizumi, "Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor : A Novel Marker of Atherosclerosis," *Circulation*, vol. 99, no. 9, pp. 1141–1146, Mar. 1999.
[74] V. Brovkovych, L. Dobrucki, I. Brovkovych, C. Do Nascimento, A. Burewicz, and T. Malinski, "Nitric oxide release from normal and dysfunctionl endothelium.," *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 50, no. 4, pp. 575–586.
[75] K. Matsubara, T. Higaki, Y. Matsubara, and A. Nawa, "Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Preeclampsia," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 3, pp. 4600–4614, Mar. 2015.
[76] L. Rochette, J. Lorin, M. Zeller, J.-C. Guilland, L. Lorgis, Y. Cottin, and C. Vergely, "Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets?," *Pharmacol. Ther.*, vol. 140, no. 3, pp. 239–257, Dec. 2013.
[77] A. Szczeklik, *Choroby wewnętrzne. Podręcznik multimedialny oparty na zasadach EBM.* Kraków: Medycyna Praktyczna, 2012.
[78] A. C. Guyton, "Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids," *Science*, vol. 252, no. 5014, pp. 1813–1816, Jun. 1991.
[79] H. Y. Choi, H. C. Park, and S. K. Ha, "Salt Sensitivity and Hypertension: A Paradigm Shift from Kidney Malfunction to Vascular Endothelial Dysfunction," *Electrolytes Blood Press. E BP*, vol. 13, no. 1, pp. 7–16, Jun. 2015.
[80] K. Narkiewicz, "The synpathetic nervous system in hypertension," *Postępy Nauk Med.*, vol. 2–3, pp. 123–128.
[81] J. Gołąb, M. Jakóbisiak, W. Lasek, and T. Stokłosa, *Immunologia*, 6 zmienione - 3 dodruk. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2014.
[82] D. G. Harrison, A. Vinh, H. Lob, and M. S. Madhur, "Role of the adaptive immune system in hypertension," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 10, no. 2, pp. 203–207, Apr. 2010.
[83] M. Filip, J. Maciąg, R. Nosalski, R. Korbut, and T. J. Guzik, "Zaburzenia funkcji śródbłonka naczyń wywołane stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej.," *Postępy Biochem.*, vol. 58, no. 2, pp. 186–194, 2012.
[84] C.-L. Gao, C. Zhu, Y.-P. Zhao, X.-H. Chen, C.-B. Ji, C.-M. Zhang, J.-G. Zhu, Z.-K. Xia, M.-L. Tong, and X.-R. Guo, "Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 320, no. 1–2, pp. 25–33, May 2010.
[85] E. SHACTER, "Quantification and Significance of Protein Oxidation in Biological Samples*," *Drug Metab. Rev.*, vol. 32, no. 3–4, pp. 307–326, Stycze 2000.
[86] T. A. Bairova, S. I. Kolesnikov, L. I. Kolesnikova, O. A. Pervushina, M. A. Darenskaya, and L. A. Grebenkina, "Lipid Peroxidation and Mitochondrial Superoxide Dismutase-2

Gene in Adolescents with Essential Hypertension," *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 158, no. 2, pp. 181–184, Dec. 2014.
[87] G. S. Reis, V. S. Augusto, A. P. C. Silveira, A. A. Jordão, J. Baddini-Martinez, O. Poli Neto, A. J. Rodrigues, and P. R. B. Evora, "Oxidative-stress biomarkers in patients with pulmonary hypertension," *Pulm. Circ.*, vol. 3, no. 4, pp. 856–861, Dec. 2013.
[88] D. A. Jones, S. L. Prior, J. D. Barry, S. Caplin, J. N. Baxter, and J. W. Stephens, "Changes in markers of oxidative stress and DNA damage in human visceral adipose tissue from subjects with obesity and type 2 diabetes," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 106, no. 3, pp. 627–633, Dec. 2014.
[89] A. C. Montezano and R. M. Touyz, "Reactive Oxygen Species and Endothelial Function – Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases," *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 110, no. 1, pp. 87–94, Jan. 2012.
[90] J. D. Lambeth, "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 3, pp. 181–189, Mar. 2004.
[91] R. M. Touyz, A. M. Briones, M. Sedeek, D. Burger, and A. C. Montezano, "NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health," *Mol. Interv.*, vol. 11, no. 1, pp. 27–35, Feb. 2011.
[92] R. S. Frey, M. Ushio–Fukai, and A. B. Malik, "NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, no. 4, pp. 791–810, Apr. 2009.
[93] F. Violi, V. Sanguigni, R. Carnevale, A. Plebani, P. Rossi, A. Finocchi, C. Pignata, D. De Mattia, B. Martire, M. C. Pietrogrande, S. Martino, E. Gambineri, A. R. Soresina, P. Pignatelli, F. Martino, S. Basili, and L. Loffredo, "Hereditary Deficiency of gp91phox Is Associated With Enhanced Arterial Dilatation: Results of a Multicenter Study," *Circulation*, vol. 120, no. 16, pp. 1616–1622, Oct. 2009.
[94] E. Schulz and T. Münzel, "NOX5, a New 'Radical' Player in Human Atherosclerosis?**Editorials published in the Journal of the American College of Cardiology reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 52, no. 22, pp. 1810–1812, Nov. 2008.
[95] T. J. Guzik, W. Chen, M. C. Gongora, B. Guzik, H. E. Lob, D. Mangalat, N. Hoch, S. Dikalov, P. Rudzinski, B. Kapelak, J. Sadowski, and D. G. Harrison, "Calcium-Dependent NOX5 Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Contributes to Vascular Oxidative Stress in Human Coronary Artery Disease," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 52, no. 22, pp. 1803–1809, Nov. 2008.
[96] Q. Zhang, P. Malik, D. Pandey, S. Gupta, D. Jagnandan, E. B. de Chantemele, B. Banfi, M. B. Marrero, R. D. Rudic, D. W. Stepp, and D. J. R. Fulton, "Paradoxical Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by NADPH Oxidase," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 9, pp. 1627–1633, Sep. 2008.
[97] A. L. Moens and D. A. Kass, "Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 11, pp. 2439–2444, Nov. 2006.
[98] R. M. Wever, T. F. Lüscher, F. Cosentino, and T. J. Rabelink, "Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase," *Circulation*, vol. 97, no. 1, pp. 108–112, Jan. 1998.
[99] L. V. d'Uscio and Z. S. Katusic, "Increased vascular biosynthesis of tetrahydrobiopterin in apolipoprotein E-deficient mice," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 290, no. 6, pp. H2466–2471, Jun. 2006.
[100] Q. Li, J.-Y. Youn, and H. Cai, "Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension:," *J. Hypertens.*, vol. 33, no. 6, pp. 1128–1136, Jun. 2015.
[101] I. Całkosiński, M. Dobrzyński, M. Całkosińska, E. Seweryn, A. Bronowicka-Szydełko, K. Dzierzba, I. Ceremuga, and A. Gamian, "Charakterystyka odczynu zapalnego.," *Postępy Hig. Med. Dośw. Online*, vol. 63, pp. 395–408, 2009.

[102] F. D'Aiuto, L. Nibali, M. Parkar, K. Patel, J. Suvan, and N. Donos, "Oxidative Stress, Systemic Inflammation, and Severe Periodontitis," *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 11, pp. 1241–1246, Nov. 2010.
[103] G. Ciprandi, D. Caimmi, R. Raschetti, M. Miraglia Del Giudice, C. Salpietro, S. Caimmi, and A. M. Castellazzi, "Adipokines and their role in allergies," *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, vol. 24, no. 4 Suppl, pp. 13–16, Oct. 2011.
[104] L. Sjökvist Ottsjö, C.-F. Flach, S. Nilsson, R. de Waal Malefyt, A. K. Walduck, and S. Raghavan, "Defining the Roles of IFN-γ and IL-17A in Inflammation and Protection against Helicobacter pylori Infection," *PloS One*, vol. 10, no. 7, p. e0131444, 2015.
[105] T. J. Guzik, "Role of immune system in arterial hypertension," *Postępy Nauk Med.*, vol. s3, pp. 36–45, Nov. 2011.
[106] A. Vinh, W. Chen, Y. Blinder, D. Weiss, W. R. Taylor, J. J. Goronzy, C. M. Weyand, D. G. Harrison, and T. J. Guzik, "Inhibition and Genetic Ablation of the B7/CD28 T-Cell Costimulation Axis Prevents Experimental Hypertension," *Circulation*, vol. 122, no. 24, pp. 2529–2537, Dec. 2010.
[107] N. Rudemiller, H. Lund, H. J. Jacob, A. M. Geurts, D. L. Mattson, and PhysGen Knockout Program, "CD247 modulates blood pressure by altering T-lymphocyte infiltration in the kidney," *Hypertension*, vol. 63, no. 3, pp. 559–564, Mar. 2014.
[108] T. J. Guzik, N. E. Hoch, K. A. Brown, L. A. McCann, A. Rahman, S. Dikalov, J. Goronzy, C. Weyand, and D. G. Harrison, "Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 10, pp. 2449–2460, Oct. 2007.
[109] D. W. Trott and D. G. Harrison, "The immune system in hypertension," *AJP Adv. Physiol. Educ.*, vol. 38, no. 1, pp. 20–24, Mar. 2014.
[110] A. Bataillard, J. C. Freiche, M. Vincent, J. Sassard, and J. L. Touraine, "Antihypertensive effect of neonatal thymectomy in the genetically hypertensive LH rat," *Thymus*, vol. 8, no. 6, pp. 321–330, 1986.
[111] S. Chen and D. K. Agrawal, "Dysregulation of T cell Subsets in the Pathogenesis of Hypertension," *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 17, no. 2, Feb. 2015.
[112] J.-C. Youn, H. T. Yu, B. J. Lim, M. J. Koh, J. Lee, D.-Y. Chang, Y. S. Choi, S.-H. Lee, S.-M. Kang, Y. Jang, O. J. Yoo, E.-C. Shin, and S. Park, "Immunosenescent CD8+ T cells and C-X-C chemokine receptor type 3 chemokines are increased in human hypertension," *Hypertension*, vol. 62, no. 1, pp. 126–133, Jul. 2013.
[113] D. W. Trott, S. R. Thabet, A. Kirabo, M. A. Saleh, H. Itani, A. E. Norlander, J. Wu, A. Goldstein, W. J. Arendshorst, M. S. Madhur, W. Chen, C.-I. Li, Y. Shyr, and D. G. Harrison, "Oligoclonal CD8+ T cells play a critical role in the development of hypertension," *Hypertension*, vol. 64, no. 5, pp. 1108–1115, Nov. 2014.
[114] K. Wallace, D. C. Cornelius, J. Scott, J. Heath, J. Moseley, K. Chatman, and B. LaMarca, "CD4+ T cells are important mediators of oxidative stress that cause hypertension in response to placental ischemia," *Hypertension*, vol. 64, no. 5, pp. 1151–1158, Nov. 2014.
[115] I. E. Dumitriu, "The life (and death) of CD4+CD28null T cells in inflammatory diseases," *Immunology*, vol. 146, no. 2, pp. 185–193, Oct. 2015.
[116] A. Hautefort, B. Girerd, D. Montani, S. Cohen-Kaminsky, L. Price, B. N. Lambrecht, M. Humbert, and F. Perros, "T-Helper 17 Cell Polarization in Pulmonary Arterial Hypertension," *CHEST J.*, vol. 147, no. 6, p. 1610, Jun. 2015.
[117] M. S. Madhur, H. E. Lob, L. A. McCann, Y. Iwakura, Y. Blinder, T. J. Guzik, and D. G. Harrison, "Interleukin 17 Promotes Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Dysfunction," *Hypertension*, vol. 55, no. 2, pp. 500–507, Feb. 2010.
[118] M. Katsuki, Y. Hirooka, T. Kishi, and K. Sunagawa, "Decreased proportion of Foxp3+CD4+ regulatory T cells contributes to the development of hypertension in genetically hypertensive rats:," *J. Hypertens.*, vol. 33, no. 4, pp. 773–783, Apr. 2015.
[119] T. Barhoumi, D. A. Kasal, M. W. Li, L. Shbat, P. Laurant, M. F. Neves, P. Paradis, and E. L. Schiffrin, "T Regulatory Lymphocytes Prevent Angiotensin II–Induced Hypertension and Vascular Injury," *Hypertension*, vol. 57, no. 3, pp. 469–476, Mar. 2011.

[120] C. T. Chan, M. Lieu, B.-H. Toh, T. S. Kyaw, A. Bobik, C. G. Sobey, and G. R. Drummond, "Antibodies in the Pathogenesis of Hypertension," *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–9, 2014.
[121] B. O. Kristensen and P. L. Andersen, "Autoantibodies in untreated and treated essential hypertension. I," *Acta Med. Scand.*, vol. 203, no. 1–2, pp. 55–59, 1978.
[122] B. O. Kristensen, P. L. Andersen, and A. Wiik, "Autoantibodies and vascular events in essential hypertension: a five-year longitudinal study," *J. Hypertens.*, vol. 2, no. 1, pp. 19–24, Feb. 1984.
[123] A. Miyazaki, N. Kitaichi, K. Ohgami, D. Iwata, X.-H. Jin, K. Iwabuchi, T. Morohashi, S. Ohno, and K. Onoé, "Anti-inflammatory effect of angiotensin type 1 receptor antagonist on endotoxin-induced uveitis in rats," *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 246, no. 5, pp. 747–757, May 2008.
[124] S. D. Crowley, C. W. Frey, S. K. Gould, R. Griffiths, P. Ruiz, J. L. Burchette, D. N. Howell, N. Makhanova, M. Yan, H.-S. Kim, P.-L. Tharaux, and T. M. Coffman, "Stimulation of lymphocyte responses by angiotensin II promotes kidney injury in hypertension," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 295, no. 2, pp. F515–524, Aug. 2008.
[125] N. E. Hoch, T. J. Guzik, W. Chen, T. Deans, S. A. Maalouf, P. Gratze, C. Weyand, and D. G. Harrison, "Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 296, no. 2, pp. R208–216, Feb. 2009.
[126] Y. Xia and R. E. Kellems, "Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond," *Circ. Res.*, vol. 113, no. 1, pp. 78–87, Jun. 2013.
[127] M. L. Fu, H. Herlitz, W. Schulze, G. Wallukat, P. Micke, P. Eftekhari, K. G. Sjögren, A. Hjalmarson, W. Müller-Esterl, and J. Hoebeke, "Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension," *J. Hypertens.*, vol. 18, no. 7, pp. 945–953, Jul. 2000.
[128] S. R. Novotny, K. Wallace, J. Heath, J. Moseley, P. Dhillon, A. Weimer, G. Wallukat, F. Herse, K. Wenzel, J. N. Martin, R. Dechend, and B. Lamarca, "Activating autoantibodies to the angiotensin II type I receptor play an important role in mediating hypertension in response to adoptive transfer of CD4+ T lymphocytes from placental ischemic rats," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 302, no. 10, pp. R1197–1201, May 2012.
[129] M. O. R. Mian, P. Paradis, and E. L. Schiffrin, "Innate Immunity in Hypertension," *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 16, no. 2, Feb. 2014.
[130] T. P. Mikołajczyk, G. Osmenda, B. Batko, G. Wilk, M. Krezelok, D. Skiba, T. Sliwa, J. R. Pryjma, and T. J. Guzik, "Heterogeneity of peripheral blood monocytes, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus," *Lupus*, p. 0961203315598014, Aug. 2015.
[131] S. Dimitrov, F. Shaikh, C. Pruitt, M. Green, K. Wilson, N. Beg, and S. Hong, "Differential TNF production by monocyte subsets under physical stress: blunted mobilization of pro-inflammatory monocytes in prehypertensive individuals," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 27C, pp. 101–108, Jan. 2013.
[132] A. Merino, P. Buendia, A. Martin-Malo, P. Aljama, R. Ramirez, and J. Carracedo, "Senescent CD14+CD16+ Monocytes Exhibit Proinflammatory and Proatherosclerotic Activity," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 3, pp. 1809–1815, Feb. 2011.
[133] K.-U. Belge, F. Dayyani, A. Horelt, M. Siedlar, M. Frankenberger, B. Frankenberger, T. Espevik, and L. Ziegler-Heitbrock, "The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF," *J. Immunol.*, vol. 168, no. 7, pp. 3536–3542, Apr. 2002.
[134] L. Ziegler-Heitbrock, "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 81, no. 3, pp. 584–592, Mar. 2007.
[135] M. Hristov and C. Weber, "Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis:," *Thromb. Haemost.*, vol. 106, no. 5, pp. 757–762, Sep. 2011.
[136] J. R. Mellembakken, P. Aukrust, M. K. Olafsen, T. Ueland, K. Hestdal, and V. Videm, "Activation of Leukocytes During the Uteroplacental Passage in Preeclampsia," *Hypertension*, vol. 39, no. 1, pp. 155–160, Jan. 2002.

[137] J. R. Mellembakken, P. Aukrust, K. Hestdal, T. Ueland, T. Åbyholm, and V. Videm, "Chemokines and Leukocyte Activation in the Fetal Circulation During Preeclampsia," *Hypertension*, vol. 38, no. 3, pp. 394–398, Sep. 2001.
[138] U. Syrbe, A. Moebes, J. Scholze, A. Swidsinski, and Y. Dörffel, "Effects of the angiotensin II type 1 receptor antagonist telmisartan on monocyte adhesion and activation in patients with essential hypertension," *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.*, vol. 30, no. 6, pp. 521–528, Jun. 2007.
[139] M. Knorr, T. MÃ¼nzel, and P. Wenzel, "Interplay of NK cells and monocytes in vascular inflammation and myocardial infarction," *Front. Physiol.*, vol. 5, Aug. 2014.
[140] S. Kossmann, M. Schwenk, M. Hausding, S. H. Karbach, M. I. Schmidgen, M. Brandt, M. Knorr, H. Hu, S. Kröller-Schön, T. Schönfelder, S. Grabbe, M. Oelze, A. Daiber, T. Münzel, C. Becker, and P. Wenzel, "Angiotensin II-induced vascular dysfunction depends on interferon-γ-driven immune cell recruitment and mutual activation of monocytes and NK-cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 6, pp. 1313–1319, Jun. 2013.
[141] R. Hambrecht, A. Wolf, S. Gielen, A. Linke, J. Hofer, S. Erbs, N. Schoene, and G. Schuler, "Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 342, no. 7, pp. 454–460, Feb. 2000.
[142] D. M. R. Silva, A. Gomes-Filho, V. C. Olivon, T. M. S. Santos, L. K. Becker, R. A. S. Santos, and V. S. Lemos, "Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1–7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat," *J. Appl. Physiol.*, vol. 111, no. 5, pp. 1272–1277, Nov. 2011.
[143] R. H. Böger, S. M. Bode-Böger, W. Thiele, A. Creutzig, K. Alexander, and J. C. Frölich, "Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 32, no. 5, pp. 1336–1344, Nov. 1998.
[144] C. D. Goonasekera, D. D. Rees, P. Woolard, A. Frend, V. Shah, and M. J. Dillon, "Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents," *J. Hypertens.*, vol. 15, no. 8, pp. 901–909, Aug. 1997.
[145] R. Maas, V. Xanthakis, J. F. Polak, E. Schwedhelm, L. M. Sullivan, R. Benndorf, F. Schulze, R. S. Vasan, P. A. Wolf, R. H. Böger, and S. Seshadri, "Association of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA with carotid artery intimal media thickness in the Framingham Heart Study offspring cohort," *Stroke J. Cereb. Circ.*, vol. 40, no. 8, pp. 2715–2719, Aug. 2009.
[146] A. Surdacki, M. Nowicki, J. Sandmann, D. Tsikas, R. H. Boeger, S. M. Bode-Boeger, O. Kruszelnicka-Kwiatkowska, F. Kokot, J. S. Dubiel, and J. C. Froelich, "Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension," *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 33, no. 4, pp. 652–658, Apr. 1999.
[147] V. J. das Neves, T. Fernandes, F. R. Roque, U. P. R. Soci, S. F. S. Melo, and E. M. de Oliveira, "Exercise training in hypertension: Role of microRNAs," *World J. Cardiol.*, vol. 6, no. 8, pp. 713–727, Aug. 2014.
[148] J. P. Després and B. Lamarche, "Low-intensity endurance exercise training, plasma lipoproteins and the risk of coronary heart disease," *J. Intern. Med.*, vol. 236, no. 1, pp. 7–22, Jul. 1994.
[149] S. K. Malin, J. M. Haus, T. P. J. Solomon, A. Blaszczak, S. R. Kashyap, and J. P. Kirwan, "Insulin sensitivity and metabolic flexibility following exercise training among different obese insulin-resistant phenotypes," *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 305, no. 10, pp. E1292–E1298, Nov. 2013.
[150] P. Clarkson, H. E. Montgomery, M. J. Mullen, A. E. Donald, A. J. Powe, T. Bull, M. Jubb, M. World, and J. E. Deanfield, "Exercise training enhances endothelial function in young men," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 33, no. 5, pp. 1379–1385, Kwiecie 1999.
[151] S. R. Collier, J. A. Kanaley, R. Carhart, V. Frechette, M. M. Tobin, A. K. Hall, A. N. Luckenbaugh, and B. Fernhall, "Effect of 4 weeks of aerobic or resistance exercise training on arterial stiffness, blood flow and blood pressure in pre- and stage-1 hypertensives," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 22, no. 10, pp. 678–686, Kwiecie 2008.

[152] U. Laufs, N. Werner, A. Link, M. Endres, S. Wassmann, K. Jürgens, E. Miche, M. Böhm, and G. Nickenig, "Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis," *Circulation*, vol. 109, no. 2, pp. 220–226, Jan. 2004.
[153] S. Steiner, A. Niessner, S. Ziegler, B. Richter, D. Seidinger, J. Pleiner, M. Penka, M. Wolzt, K. Huber, J. Wojta, E. Minar, and C. W. Kopp, "Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease," *Atherosclerosis*, vol. 181, no. 2, pp. 305–310, Aug. 2005.
[154] L. S. Pescatello, H. V. MacDonald, G. I. Ash, L. M. Lamberti, W. B. Farquhar, R. Arena, and B. T. Johnson, "Assessing the Existing Professional Exercise Recommendations for Hypertension: A Review and Recommendations for Future Research Priorities," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 90, no. 6, pp. 801–812, Jun. 2015.
[155] C. Kasapis and P. D. Thompson, "The Effects of Physical Activity on Serum C-Reactive Protein and Inflammatory Markers," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 45, no. 10, pp. 1563–1569, May 2005.
[156] M. A. Albert, R. J. Glynn, and P. M. Ridker, "Effect of physical activity on serum C-reactive protein," *Am. J. Cardiol.*, vol. 93, no. 2, pp. 221–225, Jan. 2004.
[157] D. F. Geffken, "Association between Physical Activity and Markers of Inflammation in a Healthy Elderly Population," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 153, no. 3, pp. 242–250, Feb. 2001.
[158] E. S. Ford, "Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults," *Epidemiol. Camb. Mass*, vol. 13, no. 5, pp. 561–568, Sep. 2002.
[159] T. McLaughlin, "Differentiation Between Obesity and Insulin Resistance in the Association With C-Reactive Protein," *Circulation*, vol. 106, no. 23, pp. 2908–2912, Dec. 2002.
[160] A. J. Siegel, J. J. Stec, I. Lipinska, E. M. Van Cott, K. B. Lewandrowski, P. M. Ridker, and G. H. Tofler, "Effect of marathon running on inflammatory and hemostatic markers," *Am. J. Cardiol.*, vol. 88, no. 8, pp. 918–920, Oct. 2001.
[161] C. Taylor, G. Rogers, C. Goodman, R. D. Baynes, T. H. Bothwell, W. R. Bezwoda, F. Kramer, and J. Hattingh, "Hematologic, iron-related, and acute-phase protein responses to sustained strenuous exercise," *J. Appl. Physiol.*, vol. 62, no. 2, pp. 464–469, Feb. 1987.
[162] A. Steensberg, G. van Hall, T. Osada, M. Sacchetti, B. Saltin, and B. K. Pedersen, "Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6," *J. Physiol.*, vol. 529, no. 1, pp. 237–242, Nov. 2000.
[163] N. Mathur and B. K. Pedersen, "Exercise as a Mean to Control Low-Grade Systemic Inflammation," *Mediators Inflamm.*, vol. 2008, pp. 1–6, 2008.
[164] A. M. W. Petersen and B. K. Pedersen, "The anti-inflammatory effect of exercise," *J. Appl. Physiol.*, vol. 98, no. 4, pp. 1154–1162, Apr. 2005.
[165] C. L. Falconer, A. R. Cooper, J. P. Walhin, D. Thompson, A. S. Page, T. J. Peters, A. A. Montgomery, D. J. Sharp, C. M. Dayan, and R. C. Andrews, "Sedentary time and markers of inflammation in people with newly diagnosed type 2 diabetes," *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 24, no. 9, pp. 956–962, Sep. 2014.
[166] G. Camus, D. Sondag, J. Maggipinto, J. Pincemail, A. F. Plumier, F. Feron, A. Juchmes-Ferir, J. Duchateau, M. Lamy, and G. Deby-Dupont, "[Mobilization of leukocytes during sub-maximal dynamic exercise]," *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.*, vol. 99, no. 6, pp. 419–423, Dec. 1991.
[167] B. Steppich, F. Dayyani, R. Gruber, R. Lorenz, M. Mack, and H. W. Ziegler-Heitbrock, "Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 279, no. 3, pp. C578–586, Sep. 2000.
[168] M. Baum, M. Müller-Steinhardt, H. Liesen, and H. Kirchner, "Moderate and exhaustive endurance exercise influences the interferon-gamma levels in whole-blood culture supernatants," *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 76, no. 2, pp. 165–169, 1997.
[169] N. Drela, E. Kozdron, and P. Szczypiorski, "Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence," *BMC Geriatr.*, vol. 4, p. 8, Sep. 2004.

[170] D. C. Nieman, D. A. Henson, G. Gusewitch, B. J. Warren, R. C. Dotson, D. E. Butterworth, and S. L. Nehlsen-Cannarella, "Physical activity and immune function in elderly women," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 25, no. 7, pp. 823–831, Jul. 1993.
[171] F. F. Brown, A. B. Bigley, C. Sherry, C. M. Neal, O. C. Witard, R. J. Simpson, and S. D. R. Galloway, "Training status and sex influence on senescent T-lymphocyte redistribution in response to acute maximal exercise," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 39, pp. 152–159, Jul. 2014.
[172] C. Members, R. J. Gibbons, G. J. Balady, J. T. Bricker, B. R. Chaitman, G. F. Fletcher, V. F. Froelicher, D. B. Mark, B. D. McCallister, A. N. Mooss, M. G. O'Reilly, W. L. Winters, R. J. Gibbons, E. M. Antman, J. S. Alpert, D. P. Faxon, V. Fuster, G. Gregoratos, L. F. Hiratzka, A. K. Jacobs, R. O. Russell, and S. C. Smith, "ACC/AHA 2002 Guideline Update for Exercise Testing: Summary Article A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1997 Exercise Testing Guidelines)," *Circulation*, vol. 106, no. 14, pp. 1883–1892, Oct. 2002.
[173] J. Neubauer-Geryk and L. Bieniaszewski, "Metody oceny funkcji śródbłonka. Wazodylatacja tętnicy ramiennej po niedokrwieniu," *Chor. Serca Naczyń*, vol. 4, no. 4, pp. 190–196, 2007.
[174] B. Westfal and J. Kasprzak, "Zastosowanie kliniczne oceny funkcji śródbłonka i grubości kompleksu błona środkowa-błona wewnętrzna (IMT) tętnic szyjnych," *Kardiol. Pol.*, vol. 63, no. 12, pp. 685–692, 2005.
[175] S. Shinkai, H. Kohno, K. Kimura, T. Komura, H. Asai, R. Inai, K. Oka, Y. Kurokawa, and R. Shephard, "Physical activity and immune senescence in men," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 27, no. 11, pp. 1516–1526, Nov. 1995.
[176] S. H. Gueldner, L. W. Poon, M. La Via, G. Virella, Y. Michel, M. H. Bramlett, C. A. Noble, and E. Paulling, "Long term exercise patterns and immune function in healthy older women," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 93, no. 1–3, pp. 215–222, Feb. 1997.
[177] J. . Woods, M. . Ceddia, B. . Wolters, J. . Evans, Q. Lu, and E. McAuley, "Effects of 6 months of moderate aerobic exercise training on immune function in the elderly," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 109, no. 1, pp. 1–19, Jun. 1999.
[178] L. C. Rall, R. Roubenoff, J. G. Cannon, L. W. Abad, C. A. Dinarello, and S. N. Meydani, "Effects of progressive resistance training on immune response in aging and chronic inflammation," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 28, no. 11, pp. 1356–1365, Nov. 1996.
[179] S. Bermon, P. Philip, P. Ferrari, M. Candito, and C. Dolisi, "Effects of a short-term strength training programme on lymphocyte subsets at rest in elderly humans," *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 79, no. 4, pp. 336–340, Mar. 1999.
[180] M. De la Fuente, M. Miñano, V. Manuel Victor, M. Del Rio, M. D. Ferrández, A. Díez, and J. Miquel, "Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 102, no. 2–3, pp. 263–277, May 1998.
[181] M. Utsuyama, M. Ichikawa, A. Konno-Shirakawa, Y. Fujita, and K. Hirokawa, "Retardation of the age-associated decline of immune functions in aging rats under dietary restriction and daily physical exercise," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 91, no. 3, pp. 219–228, Nov. 1996.
[182] J. Tang, X. Li, M. A. Price, E. J. Sanders, O. Anzala, E. Karita, A. Kamali, S. Lakhi, S. Allen, E. Hunter, R. A. Kaslow, and J. Gilmour, "CD4:CD8 lymphocyte ratio as a quantitative measure of immunologic health in HIV-1 infection: findings from an African cohort with prospective data," *Front. Microbiol.*, vol. 6, p. 670, 2015.
[183] H. Syrjälä, H. M. Surcel, and J. Ilonen, "Low CD4/CD8 T lymphocyte ratio in acute myocardial infarction.," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 83, no. 2, pp. 326–328, Feb. 1991.
[184] P. Marrack, C. Hannum, M. Harris, K. Haskins, R. Kubo, M. Pigeon, R. Shimonkevitz, J. White, and J. Kappler, "Antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell receptors," *Immunol. Rev.*, vol. 76, pp. 131–145, 1983.
[185] L. R. V. Antonelli, W. O. Dutra, R. R. Oliveira, K. C. L. Torres, L. H. Guimarães, O. Bacellar, and K. J. Gollob, "Disparate Immunoregulatory Potentials for Double-Negative

(CD4− CD8−) αβ and γδ T Cells from Human Patients with Cutaneous Leishmaniasis," *Infect. Immun.*, vol. 74, no. 11, pp. 6317–6323, Nov. 2006.
[186] D. Bulut, M. Scheeler, T. Wichmann, J. Börgel, T. Miebach, and A. Mügge, "Effect of protein A immunoadsorption on T cell activation in patients with inflammatory dilated cardiomyopathy," *Clin. Res. Cardiol. Off. J. Ger. Card. Soc.*, vol. 99, no. 10, pp. 633–638, Oct. 2010.
[187] P. Isler, E. Vey, J. H. Zhang, and J. M. Dayer, "Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69," *Eur. Cytokine Netw.*, vol. 4, no. 1, pp. 15–23, Feb. 1993.
[188] J. L. Viana, G. C. Kosmadakis, E. L. Watson, A. Bevington, J. Feehally, N. C. Bishop, and A. C. Smith, "Evidence for Anti-Inflammatory Effects of Exercise in CKD," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, Apr. 2014.
[189] S. F. Ziegler, F. Ramsdell, and M. R. Alderson, "The activation antigen CD69," *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 12, no. 5, pp. 456–465, Sep. 1994.
[190] Y. Chu, X. Xiangli, and W. Xiao, "Regulatory T cells protect against hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in mice," *Mol. Med. Rep.*, vol. 11, no. 4, pp. 3181–3187, Apr. 2015.
[191] M. A. Moreno-Eutimio, J. M. Tovar-Rodríguez, K. Vargas-Avila, N. G. Nieto-Velázquez, M. G. Frías-De-León, M. Sierra-Martinez, and G. Acosta-Altamirano, "Increased serum levels of inflammatory mediators and low frequency of regulatory T cells in the peripheral blood of preeclamptic Mexican women," *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. 413249, 2014.
[192] A. Echeverría, M. A. Moro-García, V. Asensi, J. A. Cartón, C. López-Larrea, and R. Alonso-Arias, "CD4+CD28null T lymphocytes resemble CD8+CD28null T lymphocytes in their responses to IL-15 and IL-21 in HIV-infected patients," *J. Leukoc. Biol.*, Jun. 2015.
[193] M. G. H. Betjes and N. H. R. Litjens, "Chronic kidney disease and premature ageing of the adaptive immune response," *Curr. Urol. Rep.*, vol. 16, no. 1, p. 471, Jan. 2015.
[194] P. B. Martens, J. J. Goronzy, D. Schaid, and C. M. Weyand, "Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 40, no. 6, pp. 1106–1114, Jun. 1997.
[195] G. Liuzzo, J. J. Goronzy, H. Yang, S. L. Kopecky, D. R. Holmes, R. L. Frye, and C. M. Weyand, "Monoclonal T-Cell Proliferation and Plaque Instability in Acute Coronary Syndromes," *Circulation*, vol. 101, no. 25, pp. 2883–2888, Jun. 2000.
[196] M. Czesnikiewicz-Guzik, W.-W. Lee, D. Cui, Y. Hiruma, D. L. Lamar, Z.-Z. Yang, J. G. Ouslander, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy, "T cell subset-specific susceptibility to aging," *Clin. Immunol.*, vol. 127, no. 1, pp. 107–118, Apr. 2008.
[197] T. P. Ng, X. Camous, M. S. Z. Nyunt, A. Vasudev, C. T. Y. Tan, L. Feng, T. Fulop, K. B. Yap, and A. Larbi, "Markers of T-cell senescence and physical frailty: insights from Singapore Longitudinal Ageing Studies," *Npj Aging Mech. Dis.*, vol. 1, p. 15005, Sep. 2015.
[198] G. Spielmann, B. McFarlin, P. Smith, K. Guy, and R. Simpson, "Regular physical activity is correlated with a reduced frequency of senescent T-lymphocytes in middle-aged men," *Int. J. Exerc. Sci. Conf. Proc.*, vol. 3, no. 1, Oct. 2009.
[199] H. Martynowicz, A. Janus, D. Nowacki, and G. Mazur, "The role of chemokines in hypertension," *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.*, vol. 23, no. 3, pp. 319–325, Jun. 2014.
[200] R. P. Mason, J. J. Corbalan, R. F. Jacob, H. Dawoud, and T. Malinski, "Atorvastatin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure, nitroxidative stress and rantes levels in hypertensive rats with diabetes," *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.*, vol. 66, no. 1, pp. 65–72, Feb. 2015.
[201] V. Amsellem, L. Lipskaia, S. Abid, L. Poupel, A. Houssaini, R. Quarck, E. Marcos, N. Mouraret, A. Parpaleix, R. Bobe, G. Gary-Bobo, M. Saker, J.-L. Dubois-Randé, M. T. Gladwin, K. A. Norris, M. Delcroix, C. Combadière, and S. Adnot, "CCR5 as a Treatment Target in Pulmonary Arterial Hypertension," *Circulation*, vol. 130, no. 11, pp. 880–891, Sep. 2014.

[202] E. Baturcam, J. Abubaker, A. Tiss, M. Abu-Farha, A. Khadir, F. Al-Ghimlas, I. Al-Khairi, P. Cherian, N. Elkum, M. Hammad, J. John, S. Kavalakatt, C. Lehe, S. Warsame, K. Behbehani, S. Dermime, and M. Dehbi, "Physical exercise reduces the expression of RANTES and its CCR5 receptor in the adipose tissue of obese humans," *Mediators Inflamm.*, vol. 2014, p. 627150, 2014.

[203] W. G. McMaster, A. Kirabo, M. S. Madhur, and D. G. Harrison, "Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage," *Circ. Res.*, vol. 116, no. 6, pp. 1022–1033, Mar. 2015.

[204] Y.-Q. Tong, J.-J. Ye, Z.-H. Wang, Y.-W. Zhang, F.-X. Zhan, X.-H. Guan, Y.-J. Geng, S.-Y. Hou, Y. Li, J.-Q. Cheng, Z.-X. Lu, and J.-F. Liu, "Association of variable number of tandem repeat polymorphism in the IL-4 gene with ischemic stroke in the Chinese Uyghur population," *Genet. Mol. Res. GMR*, vol. 12, no. 3, pp. 2423–2431, 2013.

[205] H. E. Ploeger, T. Takken, M. H. G. de Greef, and B. W. Timmons, "The effects of acute and chronic exercise on inflammatory markers in children and adults with a chronic inflammatory disease: a systematic review," *Exerc. Immunol. Rev.*, vol. 15, pp. 6–41, 2009.

[206] B. K. Pedersen, "Influence of physical activity on the cellular immune system: mechanisms of action," *Int. J. Sports Med.*, vol. 12 Suppl 1, pp. S23–29, Jun. 1991.

[207] A.-L. Millard, P. V. Valli, G. Stussi, N. J. Mueller, G. P. Yung, and J. D. Seebach, "Brief Exercise Increases Peripheral Blood NK Cell Counts without Immediate Functional Changes, but Impairs their Responses to ex vivo Stimulation," *Front. Immunol.*, vol. 4, May 2013.

[208] E. C. Gomes, A. N. Silva, and M. R. de Oliveira, "Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2012, 2012.

[209] L.-L. Jia, Y.-M. Kang, F.-X. Wang, H.-B. Li, Y. Zhang, X.-J. Yu, J. Qi, Y.-P. Suo, Z.-J. Tian, Z. Zhu, G.-Q. Zhu, and D.-N. Qin, "Exercise Training Attenuates Hypertension and Cardiac Hypertrophy by Modulating Neurotransmitters and Cytokines in Hypothalamic Paraventricular Nucleus," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, Jan. 2014.