

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Dominik Ludew

Charakteryzacja okołonaczyniowego
stanu zapalnego w chorobie
niedokrwiennej serca, związku z
czynnikiem ryzyka miażdżycy

Praca doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. med. Tomasz Guzik

Pracę wykonywano w Katedrze Chorób Wewnętrznych I Medycyny

Wsi UJ Collegium Medicum w Krakowie

Kierownik jednostki: **Prof. dr hab. med. Tomasz Guzik**

Kraków, 2015

Moim rodzicom

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania promotorowi Panu Profesorowi dr hab. Tomaszowi Guzikowi za opiekę, inspirację, życzliwość, nieustanne motywowanie w trakcie realizacji projektu oraz cenne wskazówki merytoryczne na etapie przygotowania niniejszej pracy.

Serdeczne podziękowanie składam także Panu Prof. dr hab. med. Ryszardowi Korbutowi Kierownikowi dzięki którego uprzejmości praca wykonywana była częściowo w Katedrze Farmakologii UJ Collegium Medicum

Dziękuję także dr hab. med. Wojciechowi Uraczowi za opiekę we wczesnych etapach rozwijania moich naukowych zainteresowań.

Podziękowania składam Panu Prof. dr hab. med. Bogusławowi Kapelakowi oraz dr Grzegorzowi Filipowi z Kliniki Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii UJ CM za rozwinięcie owocnej współpracy w trakcie rekrutacji pacjentów oraz pobierania próbek tkankowych.

Dziękuję także dr Karolowi Urbańskiemu za nieocenioną pomoc w trakcie wykonywania badań oraz za możliwość dzielenie się ważnymi spostrzeżeniami w trakcie realizacji projektu.

Słowo podziękowania składam także współpracownikom Laboratorium Medycyny Translacyjnej UJ CM Dr Tomaszowi Mikołajczykowi, Dr Agnieszce Sagan, Dr Pawłowi Matusikowi, Dr Agacie Schramm, za stworzenie przyjaznego naukowego klimatu w trakcie wykonywania badań.

Rodzinie dziękuję za wyrozumiałość, cierpliwość i wsparcie

Praca finansowana dzięki Projektowi Welcome Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej



Spis treści

1. WSTĘP	6
1.1 Miażdżycy	6
1.2 Rola komórek śródbłonna w inicjacji i progresji miażdżycy.....	8
1.3 Wpływ zmniejszonej biodostępności NO na przebieg miażdżycy – czynnik predykcyjny niekorzystnego przebiegu choroby	11
1.4 Rola limfocytów T w patogenezie miażdżycy	14
1.5 Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa - rola w modulacji napięcia ściany naczynia krwionośnego	18
1.6 Podobieństwa budowy tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej i tkanki tłuszczowej brunatnej oraz jej wpływ na funkcję naczynia krwionośnego.....	22
1.7 Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa w rozwoju stanu zapalnego i dysfunkcji śródbłonna	24
1.8 Znaczenie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej i nasierdziowej jako czynnika predykcyjnego w populacji pacjentów zagrożonych wystąpieniem schorzeń układu krążenia	26
2. CELE PRACY	28
3. MATERIAŁ I METODYKA.....	29
3.1 Charakterystyka kliniczna badanej populacji pacjentów.....	29
3.2 Ocena czynników ryzyka miażdżycy	30
3.3 Próbkę tkankowe	31
3.4 Cytometria przepływowa.....	32
3.5 Ocena funkcji śródbłonna naczyniowego	34
3.5.1 Zasada obliczania wielkości skurczu lub rozkurczu naczyniowego.....	36
3.6 Ocena produkcji anionorodnika nadciśnieniowego	38
3.7 Analiza statystyczna.....	40
4. WYNIKI	42
4.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów włączonych do badania.....	42
4.2 Analiza różnic w naciekach leukocytnych w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej tętnicy wieńcowej dotkniętej miażdżycą, tętnicy piersiowej wewnętrznej i tkanki tłuszczowej podskórnej	45
4.3 Analiza różnic w naciekach limfocytnych w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej tętnicy wieńcowej dotkniętej miażdżycą, tętnicy piersiowej wewnętrznej i tkanki tłuszczowej podskórnej	46
4.4 Korelacja pomiędzy naciekiem limfocytnym w tętnicy wieńcowej a IMA	47
4.5 Akumulacja limfocytów efektorowych i centralnych pamięci w naczyniach krwionośnych dotkniętych procesem miażdżycowym	49
4.6 Zwiększony naciek limfocytny w PVAT związany jest z upośledzoną funkcją rozkurczową tętnicy piersiowej wewnętrznej	52

4.7 Naciek limfocytny a produkcja anionorodnika nadciśnieniowego.....	60
4.8 Wpływ nacieku PVAT złożonego z limfocytów CD4+ efektorowych o końcowym etapie różnicowania na funkcję rozkurczową naczynia.....	63
4.9 Charakterystyka aktywowanych subpopulacji limfocytów w ośłonaczyniowej tkance tłuszczowej	64
4.10 Analiza czynników predykcyjnych zwiększonego nacieku komórek CD8+ i CD8+/HLA-DR+ w PVAT IMA.....	66
4.11 Analiza czynników predykcyjnych upośledzonej funkcji rozkurczowej naczynia IMA....	67
5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW	70
6. DYSKUSJA.....	71
6.1 Charakterystyka populacji pacjentów w badaniach ex vivo funkcji śródbłonna naczyniowego	71
6.2 Rola tkanki tłuszczowej ośłonaczyniowej w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego	73
6.3 Subpopulacje limfocytów aktywowanych i efektorowych w przewlekłym stanie zapalnym.....	77
6.4 Naciek leukocytny i limfocytny a funkcja rozkurczowa naczynia.....	79
6.5 Rola anionorodnika nadciśnieniowego	81
6.6 Rola limfocytów aktywowanych w regulacji funkcji śródbłonna i stresu oksydacyjnego.	82
6.7 Znaczenie badań dla praktyki klinicznej	83
7. WNIOSKI.....	85
8. STRESZCZENIE	86
9. SPIS SKRÓTÓW	91
10. SPIS RYCIN.....	96
11. SPIS TABEL.....	98
12. PIŚMIENNICTWO.....	99

1. WSTĘP

1.1 Miażdżycyca

Miażdżycyca jest schorzeniem przebiegającym z powstawaniem zmian zwyrodnieniowo-wytwórczych w błonie wewnętrznej i środkowej tętnic takich jak aorta, naczynia wieńcowe, mózgowe i tętnice kończyn. Nazwa łacińska schorzenia *atherosclerosis* pochodzi od złożenia dwóch słów greckiego „*ἀθήρα*” (*athera*) o pierwotnym znaczeniu „papka z mąki”, które nawiązuje do wyglądu złogów blaszki miażdżycowej i słowa *sclerosis* określające wzmożona konsystencję dotkniętego tym schorzeniem naczynia krwionośnego. Schorzenie to przebiega bezobjawowo przez dziesiątki lat. Pasma tłuszczowo-lipidowe (*fatty streaks*) obecne mogą być już u dzieci. Kolejno rozwój zmian miażdżycowych obejmuje powstanie typowych blaszek miażdżycowych o dużych rozmiarach, zmniejszających światło naczynia krwionośnego mogących z tego powodu wywoływać wysiłkowe bóle wieńcowe tzw. blaszki miażdżycowe stabilne. Następujące później włóknienie i wapnienie, czyni blaszkę miażdżycową niestabilną i podatną na pęknięcie i powstanie zakrzepu – bezpośredniej przyczyny objawowej i zagrażającej życiu pacjenta manifestacji choroby - ostrego zespołu wieńcowego (2).

Hipoteza powstawania miażdżycy obejmuje rozwój przewlekłego procesu zapalnego w tętnicach dużego i średniego kalibru. Proces zapalny jest zapoczątkowany przez działanie czynników uszkodzających prowadzących do rozwoju dysfunkcji śródbłonna. Nasilenie stanu zapalnego indukują czynniki ryzyka miażdżycy zarówno o wrodzonym jak i modyfikowalnym, środowiskowym charakterze. Istnieje wiele teorii miażdżycy, akcentujących znaczenie odpowiedzi na uszkodzenie naczynia, retencji lipoprotein o małej gęstości w ścianie naczynia czy immunologicznych mechanizmów w rozwoju miażdżycy. Pomimo istotnej roli wspomnianych czynników, obecnie uważa się, że miażdżycyca jest efektem destrukcyjnego wpływu długotrwałej reakcji zapalnej na ścianę naczynia. Patogeneza miażdżycy obejmuje także szereg procesów związanych z występowaniem stanu zapalnego takich jak nasilony stres oksydacyjny, nieprawidłowy metabolizm lipidów oraz proces proliferacji fibroblastów w ścianie naczynia (3).

Schorzenia związane z rozwojem miażdżycy, choroba niedokrwienna serca i choroby naczyniowo-mózgowe są nadal drugą po schorzeniach nowotworowych

najczęstszą przyczyną zgonu w Europie jak wynika z danych Eurostatu 2015. Choroba niedokrwienna serca była przyczyną 137 zgonów na 100 000 mieszkańców w Europie w 2012 r. z umieralnością w Polsce, podobnie jak w Niemczech, nieznacznie przekraczająca średnią unijną. Spadek liczby zgonów w okresie 2004-2012 z powodu schorzeń sercowo-naczyniowych wynosił 28,5% dla mężczyzn i 30,4% dla kobiet.

W skali globalnej liczba zgonów z powodu schorzeń sercowo-naczyniowych nadal jednak rośnie. W 2008 roku zmarło z tego powodu 17,3 miliona ludzi a jak wynika z założeń WHO w 2030 należy oczekiwać 23,3 miliona zgonów z powodu schorzeń sercowo-naczyniowych, w większości w krajach słabo i średnio rozwiniętych. Przytaczane fakty podkreślają konieczność poszukiwania nowych metod leczenia miażdżycy oraz prowadzenia dalszych badań nad mechanizmami rozwoju miażdżycy.

W ostatniej dekadzie podjęto znaczące wysiłki mające na celu wyróżnienie najbardziej zagrożonej zgonem populacji pacjentów leczonych z powodu choroby wieńcowej. Jednym z najbardziej obiecujących kierunków badań była próba wyróżnienia pacjentów z niestabilnymi, skłonnymi do pęknięcia blaszkami miażdżycowymi. Ostatnie doniesienia wskazują na niedostateczną zdolność tego czynnika predykcyjnego do wyróżniania grupy pacjentów najbardziej zagrożonych zgonem z powodu choroby niedokrwiennej serca (4). Nie wykazano bowiem aby użycie zaawansowanych technik obrazowania w monitorowaniu pacjentów z niestabilną blaszką miażdżycową istotnie i niezależnie od nasilenia klasycznych czynników ryzyka pozwalało na wyróżnienie zagrożonej grupy pacjentów. Problem ten nadal pozostaje niezwykle istotny celem zaadresowania wczesnej i intensywnej wtórnej profilaktyki w tej grupie pacjentów, która tego najbardziej potrzebuje. Socjoekonomiczna waga tego problemu skłania badaczy do poszukiwania nowych czynników predykcyjnych niepomyślnego przebiegu choroby niedokrwiennej serca.

1.2 Rola komórek śródbłónka w inicjacji i progresji miażdżycy

Śródbłonek stanowi najbardziej wewnętrzną, pojedynczą warstwę spłaszczonych, wyspecjalizowanych komórek w naczyniach krwionośnych i limfatycznych. Wraz z błoną podstawną na której spoczywają tworzy tzw. *tunica intima* naczyń i tworzy barierę pomiędzy krwią a ścianą naczyń. Najbardziej istotne funkcje tej warstwy komórek obejmują:

- utrzymanie prawidłowego napięcia ściany naczyń przez wytwarzanie naczyniorozkurczowego tlenu azotu (NO) oraz prostacykliny (PGI₂),
- hamowanie agregacji płytek krwi przez oba wymienione mediatory,
- utrzymanie prawidłowej hemostazy naczyniowej poprzez uwalnianie zmagazynowanego czynnika krzepnięcia von Willebranda, trombomoduliny, tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA),
- regulowanie przylegania leukocytów do ściany naczyń, przez uwalnianie selektyny P zawartej w ciałkach Weibela-Pallade'a,
- hamowanie przenikania leukocytów przez ścianę naczyniową.

Uważa się, że jednym z kluczowych czynników poprzedzających rozwój miażdżycy jest dysfunkcja śródbłónka definiowana jako stan patologii błony wewnętrznej naczyń spowodowany zachwianiem równowagi pomiędzy przewagą substancji antyagregacyjnych, naczyniorozkurczowych i antymitotycznych a substancji o odwrotnym działaniu wytwarzanych, uwalnianych bądź wywierających swoje działanie w tej warstwie naczyń. Jedną z najbardziej istotnych dla zachowania funkcji naczyniorozkurczowych naczyń substancji uwalnianych przez komórki śródbłónka jest tlenek azotu (NO). Zmniejszenie jego biodostępności jest cechą patognomoniczną rozwoju dysfunkcji śródbłónka (5). Wykazano, że dysfunkcja śródbłónka oceniana metodą polegającą na ultrasonograficznym pomiarze średnicy tętnicy promieniowej przed i po wywołaniu biernego przekrwienia w populacji pacjentów z obecnością czynników ryzyka miażdżycy w badaniach prospektywnych z 7-letnią obserwacją jest niezależnym od klasycznych czynników ryzyka czynnikiem predykcyjnym wystąpienia niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych (6). Inne istotne czynniki ryzyka miażdżycy nie wymieniane jako klasyczne obejmują podwyższony poziom homocysteiny (7) oraz lipoproteiny(a) (8).

Na skutek rozwoju dysfunkcji śródbłónka, która wyzwalana jest przez wiele czynników patogenetycznych, będących także czynnikami ryzyka miażdżycy, dochodzi do wzmożonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłónka i migracji monocytów oraz limfocytów do ściany naczynia. Zwiększona przepuszczalność dla lipoprotein osocza, będąca jednym ze skutków rozwoju dysfunkcji śródbłónka, prowadzi do wewnątrznaczyniowej akumulacji lipidów w ścianie naczynia. Modyfikacja cząsteczki LDL zachodząca w błonie wewnętrznej naczynia nadaje jej silnie aterogennych własności. Zmniejszona zawartość witaminy E we frakcji LDL, czyni ją podatną na oksydację i pochłanianie przez makrofagi (9) Fagocytyujące je makrofagi przekształcają się w komórki piankowe, które wraz z limfocytami T tworzą widoczny makroskopowo objaw rozwoju miażdżycy naczyń – plamkę żółtą. Migracja miofibroblastów oraz dalsza synteza elementów macierzy pozakomórkowej prowadzi w kolejnym etapie do powstania pasm tłuszczowych. Kolejne etapy rozwoju miażdżycy obejmują tworzenie tzw. blaszek włóknisto-tłuszczowych czyli właściwych blaszek miażdżycowych, które jeśli ulegną dalszemu powiększeniu doprowadzają do powstania istotnych hemodynamicznie zaburzeń przepływu krwi. Limfocyty T zlokalizowane w blaszce miażdżycowej, biorą udział w modulacji stanu zapalnego w naczyniu krwionośnym. Toczące się wewnątrz płytki miażdżycowej procesy apoptotyczne, proteolizy macierzy, znajdują się pod regulacyjnym wpływem limfocytów T i mogą być przyczyną pęknięcia włóknistej czapeczki blaszki miażdżycowej, co z kolei powoduje wystąpienie powikłania w postaci ostrego zespołu wieńcowego, jeśli proces miażdżycowy dotyka naczyń wieńcowych.

Dysfunkcja śródbłónka obejmuje szereg zmian morfologicznych i funkcjonalnych *tunica intima*, która jest związana z utratą fizjologicznych funkcji przez tę warstwę naczynia. Jednym z kluczowych mechanizmów dysfunkcji śródbłónka jest wspomniane zmniejszenie biodostępności naczyniorozkurczowego NO. Innym mechanizmem jest wzrost stężenia naczynioskurczowej endoteliny. Prowadzi do w pierwszej kolejności do upośledzonej wazodylatacji naczynia, co ma kluczowe znaczenie dla regulacji ciśnienia tętniczego krwi. Upośledzenie syntezy przeciwzapalnych autokoidów: NO i prostacykliny prowadzi także do nasilenia procesu zapalnego, wzmożonej adhezji leukocytów i zwiększonego ich przenikania do ściany naczynia. Zmniejszona synteza trombomoduliny, skutkuje uaktywnieniem trombiny, która jest przez to białko hamowana, co pozwala na aktywację mechanizmów krzepnięcia. Z drugiej strony zmniejszona ilość t-PA, prowadzi do upośledzenia procesu fibrynolizy.

W dysfunkcji śródbłónka dochodzi także do upośledzenia przeciwadhezyjnej funkcji tej warstwy naczynia krwionośnego. Na powierzchni komórek śródbłónka występuje wiele białek odpowiedzialnych za adhezję międzykomórkową. Są to: selektyny E i P, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 oraz PECAM-1. Selektyna P jest szczególnie istotna w rekrutacji eozynofików po aktywacji płytek krwi przez trombinę (10). Rola eozynofików w rozwoju miażdżycy jest obecnie przedmiotem badań (11), z drugiej strony udowodniono w modelach zwierzęcych, że leki przeciwplatekcyjne takie jak tiklopidyna zmniejszają rozległość blaszek miażdżycowych (12). W rozwoju miażdżycy szczególnie istotne wydają się być ICAM-1 oraz VCAM-1.

Migracja leukocytów do ściany naczynia jest wieloetapowym procesem. Zjawisko to jest jednym z kluczowych mechanizmów w jaki dysfunkcja śródbłónka wpływa na stan zapalny w ścianie naczynia. Pierwszym etapem jest tzw. *rolling* umożliwiony dzięki interakcji śródbłónkowej selektyny E oraz leukocytarnej selektyny L lub P. W trakcie tego krótkotrwałego kontaktu komórek może dojść do aktywacji silniejszej adhezji zależnej od wiązania się występujących na powierzchni śródbłónka cząsteczek VCAM-1 lub ICAM-1 z leukocytarnymi ligandami VLA-4 i LFA-1. W warunkach prawidłowych opisane interakcje nie zachodzą a migracja leukocytów nie występuje. Gdy rozwinie się lokalnie proces zapalny, umożliwiona zostaje adhezja leukocytów do powierzchni śródbłónka i dalsza ich transendotelialna migracja.

Cząsteczka VCAM-1 występuje na powierzchni niezmiennego śródbłónka. Jej ekspresja wzrasta wraz ze wzrostem poziomu cholesterolu we krwi. Wydzielany w warunkach laminarnego przepływu krwi NO hamuje ekspresję VCAM-1 poprzez hamowanie aktywności jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. W warunkach przepływu turbulentnego w miejscach predysponowanych do wystąpienia miażdżycy efekt ten zanika. Hamowanie inhibitorami czynności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B również znacząco zmniejsza nasilenie miażdżycy (13). Zmniejszona produkcja NO prowadzi do rozwoju dysfunkcji śródbłónka i zwiększonej ekspresji VCAM-1. Na powierzchni leukocytów ligandem dla VCAM-1 jest VLA-4, β -1 integryna obecna na monocytach i limfocytach. Innymi czynnikami mogącymi zwiększać gęstość VCAM-1 na powierzchni śródbłónka są reaktywne formy tlenu, utleniona forma LDL (ox-LDL), angiotensyna II, homocysteina.

Białko adhezyjne ICAM-1 występuje na powierzchni niezmiennych patologicznie komórek śródbłónka w niewielkiej ilości. Jego ekspresja zwiększa się po stymulacji prozapalnymi cytokinami: interferonem γ (INF γ), interleukiną-1 (IL-1), oraz czynnikiem

martwicy nowotworów (TNF α). Ligandem dla ICAM-1 jest LFA-1 (CD11a), β -integryna występująca na wszystkich typach leukocytów.

Podsumowując, śródbłonek naczyniowy pełni kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej funkcji naczynia krwionośnego a jego funkcjonowanie jest ważnym czynnikiem modulującym stan zapalny naczynia krwionośnego w przebiegu miażdżycy, choć mechanizmy tego oddziaływania nie zostały w pełni wyjaśnione.

1.3 Wpływ zmniejszonej biodostępności NO na przebieg miażdżycy – czynnik predykcyjny niekorzystnego przebiegu choroby

Odkrycie tlenu azotu w układzie biologicznym było jednym z najbardziej istotnych odkryć w XX wieku, docenionym przyznaniem nagrody Nobla dla Furchotta, Ignarro i Murada w dziedzinie medycyny i fizjologii w 1998 roku. Dodatkowego znaczenia nadało mu wprowadzenie na rynek w tym samym roku sildenafilu, leku wykorzystującego zależny od tlenu azotu mechanizm relaksacji naczynia, co zrewolucjonizowało leczenie zaburzeń erekcji. W chorobie niedokrwiennej serca lek będący donorem NO - nitrogliceryna - stosowany jest w celu łagodzenia objawów dusznicy bolesnej od 140 lat. Jednak dopiero w 1977 dzięki pracom Murada dowiedziano, że mechanizm działania tej substancji jest zależny od wzrostu stężenia 3',5'-cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) (14).

Tlenek azotu został zidentyfikowany jako biologicznie czynna cząsteczka produkowana w układzie naczyniowym dopiero w roku 1987 przez Moncadę i Palmera (15). Wykazali oni, że odkryty w 1980 r. przez Furchotta i Zawadzkiego śródbłonkowy czynnik naczyniorozkurczowy EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) jest identyczny z NO, który reaguje z ozonem tworząc chemiluminescencyjny produkt. Stwierdzili ponadto, że źródłem NO jest L-arginina. Kilka miesięcy później, tym samym roku, podobną pracę opublikował Louis Ignarro wraz ze współpracownikami, identyfikując EDRF jako NO, z wykorzystaniem dwóch metod: reakcji diazowania oraz tworzenia nitrozylohemoglobiny (16). Louis Ignarro już w 1979 udowodnił, że podanie zewnątrzpochodnego NO wywołuje rozkurcz zwierzęcych naczyń a efekt ten jest zależny od aktywacji cyklicznej guanylowej (17). Rok później Furchott i Zawadzki stwierdzili, że nieuszkodzony śródbłonek naczyń krwionośnych uwalnia pod wpływem acetylocholiny nieznany czynnik powodujący rozkurcz naczynia – EDRF, nie określając

jednak charakteru tej cząsteczki (18). Kilka lat zajęło jednak badaczom udowodnienie, że NO i EDRF to ta sama substancja. Do dziś jednak, zastosowana przez Furchgotta metoda, wykorzystująca stymulację acetylocholiny, jest najszerzej stosowaną w badaniu biodostępności NO produkowanego przez śródbłonek.

Komórki śródbłónka wytwarzają, jak już wspomniano, wiele biologicznie czynnych substancji. Pomiar relaksacji naczynia, zależny od biodostępności NO w śródbłónku jest tylko jednym ze sposobów badania funkcji tej warstwy naczynia. Dysfunkcja śródbłónka wiąże się jednak z zaburzeniem wydzielania wielu innych substancji, w tym naczyniorozkurczowej prostacykliny (PGI_2). Upośledzenie funkcji śródbłónka nie jest zatem związane tylko ze zmniejszeniem produkcji NO przez te komórki, choć ze względu na szczególne miejsce NO w patofizjologii śródbłónka, model badania funkcji śródbłónka oparty na pomiarze biodostępności tlenu azotu jest najszerzej stosowany. Ponadto badanie dysfunkcji śródbłónka, oparte na pomiarze biodostępności NO, posiada cechy czynnika rokowniczego w chorobach sercowo-naczyniowych (6). Wykazano, że upośledzona wazorelaksacja tętnic wieńcowych w odpowiedzi na acetylocholiny jest niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych definiowanych jako: śmierć z przyczyn sercowych, niestabilna choroba wieńcowa, zawał serca, udar mózgu, konieczność wykonania angioplastyki, pomostowania aortalno-wieńcowego, lub rewaskularyzacji naczyń obwodowych (19). Pomiar funkcji śródbłónka oparty na badaniu wazorelaksacji naczynia zależnej od acetylocholiny dostarcza danych nie tylko o lokalnej funkcji tej warstwy komórek w badanym odcinku tętnicy, ale daje wgląd w funkcjonowanie śródbłónka w całym organizmie. Wykazano, że pomiar zależnego od acetylocholiny rozkurczu tętnicy promieniowej u pacjentów z nadciśnieniem i chorobą niedokrwienną serca był niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych obejmujących naczynia wieńcowe oraz mózgowe w przyszłości (20, 21). Dysfunkcja śródbłónka jest więc zjawiskiem ogólnoustrojowym (22). Prospektywne badania Halcox'a z 2002 w których analizowano wazodylatację naczyń wieńcowych i naczyń mikrokrążenia u pacjentów ze stwierdzoną angiograficznie chorobą wieńcową i bez niej dostarczyły niezwykle interesujących wyników (23). Zarówno pomiar w tętnicy wieńcowej jak i w naczyniach mikrokrążenia wieńcowego był predyktorem przyszłych zdarzeń sercowo-naczyniowych. Niedawno wykazano, że wartość prognostyczna badania tętnicy promieniowej i wieńcowej u tego samego pacjenta jest podobna (24).

Podobnie udowodniono znaczenie oceny funkcji śródbłónka w przewidywaniu wystąpienia niekorzystnych następstw choroby u osób hospitalizowanych z powodu ostrego incydentu wieńcowego. Stwierdzono, że tylko niski poziom troponiny T, prawidłowa funkcja śródbłónka przy przyjęciu lub jej poprawa w ciągu 8 tygodni od wystąpienia ostrego incydentu wieńcowego były niezależnymi predyktorami przeżycia wolnego od wystąpienia nowych zdarzeń sercowo-naczyniowych (25). W zastoinowej niewydolności serca upośledzona funkcja śródbłónka wiązała się z częstszym występowaniem zdarzeń niepożądanych takich jak zgon, konieczność transplantacji serca, czy częstszymi hospitalizacjami w trakcie obserwacji (26).

Z analizy przytoczonych wyżej badań wynika, że pomimo ograniczeń metody, tj. badania oddziaływania na naczynie jedynie jednego z czynników wydzielanych przez komórki śródbłónka jakim jest NO, badana w ten sposób funkcja naczyń koreluje z przebiegiem choroby niedokrwiennej serca. Wynika z nich również, że powikłania miażdżycy rozwijają się znacznie częściej gdy stwierdza się dysfunkcję śródbłónka i wpływ ten jest tak samo istotny w naczyniach krążenia wieńcowego, krążenia mózgowego czy naczyniach obwodowych.

Ważnym potwierdzeniem istotnej roli jaką odgrywa w przebiegu miażdżycy dysfunkcja śródbłónka jest zależność jej wystąpienia od obecności klasycznych czynników ryzyka miażdżycy. Wykazano bowiem, że klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy mogą wywoływać odpowiedź zapalną śródbłónka. Upośledzenie prawidłowej czynności śródbłónka jest tym intensywniejsze im większa jest stwierdzana ilość czynników ryzyka miażdżycy (27). Stwierdzono korelację dwóch metod pomiaru funkcji śródbłónka z czynnikami ryzyka miażdżycy określonymi w skali Framingham Risk Score u pacjentów bez klinicznych cech choroby wieńcowej. Zarówno pomiary wazodylatacji tętnicy zależnej od acetylocholiny jak i wyniki badania nieinwazyjną metodą, polegającą na ultrasonograficznym pomiarze średnicy tętnicy promieniowej przed i po przywróceniu przepływu (FMD, *flow-mediated dilatation*), korelowały z wynikiem w skali ryzyka Framingham (28). Jakkolwiek wykazano później, że FMD koreluje z obecnością czynników ryzyka tylko w populacji pacjentów obciążonych niskim skumulowanym ryzykiem sercowo-naczyniowym (29). Ostatnio opublikowano wynik badań w populacji 1016 osób w wieku 70 lat, (PIVUS study), które wykazały, że w tej grupie pacjentów tylko inwazyjna metoda pomiaru z podaniem acetylocholiny do tętnicy promieniowej korelowała z ryzykiem zgonu, ostrego incydentu wieńcowego lub zawału mózgu w przyszłości (30), po wykluczeniu pacjentów u których wystąpiły

wcześniej zawał serca lub udar mózgu. Wyniki tych badań wskazują na przewagę inwazyjnego pomiaru z podaniem acetylocholino nad bezinwazyjnymi metodami, która posiada wartość prognostyczna również z zaawansowana chorobą wieńcową.

1.4 Rola limfocytów T w patogenezie miażdżycy

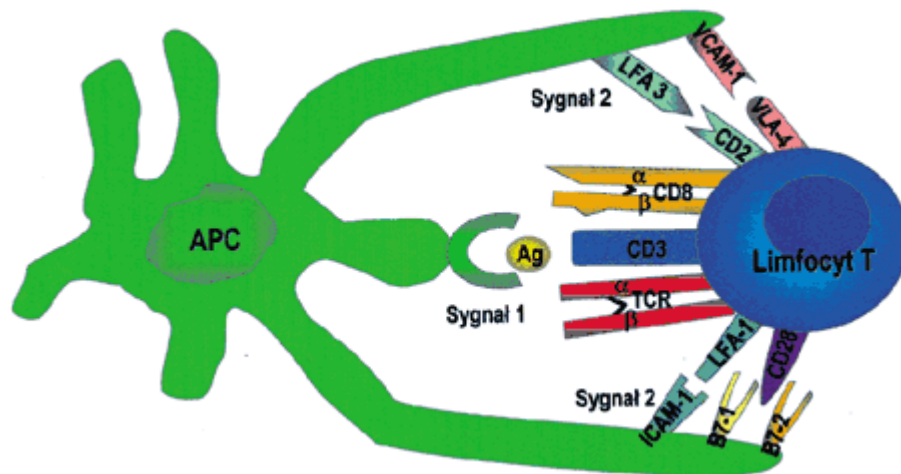
Szczególną rolę w regulacji stanu zapalnego w przebiegu miażdżycy odgrywają limfocyty T uczestniczące we wszystkich stadiach rozwoju choroby. Modulują one proces zapalny wskutek wydzielania cytokin immunoregulatorowych, których działanie w rozwoju miażdżycy jest obecnie intensywnie badane.

Populacja limfocytów jest zróżnicowana pod względem właściwości oraz obecności charakterystycznych markerów powierzchniowych. Limfocyty T posiadające na swojej powierzchni marker CD3⁺ obejmują trzy typy limfocytów: komórki pomocnicze, cytotoksyczne oraz limfocyty zawierające receptor TCR $\gamma\delta$. Wydzielono szereg subpopulacji limfocytów w zależności od obecności specyficznych białek powierzchniowych które stanowią zarazem marker etapu różnicowania limfocytów (31). Dojrzewanie komórki T po opuszczeniu grasicy, początkowo opisane w populacji komórek CD4⁺ a następnie także limfocytów CD8⁺, obejmuje jej przekształcenie kolejno w: 1) CD45RA⁺CCR7⁺, komórki naiwne, przed kontaktem z komórką prezentującą antygen; 2) CD45RA⁻CCR7⁺, komórki centralne pamięci, powstające po zetknięciu się z antygenem w węzłach chłonnych; 3) CD45RA⁻CCR7⁻, komórki efektorowe pamięci, powstające po ponownym kontakcie z antygenem w tkankach nielimfoidalnych; 4) CD45RA⁺CCR7⁻, komórki efektorowe pamięci o końcowym różnicowaniu (32). Limfocyty efektorowe wykazują zróżnicowaną ekspresję białek chemotaktycznych i posiadają na swojej powierzchni receptory dla selektyny E i P, dla chemokiny CCR5, oraz integryn: LFA-1, VLA-4 oraz wiele innych czasteczek, co pozwala im migrować do tkanek, w których toczy się proces zapalny (32). Zwiększona ekspresja integryn i selektyny P w dysfunkcyjnych komórkach śródbłonna ułatwia infiltrację ściany naczynia przez limfocyty. Podczas gdy komórki CD8⁺ przechodzą analogiczne etapy różnicowania efektorowa rola subpopulacji o o końcowym różnicowaniu jest związana z uwalnianiem perforyn i granzymu (33). Komórki CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁻ wykazują szczególnie wysoką ekspresję perforyny i nie posiadają zdolności proliferacyjnych (34).

Uważa się obecnie na podstawie wyników badań immunohistochemicznych, że w ścianie naczynia w przebiegu miażdżycy dominującą subpopulację limfocytów stanowią komórki CD3+/CD4+ zawierające TCR (*T cell receptor*) typu $\alpha\beta$. Stanowią one około 70 % wszystkich limfocytów CD3+ obecnych w zaawansowanych blaszkach miażdżycowych zarówno u ludzi jak i w modelach zwierzęcych. Znaczny ich odsetek to komórki efektorowe, a więc powstałe po ponownym kontakcie z antygenem. Skupiska tych komórek oraz komórek prezentujących antygen stwierdzono w regionach płytki miażdżycowej predysponowanej do pęknięcia, co może sugerować istotną rolę limfocytów T w powstanie niestabilnej blaszki miażdżycowej.

Do pełnej aktywacji limfocytów T oprócz kontaktu z antygenem konieczna jest także kostymulacja, która zachodzi poprzez połączenie specyficznego białka obecnego na komórce prezentującej i jego ligandu obecnego na limfocycie na przykład CD86/CD80 z CD28 lub CD40 z CD40L (Ryc. 1). Aktywacja komórek zachodząca po związaniu CD40 z CD40L prowadzi w tych komórkach do zwiększenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych: selektyny E, VCAM-1 i ICAM-1 oraz zwiększenia uwalniania prozapalnych interleukin (IL-1, IL-6, IL-8). W przypadku makrofagów interakcja cząsteczek kostymulujących prowadzi do wzmożonej ekspresji ICAM-1, antygenów MHC klasy II, a także indukcji uwalniania cytokin prozapalnych oraz metaloproteinaz. Hamowanie interakcji CD40L z CD40 przez podanie przeciwciał wiążących anty-CD40L myszom pozbawionym receptora dla LDL, żywionych dietą wysokocholesterolową zmniejszało nasilenie zmian miażdżycowych oraz zawartości lipidów oraz frakcji komórkowej w blaszkach miażdżycowych.

Inną ważną populacją limfocytów mogących odgrywać istotną rolę w rozwoju przewlekłego procesu zapalnego w miażdżycy są komórki CD3+ wykazujące lub pozbawione receptora kostymulacyjnego CD28. Szczególnie istotną rolę w miażdżycy wykazano dla limfocytów CD4+ CD28^{null}.



Ryc.1 Schemat kooperacji komórki prezentującej antygen APC (APC, antigen presenting cell) z limfocytom T ; Majewski S. Mechanizmy reakcji alergicznych Majewski S. Alergia 2000 2/5

Wzrost odsetka komórek $CD4^{+}/CD28^{\text{null}}$ uważany jest za efekt długotrwałej stymulacji $TNF\alpha$. Komórki te nabywają receptor KIR (*killer-like receptors*) i produkują zwiększone ilości interferonu γ ($INF\gamma$) (35). Wykazano także, że komórki te wykazują działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek śródbłonna (36). Opisywane są również komórki $CD8^{+}/28^{\text{null}}$, których rola jest słabiej poznana i które także mogą pełnić funkcje regulatorowe poprzez indukowanie transformacji komórek prezentujących antygen w profesjonalne komórki supresorowe (37).

Istotnym markerem obecnym na powierzchni limfocytów jest receptor dla interleukiny-1 (IL-2) cząsteczka CD25. IL-2 jest cytokiną produkowaną przez aktywowane limfocyty T będącej dla nich czynnikiem wzrostu. Wzmoczona ekspresja tej cząsteczki wymaga jedynie aktywacji receptora limfocyty TCR, jest zatem wczesnym markerem aktywacji, pojawiającym się po kilku godzinach od aktywacji komórki. Pojawienie się tej cząsteczki z drugiej strony na powierzchni limfocyty umożliwia apoptozę tej komórki. Stąd też obecność tej cząsteczki może wyrażać aktywację komórki. Cząsteczka CD25 jest też markerem obok obecności czynnika transkrypcyjnego FoxP3 specyficznej subpopulacji limfocytów regulatorowych $CD4^{+}$ (Treg). Wykazano niedawno, że zastosowanie kompleksu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko IL-2 z IL-2 selektywnie zwiększa ilość komórek Treg nawet sześciokrotnie i zmniejsza nasilenie miażdżycy w modelu mysim (38). Nie jest natomiast znana rola limfocytów $CD8^{+} CD25^{+}$.

Markerem późnej aktywacji limfocytów pozostaje HLA-DR, którego ekspresja na powierzchni limfocytów jest stymulowana przez IL-2. Zwiększona ekspresja tej cząsteczki wymaga poprzedzającej stymulacji receptora limfocyta TCR w kontekście aktywacji cząstki kostymulacyjnej CD28, wymaga zatem silnej aktywacji a maksymalna ekspresja HLA-DR pojawia się po 3-4 dniach od aktywacji komórki (39).

Wśród populacji limfocytów CD4⁺ w blaszce miażdżycowej dominują limfocyty Th1 odpowiedzialne za odpowiedź komórkową. Wydzielają one IL-2, i TNF α oraz INF γ - będący silnym aktywatorem makrofagów. Efektem działania tych cytokin jest wytworzenie nacieku zapalnego z dominacją limfocytów oraz makrofagów, podobnie jak dzieje się w reakcji alergicznej typu opóźnionego. W badaniu przeprowadzonym w modelu zwierzęcym wykazano, że myszy pozbawione genu ApoE (ApoE^{-/-}) i receptora dla INF γ wykazują 60 % redukcję wielkości blaszek miażdżycowych. INF γ hamuje proliferację komórek śródbłonna, nasila proteolizę macierzy zewnątrzkomórkowej, indukuje apoptozę komórek mięśni gładkich oraz aktywuje fosfolipazę A2, co nasila syntezę prozapalnych eikozanoidów w blaszce miażdżycowej (40). Efekty te prowadzą do osłabienia blaszki miażdżycowej i są czynnikiem czyniącym ją bardziej podatną na pęknięcie.

W blaszce miażdżycowej znajdują się też niewielkie ilości limfocytów Th2, które uważa się za antyaterogenne. Komórki te wydzielają IL-5, która aktywuje limfocyty B. Limfocyty B mogą uczestniczyć w prezentacji antygenów a także transformować w komórki plazmatyczne i wydzielać przeciwciała np. w klasie IgM, które uważa się za wywierające ochronny wpływ na przebieg miażdżycy (41). Wykazano, że przeciwciała klasy IgM mogą wiązać ox-LDL, hamując powstawanie komórek piankowatych. Immunizacja szczurów, karmionych dietą wysokocholesterolową, szczepionką zawierającą ox-LDL zmniejszała wielkość blaszek miażdżycowych o 50% (42). Badania Mallata pokazują jednak, że usunięcie dojrzałych limfocytów B z obecnym markerem CD20⁺ hamuje rozwój miażdżycy u myszy (41). Znaczna ilość IL-12, produkowana przez makrofagi, hamuje odpowiedź immunologiczną typu Th2. Z drugiej strony IL-10 wydzielana przez komórki Th2 oraz limfocyty regulatorowe (Treg) hamuje odpowiedź Th1 i promuje Th2. Wydzielana przez limfocyty IL-10 indukuje dodatkowo różnicowanie komórek Treg, które hamują z kolei czynność limfocytów CD4⁺ oraz prezentujących antygen. Transfer Treg do myszy ApoE^{-/-} hamował zarówno odpowiedź typu Th1 jak i Th2 i prowadził do zmniejszenia rozległości blaszek miażdżycowych oraz

ich komórkowości. Transfer tych komórek, zmniejszając ekspresję metaloproteinaz, stabilizuje blaszkę miażdżycową (43).

1.5 Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa - rola w modulacji napięcia ściany naczynia krwionośnego

Tkanka tłuszczowa człowieka składa się w 82-97% z tkanki tłuszczowej podskórnej, 10-15% z tkanki tłuszczowej trzewnej i 0-3% okołonaczyniowej. Rola tkanki tłuszczowej w patogenezie schorzeń układu sercowo-naczyniowego została udowodniona ponad 20 lat temu. Zaobserwowano wówczas zwiększoną ilość TNF α w tkance tłuszczowej trzewnej u otyłych pacjentów oraz zwiększony naciek makrofagów o otyłych myszy w tej tkance (44). Zwiększona ekspresja białka MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) – głównego białka odpowiadającego za rekrutację monocytów do tkanek prowadzi do nasilonego nacieku tkanki tłuszczowej trzewnej przez makrofagi (45). W dalszym etapie dochodzi do różnicowania makrofagów pod wpływem klasycznych cytokin prozapalnych : IL-1b, TNF α , i IL-6 w makrofagi M1, które zwiększają lipolizę, zmniejszają transport glukozy i wychwyt wolnych kwasów tłuszczowych przez adipocyty co z kolei skutkuje akumulacją ceramidów i diacyloglicerolu w naczyniach, mięśniach i innych organach np. wątrobie – prowadząc do ich stłuszczenia. U zdrowych myszy makrofagi stanowią 10-15% frakcji stromalnej tkanki tłuszczowej i są to głównie makrofagi M2. Wśród myszy otyłych odsetek ten sięga 45-60% a naciek zapalny złożony jest głównie z makrofagów M1 (46). Stosunkowo niedawno uwagę badaczy zwróciła tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa, w której to tkance tłuszczowej okołonaczyniowej ekspresja białka MCP-1 – głównego białka odpowiadającego za rekrutację monocytów jest 50 razy wyższa niż w tkance tłuszczowej podskórnej (47).

Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa pokrywa u ssaków większą część układu naczyniowego o średnicy naczynia powyżej 100 μ m, za wyjątkiem naczyń mózgowych i naczyń kapilarnych trzewnych, które są od niej wolne. Jakkolwiek pierwsze doniesienia o jej roli w regulacji rozkurczu naczynia, w badaniach prowadzonych przez Soltisa i Cassis na szczurzych naczyniach, pochodzą z 1991, to rola tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej nie była szerzej badana (48). W prowadzonych eksperymentach in vitro tkanka ta była odseparowywana i traktowana jako nieistotna dla funkcji naczynia

krwionośnego. Dopiero na początku 2002 roku Lohn zwrócił uwagę na jej istotny wpływ na funkcję układu sercowo-naczyniowego przez wydzielanie wielu biologicznie czynnych substancji z których za najbardziej istotne uważa się leptynę, adiponektynę a także ADRF (*adipocyte-derived relaxation factor*) oraz ADCF (*adipocyte-derived constricting factor*) (49). Jak dotąd nie została poznana natura tych dwóch czynników, co przypomina trudności w zidentyfikowaniu tlenku azotu jako czynnika odpowiadającego za wazorelaksację naczynia. ADRF wywiera efekt rozkurczowy przez aktywację kanałów potasowych bramkowanych potencjałem w mięśniówce gładkiej, zwiększając hiperpolaryzację błony i hamując napływ jonów wapniowych (50). Obecność tego czynnika wykazano również po raz pierwszy w roku 2005 w badaniach na fragmentach tętnic piersiowych ludzi poddanych CABG badanych metodą izolowanych krążków naczyniowych (51). Aktywność tego czynnika nie zmienia się po zablokowaniu syntazy tlenku azotu, zahamowaniu cyklooksygenazy czy cytochromu P-450. Wczesne prace sugerowały, że jest to czynnik białkowy, gdyż ADRF był inaktywowany przez podgrzanie do 65 st. C oraz przez proteinazę K (49). W późniejszych latach podejrzewano, że czynnikiem tym jest leptyna lub adiponektyna co stało częściowo w sprzeczności z faktem, że czynniki te wpływają na relaksację naczynia zależną od śródbłónka podczas gdy ADRF działa także bezpośrednio na mięśniówkę naczynia (Tab. 1). Adiponektyna to białko produkowane w znacznych ilościach przez adipocyty, głównie tkanki tłuszczowej podskórnej i stanowi 0,01% wszystkich białek organizmu człowieka. Jej stężenie w osoczu to 5-30 nM i jest 3 x wyższe u kobiet niż u mężczyzn (52). W przeciwieństwie do innych białek produkowanych przez adipocyty, ilość adiponektyny spada u ludzi otyłych a spadek ten jest niezależnym czynnikiem ryzyka insulinooporności, nadciśnienia, dysfunkcji śródbłónka i rozwoju choroby wieńcowej serca (53).

Jako ADRF pod uwagę brane są także ester metylowy kwasu palmitynowego, siarkowodór wytwarzany przez γ -liazę cystationylową, gdyż zahamowanie tego enzymu znacznie zmniejsza efekt naczyniorozkurczowy tkanki PVAT, zależny od zwiększenia dokomórkowego prądu potasowego (54). Ponadto atorwastatyna nasila syntezę H_2S w PVAT (55). Ostatnie badania prowadzone *in vitro* pochodzące z PVAT od otyłych i nie otyłych myszy identyfikują prostanoidy jako ADCF (56). Pod uwagę brane są także wolne rodniki tlenowe i endotelina (57). Reaktywne formy tlenu produkowane w PVAT wydają się być istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój dysfunkcji rozkurczowej naczynia. U otyłych myszy obserwowano zwiększoną ekspresję NADPH oksydazy w

PVAT a zastosowanie wymiataczy wolnych rodników przywracało prawidłową wazorelaksację naczyń (58).

Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa modyfikuje także inną funkcję naczyń krwionośnych. PVAT może między innymi wpływać na proces przebudowy ściany naczyń przez zwiększanie poziomu czynników wzrostu. Produkcja czynnika wzrostu hepatocytów do osocza zachodzi w głównej mierze dzięki aktywności tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej (59).

Tab. 1 Czynniki naczynioreaktywne wydzielane przez tkankę tłuszczową okołonaczyniową

Czynniki wpływające na napięcie ściany naczyń wydzielane przez tkankę tłuszczową okołonaczyniową i nasierdziową	
Adiponektyna	• Aktywacja eNOS przez aktywację kinaz zależnych od AMP oraz zwiększenie produkcji BH₄ (60, 61) • Rekrutacja endotelialnych komórek progenitorowych • Hamowanie kinaz aktywowanych przez mitogeny MAPK • Hamowanie proliferacji komórek mięśniówki gładkiej przez zahamowanie kinazy aktywowanej przez AMP (AMPK) • Promowanie rozkurczu naczyń niezależnego od funkcji śródbłonka przez aktywację kanałów potasowych bramkowanych potencjałem K_v (62) • Hamowanie stymulacji adrenergicznej • Promowanie różnicowania makrofagów M2 – CD206⁺ (63) • Produkcja adiponektyny zależna jest od stymulacji receptorów PPARγ (61)
Leptyna	• Aktywacja eNOS przez kinazę białkową B zależną od AMP (64) • Upośledzenie produkcji śródbłonkowego EDHF (65)

	• Aktywacja układu adrenergicznego i retencja jonów Na^+ (66) • indukcja iNOS zależna od aktywacji kinazy Akt (67)
Ester metylowy kwasu palmitynowego (PAME)	• Promowanie rozkurczu naczynia niezależnego od funkcji śródbłónka przez aktywację kanałów potasowych bramkowanych potencjałem Kv, zależną od jonów wapnia
Siarkowodór	• Promowanie rozkurczu naczynia niezależnego od funkcji śródbłónka przez aktywację kanałów potasowych bramkowanych potencjałem Kv7 KCNQ (68)
Endotelina	• ET_A receptor związany z białkiem Gq i wzrostem cytoplazmatycznego poziomu wapnia – skurcz mięśniówki naczynia • ET_B receptor związany z białkiem Gq – produkcja NO
Angiotensyna (1-7)	• Mas1 receptor związany z białkiem G
Nadtlenek wodoru	• Wazorelaksacja przez fosforylację białek kurczliwych mięśniówki gładkiej • Skurcz naczynia poprzez stymulowanie ekspresji Nox1 oksydazy i produkcji anionorodnika ponadtlenkowego (69)
Angiotensyna II	• AT1 receptor związany z białkiem Gq i wzrostem cytoplazmatycznego poziomu wapnia – skurcz mięśniówki naczynia • Wymiennik sodowo-wodorowy w kanalikule proksymalnym nefronu – retencja sodu
Anionorodnik ponadtlenkowy	• Skurcz poprzez aktywację kinaz tyrozynowych MAPK/ERK i zwiększoną ekspresję NADPH oksydazy (70)

1.6 Podobieństwa budowy tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej i tkanki tłuszczowej brunatnej oraz jej wpływ na funkcję naczynia krwionośnego

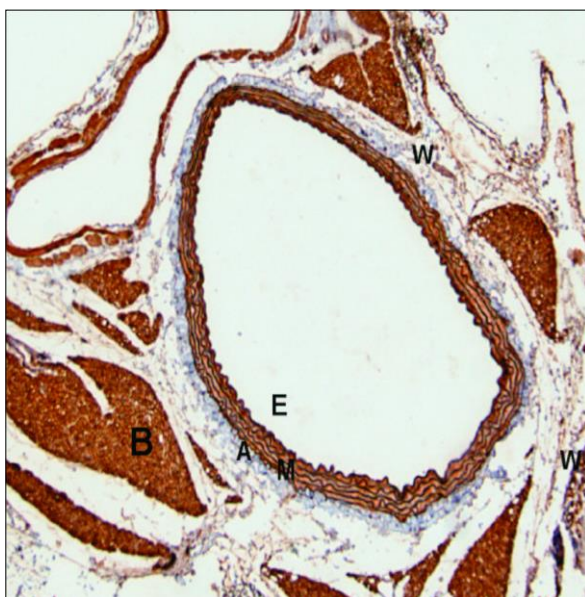
Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa otaczająca aortę piersiową u myszy przypomina bardziej tkankę tłuszczową brunatną niż żółtą a zatem jest zbudowana z większych adipocytów z licznymi małymi kropelkami tłuszczu i licznymi mitochondriami, u ludzi zaś jej charakterystyka bardziej przypomina żółtą tkankę tłuszczową (71). Podobieństwo ekspresji genów charakterystycznych dla tkanki tłuszczowej brunatnej i PVAT z wysoka ekspresją genów *Ucp-1* i *Cidea* (*cell death-inducing DNA-fragmentation factor*), będący negatywnym regulatorem lipolizy, potwierdzono metodą mikromacierzy. Tkanki te w podobny sposób wykazywały obniżoną akumulację makrofagów $CD11b^+/CD11c^+$ po karmieniu myszy dieta wysokotłuszczową w porównaniu do tkanki tłuszczowej trzewnej (1,0 vs 32% frakcji komórkowej). Postulowane jest, że PVAT podobnie jak tkanka tłuszczowa brunatna bierze udział w generowaniu ciepła w warunkach obniżonej temperatury na skutek nasilonej fosforylacji oksydacyjnej i charakteryzuje się wysoką ekspresją symportera długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i jonów wodorowych – *UCP-1* (*uncoupling protein-1*) (72). Charakter tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej u zdrowych myszy bardziej przypomina tkankę brunatną niż u myszy ze zmutowanym genem dla lipoproteiny ApoE, będących mysim modelem miażdżycy (Ryc. 2). Postuluje się także, że podobnie w populacji zdrowych ludzi PVAT ma charakter tkanki tłuszczowej brunatnej, jednak większość próbek tej tkanki pobieranych jest podczas operacji CABG a zatem w populacji starszych, dotkniętych miażdżycą pacjentów i wtedy morfologicznie przypomina tkankę tłuszczową żółtą. Badania na 1550 zdrowych ochotnikach prowadzone metoda PET poparte analizą 78 tkanek sekcyjnych wskazują na malejącą z wiekiem ekspresję *UCP-1* w tkance tłuszczowej otaczającej aortę (73). Badania prowadzone wśród myszy ze zmutowanym genem dla lipoproteiny ApoE, będące mysim modelem miażdżycy, wykazały że wzmożona termogeneza w tej tkance aktywowana przez zimno wywiera hamujący wpływ na rozwój miażdżycy, którego to efektu ochronnego nie obserwowano u myszy nie posiadających tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej (74). PVAT odpowiedzialna jest za obniżenie poziomu trójglicerydów w osoczu w warunkach obniżonej temperatury i bierze udział w utrzymaniu gradientu temperatury w naczyniach, stąd naczynia położone najbliżej serca utrzymują najwyższą

temperaturę (74). U myszy otyłych również dochodzi do utraty właściwych dla tkanki tłuszczowej brunatnej cech. Zmiany w funkcji tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej u myszy otyłych odbywa się przez zahamowanie kinazy mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) co prowadzi do indukcji ekspresji iNOS (NOS2), zwiększonej syntezy reaktywnych form tlenu i związanego z tym skurczem mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych (75). Jak wspomniano u gryzoni tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa otaczająca aortę ma charakter tkanki brunatnej powyżej przepony i tkanki żółtej poniżej przepony. Ten fakt może być związany z rozwojem blaszek miażdżycowych w odcinku aorty brzusznej prowadzący do rozwoju tętniaków (76). Istotną funkcję tkanki okołonaczyniowej hamującą proliferację śródbłonna i mięśniówki gładkiej potwierdzają badania polegające na transplantowaniu tkanki tłuszczowej trzewnej pochodzącej od myszy na diecie bogatotłuszczowej. Myszy pozbawione PVAT cechowały się silną reakcją tworzenia neointymy na uszkodzenie mechaniczne w przeciwieństwie do myszy z obecną PVAT. Przeszczep tkanki tłuszczowej trzewnej od myszy żywionej dietą bogatotłuszczową nasilał tworzenie neointymy podczas gdy przeszczep tkanki podskórnej ją znosił (77).

Co istotne obecność tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej wykazującej termogenezę odkryto niedawno u zdrowych ludzi eksponowanych na temperaturę rzędu 16°C (78). U części pacjentów objętych badaniem z BMI>25 termogeneza w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej była znacznie zredukowana w warunkach obniżonej temperatury środowiska w przeciwieństwie do populacji pacjentów z prawidłowymi wartościami BMI.

1.7 Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa w rozwoju stanu zapalnego i dysfunkcji śródbłónka

Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa jest głównym miejscem akumulacji limfocytów T i B w naczyniu myszy ApoE ^{-/-}, których to komórek ilość 80-krotnie przekracza tę obserwowaną w błonie wewnętrznej naczynia (79).



Ryc. 2 Przekroje histopatologiczne mysiej aorty wstępującej obrazujące znaczne ilości tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej. Gao i wsp. (1)

E - endothelium (intima)

M - tunica media

A – adventitia

W – white adipose tissue (biała tkanka tłuszczowa)

B – brown adipose tissue (brązowa tkanka tłuszczowa)

PVAT cechuje się wysoką ekspresją MCP-1, interleukiny – 1 (IL-1), interleukiny – 8 (IL-8) (80). Supernatant z tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej wykazywał dwukrotnie silniejsze właściwości promujące chemotaksję monocytów w porównaniu z nadsączem z tkanki tłuszczowej podskórnej (81). W tkance tłuszczowej okołonaczyniowej zdrowych myszy dominują makrofagi M2. Za rekrutację przeciwzapalnych makrofagów M2 do tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej odpowiadają eozynofile i wydzielane przez nie interleukina IL-4 i IL-13 (82). Myszy z eozynofilią okazywały się być bardziej insulinowrażliwe oraz charakteryzowały się mniejszą objętością tkanki tłuszczowej trzewnej i okołonaczyniowej. Podobny efekt wywierała aktywna infestacja pasożytnicza organizmu zwierzęcia (69).

W badaniach, w których dokonywano przeszczepu tkanki tłuszczowej do tętnicy szyjnej u myszy ApoE^{-/-}, która to tętnica zwykle jest wolna od blaszek miażdżycowych u tych gryzoni (83), przeszczep tkanki tłuszczowej trzewnej doprowadził do rozwoju blaszek miażdżycowych poprzedzonym upośledzeniem odpowiedzi wazorelaksacyjnej

w odpowiedzi na acetylocholinę. Efektu tego nie obserwowano gdy przeszczepiono tkankę tłuszczową podskórną.

Inne badanie w modelu mysim miażdżycy, w którym analizowano wpływ karmienia dieta bogatotłuszczową na rozwój miażdżycy u potomstwa myszy ApoE. 12-tygodniowe potomstwo myszy karmionych dieta wysokotłuszczową wykazywało ponaddwukrotnie większe nasilenie blaszek miażdżycowych w aorcie piersiowej. Transplantacja piersiowej PVAT do aorty brzusznej wywoływała także powstawania ponaddwukrotnie większej blaszki miażdżycowej (84).

Endotelina- 1 (ET-1) może być odpowiedzialna za rozwój stanu zapalnego tkance tłuszczowej okołonaczyniowej oraz miażdżycy. Efekt ten był niedawno badany w modelu myszy transgenicznym ApoE/eET-1 karmionych dieta bogatotłuszczową wykazujących zwiększoną ekspresję endoteliny. Myszy te charakteryzowały się o 45 % zmniejszona frakcją HDL w osoczu i ponad dwukrotnie większą ilością blaszek miażdżycowych, 2,5 krotnie zwiększoną akumulacją makrofagów w PVAT oraz obecnością tętniaków aorty brzusznej. PVAT wykazywała także ponad dwukrotnie zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu a PVAT zauważalny był naciek limfocytów CD4+ (85).

W innych badaniach badano rolę P-selektyny w rozwoju stanu zapalnego w PVAT. Jak wspomniano P-selektyna bierze udział w adhezji komórek do śródbłonna. W modelu zwierzęcym badano myszy transgeniczne pozbawione receptora dla selektyny oraz myszy kontrolne karmione były dieta bogatotłuszczową. Oceniano funkcję śródbłonna oraz analizowano nasilenie stanu zapalnego w PVAT. Zaobserwowano wzrost ilości makrofagów i parametrów stresu oksydacyjnego w PVAT myszy kontrolnych, nie stwierdzano zaś ich w grupie myszy transgenicznym pozbawionych receptora dla P-selektyny. Podobnie myszy kontrolne wykazywały upośledzoną wazorelaksację naczyń w odpowiedzi na acetylocholinę w przeciwieństwie do myszy transgenicznym. Częściowo prawidłowa funkcja rozkurczowa przywracało zastosowanie wymiatacza wolnych rodników lub przeciwciała neutralizujące receptor dla P-selektyny (86).

1.8 Znaczenie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej i nasierdziowej jako czynnika predykcyjnego w populacji pacjentów zagrożonych wystąpieniem schorzeń układu krążenia

Tkanka tłuszczowa nasierdziowa (EAT – *epicardial adipose tissue*) jest tkanką tłuszczową trzewną, która ma podobne pochodzenie rozwojowe jak tłuszcz sieci jamy brzusznej. Unaczyniana jest przez naczynia wieńcowe. W przeciwieństwie do niej tkanka tłuszczowa parakardialna zlokalizowana na worku osierdziowym pochodzi z prymitywnej mezenchymy piersiowej i jest unaczyniana przez gałąź tętnicy piersiowej wewnętrznej – tętnicę osierdziowoprzeponową. Proponuje się aby obie te przestrzenie tkankowe nazywać razem tkanką tłuszczową perikardialną. Podział ten jest istotny w aspekcie badań obrazowych u ludzi oceniających ilość tkanki tłuszczowej okołosercowej jako czynnik predykcyjny rozwoju schorzeń sercowo-naczyniowych. Wykazano, że ilość tkanki tłuszczowej nasierdziowej jest silnie skorelowana z objętością tkanki tłuszczowej trzewnej aczkolwiek istnieje populacja pacjentów z małą objętością tkanki tłuszczowej trzewnej a znaczną objętością EAT (87). Ludzie ci charakteryzują się zwiększonym ryzykiem rozwoju schorzeń układu sercowo-naczyniowego. W ocenie objętości tłuszczu nasierdziowego preferuję się badanie echokardiograficzne, gdyż tomografia komputerowa (CT) nie pozwala na wyróżnienie tkanki tłuszczowej nasierdziowej i parakardialnej. Badania CT 1155 pacjentów pochodzących z badania Framingham Heart Study wykazały że objętość EAT jest wysoce skorelowana z objętością tkanki tłuszczowej trzewnej oraz czynnikami ryzyka – hipertrójglicydemią, obniżonym poziomem HDL i nadciśnieniem. Jednak w badaniach prospektywnych 3000 pacjentów bez choroby układu naczyniowego, u których oceniano objętości tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej, nasierdziowej i trzewnej stwierdzono po 5 latach trwania badania, że jedynie objętość tkanki tłuszczowej trzewnej jest predyktorem schorzeń układu sercowo-naczyniowego oraz schorzeń nowotworowych (88).

Bardziej przekonujące są wyniki badań wpływu objętości tkanki EAT na ryzyko występowania epizodów migotania przedsionków. Otyłość i zwiększona objętość EAT jest ważnym czynnikiem ryzyka migotania przedsionków, co udowodniły ostatnio badania Framingham Heart Study (89). Wzrost objętości EAT o 1 odchylenie standardowe zwiększał ryzyko migotania przedsionków o 30% a efekt ten nie zanikał po wyeliminowaniu wpływu BMI i objętości tkanki trzewnej. Co ciekawe grubość tkanki tłuszczowej nasierdziowej na tylnej ścianie lewego przedsionka w miejscu przylegania przełyku i ujścia żył płucnych u pacjentów z utrwalonym migotaniem przedsionków była

dwukrotnie większa niż u pacjentów z napadowym migotaniem lub bez migotania przedsionków i odpowiadała za 5,3-krotny wzrost ryzyka migotania przedsionków (OR 5,3; $p < 0,01$) (90). Pacjenci z niewydolnością mięśnia sercowego charakteryzują się obniżoną objętością EAT. Pacjenci z obniżoną frakcją wyrzutową $< 55\%$ charakteryzowali się jeszcze bardziej zredukowaną objętością EAT ($83,5 \pm 98,5$ vs $114,5 \pm 98,5$; $p < 0,05$) (91).

Ostatnie badania wskazują też na zwiększoną objętość tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej oraz wzmożone jej uwapnienie w populacji kobiet cierpiących z powodu tocznia trzewnego, który jest uznanym czynnikiem ryzyka miażdżycy (92).

Badania kliniczne prowadzone w ostatnich latach wskazują na konieczność uwzględnienia tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej jako istotnego składnika procesu patogenetycznego prowadzącego do rozwoju przewlekłej choroby zapalnej - miażdżycy. Jak dotąd poznanie roli mechanizmów procesu zapalnego w miażdżycy nie zostało w pełni przełożone na poprawę efektów leczenia pacjentów dotkniętych tym schorzeniem. Dążenie do jeszcze głębszego zrozumienia roli stanu zapalnego toczącego się w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej naczyń pacjentów dotkniętych miażdżycą było głównym czynnikiem skłaniającym do podjęcia prezentowanych badań.

2. CELE PRACY

Badania eksperymentalne udowodniły istotny wpływ tkanki tłuszczowej na regulację funkcji naczyniorozkurczowej naczyń. Jedynie w pojedynczych pracach badano *ex vivo* wpływ tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej na funkcję rozkurczową naczyń ludzkich. W ostatnich latach zaobserwowano, że okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa staje się miejscem rozwoju stanu zapalnego, który poprzedza rozwój zjawisk patogenetycznych w miażdżycy. Jak dotąd nie jest znany związek nacieków zapalnych tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej z funkcją śródbłonna naczyń u pacjentów z miażdżycą. W szczególności charakter limfocytarnego nacieku zapalnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej w naczyniach ludzkich oraz jego potencjalne znaczenie czynnościowe nie jest znane.

Cele pracy :

1. Charakteryzacja populacji limfocytów T w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej:
 - zmienionych miażdżycowo tętnic wieńcowych
 - tętnic piersiowych wewnętrznychw porównaniu do tkanki tłuszczowej podskórnej.
2. Określenie związków pomiędzy okołonaczyniowymi naciekami leukocytarnymi w różnych obszarach układu krążenia.
3. Ocena związków pomiędzy naciekami limfocytarnymi tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej a funkcją śródbłonna oraz parametrami stresu oksydacyjnego.
4. Określenie subpopulacji limfocytarnych powiązanych z upośledzoną biodostępnością tlenu azotu oraz produkcją reaktywnych form tlenu w ścianie naczynia krwionośnego.
5. Określenie związku nacieku leukocytarnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej z cechami klinicznymi choroby niedokrwiennej serca.

3. MATERIAŁ I METODYKA

3.1 Charakterystyka kliniczna badanej populacji pacjentów

Badaniem zostało objętych 108 pacjentów poddanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG) z powodu stabilnej choroby niedokrwiennej serca z użyciem graftu tętnicy piersiowej wewnętrznej (IMA). Początkowo do obserwacji włączono populację 149 pacjentów u których zdecydowano wykonać zabieg CABG z użyciem IMA, spośród tej grupy u 6 pacjentów w trakcie zabiegu użyto fragmentu żyły odpiszczelowej, u 11 zabieg wykonany był ze wskazań pilnych, 2 pacjentów wykluczono z powodu aktywnej lub leczonej w czasie 5 lat choroby nowotworowej, 2 z powodu przewlekłych schorzeń zapalnych, 1 z powodu niedawno przebytego udaru lub krwawienia podpajęczynówkowego, 2 z powodu schyłkowej niewydolności nerek i 1 z powodu przebytego w ciągu 2 miesięcy innego zabiegu operacyjnego (pacjent operowany z powodu powikłań po zabiegu). W przypadku dalszych 16 pacjentów otrzymany fragment tkankowy był zbyt mały lub fragment naczynia rozcięty co wykluczyło poddanie go dalszej analizie. Pacjenci byli rekrutowani do badania w Klinice Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II. Badanie uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej UJ CM, a od chorych uzyskano uświadomioną zgodę.

Stworzona została baza danych klinicznych pacjenta, w której analizowane były czynniki ryzyka i predykcje rozwoju miażdżycy oraz nadciśnienia oraz dane demograficzne. Oceniano charakter dolegliwości pacjentów oceniając je jako stabilna choroba wieńcowa wg skali CCS (93). Z badania wykluczeni zostali pacjenci z czynnym procesem zapalnym, chorobami układowymi, procesami nowotworowymi czynnymi lub stwierdzanymi w wywiadzie w okresie poprzedzających 5 lat. Z badania wykluczeni zostali również chorzy operowani z powodu wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego w ostatnich 2 miesiącach oraz udaru lub krwotoku podpajęczynówkowego w ostatnich 2 miesiącach oraz przyjmujący leki o działaniu immunosupresyjnym i ze schyłkową niewydolnością nerek.

3.2 Ocena czynników ryzyka miażdżycy

W badanej grupie pacjentów analizowano dane obejmujące najważniejsze parametry kliniczne charakteryzujące miażdżycę, obejmujące między innymi:

- wartości ciśnienia tętniczego krwi a w podgrupie wyniki 24 h badania ciśnienia metodą Holtera;
- wskaźnik masy ciała, obwód pasa;
- poziom glikemii;
- lipidogram;
- czas palenia papierosów w przeliczeniu na paczkołata
- badanie koronarograficzne oraz echokardiograficzne serca;

Monitorowane było także leczenie farmakologiczne pacjentów.

Otyłość definiowana była jako wskaźnik masy ciała BMI $>30 \text{ kg/m}^2$; nadwaga BMI 25-29,9 kg/m^2 . Pacjenci aktualnie palący lub ci, którzy relacjonowali porzucenie nałogu w okresie krótszym niż miesiąc traktowani byli jako aktualnie palący. Pacjenci kategoryzowani byli do grupy cierpiącej z powodu cukrzycy jeśli podawali w wywiadzie leczenie z tego powodu, jeżeli zażywali leki hipoglikemizujące lub glikemia na czczo przekraczała 7,0 mmol/L. Dyslipidemia była stwierdzana na podstawie wywiadu lub nieprawidłowości lipidogramu ze stężeniem LDL $> 2,6 \text{ mmol/L}$, HDL $< 1,0 \text{ mmol/L}$ u mężczyzn i $< 1,3 \text{ mmol/L}$ u kobiet, TG $> 1,7 \text{ mmol/L}$ po 12 godzinach od spożycia posiłku (94). Nadciśnienie rozpoznawano na podstawie wywiadu i wyniku ambulatoryjnego pomiaru ciśnienia tętniczego krwi manometrem rtęciowym po 5 minutowym spoczynku i definiowano jako wartości przekraczające 140/90 mm Hg. Pomiaru dokonywano podczas badania mającego na celu uzyskanie zgody pacjenta na udział w badaniu. Nasilenie choroby oceniano angiograficznie i kwalifikowano jako choroba 1,2 lub 3-naczyniowa.

W podgrupie 55 pacjentów włączonych do badania dokonywano 24 godzinnego ambulatoryjnego pomiaru ciśnienia tętniczego krwi.

3.3 Próbkki tkankowe

Próbki do badań pozyskiwane były, po uzyskaniu zgody pacjenta, w trakcie operacji pomostowania aortalno-wieńcowego z użyciem graftu tętnicy piersiowej wewnętrznej (IMA). Fragmenty tłuszczu okołonaczyniowego pobierane były z nad tętnicy wieńcowej ze zwężeniem krytycznym – najczęściej gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej. Pobierano także fragment tłuszczu podskórnego z tkanki tłuszczowej podskórnej nadbrzusza. Odcinany przez chirurga jako bezużyteczny, dystalny fragment tętnicy IMA pobrany był wraz z powięzią oraz okołonaczyniową tkanką tłuszczową przed miejscowym podaniem leków naczyniorozkurczowych takich jak papaweryna. Próbkki pobierane są z użyciem techniki unikającej uszkodzenia naczynia (*no-touch technique*).

Próbki te oraz próbka krwi pobrana na skrzep i EDTA transportowane były do laboratorium na lodzie w buforze Krebs-Hepes w ciągu godziny od pozyskania. Dalszy proces pozyskania krążków naczyniowych obejmował odpreparowanie powięzi, fragmentów tłuszczu okołonaczyniowego oraz podział na 3 mm pierścienie przy użyciu narzędzi mikrochirurgicznych oraz mikroskopu. Do momentu rozpoczęcia doświadczenia tętnice były zanurzone w schłodzonym buforze Krebs-Hepes (KH_2P_4 1,17 mM; NaHCO_3 14,8 mM; MgSO_4 1,17 mM; KCl 3,75 mM; CaCl_2 2,1 mM; NaCl 130 mM; Hepes 10,0 mM; Glukoza 10,4 mM). Fragmenty tkanki tłuszczowej poddane zostały dalej trawieniu przy użyciu metody z użyciem buforu zawierającego enzymy proteolityczne (kolagenazę typu XI, 125 jednostek/ml; kolagenazę typu I, 450 jednostek/ml, hialuronidazę typu IV S, 60 jednostek/ml w buforze PBS zawierającym 20 mM HEPES, w temperaturze 37°C). Zawiesina komórek była następnie uzyskana z użyciem nylonowej siatki o średnicy porów 70 μm (Strainer, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Komórki były następnie dwukrotnie przemyte schłodzonym buforem PBS z 1 % stężeniem surowicy cielęcej i odwirowane w wirówce (400g przez 6 min).

Następnie dokonano zliczenia ilości uzyskanych komórek w komorze Bürkera i podzielono tę liczbę przez masę próbki w celu otrzymania bezwzględnej liczby komórek na miligram tkanki badanej.

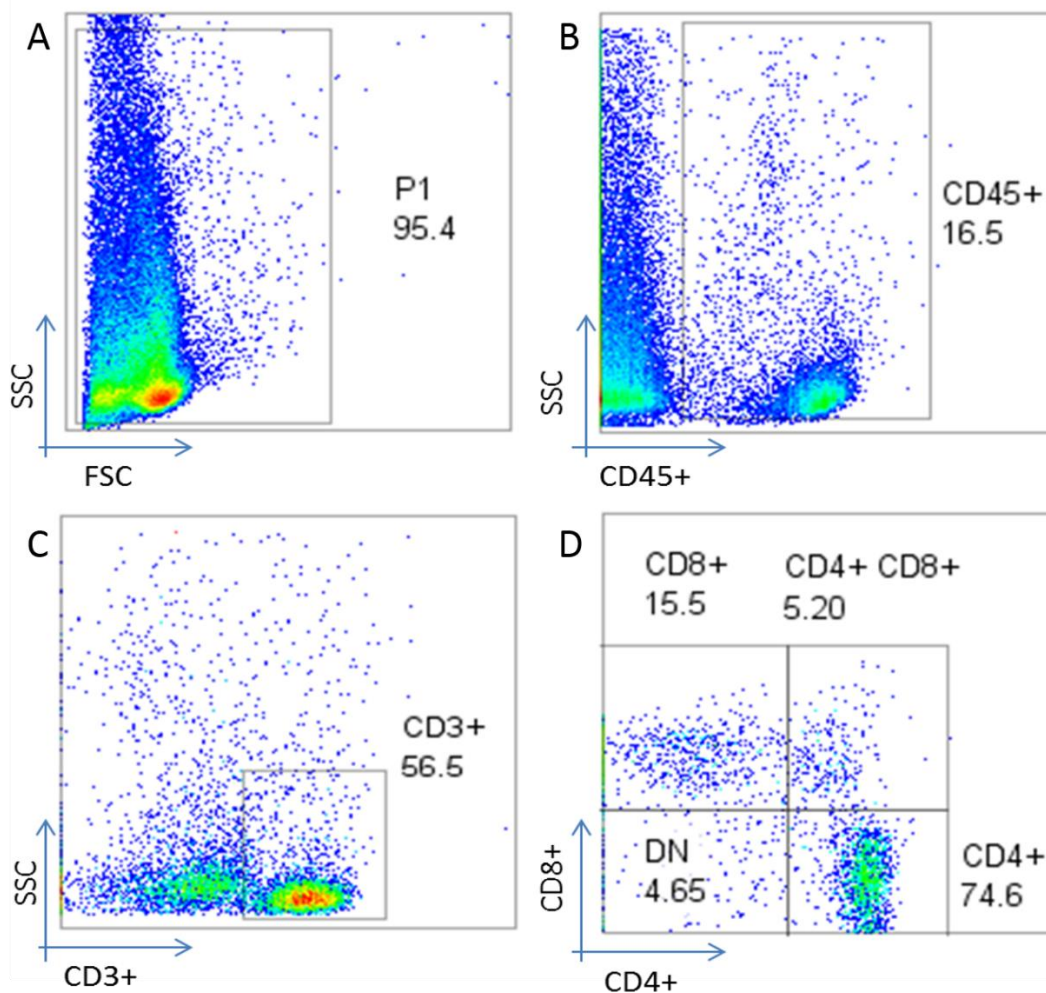
3.4 Cytometria przepływowa

Uzyskana peletka komórek po przemyciu była zawieszana ponownie w buforze PBS z 1 % stężeniem surowicy cielęcej i inkubowana ze przeciwciałami sprzęgniętymi z fluorochromem w temperaturze 4°C przez 20 min w celu wyznakowania subpopulacji limfocytarnych. Analizowano nacieki leukocytarne we frakcji stromalnej komórek, będącej frakcją komórkową tkanki tłuszczowej po odwirowaniu adipocytów metodą wirowania. Frakcja ta zawiera komórki pochodzące z przegród łącznôtankowych, złożoną z komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (CD44+, CD 90+, CD 105+; CD45-) i komórek ściany naczyń. Przygotowana zawiesina komórek była badana z użyciem cytometru FACSCanto II (BD Biosciences, USA) a uzyskane wyniki analizowane w programie FACSDiva. Stosowano przeciwciałami skierowane przeciwko markerom powierzchniowym leukocytów: CD4-APC, CD8-APC-H7, CD45-FITC, CD3-PerCP, CD25-PE, CD28-APC, CCR5-PE, CCR7-PE-Cy7, CD45Ra-PE, HLA-DR-PE-Cy7. Jednocześnie analizowano ekspresję 6 antygenów różnicowania komórkowego. Jako podstawowy zastosowano panel złożony z przeciwciał znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi (Tab. 2): CD45-FITC, CD3-PerCP, CD4-APC, CD8-APC H7, HLA-DR PE-Cy7, CCR5-PE (BD Biosciences, USA). Na podstawie obecności specyficznych markerów wyodrębniane były populacje limfocytów i przedstawiane jako odsetek oraz ilość komórek / mg tkanki.

Analizowano populacje limfocytów CD4+ oraz CD8+, obecnych w tkance tłuszczowej podskórnej oraz okołonaczyniowej IMA i proksymalnej części tętnicy gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej (LAD), w aspekcie pozagrasiczego dojrzewania limfocytów w podgrupie pacjentów, w której dostarczone fragmenty tkankowe pozwoliły na uzyskanie odpowiedniej liczby komórek (> 100 tys) frakcji stromalnej pozwalającej na przeprowadzenie dodatkowych oznaczeń cytometrycznych (n=53).

Analizy subpopulacji limfocytów w aspekcie obecności markerów aktywacji przeprowadzono w podgrupie pacjentów, w której dostarczone fragmenty tkankowe pozwoliły na uzyskanie adekwatnej liczby komórek frakcji stromalnej pozwalającej na przeprowadzenie dodatkowych oznaczeń cytometrycznych.

Przykłady analizy cytometrycznej przedstawiono na Ryc. 3



Ryc. 3 Reprezentatywne wyniki analizy cytometrycznej zawiesiny komórek frakcji stromalnej tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej IMA. Panel A obrazuje rozdział komórek w zależności od wielkości i obecności ziarnistości w komórce (FSC, forward scatter; SSC, side-scattered light); Panel B obrazuje rozdział komórek po barwieniu przeciwciałem sprzężonym z fluorochromem FITC skierowanym przeciwko antygenowi CD45, wartość liczbową odpowiada odsetkowi komórek; Panel C obrazuje rezultat rozdziału komórek z obecnym antygenem powierzchniowym CD3 dzięki użyciu przeciwciała sprzężonego z innym fluorochromem (PerCP); Panel D obrazuje rozdział komórek CD3+ na subpopulacje z obecnym antygenem powierzchniowym CD4 i CD8 oraz komórek nie posiadających tych antygenów – komórki DN – *double negative*. (fluorochromy: CD4 – APC; CD8- APC-H7)

Tab. 2 Wykaz użytych przeciwciał w analizie cytometrycznej

Marker powierzchniowy	Fluorochrom
CD45	FITC
CD3	PerCP
CD4	APC
CD8	APCH7
HLA-DR	PeCy7
CD45Ra	PE
CD25	PE
CD28	APC
CCR5	PE
CCR7	PeCy7

3.5 Ocena funkcji śródbłónka naczyniowego

Oceniano *in vitro* metodą rejestrowania napięcia izometrycznego funkcję rozkurczową fragmentu tętnicy piersiowej wewnętrznej nie użytego do operacji pomostowania aortalno-wieńcowego w odpowiedzi na wzrastające dawki acetylocholino. Badano w ten sposób rozkurcz naczyń zależny od biodostępności tlenu azotu.

Ocena funkcji śródbłónka naczyniowego przeprowadzona była *ex vivo* za pomocą pomiaru rozkurczu izometrycznego metodą izolowanych krążków naczyniowych w łaźni wodnej (*organ-bath*). Fragment naczynia szerokości 2-3 mm został umieszczony w 5 ml buforu Krebsa-Henseleita z dodatkiem 10 μ M indometacyny celem zahamowania syntezy prostanoidów (KHB, 37°C, 120 mN NaCl; 4.7 mM KCl; 1.2 mM MgSO₄; 1.2 mM KH₂PO₄; 2.5 mM CaCl₂; 25 mM NaHCO₃ and 5.5 mM glukozy) i po 60 minutach adaptacji rozciągnięty do osiągnięcia przykurczu izometrycznego naczynia wynoszącego 20 mN (95). Następnie naczynie było przykurczone kilkakrotnie roztworem chlorku potasu (60 mM) w buforze KHB, aż do osiągnięcia porównywalnych przykurczów w dwóch kolejnych próbach a tak uzyskana siła skurczu uznana była za maksymalną (96). Naczynie, po kilkakrotnym przepłukaniu i uzyskaniu stabilizacji skurczu izometrycznego przez przynajmniej 30 min, było przykurczane wzrastającymi dawkami fenylefryny (10^{-9} – 10^{-2} M) do osiągnięcia 60-70% wartości maksymalnego skurczu naczynia. Funkcja rozkurczowa śródbłónka była badana poprzez pomiar rozkurczu naczyniowego w odpowiedzi na wzrastające stężenia Acetylocholino (10^{-9} – 10^{-5} M).

Następnie naczynie było ponownie przykurczane fenylefryną, dzięki której uzyskiwano 60-70% maksymalnego przykurczu i dodawano nieselektywny inhibitor syntazy tlenu azotu L-NAME (100 μ M/L). Zablokowanie wazodylatacyjnego wpływu produkcji NO powodowało dodatkowy przykurcz o około 15-20%. Kolejnym etapem było wykreślenie krzywej relaksacji zależnej od zewnętrznego donora NO (nitroprusydek sodowy; SNP; 10^{-9} – 10^{-5} M).

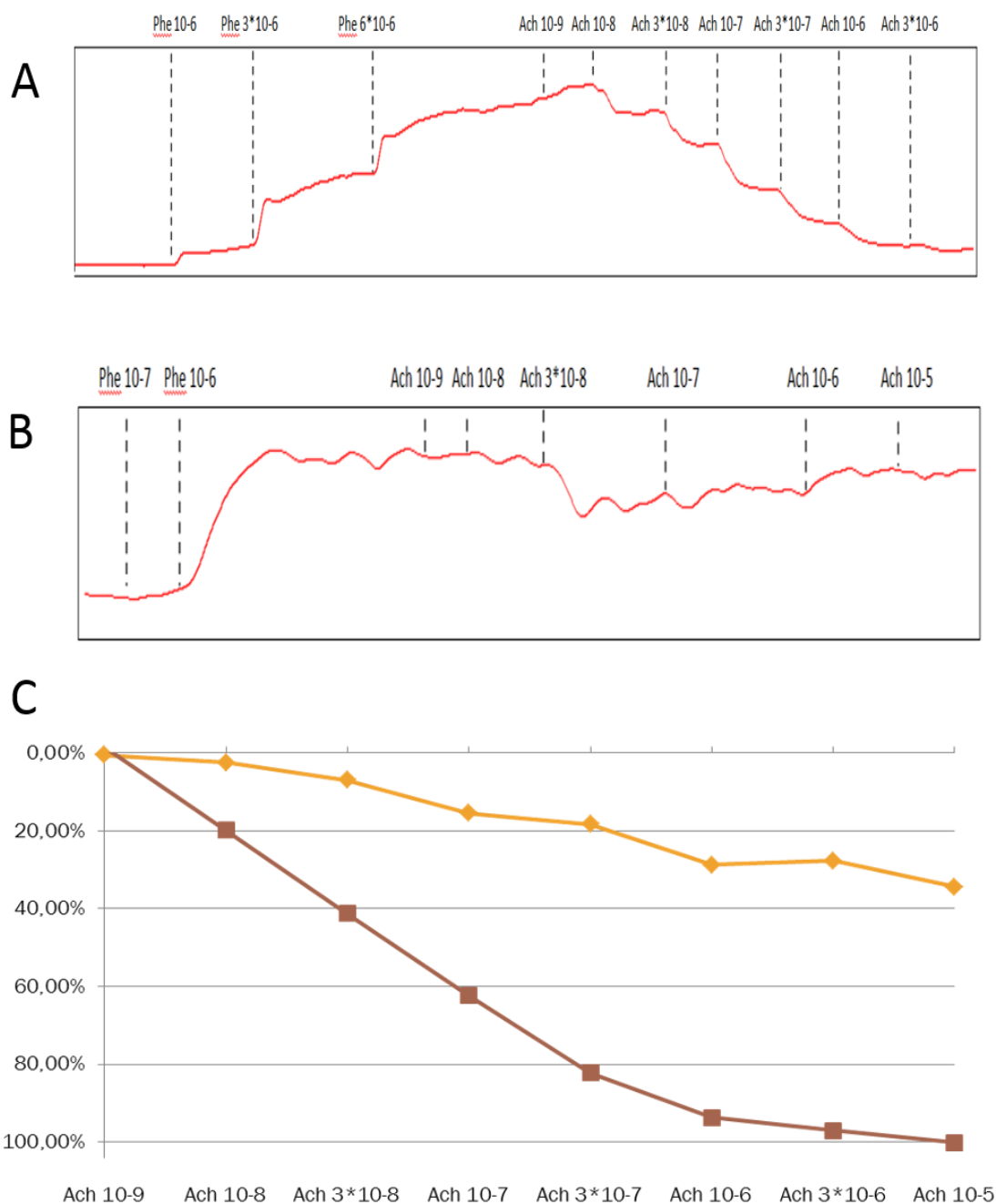
Doświadczenia wykonywane były w łaźni naczyniowej (Ryc. 4) złożonej z czterech cylindrycznych naczyń o pojemności 5 ml, w których na dwóch stalowych drucikach rozpięte jest badane naczynie krwionośne, zanurzone w buforze inkubacyjnym. Odpowiedni odczyn buforu oraz jego mieszanie było zapewnione przez stały przepływ mieszaniny gazów o składzie o składzie CO₂ 5%, O₂ 95% (Linde, Polska). Pomiar napięcia jest dokonywany przez połączony z jednym z drucików tensometr, a sygnał jest wzmacniany przez układ przetworników. Dane przetwarzane są z analogowych na cyfrowe przez układ akwizycji danych Biopac MP 100 oraz program Acqknowledge TM. Pomiarów dokonywano równolegle dla czterech pierścieni naczyniowych. Czas każdego doświadczenia u jednego pacjenta wynosił 7-11 godzin.



Ryc 4. Schemat łązni naczyniowej (*organ-bath*) z umieszczonym w ramionach tensometru krążkiem naczyniowym

3.5.1 Zasada obliczania wielkości skurczu lub rozkurczu naczyniowego

Skurcz maksymalny naczyń określony był jako siła wyrażona w mN wywierana na dźwignię tensometru po dodaniu do buforu inkubacyjnego roztworu KCl. Następnie uzyskiwano przykurcz przy użyciu fenylefryny do osiągnięcia 60-70% skurczu maksymalnego (skurcz submaksymalny). Wielkość rozkurczu po podaniu ACh była określona jako procent wyjściowego skurczu naczyń wywołanego fenylefryną (Ryc. 5). Relaksacja zależna od donorów NO (nitroprusydek sodowy; 10^{-9} – 10^{-5} M) stosowana była jako kontrola eksperymentu. Wszystkie eksperymenty były prowadzone w obecności inhibitora syntezy prostaglandyn (indometacyna, 10 μ mol/L), celem zminimalizowania rozkurczu naczyń zależnego od prostacykliny (97).



Ryc. 5 Przykładowy zapis rozkurczów wywołanych acetylocholiną dwóch naczyń: z prawidłową (panel A) i upośledzoną (panel B) funkcją śródbłonna. Naczynia przykurczano wstępnie fenylefryną (PE, typowo 3×10^{-6} M), a następnie podawano wzrastające dawki acetylocholiny. Odpowiedzi naczyń analizowano jako procent wstępnego skurczu (panel C)

3.6 Ocena produkcji anionorodnika ponadtlenkowego

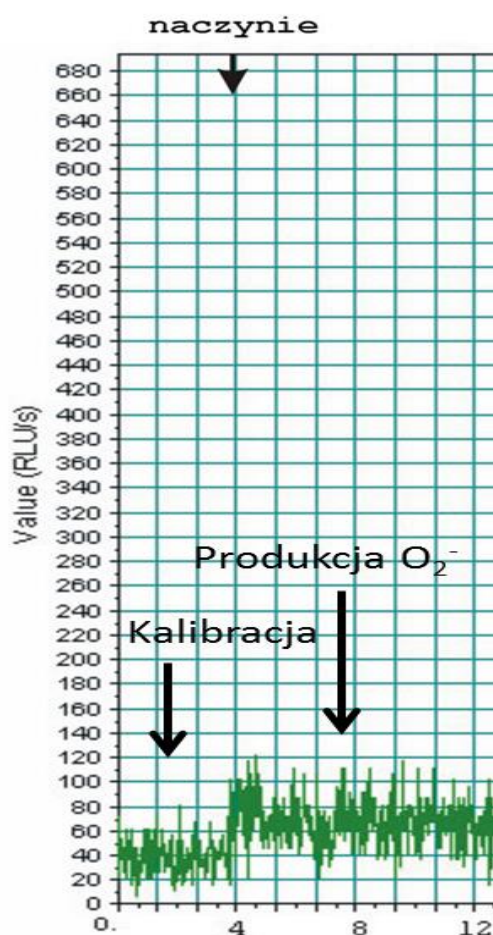
Jako wykładnik stresu oksydacyjnego była oznaczana produkcja anionorodnika ponadtlenkowego z fragmentu naczynia metodą chemiluminescencji zależnej od lucygeniny zgodnie z opisaną wcześniej metodyką (95, 98). Chemiluminescencja pomimo wprowadzenia nowych metod m. in. metody paramagnetycznego rezonansu elektronowego jest nadal najczulszym sposobem wykrywania anionorodnika ponadtlenkowego i w przypadku stosowania niskich stężeń lucygeniny ($5\mu\text{M}$) jest uznana za wiarygodną metodę (99). Dodatkową trudnością w użyciu metody EPR w badaniu jest konieczność homogenizacji tkanki oraz użycie kilkumiligramowej jej ilości (100). Lucygenina (Sigma, Wielka Brytania) jest barwnikiem akrydynowym 16 razy bardziej selektywnym w stosunku do anionorodnika ponadtlenkowego niż hydroksylowego i praktycznie nie wykrywa innych reaktywnych form tlenu (101). Metoda ta jest szczególnie użyteczna w badaniach całych fragmentów tkanki oraz pomiarach kinetyki wydzielania anionorodnika ponadtlenkowego w obecności specyficznych inhibitorów. Stosowanie niskich stężeń lucygeniny ($<50\mu\text{M}$) zapobiega sztucznemu generowaniu sygnału przez sam barwnik chemiluminescencyjny (tzw. *redox cycling*). Metoda ta była walidowana we wcześniej prowadzonych badaniach (102).

Fragmenty tętnicy piersiowej wewnętrznej w ciągu godziny od uzyskania, będące rozcięte podłużnie, były początkowo inkubowane w buforze KREBS-HEPES natlenianym mieszaniną gazów 95% O_2 / 5% CO_2 przez 30 minut w 37°C . Produkcja wolnych rodników oceniana była przez pomiar chemiluminescencji w buforze (2ml) zawierającym lucygeninę w niskim stężeniu ($5\mu\text{M}$). W trakcie pomiaru tła 18 ml naczynie scyntylicyjne (Beckmann) zawierające 2 ml $5\mu\text{M}$ stężenie lucygeniny było umieszczone w komorze pomiarowej luminometru do czasu uzyskania stałej w czasie wartości pomiaru (Ryc.6). Następnie mierzono podstawową produkcję wolnych rodników przez naczynie, po umieszczeniu go w roztworze lucygeniny, powierzchnią śródbłonna skierowaną w kierunku kamery luminometru. Naczynie było później suszone przez 24 h w temperaturze $45\text{--}50^\circ\text{C}$ i wazone na wadze miligramowej.

Wartość pomiaru wyrażona została w jednostkach względnych RLU (*relative light units/mg* suchej masy tkanki/ sek). Sucha masa próbki jest skorelowana z zawartością białka całkowitego, co pozwala na analizę porównawczą próbek. Pomiaru dokonywano

przy pomocy luminometru Berthold FB12, Niemcy. Wartość odczytywano po uzyskaniu stałej w czasie wartości pomiaru (*plateau*).

Pomiarów dokonywano w podgrupie pacjentów, w której wielkość dostarczonego fragmentu tętnicy piersiowej pozwoliły na przeprowadzenie dodatkowej analizy metodą chemiluminescencji (n=72).



Ryc. 6 Reprezentatywny przykład zapisu pomiaru chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5 μ M) we fragmencie naczynia tętniczego IMA. Fragment zapisu między czasem 0 a 4 minutą obrazuje poziom chemiluminescencji tła. Po dodaniu fragmentu naczynia do buforu chemiluminescencja osiąga wartości stałe (*plateau*) zależne od produkcji anionorodnika nadadtlenkowego w naczyniu krwionośnym.

3.7 Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki zostały opracowane statystycznie przy pomocy programu komputerowego Statistica 6.0 (StatSoft, Polska). Wyznaczone były statystyki opisowe jak: średnia arytmetyczna, mediana, wariancja, odchylenie standardowe oraz błąd standardowy. Rozkład normalny zmiennych był oceniany testem Kołomorova-Smirnova.

Określenie istotności różnic pomiędzy analogicznymi parametrami na poziomie $p < 0.05$

przeprowadzono stosując:

- test t dwustronny - dla par zmiennych zależnych i niezależnych, dla których wykazano rozkład normalny
- test Wilcoxona - dla par zmiennych zależnych, które nie uzyskały rozkładu normalnego
- metodę jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA) wraz z testem post hoc Bonferroni'ego. – dla porównania średnich w więcej niż dwóch grupach

Założenie analizy wariancji – równości wariancji w obrębie grup badano przy użyciu testu Levene'a, najmniej wrażliwego z testów na naruszenie założenia o jednorodności wariancji.

Krzywa zależności odpowiedzi wazorelaksacyjnej naczyń w odpowiedzi na podanie wzrastających dawek acetylocholino i SNP była porównywana w obrębie grup (teryli) przy zastosowaniu testu ANOVA dla powtarzanych pomiarów.

Siłę związku pomiędzy zmiennymi ciągłymi były oceniane metodą wyznaczenia współczynników korelacji liniowej Pearsona dla cech ilościowych i Spearmana dla zmiennych wyrażonych w skali porządkowej.

Dokonana została analiza istotności i wpływu badanych cech na określone czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy przy pomocy testów t-studenta, Wilcoxona, Mana-Whitneya, testu ANOVA dla powtarzanych pomiarów, analizy wielowymiarowej wariancji (MANOVA). Analizowano spełnienie założeń matematycznych testów.

Analiza korelacji będzie dokonywana z zastosowaniem analizy regresji wielorakiej ze sprawdzeniem założeń metodą analizy reszt. Określano współliniowość zmiennych zależnych wyznaczając nadmiarowe zmienne przez wyznaczenie współczynników tolerancji dla danej zmiennej ($1-R^2$). Sprawdzano założenie o rozkładzie normalnym reszt zmiennych modelu regresji liniowej testem Shapiro-Wilka. Oceniano brak autokorelacji składnika losowego testem Durбина-Watsona. Oceniano

homoscedastyczność wariancji, liniowości modelu, punkty odstające analizowano metodą odległości Cooka i Mahalanobisa.

Za statystycznie znamienne przyjmowano $p=0,05$. Dane charakteryzujące zmienne ciągłe zachowujące rozkład normalny przedstawiano jako średnia arytmetyczna $\pm$ błąd standardowy średniej (Mean $\pm$ SEM). Dane charakteryzujące zmienne ciągłe nie charakteryzujące się rozkładem przedstawiano jako mediana $\pm$ odchylenie ćwiartkowe.

4. WYNIKI

4.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów włączonych do badania

Do badania włączono 108 pacjentów poddanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego z powodu stabilnej choroby niedokrwiennej serca z użyciem graftu tętnicy piersiowej wewnętrznej (IMA). Większość z badanych chorych stanowili mężczyźni (84 pacjentów; 77,8%; Tab. 3). Operowani pacjenci byli w wieku od 29 rż do 80 rż a średnia wieku leczonych pacjentów to $63,7 \pm 9,2$ lat. Średni wiek rozpoznania choroby niedokrwiennej serca wynosił $56,9 \pm 11,6$ lat (Tab.3).

Tab. 3 Charakterystyka kliniczna pacjentów.

Pacjenci, n	108
Mężczyźni/Kobiety [n,%]	84/24; 77,8/22,2%
Wiek [lata]	$63,7 \pm 9,2$
Wiek rozpoznania choroby niedokrwiennej serca [lata]	$56,9 \pm 11,6$
Czynniki ryzyka	
Nadciśnienie, [n, %]	94 (87,1%)
Dyslipidemia [n, %]	86 (79,6%)
Palenie tytoniu obecnie / w przeszłości [n, %]	29/63 (26,9/58,3 %)
Cukrzyca [n, %]	37 (34,3%)
Nadwaga	85 (78,7%)
Otyłość	37 (34,3%)
Parametry kliniczne	
BMI, [kg/m²]	$28,5 \pm 3,9$
Obwód pasa [cm]	$93,8 \pm 11,5$
Ciśnienie średnie skurczowe 24 h pomiar [mm Hg]	$119,0 \pm 15,4$

Ciśnienie średnie rozkurczowe 24 h	69,1 ± 10,1
pomiar [mm Hg]	
Cholesterol całkowity [mmol/L]	4,76 ± 1,3
Poziom glikemii na czczo [mmol/L]	6,6 ± 2,0
Palenie (Paczkolata)	29,5 ± 17,5
Nasilenie choroby wieńcowej oceniane angiograficznie [n, %]	
Choroba jednonaczyniowa	4 (3,7%)
Choroba dwunaczyniowa	24 (22,2%)
Choroba trójnaczyniowa	80 (74,1%)

Obserwowano występowanie klasycznych czynników ryzyka miażdżycy w badanej populacji. Stwierdzano występowanie nadciśnienia tętniczego u 94 pacjentów (87,1%). Podwyższone wartości ciśnienia tętniczego krwi (>140/90 mm Hg) odnotowano u 63 pacjentów (58%). Nadwaga (BMI>25) występowała u 85 pacjentów (78,7%), otyłość (BMI>30) u 37 pacjentów (34,3%). Średnia wartość BMI wynosiła 28,5 ± 3,9. Oceniano także otyłość brzuszna – dokonywano pomiarów obwodu pasa i średnio wynosił on 93,8 ± 11,5 cm. Dyslipidemia była stwierdzona w przeszłości u 86 pacjentów (79,6%), większość pacjentów była leczona lekami hipolipemizującymi. Nieliczni pacjenci przyznawali się do palenia wyrobów tytoniowych obecnie – 29 pacjentów (26,9%), większy odsetek pacjentów palił w przeszłości – 63 osoby (58,3%). Cukrzycę rozpoznawano u 37 pacjentów (34,3%). Podwyższony poziom glikemii na czczo (>7 mmol/L) badany dzień przed zabiegiem chirurgicznym notowano u 19 pacjentów (17,6%) a zatem pacjenci ci nie spełniali kryteriów wyrównania cukrzycy z 2012 wg Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego.

W 24 godzinnym ambulatoryjnym pomiarze ciśnienie średnie skurczowe dobowe, wynosiło średnio 119,0 ± 15,4 mm Hg a ciśnienie średnie rozkurczowe 69,1 ± 10,1 mm Hg. Oszacowany poziom cholesterolu całkowitego wyniósł średnio 4,76 ± 1,3 mmol/L. Poziom glikemii na czczo dzień przed zabiegiem operacyjnym wyniósł średnio 6,6 ± 2,0 mmol/L.

Większość pacjentów poddanych zabiegowi CABG – 80 (74,1%) cierpiała z powodu zaawansowanej choroby wieńcowej skutkującej powstaniem zwężeń we wszystkich trzech głównych gałęziach tętnic wieńcowych – gałęzi okalającej lewej

tętnicy wieńcowej (Cx), gałęzi międzykomorowej przedniej (LAD) oraz prawej tętnicy wieńcowej (Rx) czyli tzw. choroby trójnaczyniowej. Grupę 24 (22,2%) pacjentów operowano z powodu choroby dwunaczyniowej, głównie z powodu zwężenia pnia lewej tętnicy wieńcowej. 4 pacjentów było operowanych w przypadku choroby wieńcowej z wytworzeniem istotnego zwężenia w jednej z głównej gałęzi tętnic wieńcowych – operowani z powodu niepowodzenia pierwotnie wykonanego zabiegu PCI lub zwężenia proksymalnego odcinka LAD.

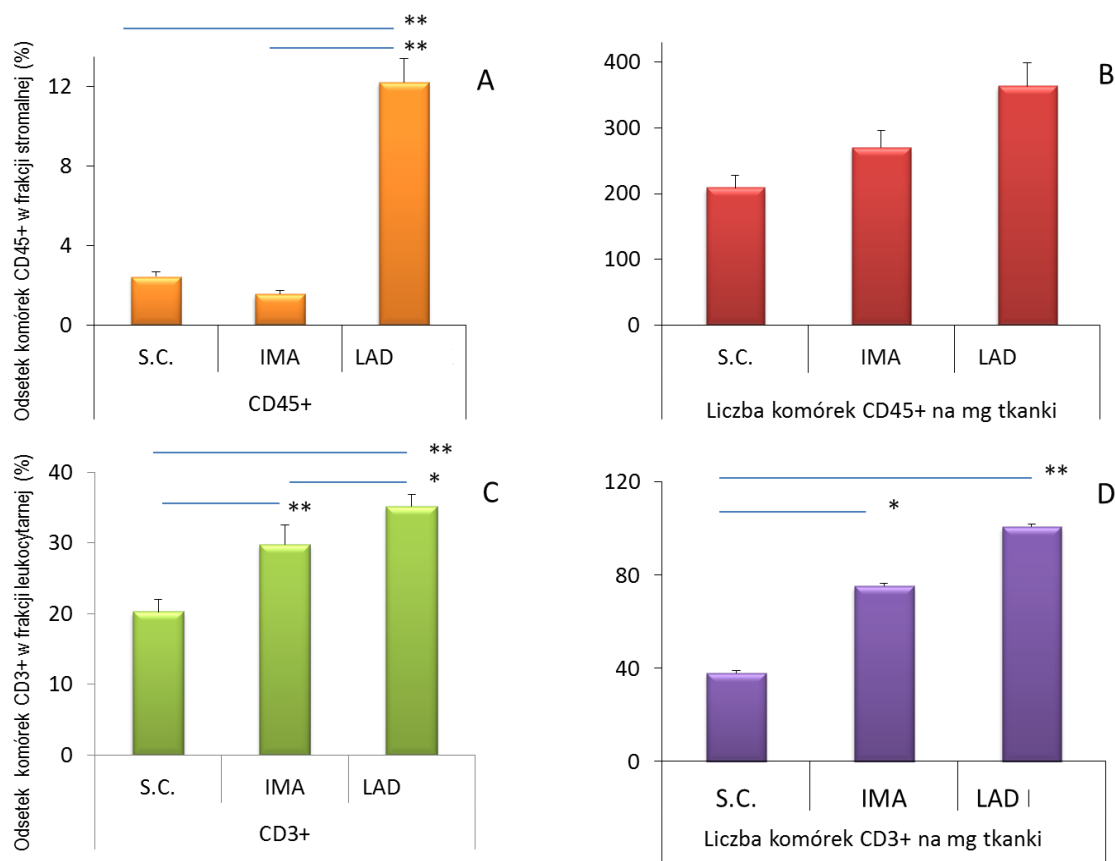
Pacjenci włączeni do badania zażywali leki stabilizujące blaszki miażdżycowe i hipolipemizujące takie jak statyny (Tab.4) - 88 pacjentów (81,5%), leki wpływające na remodeling mięśnia sercowego i obniżenie obciążenia następczego mięśnia sercowego – inhibitory konwertazy angiotensynowej (ACEI) lub blokery receptora angiotensynowego AT1 – u 88 (81,5%) pacjentów. β -blokery stosowane były u 87 pacjentów (80,6%). Aspirynę zażywało 96 pacjentów (88,9%). Oceniano także stosowanie blokerów wapniowych, leków przeciwcukrzycowych, insuliny, diuretyków, nitratów, blokerów receptora aldosteronowego.

Tab.4 Charakterystyka kliniczna pacjentów – zażywane leki

Leki [n, %]	
Statyny	95 (88,0%)
ACEI/ARB	88 (81,5%)
Blokery kanałów wapniowych	29 (26,8%)
β-blokery	87 (80,6%)
Diuretyki	18 (16,7%)
Blokery receptora aldosteronowego	17 (15,7%)
Nitraty	23 (21,3%)
Insulina	12 (11,1%)
Doustne leki hipoglikemizujące	25 (23,1%)
Aspiryna	96 (88,9%)

4.2 Analiza różnic w naciekach leukocytarnych w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej tętnicy wieńcowej dotkniętej miażdżycą, tętnicy piersiowej wewnętrznej i tkanki tłuszczowej podskórnej

Naciek leukocytarny wyrażany jako odsetek komórek frakcji stromalnej tkanki tłuszczowej, analizowanej po oddzieleniu adipocytów metodą wirowania, wykazuje podobieństwo pomiędzy tkanką tłuszczową podskórną i IMA PVAT ($2,4 \pm 0,22$, $1,6 \pm 0,15$; $p=NS$) (Ryc.7, panel A) W obrębie PVAT tętnicy dotkniętej procesem miażdżycowym LAD odsetek leukocytów jest istotnie wyższy – odpowiednio pięć i ośmiokrotnie wyższy w porównaniu do nacieku w IMA i tkance podskórnej ($12,21 \pm 1,2$; $p<0,001$). Różnice w przeliczeniu liczby komórek CD45+ na miligram tkanki są zauważalne ale nieistotne statystycznie (Anova; Ryc. 7, panel B).



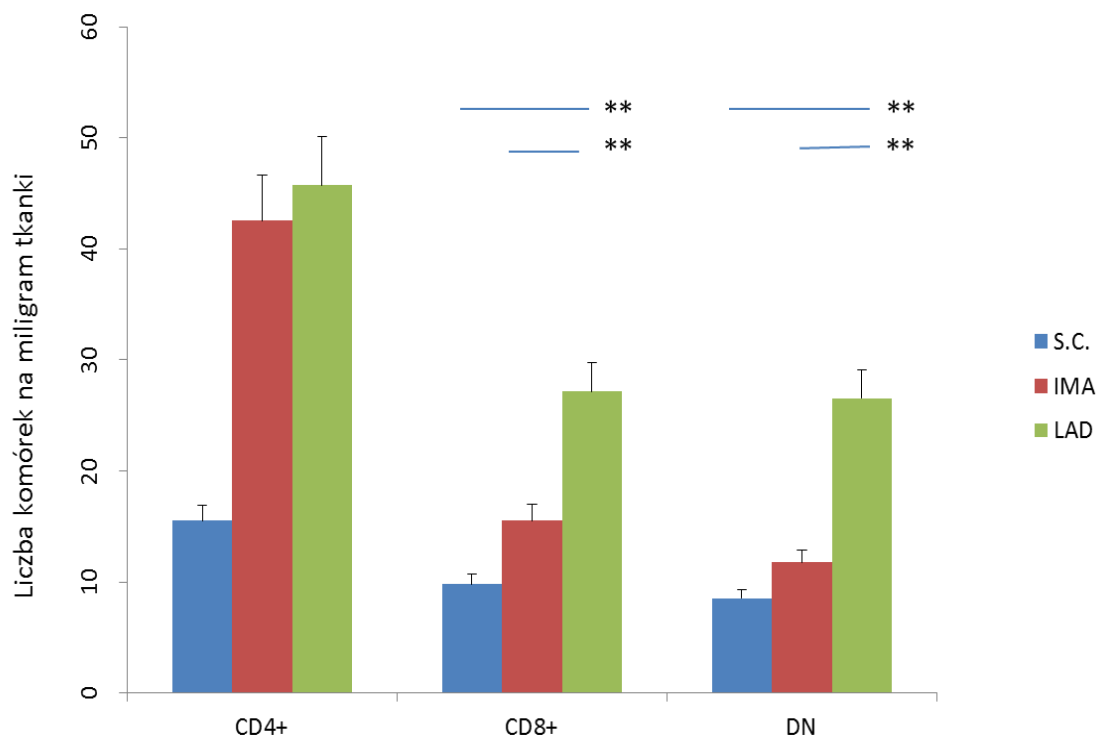
Ryc. 7 Charakterystyka nacieku leukocytarnego i limfocytarnego w tkance tłuszczowej podskórnej oraz okołonaczyniowej w naczyniach IMA i fragmencie LAD. **Panel A** obrazuje porównanie odsetku komórek CD45+ we frakcji stromalnej tkanki tłuszczowej podskórnej S.C.; tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej tętnicy IMA oraz tętnicy LAD. **Panel B** obrazuje naciek komórkowy wyrażony jako liczba komórek CD45+ / mg suchej tkanki tłuszczowej podskórnej S.C.; tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej tętnicy IMA oraz tętnicy LAD. **Panel C** obrazuje porównanie odsetku komórek CD3+ we frakcji leukocytów tkanki

tłuszczowej podskórnej S.C.; tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej tętnicy IMA oraz tętnicy LAD **Panel D** obrazuje naciek komórkowy wyrażony jako liczba komórek CD3+/ mg suchej tkanki tłuszczowej podskórnej S.C.; tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej tętnicy IMA oraz tętnicy LAD; ANOVA z poprawką Bonferroni'ego w porównaniu post hoc * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Naciek limfocytarny wyrażany jako odsetek wszystkich leukocytów (komórek CD45+) we frakcji stromalnej tkanki tłuszczowej wykazuje wzrastający odsetek komórek CD3+ porównując pomiędzy tkanką tłuszczową podskórną, IMA i LAD ($20,3 \pm 1,8$, $29,7 \pm 2,9$, $35,2 \pm 1,7$; $p < 0,001$ Anova; Ryc.7; panel C) Analizując różnice w ilości komórek CD3+ w przeliczeniu na miligram tkanki stwierdzono trzy i dwukrotnie zwiększony naciek w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej otaczających LAD i IMA w porównaniu z tkanką tłuszczową podskórną ($103,7 \pm 15,0$ vs $75,2 \pm 7,2$ vs $38,0 \pm 3,4$ komórek/mg suchej tkanki; $p < 0,01$; wartości porównań post hoc na wykresie, Ryc.7; panel D).

4.3 Analiza różnic w naciekach limfocytarnych w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej tętnicy wieńcowej dotkniętej miażdżycą, tętnicy piersiowej wewnętrznej i tkanki tłuszczowej podskórnej

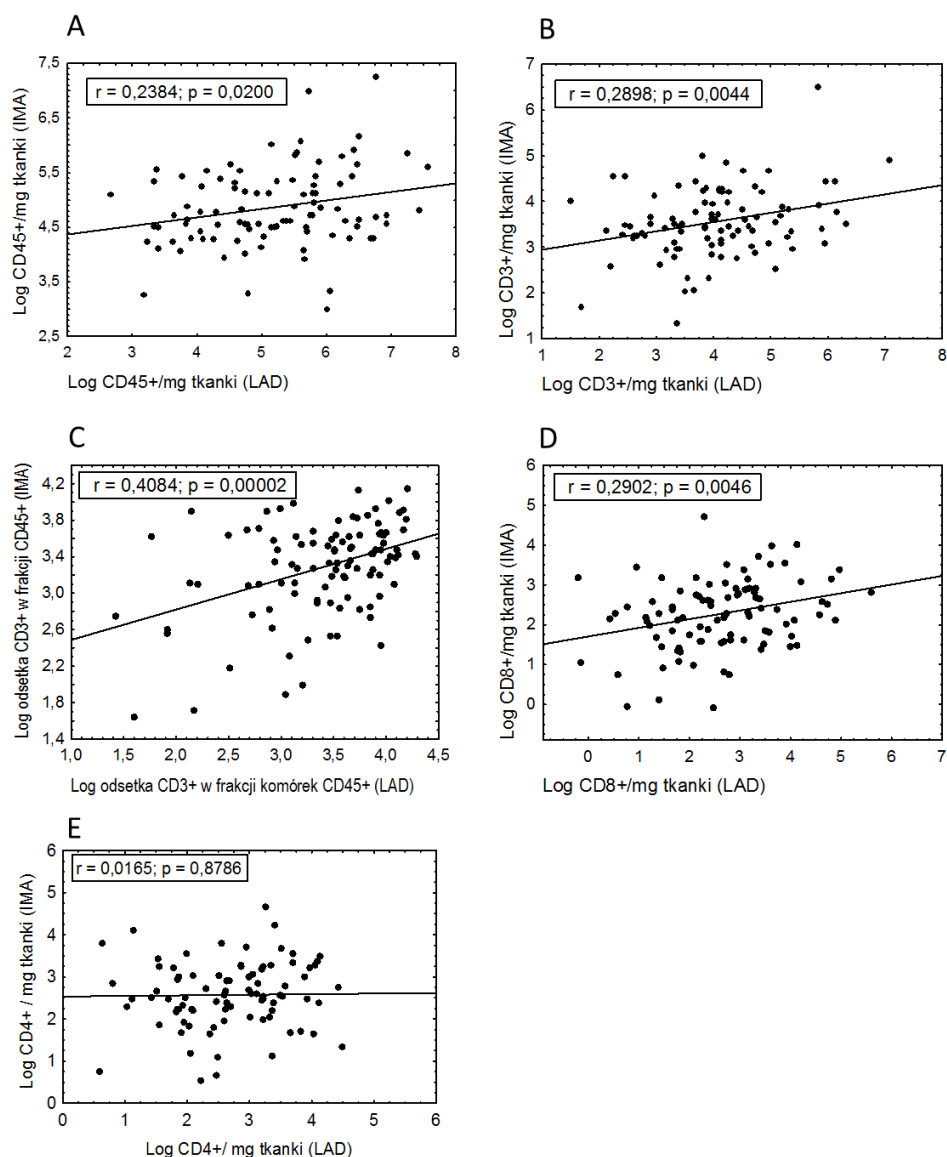
W aspekcie istotnych różnic w nacieku leukocytarnym obserwowanych w porównaniu tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej pochodzącej z naczynia dotkniętego procesem miażdżycowym (LAD) do naczynia wolnego od procesu miażdżycowego (IMA) i tkanki podskórnej analizowano różnice subpopulacji limfocytarnych naciekających tkankę tłuszczową okołonaczyniową (Ryc. 8). Zaobserwowano że w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej otaczającej naczynia wieńcowe dotknięte miażdżycą dochodzi do istotnego statystycznie prawie dwukrotnie zwiększonego nacieku komórek CD8+ w porównaniu z tkanką tłuszczową okołonaczyniową IMA ($27,2 \pm 3,7$ vs $15,5 \pm 2,1$ komórek/mg tkanki; $p < 0,01$) i prawie trzykrotnie w porównaniu z tkanką tłuszczową podskórną ($27,2 \pm 3,8$ vs $9,8 \pm 1,5$ komórek/mg tkanki; $p < 0,0001$). Podobne różnice stwierdzono rozpatrując naciek tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej złożony z komórek podwójnie negatywnych, w tkance tłuszczowej LAD obserwowano $26,5 \pm 5,0$ komórek/mg tkanki w porównaniu do $11,8 \pm 2,7$ komórek/mg tkanki w IMA ($p < 0,05$) i $8,6 \pm 0,9$ komórek/mg tkanki w tkance tłuszczowej podskórnej ($p < 0,001$).



Ryc. 8 Charakterystyka nacieku limfocytarnego w tkance tłuszczowej podskórnej oraz okołonaczyniowej w naczyniach IMA i fragmencie naczynia LAD. Rycina obrazuje naciek komórkowy wyrażony jako liczba komórek CD4+, komórek CD8+ i DN / mg suchej tkanki. ANOVA z poprawką Bonferroni'ego* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

4.4 Korelacja pomiędzy naciekiem limfocytarnym w tętnicy wieńcowej a IMA

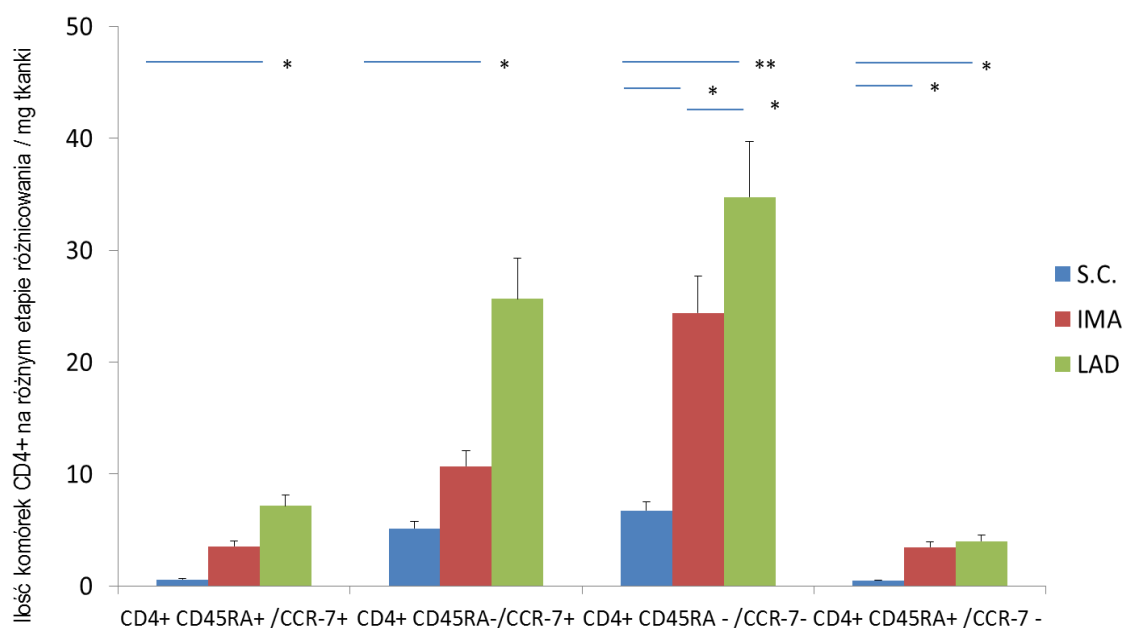
W celu określenia związku pomiędzy stopniem nacieku zapalnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej w obrębie naczyń dotkniętych procesem miażdżycowym LAD – naczyniach wieńcowych i naczyniach krążenia systemowego np. IMA, oceniano korelację pomiędzy naciekiem limfocytarnym i leukocytarnym w obu przestrzeniach naczyniowych (LAD i IMA, Ryc. 9) Zaobserwowano dodatnia korelację pomiędzy wielkością nacieku leukocytarnego ($r = 0,24$; $p < 0,05$), limfocytarnego ($r = 0,3$ $p < 0,01$) i ilości komórek CD8+ ($r = 0,3$ $p < 0,01$) wyrażonych jako liczba komórek danego typu / mg suchej tkanki w PVAT otaczającej naczynie dotknięte i wolne od procesu miażdżycowego – odpowiednio LAD i IMA. Może to wskazywać na uogólniony charakter stanu zapalnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej w populacji pacjentów poddawanych CABG z powodu choroby wieńcowej. Naciek limfocytów CD4+ nie był skorelowany we wspomnianych przestrzeniach tkankowych.



Ryc. 9 Analiza korelacji pomiędzy naciekami leukocytarnym i subpopulacjami limfocytarnymi w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej naczynia dotkniętego procesem miażdżycowym LAD i wolnym od miażdżycy IMA. **Panel A** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem leukocytarnym (komórki CD45+) wyrażonym jako liczba komórek / mg tkanki w LAD i IMA. **Panel B** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem limfocytarnym (komórki CD3+) wyrażonym jako liczba komórek / mg tkanki w LAD i IMA. **Panel C** obrazuje korelację pomiędzy odsetkiem komórek CD3+ z frakcji leukocytarnej tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej w LAD i IMA wyrażonych jako odsetek komórek CD45+. **Panel D** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD8+ wyrażonym jako liczba komórek / mg tkanki w LAD i IMA. **Panel E** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD4+ wyrażonym jako liczba komórek / mg tkanki w LAD i IMA.

4.5 Akumulacja limfocytów efektorowych i centralnych pamięci w naczyniach krwionośnych dotkniętych procesem miażdżycowym

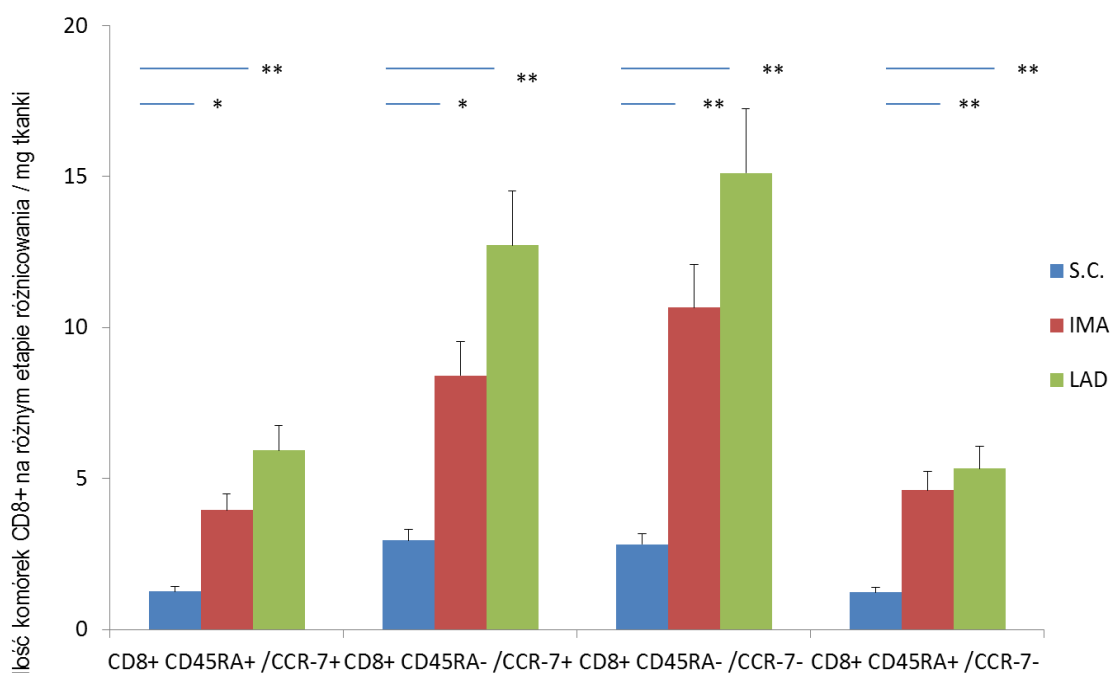
Podjęto próbę oceny dominujących populacji limfocytnych w różnych etapach dojrzewania pozagrasicznego zasiedlających tkankę tłuszczową okołonaczyniowej w różnych przedziałach tkankowych obejmujących tkankę tłuszczową okołonaczyniową z naczynia dotkniętego procesem miażdżycowym, naczynia wolnego od miażdżycy i tkanki tłuszczowej podskórnej (odpowiednio LAD, IMA, S.C.). Analizowano nacieki komórkowy poszczególnych subpopulacji limfocytnych na różnym etapie różnicowania pozagrasicznego wyrażony jako liczba komórek na mg tkanki. Zaobserwowano istotne różnice w ilości komórek centralnych pamięci (CD45RA-CCR7+) i efektorowych pamięci (CD45RA-CCR7-) w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej oraz tkance tłuszczowej podskórnej (Ryc.10).



Ryc. 10 Obrazuje ilość komórek CD 4+ wyrażonych jako liczba komórek / mg tkanki w poszczególnych etapach różnicowania w różnych kompartmentach tkankowych (tkanka tłuszczowa podskórna S.C., tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa IMA i LAD) wyrażonych jako liczba komórek/ mg tkanki. W kolejnych histogramach komórki naiwne (CD45RA+CCR7+), komórki centralne pamięci (CD45RA-CCR7+), komórki efektorowe pamięci, efektorowe o końcowym różnicowaniu (CD45RA+CCR7-) . ANOVA z poprawką Bonferroni'ego, * p<0,05 ** p<0,001;

W obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej pobranej z naczynia dotkniętego procesem miażdżycowym dochodzi do wyraźnej przewagi komórek centralnych pamięci CD4⁺ CD45RA⁻/CCR-7⁺ ($25,7 \pm 3,6$ komórek/mg tkanki) i efektorowych pamięci CD4⁺ CD45RA⁻/CCR-7⁻ ($34,8 \pm 4,9$ komórek/mg tkanki) nad ilością komórek naiwnych CD4⁺ CD45RA⁺/CCR-7⁺ ($7,1 \pm 1,0$ komórek/mg tkanki) i efektorowych o końcowym etapie różnicowania CD4⁺ CD45RA⁺/CCR-7⁻ ($4,0 \pm 0,56$ komórek/mg tkanki) (Ryc. 10). W obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej otaczającej IMA ta przewaga jest mniej silnie wyrażona: komórek centralnych pamięci CD4⁺ CD45RA⁻/CCR-7⁺ ($10,7 \pm 1,4$ komórek/mg tkanki) i efektorowych pamięci CD4⁺ CD45RA⁻/CCR-7⁻ ($24,4 \pm 3,3$ komórek/mg tkanki) , komórek naiwnych CD4⁺ CD45RA⁺/CCR-7⁺ ($3,6 \pm 0,48$ komórek/mg tkanki) i efektorowych o końcowym etapie różnicowania CD4⁺ CD45RA⁺/CCR-7⁻ ($3,5 \pm 0,47$ komórek/mg tkanki). W obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej IMA dochodzi do wyraźnej, ponad dwukrotnej przewagi ilości komórek efektorowych pamięci CD4⁺ CD45RA⁻ CCR7⁻ nad ilością komórek centralnych pamięci ($24,4 \pm 3,3$ vs $10,7 \pm 1,4$ komórek/mg tkanki Ryc. 10). W odniesieniu do populacji limfocytów CD8⁺ przewaga komórek efektorowych pamięci (CD45RA⁻CCR7⁻) nad populacją komórek centralnych pamięci nie jest tak wyraźna (Ryc. 11).

Obserwowano również istnienie istotny statystycznie zwiększony naciek komórek centralnych pamięci w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej otaczającej naczynie wieńcowe w porównaniu do IMA ($p < 0,05$, ANOVA z poprawką Bonferroniego).



Ryc. 11 Obrazuje ilość komórek CD 8+ wyrażonych jako liczba komórek / mg tkanki w poszczególnych etapach różnicowania w różnych kompartmentach tkankowych (tkanka tłuszczowa podskórna S.C., tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa IMA i LAD) wyrażonych jako liczba komórek/ mg tkanki. W kolejnych histogramach komórki naiwne (CD45RA+CCR7+), komórki centralne pamięci (CD45RA-CCR7+), komórki efektorowe pamięci, efektorowe o końcowym różnicowaniu (CD45RA+CCR7-) . ANOVA z poprawką Bonferroni’ego, * p<0,05 ** p<0,001;

W obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej LAD dochodzi do wyraźnej przewagi komórek centralnych pamięci CD8+ CD45RA-/CCR-7+ ($12,7 \pm 1,8$ komórek/mg tkanki) i efektorowych pamięci CD8+ CD45RA-/CCR-7-; ($15,1 \pm 2,1$ komórek/mg tkanki) nad ilością komórek naiwnych CD8+ CD45RA+/CCR-7+ ($5,3 \pm 0,84$ komórek/mg tkanki) i efektorowych o końcowym etapie różnicowania CD8+ CD45RA+/CCR-7- ($5,9 \pm 0,76$ komórek/mg tkanki) (Ryc. 11). W obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej otaczającej IMA ta przewaga jest mniej silnie wyrażona: komórek centralnych pamięci CD8+ CD45RA-/CCR-7+ ($8,4 \pm 1,1$ komórek/mg tkanki) i efektorowych pamięci CD8+ CD45RA-/CCR-7-; ($10,7 \pm 1,4$ komórek/mg tkanki) , komórek naiwnych CD8+ CD45RA+/CCR-7+ ($3,9 \pm 0,53$ komórek/mg tkanki) i efektorowych o końcowym etapie różnicowania CD8+ CD45RA+/CCR-7- ($4,6 \pm 0,62$ komórek/mg tkanki).

4.6 Zwiększony naciek limfocytny w PVAT związany jest z upośledzoną funkcją rozkurczową tętnicy piersiowej wewnętrznej

Populację pacjentów podzielono na tertyle w zależności od wielkości, wyrażonego w formie logarytmu dziesiętnego liczby komórek na mg tkanki, nacieku komórek zapalnych we frakcji stromalnej tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej tętnicy piersiowej wewnętrznej. Tertyle obejmowały równe populacje pacjentów z naciekiem wyrażonym jako naciek niski, średni lub wysoki. Rozkurcz naczynia analizowany był osobno w każdym tertyle metodą analizy wariancji (Anova dla powtarzanych pomiarów, Ryc 12).

W tabeli przedstawiono analizę demograficzną i kliniczną pacjentów podzielonych na tertyle w zależności od wielkości nacieku limfocytów CD8+ w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej IMA (Tab. 5 i Tab. 6). Analizowano populację 92 pacjentów w której to populacji uzyskano wszystkie dane kliniczne a uzyskany od pacjentów fragment IMA charakteryzował się dobrą funkcją wazomotoryczną. W tej populacji pacjentów uzyskano prawidłowy rozdział cytometryczny frakcji komórek podścieliska tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej. W populacjach pacjentów z wyższym naciekiem komórek CD8+ istotnie zwiększony był odsetek byłych palaczy. Poza tym czynnikiem nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy grupami pacjentów z niskim, średniowysokim i wysokim naciekiem limfocytów CD8+ w PVAT.

Tab. 5 Charakterystyka kliniczna pacjentów z podziałem na tertyle w zależności od wielkości nacieku PVAT IMA złożonego z komórek CD8+

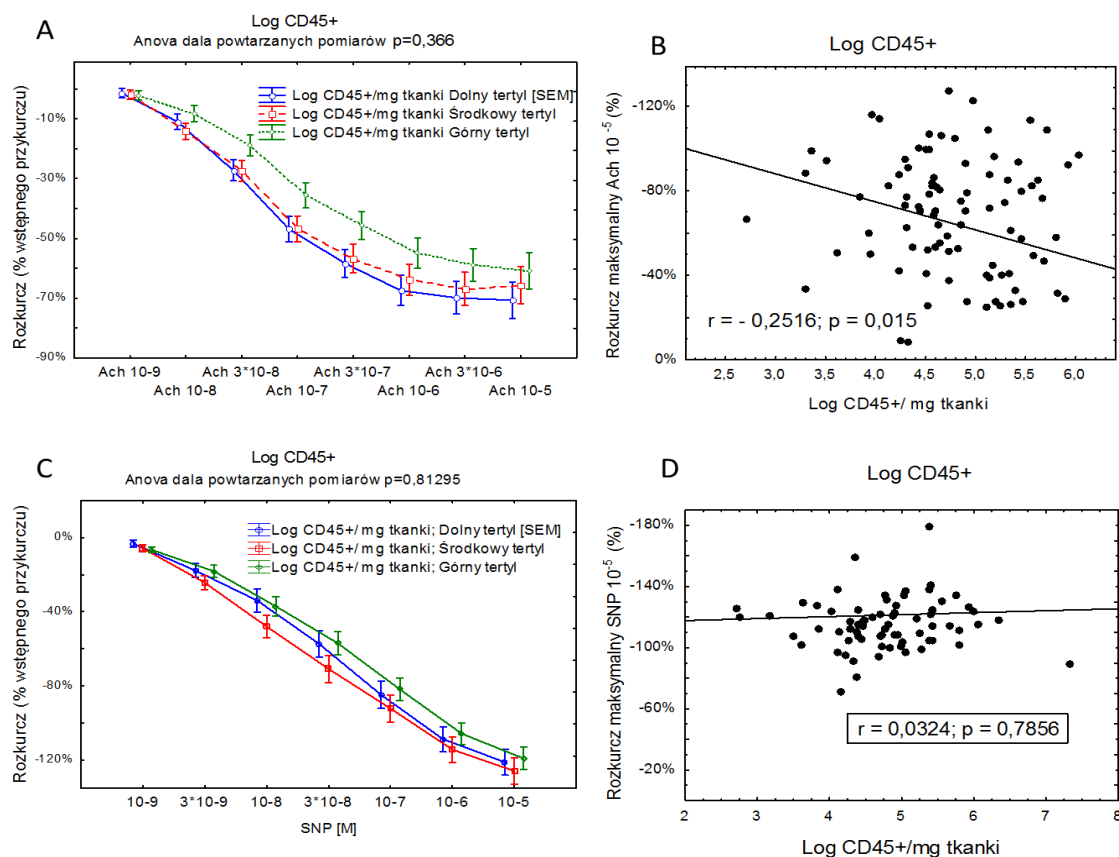
	Log CD8+ IMA(komórek /mg tkanki)			
	Tertyle			
	Dolny	Środkowy	Górny	
Pacjenci, n	31	30	31	P-value
Mężczyźni/Kobiety [n,%]	25/6 (80,6/19,4)	27/3 (90,0/10,0)	26/5 (83,9/16,1)	0,59
Wiek [lata]	62,4 ± 10,3	62,9 ± 8,8	64,7 ± 9,6	0,60
Wiek rozpoznania choroby niedokrwiennej serca [lata]	56,7 ± 12,4	55,4 ± 10,7	56,0 ± 2,4	0,92
Czynniki ryzyka				

Nadciśnienie, [n, %]	17 (54,9)	13 (43,3)	15 (48,4)	0,41
Dyslipidemia [n, %]	21 (67,7)	20 (66,7)	20 (64,5)	0,86
Palenie tytoniu obecnie / w przeszłości [n, %]	6/14 (19,4/45,2)	8/17 (26,7/56,7)	12/27 (38,7/87,1)	0,23/ 0,03
Cukrzyca [n, %]	12 (38,7)	16 (53,3)	8 (26,7)	0,09
Nadwaga	25 (80,6)	24 (80,0)	23 (74,2)	0,79
Otyłość	11 (35,5)	8 (26,7)	12 (38,7)	0,59
Parametry kliniczne				
BMI, [kg/m²]	28,6 ± 3,1	28,6 ± 3,6	28,3 ± 4,6	0,97
Obwód pasa [cm]	93,8 ± 9,3	95,0 ± 9,9	93,6 ± 13,7	0,92
Ciśnienie średnie skurczowe 24 h pomiar [mm Hg]	118,5 ± 10,9	123,0 ± 17,0	112,1 ± 15,9	0,12
Ciśnienie średnie rozkurczowe 24 h pomiar [mm Hg]	68,3 ± 7,4	72,1 ± 11,2	66,5 ± 8,1	0,19
Poziom cholesterolu całkowitego [mmol/L]	4,32 ± 1,15	4,57 ± 1,06	4,69 ± 1,49	0,76
Poziom glikemii na czczo [mmol/L]	6,52 ± 1,9	6,44 ± 1,5	7,3 ± 2,73	0,41
Paczkolata	23,7 ± 14,9	24,2 ± 16,2	33,9 ± 16,2	0,11
Nasilenie choroby wieńcowej oceniane angiograficznie [n, %]				0,28
Choroba jednonaczyniowa	1 (3,2%)	0 (0,0%)	1 (3,2%)	
Choroba dwunaczyniowa	6 (19,4%)	3 (10,0%)	9 (29,0%)	
Choroba trójnaczyniowa	24 (77,4%)	27 (90,0%)	21(67,7%)	

Tab. 6 Charakterystyka kliniczna pacjentów z podziałem na tertyle w zależności od wielkości nacieku PVAT IMA złożonego z komórek CD8+; przyjmowane leki

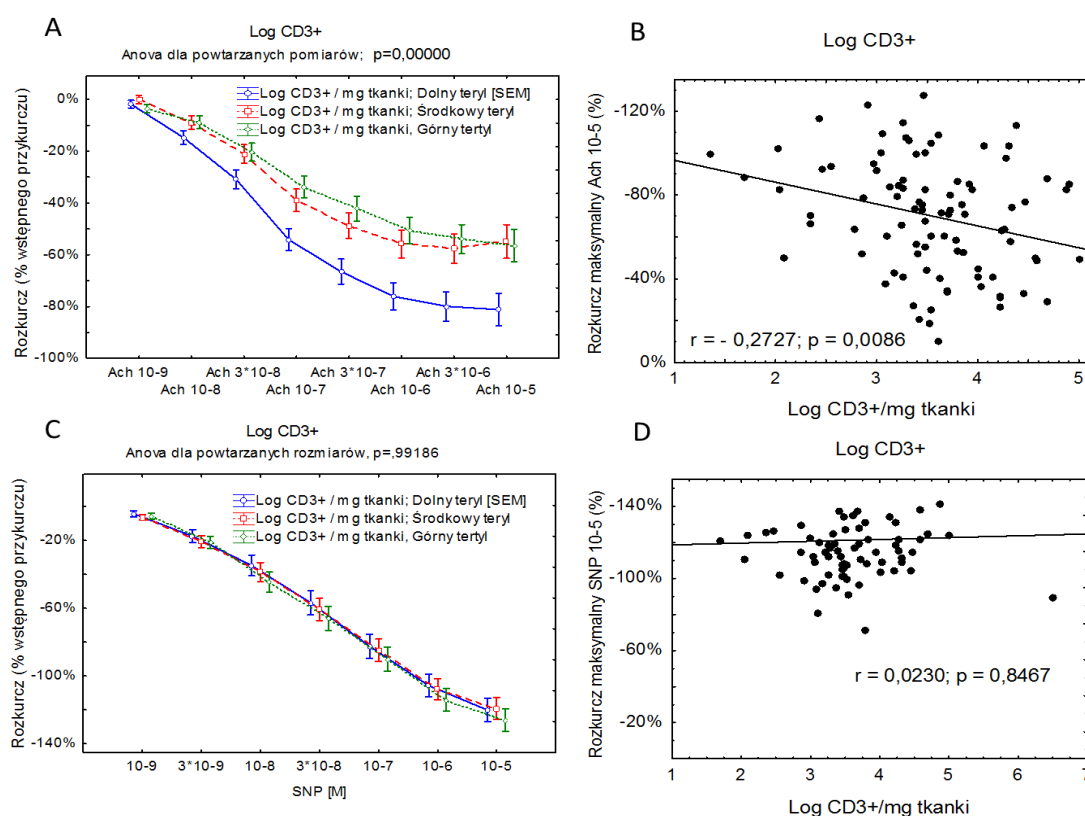
	Log CD8+ IMA(komórek /mg tkanki) Tertyle			P-value
	Dolny	Środkowy	Górny	
Leki [n, %]	31	30	31	
Statyny	27 (87,1%)	28 (93,3%)	26(83,9%)	0,69
ACEI/ARB	25 (80,6%)	25(83,3%)	25(80,6%)	0,30
β-blokery	25 (86,0%)	25 (83,3)	23(74,2%)	0,37
Aspiryna	31 (100%)	29 (96,7%)	28(90,3%)	0,54
Diuretyki	7 (22,6%)	7 (23,3%)	3 (9,7%)	0,52
Klopidogrel	9 (29,0%)	11 (36,7%)	10(32,2%)	0,41

Analizując rozkurcz krążków naczyniowych fragmentów tętnicy IMA w odpowiedzi na Ach u pacjentów należących do grup z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórek CD45+ nie zaobserwowano różnic w wartości rozkurczu metodą analizy wariancji metodą powtarzanych pomiarów ($p=NS$) w tych tertylach pacjentów (Ryc. 12 Panel A). Analizując wartość maksymalnego rozkurczu jako zmienną ciągłą metodą korelacji liniowej Pearsona w relacji z naciekiem tkanki PVAT, wyrażonej jako logarytm dziesiętny liczby komórek CD45+ na mg suchej tkanki, stwierdzono istnienie odwrotnej korelacji pomiędzy wielkością nacieku a wielkością maksymalnego rozkurczu naczynia ($r = - 0.25$; $p < 0,05$; Ryc. 12 Panel B). Nie zaobserwowano różnic w wielkości odpowiedzi wazorelaksacyjnej naczynia w odpowiedzi na nitroprusydek sodu w grupach pacjentów z niskim, średnio wysokim i wysokim naciekiem PVAT przez komórki CD45+ (Ryc. 12 Panel C). Nie stwierdzono też istnienia korelacji pomiędzy wielkością nacieku komórek CD45+ w PVAT IMA a maksymalnym rozkurczem w odpowiedzi na SNP (Ryc. 12 Panel D).



Ryc. 12 **Panel A** obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD45+ w PVAT (tertile odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki). Krążki naczyniowe były badane metodą rozkurczu izometrycznego w odpowiedzi na wzrastające stężenia Ach (10^{-9} - 10^{-5} M) – ANOVA dla powtarzanych pomiarów. **Panel B** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD45+ w PVAT IMA wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki a wielkością maksymalnego rozkurczu w odpowiedzi na 10^{-5} Ach. **Panel C** obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD45+ w PVAT (tertile odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki). Krążki naczyniowe były badane metodą rozkurczu izometrycznego w odpowiedzi na wzrastające stężenia nitroprusydku sodowego (SNP, 10^{-9} - 10^{-5} M); ANOVA dla powtarzanych pomiarów. **Panel D** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD45+ w PVAT IMA wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki a wielkością maksymalnego rozkurczu w odpowiedzi na 10^{-5} SNP

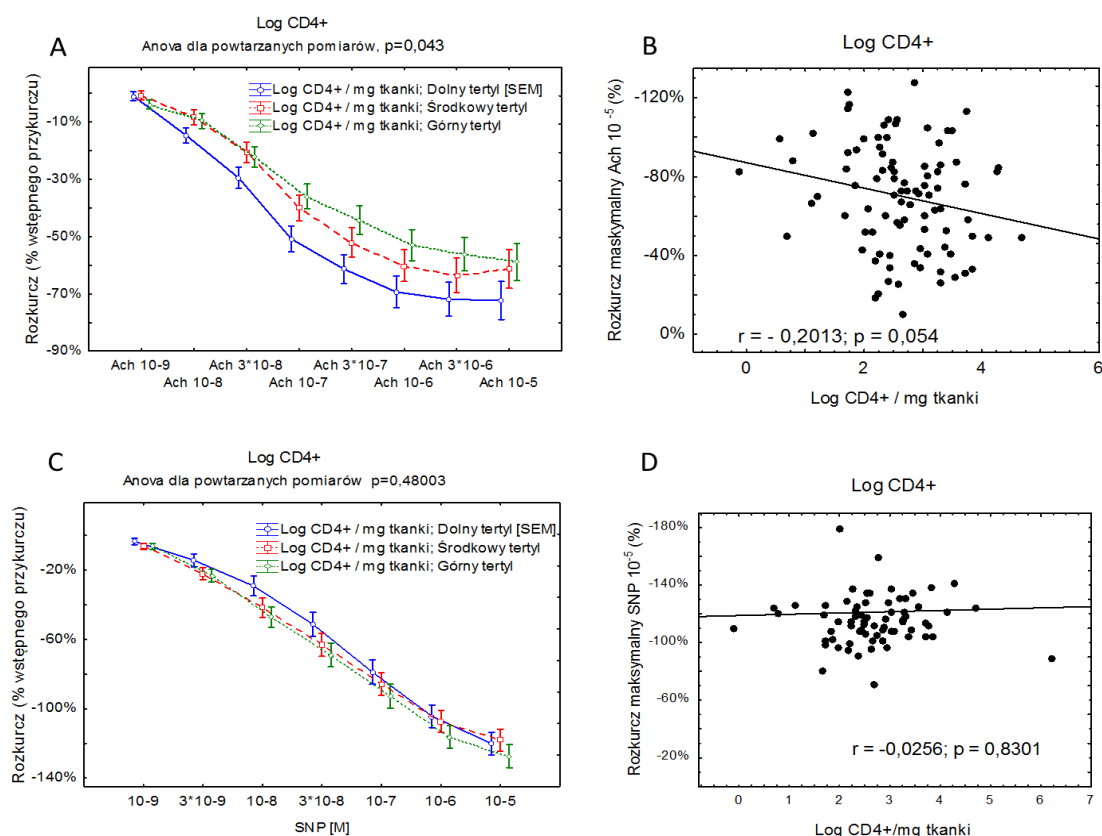
Analizując rozkurcz krążków naczyniowych fragmentów tętnicy IMA w odpowiedzi na Ach u pacjentów należących do grup z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórek CD3+ zaobserwowano istotną różnicę w wartości rozkurczu metodą analizy wariancji metodą powtarzanych pomiarów w tych tertylach pacjentów ($p < 0,0001$; Ryc. 13 Panel A). Analizując wartość maksymalnego rozkurczu jako zmienną ciągłą metodą korelacji liniowej Pearsona w relacji z naciekiem tkanki PVAT, wyrażonej jako logarytm dziesiętny liczby komórek CD3+ na mg suchej tkanki, stwierdzono istnienie odwrotnej korelacji pomiędzy wielkością nacieku a wielkością maksymalnego rozkurczu naczynia ($r = -0,3$; $p < 0,01$; Ryc. 13 Panel B). Nie zaobserwowano różnic w wielkości rozkurczu naczyń w odpowiedzi na nitroprusydek sodu w grupach pacjentów z niskim, średnio wysokim i wysokim naciekiem PVAT przez komórki CD3+ (Ryc. 13 Panel C). Nie stwierdzono też istnienia korelacji pomiędzy wielkością nacieku komórek CD3+ w PVAT IMA a maksymalnym rozkurczem w odpowiedzi na SNP (Ryc. 13 Panel D).



Ryc. 13 **Panel A** obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD3+ w PVAT (tertyle odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki). Krążki naczyniowe były badane metodą rozkurczu izometrycznego w odpowiedzi na wzrastające stężenia Ach

(10^{-9} - 10^{-5} M) – ANOVA dla powtarzanych pomiarów. **Panel B** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD3+ w PVAT IMA wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki a wielkością maksymalnego rozkurczu w odpowiedzi na 10^{-5} Ach. **Panel C** obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD3+ w PVAT (tertile odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki). Krążki naczyniowe były badane metodą rozkurczu izometrycznego w odpowiedzi na wzrastające stężenia nitroprusydku sodowego (SNP, 10^{-9} - 10^{-5} M); ANOVA dla powtarzanych pomiarów. **Panel D** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD3+ w PVAT IMA wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki a wielkością maksymalnego rozkurczu w odpowiedzi na 10^{-5} SNP

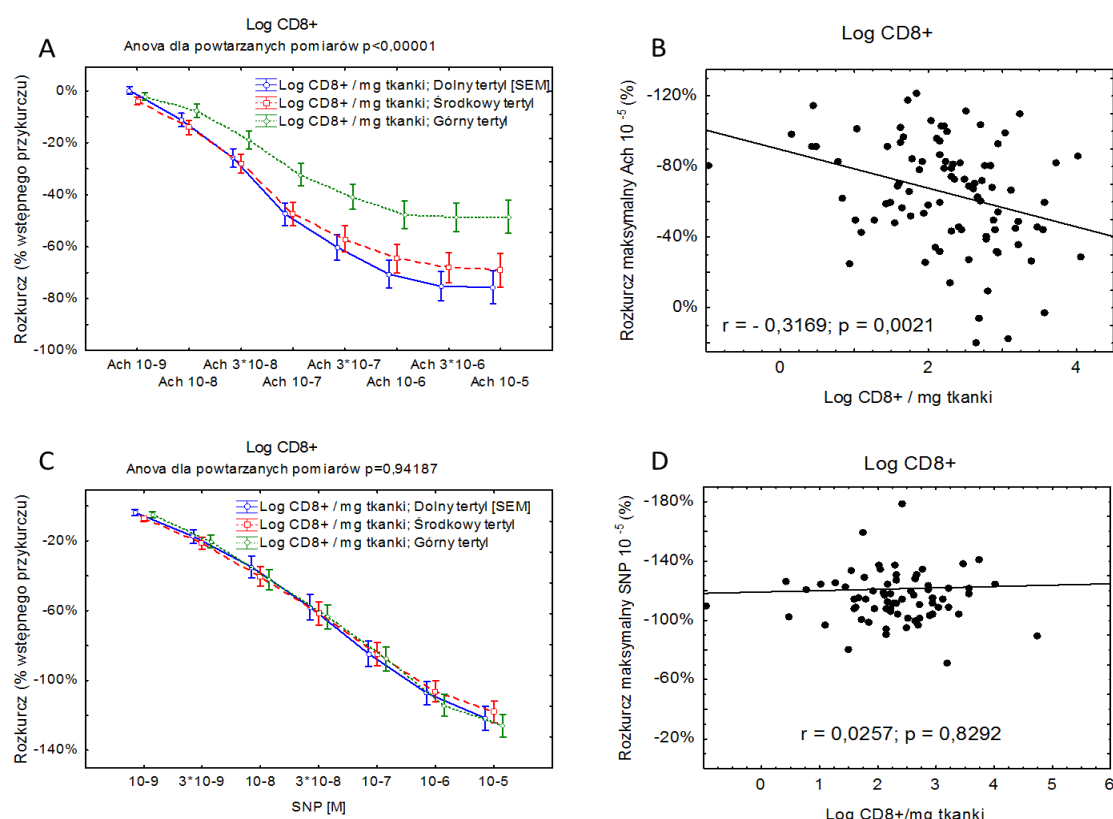
Analizując rozkurcz krążków naczyniowych fragmentów tętnicy IMA w odpowiedzi na Ach u pacjentów należących do grup z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórek CD4+ zaobserwowano istotną różnicę w wartości rozkurczu metodą analizy wariancji metodą powtarzanych pomiarów w tych terylach pacjentów ($p < 0,05$; Ryc. 14 Panel A). Analizując wartość maksymalnego rozkurczu jako zmienną ciągłą metodą korelacji liniowej Pearsona w relacji z naciekiem tkanki PVAT, wyrażonej jako logarytm dziesiętny liczby komórek CD4+ na mg suchej tkanki, nie stwierdzono istotnej odwrotnej korelacji pomiędzy wielkością nacieku a wielkością maksymalnego rozkurczu naczynia ($r = -0.20$; $p > 0,05$; Ryc. 14 Panel B). Nie zaobserwowano różnic w wielkości rozkurczu naczyń w odpowiedzi na nitroprusydek sodu w grupach pacjentów z niskim, średnio wysokim i wysokim naciekiem PVAT przez komórki CD4+ (Ryc. 14 Panel C). Nie stwierdzono też istnienia korelacji pomiędzy wielkością nacieku komórek CD4+ w PVAT IMA a maksymalnym rozkurczem w odpowiedzi na SNP (Ryc. 14 Panel D).



Ryc. 14 **Panel A** obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD4+ w PVAT (tertyle odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki). Krążki naczyniowe były badane metodą rozkurczu izometrycznego w odpowiedzi na wzrastające stężenia Ach (10^{-9} - 10^{-5} M) – ANOVA dla powtarzanych pomiarów. **Panel B** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD4+ w PVAT IMA wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki a wielkością maksymalnego rozkurczu w odpowiedzi na 10^{-5} Ach. **Panel C** obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD4+ w PVAT (tertyle odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki). Krążki naczyniowe były badane metodą rozkurczu izometrycznego w odpowiedzi na wzrastające stężenia nitroprusydku sodowego (SNP, 10^{-9} - 10^{-5} M); ANOVA dla powtarzanych pomiarów. **Panel D** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD4+ w PVAT IMA wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki a wielkością maksymalnego rozkurczu w odpowiedzi na 10^{-5} SNP

Analizując rozkurcz krążków naczyniowych fragmentów tętnicy IMA w odpowiedzi na Ach u pacjentów należących do grup z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórek CD8+ zaobserwowano istotną różnicę w wartości rozkurczu metodą analizy wariancji metodą powtarzanych pomiarów w tych tertylach pacjentów ($p<0,00001$; Ryc. 15 Panel A). Analizując wartość maksymalnego rozkurczu jako

zmienną ciągłą metodą korelacji liniowej Pearsona w relacji z naciekiem tkanki PVAT, wyrażonej jako logarytm dziesiętny liczby komórek CD8+ na mg suchej tkanki, stwierdzono istotną odwrotną korelację pomiędzy wielkością nacieku a wielkością maksymalnego rozkurczu naczynia ($r = -0.32$; $p < 0,01$; Ryc. 15 Panel B). Wartość tej korelacji była najsilniejsza z obserwowanych korelacji dla poszczególnych subpopulacji limfocytów w PVAT. Nie zaobserwowano różnic w wielkości rozkurczu naczyń w odpowiedzi na nitroprusydek sodu w grupach pacjentów z niskim, średnio wysokim i wysokim naciekiem PVAT przez komórki CD8+ (Ryc. 15 Panel C). Nie stwierdzono też istnienia korelacji pomiędzy wielkością nacieku komórek CD8+ w PVAT IMA a maksymalnym rozkurczem w odpowiedzi na SNP (Ryc. 15 Panel D).



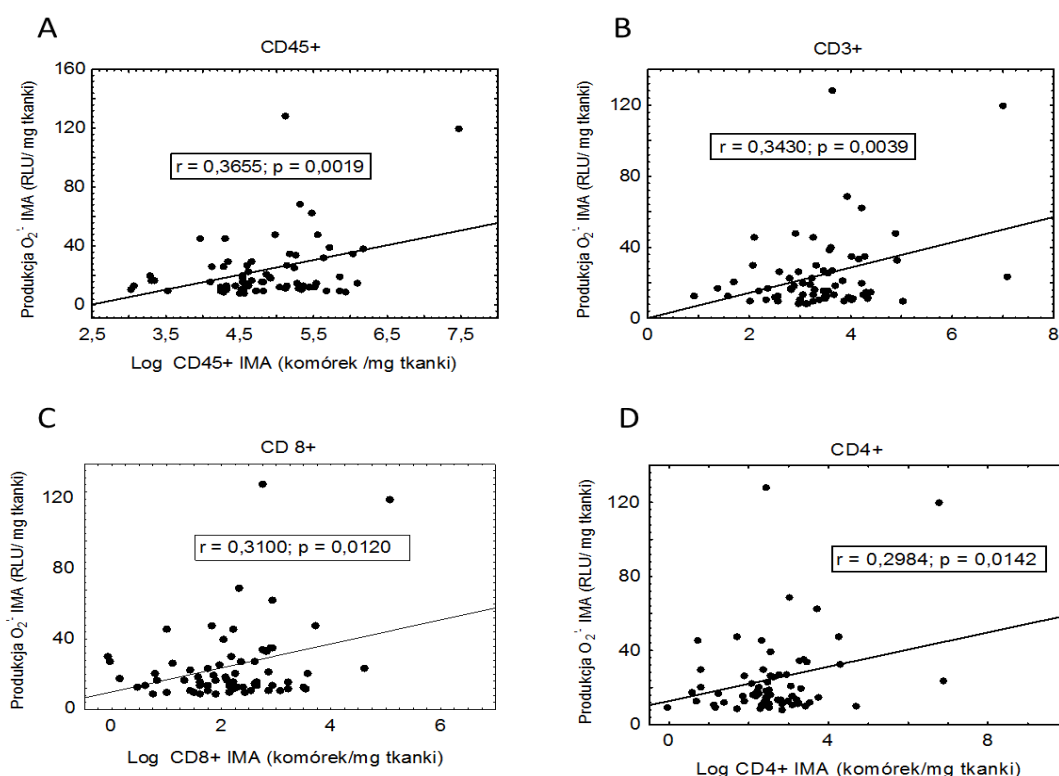
Ryc. 15 **Panel A** obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD8+ w PVAT (tertyłe odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki). Krążki naczyniowe były badane metodą rozkurczu izometrycznego w odpowiedzi na wzrastające stężenia Ach (10^{-9} - 10^{-5} M) – ANOVA dla powtarzanych pomiarów. **Panel B** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD8+ w PVAT IMA wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki a wielkością maksymalnego rozkurczu w odpowiedzi na 10^{-5} Ach. **Panel C** obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD8+ w

PVAT (tertile odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki). Krążki naczyniowe były badane metodą rozkurczu izometrycznego w odpowiedzi na wzrastające stężenia nitroprusydku sodowego (SNP, 10^{-9} - 10^{-5} M); ANOVA dla powtarzanych pomiarów. **Panel D** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD8⁺ w PVAT IMA wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki a wielkością maksymalnego rozkurczu w odpowiedzi na 10^{-5} SNP

4.7 Naciek limfocytny a produkcja anionorodnika ponadtlenkowego

Analizowano korelację pomiędzy naciekiem komórkowym PVAT tętnicy piersiowej wewnętrznej wyrażonej jako liczba komórek / mg suchej tkanki a produkcją anionorodnika ponadtlenkowego metodą chemiluminescencji zależnej od lucygeniny i wyrażonej w jednostkach względnych RLU / s /mg suchej tkanki (Ryc. 17).

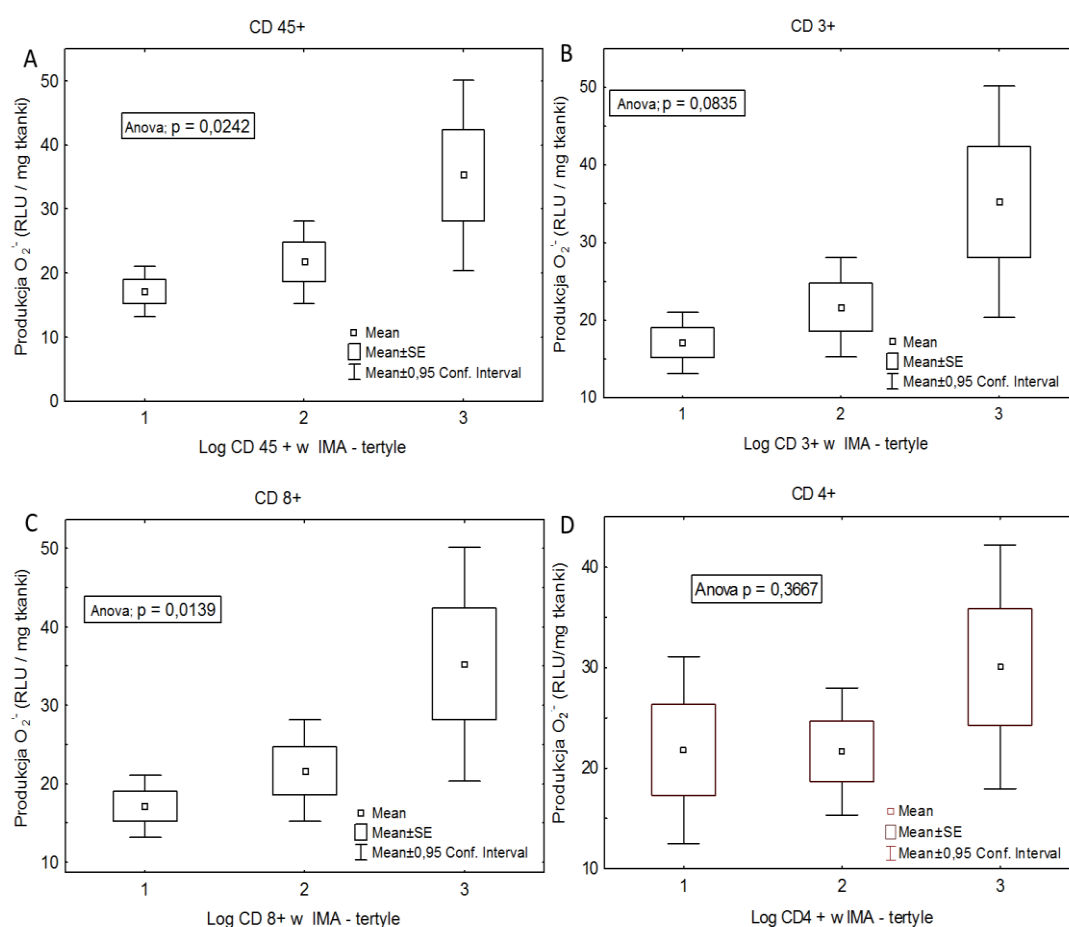
Zaobserwowano dodatnią korelację liniową pomiędzy wielkością nacieku komórek CD 45⁺ a produkcją anionorodnika ponadtlenkowego przez ścianę naczynia krwionośnego ($r = 0,37$; $p < 0,01$; Ryc. 16 Panel A). Podobnie wykazano korelację pomiędzy naciekiem komórek CD3⁺ a produkcją anionorodnika ponadtlenkowego ($r = 0,34$; $p < 0,01$; Ryc. 16 Panel B) wielkością nacieku złożonego z komórek CD8⁺ a produkcją tej reaktywnej formy tlenu ($r = 0,31$; $p < 0,01$; Ryc. 16 Panel C) oraz wielkością nacieku złożonego z komórek CD4⁺ a produkcją tej reaktywnej formy tlenu ($r = 0,29$; $p < 0,05$; Ryc. 16 Panel D)



Ryc. 16 **Panel A** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD45+ w PVAT IMA wyrażonego jako Log liczby komórek/ mg tkanki a wielkością produkcji anionorodnika nadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA. Wielkość produkcji wyrażona jest w jednostkach względnych (RLU)/sek/mg tkanki. **Panel B** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD3+ w PVAT IMA wyrażonego jako Log liczby komórek/ mg tkanki a wielkością produkcji anionorodnika nadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA. Wielkość produkcji wyrażona jest w jednostkach względnych (RLU)/sek/mg tkanki. **Panel C** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD8+ w PVAT IMA wyrażonego jako Log liczby komórek/ mg tkanki a wielkością produkcji anionorodnika nadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA. Wielkość produkcji wyrażona jest w jednostkach względnych (RLU)/sek/mg tkanki. **Panel D** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD4+ w PVAT IMA wyrażonego jako Log liczby komórek/ mg tkanki a wielkością produkcji anionorodnika nadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA. Wielkość produkcji wyrażona jest w jednostkach względnych (RLU)/sek/mg tkanki.

Zależność pomiędzy wielkością nacieku zapalnego a produkcją anionorodnika nadtlenkowego badano także metodą analizy wariancji. Oceniano różnice pomiędzy grupami pacjentów podzielonych na tertyle w zależności od wielkości nacieku odpowiednio komórek CD45+, CD3+ oraz CD8+. Zaobserwowano istotne statystycznie

różnice pomiędzy grupami pacjentów z niskim, średnio wysokim i wysokim naciekiem komórek CD45+ ($p < 0,05$; Ryc. 17 Panel A) Podobną zależność stwierdzono analizując nacieki komórek CD8+ w PVAT ($p < 0,05$; Ryc. 17 Panel C) . W teście post-hoc testem Fishera najmniejszych istotnych różnic (LSD Fisher test) wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą z niskim i wysokim naciekiem komórek CD45+ i CD 8+ (teteryl 1 i 3; $p < 0,01$ i $p < 0,01$) oraz pomiędzy grupą ze średnio wysokim i wysokim naciekiem złożonym z tych komórek (teteryl 2 i 3; $p < 0,05$). Nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupami pacjentów podzielonych względem wielkości nacieku limfocytami CD3+ i CD8+ (Ryc. 17 Panel B i Panel D).

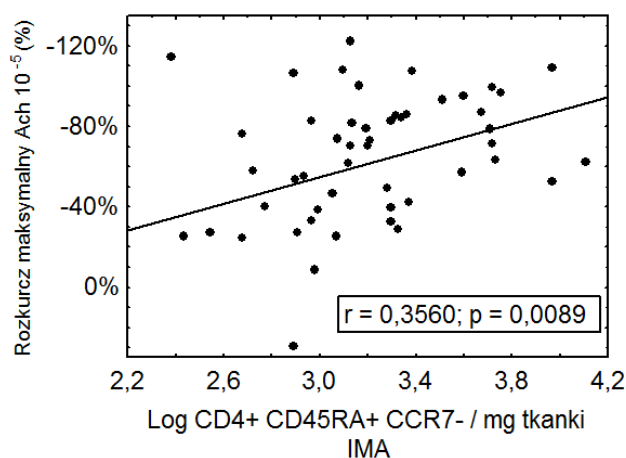


Ryc. 17 **Panel A** obrazuje zależność pomiędzy wielkością nacieku komórek CD45+ w PVAT IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym w PVAT (tertyle odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki) a wielkością produkcji anionorodnika nadadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA. ANOVA. **Panel B** obrazuje zależność pomiędzy wielkością nacieku komórek CD3+ w PVAT IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym w PVAT (tertyle odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki) a wielkością produkcji anionorodnika nadadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w

fragmencie naczynia IMA. ANOVA. **Panel C** obrazuje zależność pomiędzy wielkością nacieku komórek CD8+ w PVAT IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym w PVAT (tertile odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki) a wielkością produkcji anionorodnika ponadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA. ANOVA. **Panel D** obrazuje zależność pomiędzy wielkością nacieku komórek CD4+ w PVAT IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym w PVAT (tertile odzwierciedlające wartość Log wielkości nacieku wyrażonego jako liczba komórek/ mg tkanki) a wielkością produkcji anionorodnika ponadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA. ANOVA

4.8 Wpływ nacieku PVAT złożonego z limfocytów CD4+ efektorowych o końcowym etapie różnicowania na funkcję rozkurczową naczynia

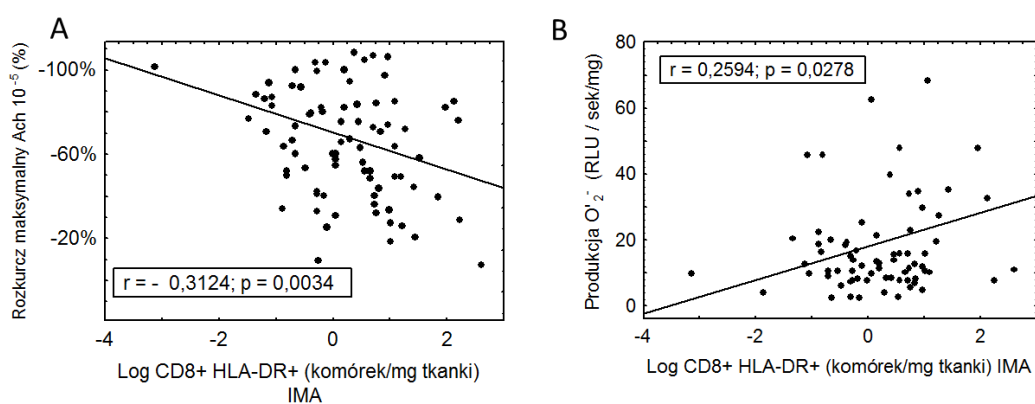
W celu określenia roli subpopulacji komórek w kolejnych etapach pozagracicznego dojrzewania w modulowaniu zależnej od biodostępności tlenu azotu wazorelaksacji naczynia IMA wykreślono krzywe korelacji liniowej i określono współczynniki korelacji Pearsona. Stwierdzono, że zwiększony naciek komórek CD4+ efektorowych o końcowym etapie różnicowania związany jest z dobrą relaksacją naczynia w odpowiedzi na acetylocholinę ($r = 0,36$; $p < 0,01$; Ryc. 18) wskazując na potencjalnie protekcyjny wpływ tej subpopulacji komórek na zachowanie zależnego od biodostępności tlenu azotu funkcji rozkurczowej naczynia.



Ryc. 18 Korelacja pomiędzy maksymalnym rozkurczem IMA po podaniu Ach 10^{-5} a naciekiem PVAT IMA komórkami CD4+ efektorowymi o końcowym etapie różnicowania (CD45RA+ CCR7-) wyrażonym jako liczba komórek/mg tkanki

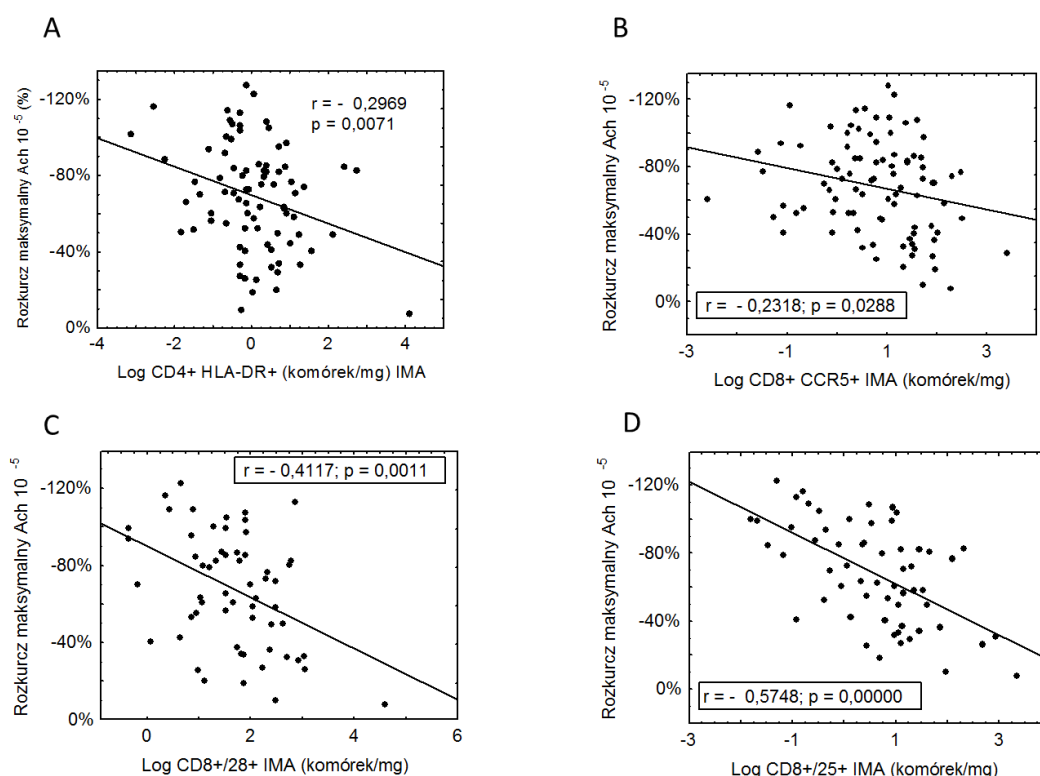
4.9 Charakterystyka aktywowanych subpopulacji limfocytów w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej

Markerami późnej aktywacji limfocytów jest pojawienie się na powierzchni komórek antygenów zgodności tkankowej HLA-DR. Wykazano, że zwiększony naciek aktywowanych limfocytów CD8⁺ HLA-DR⁺ koreluje z upośledzoną relaksacją tętnicy IMA w odpowiedzi na Ach. ($r = -0,31$; $p < 0,01$; Ryc. 19 Panel A). Zwiększona ilość komórek CD8⁺ HLA-DR⁺ w PVAT IMA wiązała się ze wzmożoną produkcją anionorodnika ponadtlennkowego przez to naczynie ($r = 0,26$; $p < 0,05$; Ryc. 19 Panel B).



Ryc. 19 **Panel A** Korelacja pomiędzy maksymalnym rozkurczem IMA po podaniu Ach 10^{-5} a naciekiem PVAT IMA komórkami CD8⁺ HLA-DR⁺ wyrażonym jako liczba komórek/mg tkanki. **Panel B** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem komórek CD8⁺ HLA-DR⁺ w PVAT IMA wyrażonego jako Log liczby komórek/ mg tkanki a wielkością produkcji anionorodnika ponadtlennkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA. Wielkość produkcji wyrażona jest w jednostkach względnych (RLU)/sek/mg tkanki

Zwiększony naciek złożony z limfocytów CD4⁺ z markerem aktywacji HLA-DR również koreluje z upośledzoną relaksacją tętnicy IMA w odpowiedzi na Ach. ($r = -0,3$; $p < 0,01$; Ryc. 20 Panel A).



Ryc. 20 **Panel A** Korelacja pomiędzy maksymalnym rozkurczem IMA po podaniu Ach 10^{-5} a naciekiem PVAT IMA komórkami CD4+ HLA-DR+ wyrażonym jako liczba komórek/mg tkanki. **Panel B** Korelacja pomiędzy maksymalnym rozkurczem IMA po podaniu Ach 10^{-5} a naciekiem PVAT IMA komórkami CD8+ CCR5+ wyrażonym jako liczba komórek/mg tkanki. **Panel C** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem PVAT IMA komórkami CD8+ CD28+ wyrażonym jako liczba komórek/mg tkanki a maksymalnym rozkurczem IMA po podaniu Ach 10^{-5} . **Panel D** obrazuje korelację pomiędzy naciekiem PVAT IMA komórkami CD8+ CD25+ wyrażonym jako liczba komórek/mg tkanki a maksymalnym rozkurczem IMA po podaniu Ach 10^{-5} .

Inne markery aktywacji limfocytów obejmują występowanie receptora dla chemokin CCR5+. Zwiększony naciek PVAT przez komórki CD8+ posiadające receptor dla chemokin typu 5 CCR5+, którego obecność charakteryzuje komórki efektorowe pamięci i jest również markerem aktywacji, korelują z upośledzoną wazorelaksacją naczynia w odpowiedzi na acetylocholinę ($r = -0,23$; $p < 0,05$; Ryc. 20 Panel B).

Podobnie z upośledzoną wazorelaksacją naczynia w odpowiedzi na acetylocholinę koreluje nasilony naciek złożony z komórek posiadających na swojej powierzchni marker wczesnej aktywacji – cząstkę kostymulacyjną CD28+. Zwiększony naciek komórek CD8+ CD28+ będących limfocytami cytotoksycznymi (CD8+CD28- limfocyty regulatorowe) w PVAT koreluje silniej z upośledzonym rozkurczem IMA niż

całkowity naciek złożony ze wszystkich komórek CD8+ ($r = -0,41$ $p = 0,001$, vs $r = -0,32$, $p < 0,01$; Ryc. 20 Panel C oraz wykres prezentowany wyżej).

Najsilniejsza jednak wartość współczynnika korelacji liniowej dotyczy komórek CD8+ posiadających na swojej powierzchni marker aktywacji CD25+, będący receptorem dla interleukiny-2 (IL-2 R). Wartość współczynnika korelacji liniowej wskazuje na wysoką korelację nacieku złożonego z komórek CD8+ CD25+ z dysfunkcją śródbłonna naczyń tętniczych w ChNS ($r = 0,58$; $p < 0,0001$; Ryc. 20 Panel D).

4.10 Analiza czynników predykcyjnych zwiększonego nacieku komórek CD8+ i CD8+/HLA-DR+ w PVAT IMA

Analizowano czynniki predykcyjne zwiększonego nacieku limfocytów CD8+ w PVAT tętnicy IMA metodą regresji wielorakiej. W modelu uwzględniono wpływ uznanych czynników ryzyka choroby wieńcowej oraz produkcji anionorodnika nadadtlenkowego na zwiększony naciek komórek CD8+ w PVAT IMA. Model uwzględniający te zmienne charakteryzował się dobrym dopasowaniem i wartością predykcji pozwalającą wyjaśnić 25% zmienności obserwowanego parametru - nacieku komórek CD8+ w PVAT ($R^2 = 0,25$; $p < 0,01$; Tab. 7). Czynniki ryzyka miażdżycy tj: płeć męska ($\beta = 0,35$; $p < 0,01$), dyslipidemia ($\beta = 0,27$; $p < 0,01$), palenie ($\beta = 0,21$; $p < 0,05$) i starszy wiek ($\beta = 0,21$; $p < 0,05$) były istotnie skorelowane ze zwiększonym naciekiem limfocytarnym CD8+ w IMA.

Tab.7 Analiza regresji liniowej wielorakiej dla wielkości nacieku komórek CD8+ w PVAT IMA z uwzględnieniem czynników ryzyka miażdżycy

	Model R^2	Stand. β	P-value
Predyktory Log CD8+/ mg tkanki IMA	0,25		0,002
Produkcja anionorodnika Log O_2^-		0,07	0,54
Płeć męska		0,35	0,002
Otyłość		-0,04	0,70
Palenie		0,21	0,04
Cukrzyca		0,13	0,24
Dyslipidemia		0,27	0,01
Nadciśnienie		-0,01	0,92
Wiek		0,21	0,05

Podobnie analizując czynniki predykcyjne zwiększonego nacieku limfocytów CD8+/HLA-DR+ w PVAT tętnicy IMA model uwzględniający uznane czynniki ryzyka choroby wieńcowej oraz zwiększoną produkcję anionorodnika ponadtlenkowego charakteryzował się dobrym dopasowaniem i wartością predykcji pozwalającą wyjaśnić 29% zmienności obserwowanego parametru - nacieku komórek CD8+/HLA-DR+ w PVAT ($R^2 = 0,25$; $p < 0,01$; Tab.8). Oceniano współliniowość badanych parametrów analizując współczynniki korelacji cząstkowych i nadmiarowość kolejnych czynników, wartości tolerancji ($1-R^2$) wynosiły od 0,85-0,92 dla poszczególnych zmiennych. Model spełniał założenia opisanej analizy reszt.

Tab 8. Analiza regresji liniowej wielorakiej dla wielkości nacieku komórek CD8+/HLA-DR+ w PVAT IMA z uwzględnieniem czynników ryzyka miażdżycy.

	Model R^2	Stand. β	P-value
Predyktory Log CD8+/HLA-DR+ mg tkanki IMA	0,29		0,005
Produkcja anionorodnika Log O_2^-		0,16	0,16
Płeć męska		0,36	0,002
Otyłość		-0,04	0,73
Palenie		0,12	0,26
Cukrzyca		0,15	0,17
Dyslipidemia		0,32	0,005
Nadciśnienie		-0,06	0,62
Wiek		0,21	0,07

4.11 Analiza czynników predykcyjnych upośledzonej funkcji rozkurczowej naczynia IMA

Oceniano czynniki odpowiadające za upośledzoną funkcję rozkurczową naczynia IMA zależną od biodostępności tlenu azotu metodą regresji wielorakiej. W modelu uwzględniono wpływ uznanych czynników ryzyka choroby wieńcowej oraz zwiększonego nacieku limfocytarnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej IMA. Naciek limfocytarny CD3+ skorelowany był z upośledzoną funkcją śródbłonna. Model uwzględniający naciek CD3+ i klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy charakteryzował się dobrym dopasowaniem i wartością predykcji pozwalającą wyjaśnić 25,2% zmienności zależnej od biodostępności tlenu azotu wazorelaksacji naczynia IMA ($R^2 = 0,25$; $p < 0,01$; Tab. 9). Palenie ($\beta = 0,33$; $p = 0,005$) i płeć żeńska ($\beta = 0,30$; $p < 0,01$) były istotnie skorelowane z upośledzoną funkcją rozkurczową IMA.

Tab.9 Analiza regresji liniowej dla maksymalnego rozkurczu IMA po podaniu Ach 10^{-5} z uwzględnieniem wielkości nacieku komórek CD3+ i czynników ryzyka miażdżycy.

	Model R ²	Stand. β	P-value
Predyktory upośledzonego rozkurczu naczynia zależnego od acetylocholino	0,252		0,005
Log nacieku CD3+ /mg tkanki IMA		0,06	0,61
Płeć męska		-0,30	0,007
Otyłość		0,13	0,20
Palenie		0,33	0,002
Cukrzyca		0,08	0,44
Dyslipidemia		0,09	0,43
Nadciśnienie		0,07	0,50
Wiek		0,06	0,58

Naciek komórek CD8+ w PVAT skorelowany był skorelowany z upośledzoną funkcją śródbłonna silniej niż subpopulacja limfocytów CD3+. Model uwzględniający naciek CD8+ i klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy charakteryzował się dobrym dopasowaniem i wartością predykcji pozwalającą wyjaśnić 25,5% zmienności zależnej od biodostępności tlenu azotu wazorelaksacji naczynia IMA ($R^2 = 0,25$; $p < 0,01$; Tab. 10). Palenie ($\beta = 0,32$; $p < 0,01$) i płeć żeńska ($\beta = 0,32$; $p < 0,01$) były istotnie skorelowane z upośledzoną funkcją rozkurczową IMA.

Tab. 10 Analiza regresji liniowej dla maksymalnego rozkurczu IMA po podaniu Ach 10^{-5} z uwzględnieniem wielkości nacieku komórek CD8+ i czynników ryzyka miażdżycy.

	Model R ²	Stand. β	P-value
Predyktory upośledzonego rozkurczu naczynia zależnego od acetylocholino	0,25		0,005
Log nacieku CD8+ /mg tkanki IMA		0,08	0,480
Płeć męska		-0,32	0,007
Otyłość		0,14	0,19
Palenie		0,32	0,004
Cukrzyca		0,08	0,49
Dyslipidemia		0,08	0,45
Nadciśnienie		0,07	0,51
Wiek		0,05	0,63

Uwzględniono naciek najsilniej skorelowanej z upośledzoną funkcją śródbłonna subpopulacji aktywowanych limfocytów CD8+ CD25+. Model uwzględniający te zmienne charakteryzował się dobrym dopasowaniem i wartością predykcji pozwalającą wyjaśnić 38,3% zmienności zależnej od biodostępności tlenu azotu wazorelaksacji naczyń IMA ($R^2 = 0,38$; $p < 0,01$; Tab. 11). Naciek limfocytarny CD8+ CD 25+ ($\beta = 0,39$; $p < 0,01$), otyłość ($\beta = 0,25$; $p < 0,05$), płeć żeńska ($\beta = 0,27$; $p < 0,05$) były istotnie skorelowane z upośledzoną funkcją rozkurczową IMA.

Analiza ta dowodzi, że zwiększony naciek PVAT złożony z aktywowanych komórek CD8+ CD25+ jest niezależnym od klasycznych czynników ryzyka miażdżycy czynnikiem predykcyjnym upośledzonej funkcji rozkurczowej naczyń zależnej od biodostępności tlenu azotu.

Tab.11 Analiza regresji liniowej dla maksymalnego rozkurczu IMA po podaniu Ach 10⁻⁵ z uwzględnieniem wielkości nacieku komórek CD8+/CD25+ i czynników ryzyka miażdżycy.

	Model R^2	Stand. β	P-value
Predyktory upośledzonego rozkurczu naczyń zależnego od acetylocholin	0,38		0,01
Log nacieku CD8+/CD25+ /mg tkanki IMA		0,39	0,01
Płeć męska		-0,27	0,04
Otyłość		0,25	0,05
Palenie		0,21	0,14
Cukrzyca		0,01	0,94
Dyslipidemia		0,07	0,61
Nadciśnienie		0,07	0,64
Wiek		0,06	0,62

5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. W obrębie PVAT tętnicy dotkniętej procesem miażdżycowym LAD odsetek leukocytów jest istotnie wyższy – odpowiednio pięć i ośmiokrotnie wyższy w porównaniu do nacieku w IMA i tkance podskórnej.
2. Stwierdzono trzy i dwukrotnie zwiększony naciek komórek CD3+ w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej otaczających LAD i IMA w przeliczeniu na miligram tkanki w porównaniu z tkanką tłuszczową podskórną.
3. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wielkością nacieku leukocytnego ($r = 0,24$; $p=0,02$), limfocytnego ($r = 0,29$ $p=0,004$) i ilości komórek CD8+ ($r = 0,29$ $p=0,005$) wyrażonych jako liczba komórek danego typu/mg suchej tkanki w PVAT otaczającej naczynie dotknięte i wolne od procesu miażdżycowego (odpowiednio LAD i IMA. Może to wskazywać na uogólniony charakter stanu zapalnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej w populacji pacjentów poddawanych CABG z powodu choroby wieńcowej.
4. W obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej dochodzi do wyraźnej przewagi komórek efektorowych pamięci CD4+ oraz CD8+ , powstałych po kontakcie z antygenem, nad komórkami naiwnymi i centralnymi pamięci. W obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej pobranej z naczynia dotkniętego procesem miażdżycowym dochodzi do wyraźnej dominacji komórek centralnych pamięci CD4+ i CD8+ CD45RA-/CCR-7+ i efektorowych pamięci CD4+ CD45RA-/CCR-7- nad ilością komórek naiwnych i efektorowych o końcowym etapie różnicowania.
5. Wykazano zależność upośledzonej funkcji rozkurczowej krążków naczyniowych IMA zależnej od biodostępności NO od nasilonego nacieku komórek CD 3+ oraz CD8+ w PVAT.
6. Produkcja anionorodnika ponadtlenkowego przez naczynie IMA jest zależna od wielkości nacieku leukocytnego i złożonego z komórek CD8+ w PVAT.
7. Naciek złożony z komórek naiwnych CD8+ oraz aktywowanych limfocytów CD8+ posiadających markery późnej aktywacji HLA-DR, receptory dla chemokin CCR5+ oraz receptory dla IL-2 są szczególnie silnie skorelowane z upośledzoną funkcją rozkurczową IMA.
8. Naciek limfocytny złożony z komórek CD8+/CD25+ w PVAT stanowi istotny i niezależny czynnik predykcyjny upośledzonej funkcji rozkurczowej naczynia obok klasycznych czynników ryzyka miażdżycy.

6. DYSKUSJA

W obecnej rozprawie zaobserwowano po raz pierwszy, iż nacieki leukocytarne w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej u chorych z miażdżycą składają się przede wszystkim z limfocytów efektorowych i centralnych pamięci, a ich ilość jest skorelowana pomiędzy różnymi obszarami naczyniowymi, choć w tkance tłuszczowej otaczającej tętnice wieńcowe jest tych komórek kilkukrotnie więcej niż w tkance otaczającej tętnicę piersiową wewnętrzną. Choć zjawisko to dotyczy zarówno limfocytów CD4+ jak i CD8+ to obecność aktywowanych limfocytów CD8+ związana jest z upośledzoną funkcją śródbłonna i nasiloną produkcją anionorodnika nadadtlenkowego w badanych naczyniach krwionośnych. Związek ten w odniesieniu do limfocytów CD8+ zawierających markery aktywacji CD25+ pozostawał znamieny statystycznie w analizie wieloczynnikowej obejmującej wpływ znanych czynników miażdżycy.

6.1 Charakterystyka populacji pacjentów w badaniach ex vivo funkcji śródbłonna naczyniowego

Od odkrycia w latach 80 faktu, że acetylocholina wymaga istnienia warstwy śródbłonna aby mogła wywierać efekt naczyniorozkurczowy, rola śródbłonna i jego dysfunkcji była intensywnie badana. Stwierdzono, że dysfunkcja śródbłonna może wyprzedzać pojawienie się nadciśnienia np. u potomstwa pacjentów z wysokim nadciśnieniem (103). Podobnie, upośledzona funkcja śródbłonna występuje częściej u osób dotkniętych rodzinną hipercholesterolemią, palaczy i osób z licznymi czynnikami ryzyka miażdżycy i pojawia się zanim wystąpią objawy choroby (104). W ostatnio opublikowanych badaniach prospektywnych w populacji pacjentów bez choroby serca, u których rozkurcz naczyń mierzony był metodą FMD stwierdzono, że upośledzony rozkurcz jest najlepszym czynnikiem predykcyjnym niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych w ciągu 5 lat – (OR 2,93; 1,28-6,68) (105).

Badania funkcji naczyniowej in vivo metodą badania skurczu izometrycznego krążków naczyniowych pacjentów operowanych z powodu choroby niedokrwiennej serca metodą CABG miały miejsce już w końcu lat '80 jednak badania na znaczących populacjach pacjentów (>100) opublikowano dopiero w roku 2000 (Guzik i wsp.) (95) poprzedzone badaniem Huraux i wsp w populacji 97 pacjentów z 1999 (106). Badania populacyjne obejmujące populację 201 pacjentów publikowane były w 2009 roku przez Antonidesa i współpracowników (107). Wdrożenie wytycznych profilaktyki wtórnej choroby

niedokrwiennej serca w początkach tego wieku obok zmniejszenia występowania modyfikowalnych czynników ryzyka spowodowało znaczący spadek śmiertelności z powodu choroby niedokrwiennej serca w krajach rozwiniętych. Szacuje się, że oba te czynniki odpowiadają za około 50 % redukcji śmiertelności (108). Modyfikowalne czynniki ryzyka odpowiadają za 90 % zawałów serca co udowodniły badania INTERHEART (109). Z kolei wieloośrodkowe badania znaczenia statyn ASCOTT, PROVE IT; inhibitorów konwertazy angiotensyny 4S, EUROPA doprowadziły do powszechnego stosowania tych leków w profilaktyce wtórnej choroby niedokrwiennej serca. Fakty te wpłynęły na zmianę charakterystyki klinicznej pacjentów poddanych CABG z powodu choroby niedokrwiennej serca.

Populacja pacjentów prezentowana w niniejszej pracy jest podobna pod względem charakterystyki demograficznej do tej prezentowanych w pracach Antonidesa i wsp. z 2009 czy aktualnych pracach pochodzących z innych ośrodków europejskich. Średni wiek pacjentów w prezentowanej pracy pracy Antonidesa i wsp., badaniach Huraux i wsp. z 1999 oraz Guzika i wsp. z 2000 wynosił 63,6 – 65,9 lat. Odsetek kobiet różnił się znacząco w poszczególnych badaniach. Zauważalny jest wzrost odsetka pacjentów otrzymujących ACEI lub ARB oraz β -blokery w badaniach prowadzonych na początku i w końcu pierwszej dekady XXI wieku (Tab. 12). Większa część pacjentów otrzymywała także statyny i aspirynę. Podobnie w prezentowanej pracy jak i cytowanych obserwowano klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy, różnice pomiędzy populacjami były niewielkie.

Tab. 12 Porównanie charakterystyki klinicznej pacjentów w cytowanych badaniach populacji pacjentów poddanych CABG z powodu choroby niedokrwiennej serca

	Huraux 1999	Guzik 2000	Antoniades 2009	Prezentowane wyniki
Wiek	63,6 $\pm$ 01,3	64 $\pm$ 0,8	65.91 $\pm$ 8.9	63,7 $\pm$ 9,2
Odsetek kobiet	35%	19,5%	14,1%	22%
Statyny	n.a	80%	91%	88%
ACEI/ARB	37%	46%	70%	81,5%
β-blokery	47%	60%	83%	80,5%
Aspiryna	n.a.	86%	85%	88,9%

6.2 Rola tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego

Rola tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego nie jest dostatecznie poznana. Większość wniosków odnośnie jej funkcji w rozwoju schorzeń układu sercowo-naczyniowego pochodzi z badań na zwierzętach i badań *in vitro* (56, 110). Dzięki tym badaniom udowodniono istotną rolę przebudowanej w procesie miażdżycowym przydanki w akceleracji rozwoju dysfunkcji śródbłónka. Doświadczenia prowadzone na świniach wykazały, że okluzja naczyń *vasa vasorum* biegnących w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej i przydanki prowadzi do przyspieszonego remodelingu ściany naczynia i pogrubienia intymy w ciągu kilku dni od powstania uszkodzenia (111). Bardzo istotna praca dotycząca patomechanizmu rozwoju miażdżycy i roli przydanki w tym procesie została opublikowana przez grupę Akira Takeshita w 2000r. Stwierdzono wówczas, że świnię których naczynia wieńcowe zostały owinięte materiałem uwalniającym MCP-1, Ox-LDL lub obie substancje wykazywały się szybką akumulacją makrofagów w przydanki już po 3-7 dniach i rozwojem blaszek miażdżycowych po 2 tygodniach. Efekt ten był odwracany przez podanie przeciwciał neutralizujących MCP-1 lub Fasudilu – inhibitora Rho-kinazy (112). Inne badania z 2006 udowodniły efekt przywracający funkcję rozkurczową naczynia zależną od NO po podaniu Fasudilu w badaniu FMD pacjentów z ChNS (113).

Pomimo interesujących wyników badań prowadzonych na modelach zwierzęcych istnieją tylko nieliczne badania kliniczne na znaczących populacjach pacjentów, których głównym celem jest wyjaśnienie roli PVAT w chorobie niedokrwiennej serca (114). Większość z badań analizujących funkcje wazomotoryczne naczyń w populacji ludzkiej to badania obserwacyjne oparte o pośrednie, nieinwazyjne metody pomiaru rozkurczu naczynia takie jak oceniane ultrasonograficznie u pacjenta rozszerzenie tętnicy promieniowej, zależne od wzrostu stężenia tlenu azotu, w odpowiedzi na zwiększenie przepływu i związanym z nim wzrost sił ścinających (*shear stress*; badanie FMD – *flow mediated vasodilatation*) (61). Pojedyncze badania prowadzone były przez bezpośredni pomiar funkcji rozkurczowej naczynia w odpowiedzi na wzrastające stężenia acetylocholiny. Ten kierunek badań jest szczególnie interesujący w świetle faktu, że przydanka jest miejscem końcowych zakończeń współczulnych, skąd wydzielana acetylocholina dociera dalej przez *vasa vasorum* do śródbłónka (107, 115). Rolę przydanki jako fragmentu naczynia regulującego funkcje

warstwy śródbłonkowej podkreśla też fakt, że nowotworzenie naczyń *vasa vasorum* w przydance u świń z hipercholesterolemią wyprzedza powstanie dysfunkcji śródbłonka (116). Współcześnie tkankę tłuszczową okołonaczyniową i przydanę traktuje się jako jedną strukturę z powodu trudności z ich ścisłym wyodrębnieniem (115).

Istnieją pojedyncze badania, których celem byłoby wyjaśnienie roli nacieku leukocytnego w PVAT w chorobie niedokrwiennej serca u ludzi. Histopatologiczna ocena ponad 500 fragmentów blaszek miażdżycowych pobranych z 22 aort ludzkich śródsekcyjnie opublikowana przez Moreno i wsp. w 2002 wykazała zwiększony naciek zapalny w przydance w pękniętych blaszkach miażdżycowych (117). Prace tego rodzaju mają istotną wadę – próbki tkankowe pochodzą od niewielkiej i mało zróżnicowanej grupy pacjentów, naciek zapalny oceniany immunohistochemicznie metodą liczenia komórek w polu widzenia nie daje obrazu nacieku w całej objętości tkanki. Te trudności doprowadziły nas do poszukiwania metody badania tkanki tłuszczowej korelującej z naciekiem w całej objętości tkanki poprzez wyodrebnienie komórek z frakcji wisceralno-stromalnej i ich analiza cytometryczna.

Ostatnio opublikowane prace, wykorzystujące opisaną wyżej metodę badania nacieku zapalnego obecnego w tkance PVAT przez zliczenie komórek w przekrojach tkanki po zabarwieniu metodą immunohistochemiczną, koncentrują się na wyjaśnieniu roli nacieku złożonego z makrofagów. Opublikowana w 2014 r praca w populacji 38 pacjentów poddanych operacji CABG w której badano nacieki zapalne złożone z makrofagów (CD68+) klasycznych M1 (CD11c) i M2 (CD206+), wykazała zwiększoną produkcję prozapalnych cytokin Il-1, Il-17 i Il-23 w PVAT oddalonej od miejsca zwężenia w porównaniu do fragmentu pochodzącego z miejsca zwężenia tętnicy wieńcowej (118). W badaniu tym za pomocą mało czułych metod histologicznych nie stwierdzono różnic w nacieku limfocytarnym w PVAT pochodzącym z miejsca zwężenia i miejsca oddalonego od zwężenia, natomiast we fragmencie oddalonym od zwężenia 2-3 krotnie zwiększony był naciek złożony z makrofagów, których większość stanowiły komórki M2 i których liczba korelowała z produkcją IL-6, VCAM, VEGF, katepsyny S białka wiążącego retinol RBP-4 w tkance PVAT. Mniejsza liczba makrofagów w otoczeniu zwężenia tłumaczona jest przez autorów przez istnienie warunków hipoksji wokół zwężenia, czego nie potwierdza jednak zmniejszona koncentracja czynników wzrostu, która powinna być podwyższona w warunkach hipoksemii. Fragmenty pochodzące z okolicy zwężenia wykazywały też znacząco mniejszą produkcję adipocytokin. Warto zauważyć, że badania te prowadzone były na

niewielkich populacjach pacjentów, stąd ich niewielka moc wykrywania bardziej subtelnych różnic w nacieku zapalnym tkanki PVAT oraz w różnicowaniu nacieku zaplanego złożonego ze specyficznych subpopulacji limfocytarnych. Ponadto ocena nacieku zapalnego odbywała się poprzez zliczenie komórek w wybranych jedynie przekrojach tkanki po zabarwieniu metodą immunohistochemiczną.

W niniejszej pracy wykazano istnienie zwiększonego nacieku leukocytarnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej wyrażone zarówno jako odsetek komórek frakcji stromalnej jak i bezwzględna ilość komórek danego typu na mg suchej tkanki PVAT. Odsetek komórek CD45+ był 5 – 8 krotnie zwiększony w tkance tłuszczowej pobranej znad zwężenia tętnicy wieńcowej porównując z tkanką tłuszczową okołonaczyniową naczynia nie dotkniętego procesem miażdżycowymi – IMA i tkanką tłuszczową podskórna. Komórki CD 45+ stanowiły 12,2% wszystkich komórek frakcji stromalnej PVAT w LAD.

Obserwowane wartości nacieków leukocytarnych stanowią wartości niższe niż odsetek komórek CD45+ w tkance tłuszczowej myszy. Tkanka tłuszczowa myszy dystrybuuje się inaczej niż u ludzi – tkanka tłuszczowa okołogonadlana stanowi 30 % całkowitej masy tkanki tłuszczowej i waży zwykle około 4 g i z powodu łatwości wyodrebnienia często stanowi obiekt badań naukowych. Dla porównania typowa tkanka tłuszczowa trzewna waży u myszy tylko około 0,5 g (119). Różnice w nacieku leukocytarnym w tych przedziałach nie są znane. Jednak podobnie jak u ludzi, u myszy główną masę komórek frakcji stromalnej tkanki tłuszczowej stanowią komórki macierzyste, fibroblasty oraz komórki podścieliska naczyń krwionośnych. Z frakcji stromalnej komórek pochodzi około 70% wszystkich białek izolowanych z tkanki tłuszczowej (120).

Naciek limfocytarny wyrażany w liczbie komórek na mg tkanki był dwukrotnie wyższy w PVAT LAD niż IMA i 3-krotnie wyższy niż w tkance tłuszczowej podskórnej. Odsetki komórek CD3+ oraz liczba komórek wyrażana na mg tkanki jest około 2 krotnie niższa niż w tkance tłuszczowej trzewnej myszy. Liczba komórek CD4+, wynosiła 40-50 komórek/ mg w PVAT a CD8+ 15 i 25 komórek / mg tkanki w PVAT. Odpowiednio IMA i LAD. Dla porównania w tkance tłuszczowej mysiej liczba komórek CD4+ wynosiła u myszy karmionych dietą standardowa 40-50 komórek / mg tkanki i 120-130 komórek/mg tkanki w populacji myszy karmionych dietą wysokokaloryczną (121). Naciek komórek CD4+ w populacji pacjentów operowanych z powodu choroby wieńcowej jest więc podobny do nacieku zapalnego obserwowanego u zdrowych myszy.

W prezentowanych w pracy badaniach wielkości nacieków zapalnych były wzajemnie skorelowane w obrebie PVAT naczynia dotkniętego procesem miażdżycowym jak i wolnym od miażdżycy. Korelacja dotyczyła nacieku leukocytarnego, limfocytarnego jak i ilości komórek CD8+, co może wskazywać na uogólniony charakter stanu zapalnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej w populacji pacjentów poddawanych CABG z powodu choroby wieńcowej.

Starsze badania prowadzone na nieselektywnie pobranych fragmentach tkanki tłuszczowej nasierdziowej i trzewnej pobranych od 46 pacjentów operowanych z powodu ChNS i 12 operowanych kardiochirurgicznie z innych powodów (wady zastawkowe) wykazały zwiększony poziom prozapalnych cytokin TNF α i IL-6 oraz adipocytokin – leptyny i wisfatyny w populacji pacjentów operowanych z powodu ChNS tak w tkance tłuszczowej trzewnej jak i nasierdziowej, Poziom adiponektyny był natomiast niższy u tych pacjentów w porównaniu do pacjentów operowanych z powodu wad zastawkowych (122). Biorąc pod uwagę fakt, że większa ilość TNF α oraz IL-6 jest produkowana przez aktywowane makrofagi oraz leukocyty i limfocyty istotnym problem wydawało się określenie roli tych komórek zapalnych w PVAT.

Jak wspomniano nieliczne badania PVAT w populacji pacjentów operowanych z powodu ChNS koncentrowały się raczej na wyjaśnieniu roli nacieku złożonego z makrofagów. W badaniach Hiraty i wsp. porównujących nacieki makrofagów M1 i M2 w nieselektywnie pobranych fragmentach tkanki tłuszczowej nasierdziowej u 38 pacjentów poddanych operacji kardiochirurgicznej z powodu ChNS i 40 poddanych zabiegowi wymiany zastawki wykazano że stosunek makrofagów M1/M2 był skorelowany z rozległością miażdżycy wg skali Gensiniego (123) i produkcją prozapalnych cytokin (124). W niniejszej pracy analizowano specyficzne subpopulacje limfocytów w różnych etapach pozagrasicznego różnicowania oraz limfocytów aktywowanych.

6.3 Subpopulacje limfocytów aktywowanych i efektorowych w przewlekłym stanie zapalnym

Limfocyty naiwne akumulowane są w warstwie korowej węzłów chłonnych dzięki wysokiej ekspresji CCR7 i wysokiej ekspresji ligandów tj CCL19 i CCL21 w komórkach śródbłonna kory węzła chłonnego. Do warstwy tej migrują także komórki APC np. komórki Langerhansa również dzięki wysokiej ekspresji tej cząsteczki. W następstwie kontaktu komórki APC i naiwnego limfocyta T w warstwie korowej dochodzi do aktywacji przy współudziale cząstki kostymulacyjnej CD80/86 komórki APC i ligandu CD28 limfocyta T oraz do przekształcenia części naiwnych komórek T w komórki pamięci a pozostałych limfocytów w komórki efektorowe. W zależności od charakteru czynnika aktywującego oraz środowiska cytokin dochodzi do różnicowania w komórki Th1, Th17, Th2, Th3 produkujące TGF β (transforming growth factor) lub Tregs (CD25+, FoxP3+). Z drugiej strony komórki centralne pamięci mogą tracić cząsteczkę CCR7 stając się komórkami efektorowymi pamięci, nie mogącymi zasiedlać węzłów chłonnych. Ich rolą jest patrolowanie tkanek i szybka reakcja na stymulację antygenową. Po aktywacji wykazują wysoką ekspresję perforyny i tracą zdolności proliferacyjne. W przypadku braku stymulacji antygenowej mogą one ponownie nabywać CCR7 i ponownie uzyskać możliwość zasiedlania węzłów chłonnych stając się komórkami centralnymi pamięci (125).

W prezentowanej pracy wykazano istotne różnice w odsetkach populacji komórek centralnych pamięci (CD45RA-CCR7+) i efektorowych pamięci (CD45RA-CCR7-) w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej oraz tkance tłuszczowej podskórnej. W obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej dochodzi do wyraźnej dominacji komórek efektorowych pamięci CD4+ oraz CD8+ CD45RA- CCR7-, powstałych po kontakcie z antygenem, nad komórkami naiwnymi i centralnymi pamięci (CD4+ $p < 0,001$; CD8+ $p < 0,05$ ANOVA). Komórki efektorowe stanowią 60% wszystkich limfocytów CD4+ oraz około 40 % limfocytów CD8+ w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej. Kolejną pod względem częstości populacją są komórki centralne pamięci stanowiące 30 % wszystkich limfocytów CD4+ oraz CD8+. W przypadku limfocytów CD4+ odsetek komórek efektorowych jest dwukrotnie wyższy niż komórek centralnych pamięci.

Podobnie w odniesieniu do populacji limfocytów CD8+ w obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej dochodzi do wyraźnej dominacji komórek efektorowych pamięci CD8+ CD45RA-CCR7- , powstałych po kontakcie z antygenem nad komórkami

centralnymi pamięci (CD8+ $p < 0,05$ ANOVA) aczkolwiek dominacja komórek efektorowych nie jest aż tak wyraźna. Analiza charakteru nacieku zapalnego z dominacją autoreaktywnych komórek CD8+ przypomina komórki stwierdzone w przewlekłym stanie zapalnym np. w kontaktowym zapaleniu skóry (126) czy schorzeniach o podłożu autoimmunologicznym. Promieniowanie UVB, witamina D, blokery kanałów potasowych K_v1.3 (KCNA3) oraz retinoidy hamują powstawanie efektorowych limfocytów CD8+ w kontaktowym zapaleniu skóry, a blokada kanałów potasowych K_v1.3 charakterystycznych dla komórek efektorowych pamięci wydawała się być skuteczna w modelach zwierzęcych w leczeniu cukrzycy typu 1 i 2, stwardnienia rozsianego i reumatoidalnego zapalenia stawów oraz chorób przyzębia, postulowano też możliwą skuteczność inhibitorów tego kanału potasowego w leczeniu otyłości. Niedawno zaobserwowano, że kłofazymina lek stosowany od 1969 w dermatologii w leczeniu trądu, wykazujący również silne działanie immunosupresyjne wykorzystywane w hamowaniu reakcji GvH, wywiera swe działanie dzięki hamowaniu kanałów potasowych K_v1.3 (127).

W badaniach na zwierzętach wykazano, że otyłość zmniejsza ilość komórek T naiwnych na rzecz komórek efektorowych pamięci, co przedstawiono w wynikach niniejszej pracy ale w odniesieniu do miażdżycy. Komórki efektorowe w tkance tłuszczowej otyłych myszy posiadają zmniejszoną różnorodność receptorów TCR-V β (128). Badania ostatnich lat wykazały też, że zwiększona ilość komórek efektorowych CD8+ obecna jest u myszy poddawanych naprzemiennym epizodom przybierania na masie i utraty masy ciała, natomiast ilości ani odsetki makrofagów M1/M2 nie zmianały się (128) (129). W świetle prezentowanych badań zastosowanie potencjalne zastosowanie leków hamujących aktywność komórek efektorowych pamięci w zapobieganiu i leczeniu choroby niedokrwiennej serca wydaje się być interesującym kierunkiem przyszłych badań.

W niniejszej pracy stwierdzono także, że zwiększony naciek komórek CD4+ efektorowych o końcowym etapie różnicowania skorelowany jest z relaksacją naczyń w odpowiedzi na acetylocholinę, wskazując na potencjalnie protekcyjny wpływ tej subpopulacji komórek na zachowanie zależnego od biodostępności tlenu azotu funkcji rozkurczowej naczyń.

6.4 Naciek leukocytny i limfocytny a funkcja rozkurczowa naczyń

Rola komórek zapalnych w rozwoju blaszki miażdżycowej i promowaniu niestabilności blaszki miażdżycowej była przedmiotem wielu badań. Niezwykle istotne wnioski poszerzające nasze rozumienie patofizjologii miażdżycy miały swoje źródło w obserwacjach dokonanych w modelach zwierzęcych. Pomimo to badacze są świadomi istnienia istotnych różnic w modelach miażdżycy ludzkich i zwierzęcych, stąd niezwykle istotna wydaje się promocja badań translacyjnych obejmujących zastosowanie precyzyjnych metod laboratoryjnych w badaniu fragmentów tkanek pochodzących od pacjentów. Przykładem istotnych różnic w patofizjologii miażdżycy w modelach ludzkim i zwierzęcym może być rola receptora dla chemokin X3 – CX₃CR1. Receptor ten pełni ważną funkcję w rekrutacji makrofagów do blaszki miażdżycowej i powstawaniu komórek piankowatych u ludzi a także migracji monocytów do tkanki tłuszczowej. Kontrastuje to z rolą tego receptora w modelu mysim, gdzie cząsteczka ta nie wydaje się być istotna w regulowaniu migracji monocytów (130). W związku z tym zaplanowano badania translacyjne w populacji ludzkiej z wykorzystaniem precyzyjnych metod badań *in vitro*.

Analizując rozkurcz krążków naczyniowych IMA zależny od biodostępności NO wykazano w niniejszej pracy zależność pomiędzy upośledzoną funkcją rozkurczową naczyń a nasilonym naciekiem komórek CD 3+ oraz CD8+ w PVAT. Uzyskane wyniki poparte są wykorzystaniem precyzyjnej metody izolowanych krążków naczyniowych z pomiarem wpływu pojedynczego czynnika – stężenia acetylocholino. Analiza statystyczna potwierdza istotność jest stwierdzana dzięki analizie kolejnych przyrostów rozkurczu metodą powtarzanych pomiarów.

Wynik niniejszego badania przeprowadzonego w populacji pacjentów rzuca nowe światło na rolę zwiększonego nacieku limfocytów CD8+ w PVAT w patogenezie miażdżycy u ludzi. Jak dotąd prowadzone na myszach badania rozwoju insulinooporności i otyłości u myszy karmionych dietą wysokotłuszczową uzasadniały wniosek, że limfocyty CD8+ są zaangażowane w rozwój insulinooporności, wzmożonego nacieku zapalnego w tkance tłuszczowej zaś limfocyty CD4+ hamują powstawanie insulinooporności i promują prawidłową masę tkanki tłuszczowej u myszy. W cytowanych badaniach w tkance tłuszczowej najądrzowej dochodzi w trakcie karmienia dietą wysokotłuszczową do 2-3 krotnego zwiększonego nacieku komórek

CD8⁺ CD44⁺, 3-4 krotnego makrofagów i około dwukrotnie zmniejszonego odsetka komórek CD4⁺ oraz CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ po 30 tygodniach karmienia dietą wysokotłuszczową (131). Co zaskakujące myszy ze nokautowanym genem dla cząsteczki CD8⁺ poza faktem, że nie wykazywały zwiększonego odsetka komórek CD8⁺ w tkance tłuszczowej, nie wykazywały także zwiększonego odsetka makrofagów oraz obniżone poziomy TNF α i Il-6 w trakcie karmienia dietą wysokotłuszczową, pomimo zwiększonej masy ciała. Również tolerancja glukozy była tylko w niewielkim stopniu obniżona u myszy CD8a^{-/-}. Transfer komórek CD8⁺ przywracał odsetki komórek zapalnych oraz upośledzoną tolerancję glukozy charakterystyczną dla myszy bez wyłączonej ekspresji genu. Dalsze eksperymenty wykazały istotną funkcję limfocytów CD8⁺ pochodzących od myszy karmionych dietą wysokotłuszczową w transformowaniu monocytów w makrofagi M1, za co w głównej mierze odpowiada MCP-1.

Z kolei inne badania, w których wykorzystywano metodę transferu limfocytów do krwioobiegu myszy Rag1-null^{-/-} pozbawionych limfocytów, wykazały, że to transfer limfocytów CD4⁺ powodował spadek masy ciała oraz przywracał insulinowrażliwość (poziom insuliny spadał 2-3 krotnie tak jak i poziom glukozy) u tych *knock-out*'ów. Transfer limfocytów pozbawionych receptorów TCR nie powodował tego efektu. Zmniejszał się także poziom leptyny, MCP-1 a efekt ten nie był zależny od obecności komórek CD4⁺ FoxP3⁺. Zależny był od możliwości różnicowania limfocytów T do komórek Th2 co z kolei uzależnione jest od aktywności czynnika transkrypcyjnego Stat6. Transfer limfocytów CD4⁺Stat⁻ nie powodował zmniejszenia masy ciała i spadku insulinooporności. Stwierdzono, że w tkance tłuszczowej trzewnej myszy na diecie wysokotłuszczowej dochodzi do zmniejszenia liczby komórek regulatorowych CD4⁺ FoxP3⁺ (z 12 do 8 komórek/mg tkanki); 2-3 krotnego wzrostu komórek CD4⁺ (z 40-50 do 120-130 komórek/ mg tkanki) oraz Th1 komórek INF γ ⁺ (z 20 do około 60 komórek/mg tkanki) a zmniejszenia ilości komórek prozapalnych Th17 (z 1 do 0,5 komórki/mg tkanki). Myszy Rag^{-/-} nie posiadające limfocytów przybierają bardziej na wadze głównie na drodze hipertrofii adipocytów i wykazują bardziej nasiloną insulinooporność. Podawanie przeciwciała anty CD3, które zmniejsza pulę limfocytów ale promuje różnicowanie komórek CD4⁺ FoxP3⁺, powodowało spadek masy ciała myszy i przywrócenie insulinowrażliwości pomimo braku zmniejszenia ilości komórek Th1 INF γ ⁺. Przeciwciało to powoduje także wzrost odsetka makrofagów M2 i wtórnie do tego wzrostu zwiększenie 3 krotnie ilości Il-10.

Badania te sugerują istotną rolę limfocytów Th2 produkujących Il-4 i Il-13 w utrzymaniu prawidłowej masy ciała, odwrotny efekt wywiera naciek komórek CD8+, promujący różnicowanie makrofagów w kierunku klasycznych komórek prozapalnych M1. Migracja limfocytów T do tkanki tłuszczowej zależy od obecności receptora TCR rozpoznającego antygeny zgodności tkankowej. Niedawno opisana populacja komórek regulatorowych CD4+/FoxP3+ z ograniczonym repertuarem receptorów TCR (132) wskazuje na występowanie presji selekcyjnej na dojrzewanie komórek T rozpoznających antygeny tkanki tłuszczowej i preferencyjne zasiedlanie przez te limfocyty tkanki tłuszczowej (125).

W badaniach nie analizowano frakcji Th17 z powodu bardzo niewielkiej ilości i możliwości wystąpienia błędu systematycznego.

Wykorzystywana w niniejszej pracy metoda badania rozkurczu naczyń *in vitro* pozwala na określenie wpływu innych wybranych czynników na zależny od biodostępności tlenu azotu rozkurcz naczyń. Znanym czynnikiem wpływającym na biodostępność tlenu azotu jest anionorodnik ponadtlenkowy reagujący z NO i zmniejszający w ten bezpośredni sposób jego biodostępność.

Z drugiej strony ważnym źródłem anionorodnika ponadtlenkowego są leukocyty. W związku z tym podjęto próbę analizy wpływu zwiększonego nacieku leukocytarnego w PVAT na produkcję anionorodnika ponadtlenkowego.

6.5 Rola anionorodnika ponadtlenkowego

W badaniach na zwierzętach obserwowano zależność pomiędzy zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej a dysfunkcją śródbłona. W badaniach na myszach karmionych 8 miesięcy dietą wysokokaloryczną stwierdzono, że tętnice pozbawione tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej wykazywały mniej nasiloną dysfunkcję śródbłona w porównaniu z fragmentami naczyń nie pozbawionymi PVAT. Obecność tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej zapewniała z kolei silniejszy rozkurcz w naczyniach pobranych od myszy karmionych standardową dietą. PVAT pochodząca od otyłych myszy wykazywała zwiększoną produkcję anionorodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenu wodoru, a zahamowanie NADPH oksydazy przez apocyninę lub usunięcie reaktywnych form tlenu przez dodanie substancji wymiatającej wolne rodniki katalazy czy Tironu niwelowało ten wzrost. Te

środki farmakologiczne przywracały też prawidłową wazorelaksację naczyń w naczyniach od myszy otyłych z obecną tkanką okołonaczyniową (58).

W niniejszej pracy zaobserwowano dodatnią korelację liniową pomiędzy wielkością nacieku komórek CD 45+; CD3+ oraz CD8+ a produkcją anionorodnika nadtlenkowego przez ścianę naczyń krwionośnych. Badania te opisują po raz pierwszy tę zależność w dużej populacji pacjentów poddanych CABG z powodu ChNS. Istotna rola reaktywnych form tlenu w rozwoju dysfunkcji śródbłona w badaniach niewielkiej grupy pacjentów z otyłością olbrzymią opisywana była wcześniej (133).

W populacji 20 pacjentów oceniano funkcję rozkurczową małych naczyń tkanki tłuszczowej podskórnej 6 miesięcy po operacji bariatrycznej. Badano odpowiedź skurczową na fenylefrynę w obecności PVAT, w obecności blokera dla adiponektyny, obecności SOD i katalazy (133). Wykazano, że odpowiedź skurczowa była znacząco słabsza po zabiegu oraz zmniejszona przed zabiegiem jeśli użyto wymiataczy wolnych rodników a podwyższona jeśli użyto blokera receptorów dla adiponektyny. Wyniki wskazują na obecność zależnej od produkcji reaktywnych form tlenu dysfunkcji śródbłona hamowanej przez adiponektynę w otyłości olbrzymiej. Po operacji ilość makrofagów oceniania histologicznie zmniejszyła się o połowę, czemu towarzyszył ponaddwukrotny spadek TNF α , zmniejszył się rozmiar adipocytu, co korelowało ze spadkiem BMI, wzrostem poziomu adiponektyny i spadkiem poziomu leptyny.

6.6 Rola limfocytów aktywowanych w regulacji funkcji śródbłona i stresu oksydacyjnego

Naciek złożony z komórek naiwnych CD8+ oraz aktywowanych limfocytów CD8+ posiadających markery późnej aktywacji HLA-DR, receptory dla chemokin CCR5 oraz receptory dla IL-2 (CD25+) są szczególnie silnie skorelowane z upośledzoną funkcją rozkurczową IMA. Zwiększony odsetek komórek CD 8+ CD 25+ we krwi także koreluje z upośledzoną funkcją rozkurczową IMA.

Markerami późnej aktywacji limfocytów jest pojawienie się na powierzchni komórek antygenów zgodności tkankowej HLA-DR. Wykazano, że zwiększony naciek aktywowanych limfocytów CD8+ HLA-DR+ koreluje z upośledzoną relaksacją tętnicy IMA w odpowiedzi na Ach i związany jest też ze wzmożoną produkcją anionorodnika nadtlenkowego przez to naczynie. Podobne zależności prezentowano w odniesieniu do limfocytów CD4+ HLA-DR.

Inne markery aktywacji limfocytów obejmują występowanie receptora dla chemokin CCR5, którego obecność wskazuje na niedawny kontakt limfocyta efektorowego z antygenem a którego obecność ułatwia *homing* limfocyta do docelowej tkanki obwodowej (126). W niniejszej pracy obserwowano korelacje pomiędzy zwiększonym naciekem PVAT przez komórki CD8+ posiadające receptor dla chemokin typu 5 CCR5+, a upośledzoną wazorelaksacją naczyń w odpowiedzi na acetylocholinę.

Podobnie nasilony naciek złożony z komórek posiadających na swojej powierzchni marker wczesnej aktywacji – cząstkę kostymulacyjną CD28 – jest związany z upośledzoną relaksacją naczyń w odpowiedzi na Ach. Zwiększony naciek komórek CD8+ CD28+ będących limfocytami cytotoksycznymi (podczas gdy limfocyty CD8+CD28- to limfocyty regulatorowe) w PVAT koreluje silniej z upośledzonym rozkurczem IMA niż całkowity naciek złożony ze wszystkich komórek CD8+.

Najsilniejsza jednak wartość współczynnika korelacji liniowej dotyczy komórek CD8+ posiadających na swojej powierzchni marker aktywacji CD25+, będący receptorem dla interleukiny – 2 (IL-2 R). Wartość współczynnika korelacji liniowej wskazuje na wysoką korelację nacieku złożonego z komórek CD8+ CD25+ z dysfunkcją śródbłónka naczyń tętniczych w ChNS. Co interesujące również zwiększona bezwzględna ilość komórek CD8+ CD 25+ we krwi korelowała z upośledzoną funkcją śródbłónka tętnicy IMA ale korelacja ta była istotnie słabsza.

6.7 Znaczenie badań dla praktyki klinicznej

Analiza ta dowodzi, że zwiększony naciek PVAT złożony z aktywowanych komórek CD8+ CD25+ jest niezależnym od klasycznych czynników ryzyka miażdżycy czynnikiem predykcyjnym upośledzonej funkcji rozkurczowej naczyń zależnej od biodostępności tlenu azotu.

Przeprowadzone badania wskazują na istotną rolę tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej w modulacji funkcji rozkurczowej naczyń. Po raz pierwszy wykazano, że naciek zapalny złożony z aktywowanej frakcji efektorowej komórek CD8+ wpływa na funkcję wazorelaksacyjną naczyń w populacji pacjentów operowanych z powodu choroby niedokrwiennej serca. Nieprzedstawione w prezentowanej pracy wyniki wskazujące na upośledzoną funkcję IMA po usunięciu tkanki tłuszczowej

okołonaczyniowej kierują uwagę na istotną rolę tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej w zachowaniu właściwej funkcji relaksacyjnej naczynia.

Do podobnych wniosków doprowadziły też wielokrotnie stawiane pytania o technikę wszczepiania graftu naczyniowego. Obecnie dominuje pogląd preferujący przeszczep fragmentów IMA i żyły odpiszczelowej w bloku tkankowym z przydanką i tkanką tłuszczową okołonaczyniową. Odpreparowywanie tętnicy czy żyły odpiszczelowej prowadzi do uszkodzeń przydanki i odżywczej sieci *vasa vasorum*. W świetle prezentowanych w niniejszej pracy i cytowanych wyników badań wysnuć można wniosek, że pacjenci z nasilonym naciekiem limfocytarnym w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej mogą odnieść mniejszą korzyść z przeszczepu fragment IMA w bloku tkankowym niż pacjenci z niskim naciekiem zapalnym w PVAT (134).

7. WNIOSKI

1. Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa wokół naczyń dotkniętych procesem miażdżycowym charakteryzuje się kilkukrotnie wyższym naciekiem leukocytarnym i limfocytarnym w porównaniu do tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej pobranej z tętnicy wolnej od miażdżycy i w porównaniu z tkanką tłuszczową podskórną. Pomimo to wielkość nacieku jest wzajemnie skorelowana pomiędzy naczyniem dotkniętym miażdżycą i wolnym od niej.
2. W nacieku limfocytarnym tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej znad naczyń dotkniętego miażdżycą dominują komórki centralne i efektorowe pamięci CD4⁺ i CD8⁺.
3. Funkcja rozkurczowa naczyń zależna od biodostępności tlenu azotu jest skorelowana z wielkością nacieku limfocytarnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej. Związek ten jest szczególnie silny w odniesieniu do aktywowanych limfocytów CD8⁺ posiadających markery aktywacji HLA-DR, CCR5 i CD25. Z naciekiem zapalnym złożonym z limfocytów CD8⁺ związana jest także zwiększona produkcja anionorodnika nadtlenkowego przez ścianę naczyń krwionośnych.
4. Zwiększony naciek limfocytarny komórek CD8⁺/25⁺ w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej stanowi istotny i niezależny czynnik predykcyjny upośledzonej funkcji rozkurczowej naczyń obok klasycznych czynników ryzyka miażdżycy.

8. STRESZCZENIE

Wprowadzenie: miażdżyca jest schorzeniem przebiegającym z powstawaniem zmian zwyrodnieniowo-wytwórczych i przewlekłego stanu zapalnego w błonie wewnętrznej i środkowej tętnic takich jak aorta, naczynia wieńcowe, mózgowie i tętnice kończyn. Schorzenia związane z rozwojem miażdżycy w tym choroba niedokrwienna serca są drugą najczęstszą przyczyną zgonów w Europie. Rozwój blaszki miażdżycowej w ścianie naczynia krwionośnego jest zapoczątkowany przez rozwój dysfunkcji wewnętrznej błony naczynia warstwy komórek śródbłonna z czym związana jest zmniejszona biodostępność tlenku azotu (NO). Do zmniejszenia biodostępności NO prowadzi zmniejszona jego produkcja oraz reagowanie z produkowanymi w przebiegu stanu zapalnego reaktywnymi formami tlenu takimi jak anionorodnik ponadtlenkowy. Wyniki badań prowadzonych w modelach zwierzęcych w ostatnich latach wskazują na istotną rolę błony zewnętrznej ściany naczynia – przydanki oraz tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej (*perivascular adipose tissue*, PVAT) w rozwoju miażdżycy. Jak dotąd nie znany jest wpływ rozwoju przewlekłego stanu zapalnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej na rozwój i przebieg procesu miażdżycowego. Nie został też scharakteryzowany naciek zapalny w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej w populacji pacjentów leczonych z powodu zaawansowanej choroby niedokrwiennej serca.

Metody: Badaniem zostało objętych 108 pacjentów poddawanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG) z powodu stabilnej choroby wieńcowej z użyciem graftu tętnicy piersiowej wewnętrznej (IMA). Analizowano czynniki ryzyka. Pobrane fragmenty tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej otaczającej dotknięte procesem miażdżycowym naczynie wieńcowe – gałąź zstępującą przednią lewej tętnicy wieńcowej (LAD), otaczającej fragment tętnicy piersiowej wewnętrznej oraz tkanki tłuszczowej podskórnej nadbrzusza były fragmentowane i trawione przy użyciu buforu zawierającego kolagenazę typu XI, kolagenazę typu I oraz hialuronidazę. Otrzymana zawiesina komórek frakcji stromalnej barwiona była cytometrycznie przeciwciałami sprzęgniętymi z fluorochromem skierowanymi przeciwko markerom powierzchniowym CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CCR5, CCR7, CD45Ra, HLA-DR i analizowana cytometrycznie. Naciek komórkowy był wyrażany w liczbie komórek na mg suchej tkanki. Rozkurcz naczynia IMA zależny od biodostępności NO w odpowiedzi na wzrastające stężenia acetylocholino (10^{-9} – 10^{-5} M) był badany metoda badania rozkurczu izometrycznego izolowanych krążków naczyniowych w łaźni wodnej po przykurczeniu

naczynia fenylefryną w obecności indometacyny. Analizowano produkcję anionorodnika nadtlenkowego przez ścianę naczyń metodą chemiluminescencji zależnej od lucygeniny.

Wyniki: W obrębie PVAT tętnicy dotkniętej procesem miażdżycowym dochodzi do pięciokrotnie zwiększonego nacieku odsetka komórek CD45+ w porównaniu do IMA i ośmiokrotnie większego w porównaniu do tkanki tłuszczowej podskórnej ($12,2 \pm 1,2$ vs $2,4 \pm 0,2$ i $12,2 \pm 1,2$ vs $1,6 \pm 0,1$). Naciek złożony z komórek CD3+ jest trzykrotnie wyższy w PVAT LAD w porównaniu do S.C. ($103,7 \pm 15,0$ vs $38,0 \pm 3,4$ komórek na mg tkanki) i dwukrotnie wyższy w PVAT IMA w porównaniu do S.C. ($75,2 \pm 7,2$ vs $38,0 \pm 3,4$ komórek na mg tkanki).

Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wielkością nacieku leukocytnego ($r = 0,24$; $p=0,02$), limfocytnego ($r = 0,29$ $p=0,004$) i ilości komórek CD8+ ($r = 0,29$ $p=0,005$) wyrażonych jako liczba komórek danego typu / mg suchej tkanki w PVAT otaczającej naczynie dotknięte i wolne od procesu miażdżycowego – odpowiednio LAD i IMA. Może to wskazywać na uogólniony charakter stanu zapalnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej w populacji pacjentów poddawanych CABG z powodu choroby wieńcowej. W obrębie tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej LAD dochodzi do wyraźnej przewagi komórek efektorowych pamięci (CD45RA-/CCR7-) CD4+ oraz CD8+ (CD4+; $34,8 \pm 4,9$ CD8+; $15,1 \pm 2,1$ komórek/ mg tkanki), powstałych po kontakcie z antygenem, nad komórkami naiwnymi (CD45RA+/CCR7+) i centralnymi pamięci (CD45RA-/CCR7+) (odpowiednio $7,1 \pm 1,0$ i $25,7 \pm 3,6$ dla komórek CD4+ i $5,3 \pm 0,8$ i $12,7 \pm 1,8$ dla komórek CD8+). Wykazano zależność upośledzonej funkcji rozkurczowej krążków naczyniowych IMA zależnej od biodostępności NO od nasilonego nacieku komórek CD3+ ($p<0,001$, ANOVA) oraz CD8+ ($p<0,001$) w PVAT. Produkcja anionorodnika nadtlenkowego przez naczynie IMA jest zależna od wielkości nacieku leukocytnego ($p<0,05$, ANOVA) i złożonego z komórek CD8+ ($p<0,05$) w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej. Naciek z aktywowanych limfocytów CD8+ posiadających markery późnej aktywacji HLA-DR ($r = -0,31$; $p<0,01$) receptory dla chemokin CCR5+ ($r = -0,23$; $p<0,05$) oraz receptory dla IL-2 ($r = -0,57$; $p<0,001$) są szczególnie silnie skorelowane z upośledzoną funkcją rozkurczową IMA. Naciek limfocytny złożony z komórek CD8+/CD25+ w PVAT stanowi istotny i niezależny czynnik predykcyjny upośledzonej funkcji rozkurczowej naczyń obok klasycznych czynników ryzyka miażdżycy ($R^2=0,38$; $p<0,01$, analiza wieloczynnikowa).

Wnioski: Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa wokół naczyń dotkniętych procesem miażdżycowym charakteryzuje się wyższym naciekiem leukocytarnym i limfocytarnym w porównaniu PVAT tętnicy wolnej od miażdżycy IMA i w porównaniu z tkanką tłuszczową podskórną. Wielkość nacieku jest wzajemnie skorelowana pomiędzy naczyniem dotkniętym miażdżycą i wolnym od niej. W nacieku limfocytarnym tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej znad naczyń dotkniętych miażdżycą dominują komórki centralne i efektorowe pamięci CD4⁺ i CD8⁺. Funkcja rozkurczowa naczyń zależna od biodostępności tlenu azotu jest skorelowana z wielkością nacieku limfocytarnego w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej. Związek ten jest szczególnie silny w odniesieniu do aktywowanych limfocytów CD8⁺ posiadających markery aktywacji HLA-DR, CCR5 i CD25. Z naciekiem zapalnym złożonym z limfocytów CD8⁺ związana jest także zwiększona produkcja anionorodnika nadtlenkowego przez ścianę naczyń krwionośnych. Zwiększony naciek limfocytarny komórek CD8⁺/25⁺ w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej stanowi istotny i niezależny czynnik predykcyjny upośledzonej funkcji rozkurczowej naczyń obok klasycznych czynników ryzyka miażdżycy.

Abstract

Introduction: atherosclerosis is a chronic disease progressing with accumulation of fibro-fatty plaques in intimal and medial layer of arterial wall. The process is initiated by the development of chronic inflammatory process in the affected arteries. Main areas of circulation affected include the aorta, coronary, carotid, renal and peripheral arteries. Diseases related to development of atherosclerosis are the second most common cause of death in Europe. Development of atherosclerotic plaque is preceded by endothelial dysfunction characterized by diminished nitric oxide (NO) bioavailability caused by lowered NO production or reacting of produced NO with reactive oxygen species such as superoxide anion. Preliminary studies in animal models demonstrated important role of adventitia and perivascular adipose tissue (PVAT) at the early stages of the development of atherosclerosis. Nevertheless, role of development of chronic inflammatory process in PVAT in progression and course of atherosclerosis in human is not known. The **aim of the present study was to** characterise the inflammatory infiltration of PVAT in population of patients with severe coronary artery disease following coronary artery bypass graft surgery (CABG), with particular focus on the role of T cells as drivers of vascular inflammation.

Methods: 108 patients, who underwent CABG surgery with internal mammary artery (IMA) grafting, were enrolled to the study. Atherosclerosis risk factors were analysed in detail in relation to general clinical characteristics. PVAT specimens from anterior ascending branch of left coronary artery affected with atherosclerotic process and IMA not affected with atherosclerosis as well as subcutaneous tissue were fragmented and digested with enzyme - containing buffer (hyaluronidase, collagenase XI and I). Suspension of cell were centrifuged and stained with labelled antibodies (CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CCR5, CCR7, CD45Ra, HLA) and analysed with cytometer FACS Canto II. Inflammatory infiltration were presented as number of cells per mg of tissue. NO-dependent vasorelaxation of IMA as a result of increasing doses of acetylcholine (10^{-9} – 10^{-5} M) was studied by recording of isometric tension of arterial rings in organ bath chamber. Studies were performed after precontraction with phenylephrine in the presence of indomethacin. Superoxide anion production by vascular wall was analyzed with lucigenin-enhanced chemiluminescence.

Results: In PVAT of atherosclerotic coronary artery (LAD) CD45+ cells percentage in stromal fraction is 5-fold higher than in IMA and 8-fold higher in comparison with SC

($12,2 \pm 1,2$ vs $2,4 \pm 0,2$ and $12,2 \pm 1,2$ vs $1,6 \pm 0,1$, respectively). CD3⁺ infiltration is 3-fold higher in PVAT LAD comparing with S.C. ($103,7 \pm 15,0$ vs $38,0 \pm 3,4$ cell per mg of tissue) and 2-fold higher in PVAT IMA comparing with S.C. ($75,2 \pm 7,2$ vs $38,0 \pm 3,4$ cells per mg of tissue). Positive correlation between leukocytic ($r = 0,24$; $p=0,02$), lymphocytic ($r = 0,29$ $p=0,004$), CD8⁺ cells infiltration ($r = 0,29$ $p=0,005$) of PVAT in atherosclerotic LAD arteries and not affected with atherosclerosis IMA arteries were demonstrated indicating that inflammatory infiltration in PVAT is generalised. Predominance of CD4⁺ and CD8⁺ effector memory cells (CD45RA⁺/CCR-7⁻) in PVAT LAD (CD4⁺; $34,8 \pm 4,9$ CD8⁺; $15,1 \pm 2,1$ cells/ mg of tissue) comparing with naïve (CD45RA⁺/CCR-7⁺) and central memory cells (CD45RA⁻/CCR-7⁺) (CD4⁺ $7,1 \pm 1,0$ and $25,7 \pm 3,6$; CD8⁺ $5,3 \pm 0,8$ and $12,7 \pm 1,8$; respectively) were demonstrated. NO-dependent endothelial dysfunction was related with increased accumulation of CD3⁺ cells ($p<0,001$, ANOVA) and CD8⁺ cells ($p<0,001$) in PVAT IMA. Superoxide anion production in IMA was associated with increased CD45⁺ ($p<0,05$, ANOVA) and CD8⁺ cells infiltration of PVAT IMA ($p<0,05$). Inflammatory infiltrates of activated CD8⁺ lymphocytes with late-activation marker HLA-DR ($r = -0,31$; $p<0,01$) CCR5 receptor ($r = -0,23$; $p<0,05$) and IL-2 receptor (CD25⁺; $r = -0,57$; $p<0,001$) are particularly strongly correlated with impaired endothelial function of IMA. Lymphocytic infiltrate of CD8⁺/CD25⁺ cells w PVAT is significant and independent prediction factor of impaired endothelial function apart from classical atherosclerosis risk factors ($R^2=0,38$; $p<0,01$, MANOVA).

Conclusions: Leukocytic and lymphocytic infiltration of PVAT in coronary arteries affected with atherosclerosis is markedly increased comparing with PVAT of atherosclerosis-free IMA and subcutaneous tissue. The extent of inflammatory infiltration is correlated in affected and non-affected arteries. In PVAT of affected arteries central memory cells and effector memory cells predominance was observed. NO-dependent vasorelaxation is correlated with lymphocytic infiltration. These relation is particularly strong in respect of activated CD8⁺ cells with HLA-DR, CCR5 and CD25 markers. Superoxide anion production by vascular wall is also related with increased CD8⁺ cells infiltration in PVAT. Increased lymphocytic infiltration of activated CD8⁺/25⁺ cells in PVAT is a significant and independent prediction factor of impaired endothelial function apart from classical atherosclerosis risk factors.

9. SPIS SKRÓTÓW

- ACE**, *angiotensin-converting-enzyme*, enzym konwertujący angiotensynę
- ACEI**, *angiotensin-converting-enzyme inhibitor*, inhibitor enzymu konwertującego angiotensynę
- Ach**, *acetylcholine*, acetylocholina
- ADRF**, *adipocyte derived relaxing factor*, czynnik naczynioworozkurczowy pochodzący z tkanki tłuszczowej
- ADCF**, *adipocyte derived contracting factor*, czynnik naczyniowoskurczowy pochodzący z tkanki tłuszczowej
- Akt**, *Protein kinase B (PKB)*, kinaza białkowa B
- AMPK**, *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*, Kinaza aktywowana 5'AMP
- ANOVA**, *Analysis of variance*, analiza wariancji
- ApoE**, *apolipoprotein E*, Apolipoproteina E
- AT1**, *Angiotensin II receptor, type 1*, receptor dla angiotensyny – 1
- BH4**, *Tetrahydrobiopterin* tetrahydrobiopteryna
- BMI**, *body mass index*, wskaźnik masy ciała
- CABG**, *Coronary Artery Bypass Graft*, Pomostowanie aortalno-wieńcowe
- cAMP**, *Cyclic adenosine monophosphate*, cykliczny adenozynomonofosforan
- CaCl₂** *calcium chlorate*, chlorek wapnia
- CCS**, *Canadian Cardiovascular Society Scale*, Skala CCS
- CCR5**, *Receptor C-C chemokine typ 5*, receptor chemokiny typu 5
- CCR7**, *Receptor C-C chemokine typ 7*, receptor chemokiny typu 7
- CD3**, *cluster of differentiation 3*, marker limfocytów T
- CD4**, *cluster of differentiation 4*, marker limfocytów T
- CD8**, *cluster of differentiation 8*, marker limfocytów T
- CD11c**, *integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)*; łańcuch białkowy integryny alfa X
- CD25**, *cluster of differentiation 25, IL2R α* , łańcuch alfa receptora dla interleukiny 2.
- CD28**, *cluster of differentiation 28*, białko powierzchniowe odpowiedzialne za dostarczenie sygnału kostymulującego limfocyta
- CD40**, *cluster of differentiation 40*, białko występujące na powierzchni komórek prezentujących antygen, niezbędne do ich aktywacji

CD40L, CD154, *cluster of differentiation 154*, białko powierzchniowe limfocytów dostarczające sygnału kostymulacji

CD44, *cluster of differentiation 44*, glikoproteina odpowiedzialna za adhezję i migrację

CD45, *Protein tyrosine phosphatase, receptor type C, leukocyte common antigen (LCA)*, białko powierzchniowe leukocytów

CD45Ra, *splice variant of the tyrosine phosphatase CD45*, wariant splicingowy białka CD45

CD80/86, *cluster of differentiation 80/86*, białka powierzchniowe aktywowanych komórek prezentujących antygen, dostarczające sygnał kostymulujący limfocytom T

CD90, *Thy-1 (Cluster of Differentiation 90)*, białko powierzchniowe wiążące glikofosfatydyloinozitol

CD105, *Endoglin*, białko powierzchniowe będące składową receptora TGFβ

CD206, *cluster of differentiation 206*, receptor dla mannozy

cGMP, *Cyclic guanosine monophosphate*, cykliczny guanozyno-5'-monofosforan

ChNS, *coronary artery disease*, Choroba niedokrwienna serca

Cidea, *Cell death activator CIDE-A*, aktywator receptora zaprogramowanej śmierci komórki

CRP, *C-reactive protein*, białko C reaktywne

CT, *computed tomography*, tomografia komputerowa

CX3CR1, *chemokine receptor 1*, receptor chemokin 1

EAT, *epicardial adipose tissue*, tkanka tłuszczowa nasierdziowa

EDHF, *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor* śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący

EDRF, *Endothelium-derived relaxing factor* śródbłonkowy czynnik naczyniorozkurczający

EDTA, *Ethylenediaminetetraacetic acid*, kwas wersenowy,

EPR, *Electron paramagnetic resonance*, paramagnetyczny rezonans elektronowy

eNOS, *endothelial nitric oxide synthase 3*, śródbłonkowa syntaza tlenku azotu

FMD, *flow mediated vasodilatation*, rozkurcz wywołany przez przepływ krwi

Gq, *G_q protein*, białko G aktywujące fosfolipazę C

HDL, *High-density lipoprotein*, lipoproteina o wysokiej gęstości

HEPES, *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*, kwas 4-hydroksy-2-etylo-1-piperazynoetanosulfonowy

HLA-DR, *MHC class II cell surface receptor encoded by the human leukocyte antigen*, leukocytny receptor głównego antygenu zgodności tkankowej

ICAM, *intercellular adhesion molecules*, wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna

IL, *interleukin*, interleukina

IFN γ , *interferon gamma*, interferon γ

iNOS, *inducible nitric oxide synthase*, indukowana syntaza tlenku azotu (NOS2)

IMA, *internal mammary artery*, tętnica piersiowa wewnętrzna

KCl, *potassium chloride*, chlorek potasu

KH₂PO₄, *Monopotassium phosphate* dwuwodorofosforan potasu

Kv1.3 (KCNA3), *Potassium voltage-gated channel shaker-related subfamily, member3*, kanał potasowy bramkowany potencjałem

Kv7 KCNQ, Kv7.1 (KvLQT1) *Potassium voltage-gated channel*, kanał potasowy bramkowany potencjałem

LAD, *Left anterior descending artery*, gałąź zstępująca przednia lewej tętnicy wienkowej

LDL, *Low-density lipoprotein*, lipoproteina o niskiej gęstości

LFA-1 *Lymphocyte function-associated antigen 1, CD11a*, łańcuch L integryny alfa

M1, *Macrophages with ability to metabolize arginine to nitric oxide*, Makrofagi M1

M2, *Macrophages with ability to metabolize arginine to the ornithine*, Makrofagi M2

MAPK/ERK, *MAPK/ERK kinases*, kinaza MAPK/ERK

MCP, *monocyte chemoattractant protein*, białko chemotaktyczne monocytów

MHC, *major histocompatibility complex*, główny antygen zgodności tkankowej

MgCl₂·6H₂O *magnesium chloride*, chlorek magnezu-heksahydrat

MgSO₄, *magnesium sulphate* siarczan magnezu

mm Hg, *millimeter of mercury*, milimetr słupa rtęci

mM, *milimolar*, stężenie milimolarne

mTORC2, *mTOR Complex 2, mammalian target of rapamycin kinase*, Kinaza mTOR

NF κ B, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, czynnik transkrypcyjny

NO, *nitric oxide*, tlenek azotu

NOX, *subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*, homolog podjednostki oksydazy NAD(P)H

O₂⁻, *superoxide*, anion ponadtlenkowy

ONOO⁻, *peroxynitrate*, nadtlenoazotyn

ox-LDL, *Oxidized low-density lipoprotein* utlenione LDL

OR, *odds ratio*, iloraz szans

PBS, *Phosphate-buffered saline*, roztwór soli fizjologicznej stabilizowany buforem fosforanowym

PECAM, *Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31)*, płytkowo-śródbłonkowa cząstka adhezyjna

PET, *positron emission tomography*, pozytronowa tomografia emisyjna

PGI₂, *prostacyclin*, prostacyklina

Phe, *phenylephrine*, fenylefryna

FoxP3, **FOXP3**, *scurfin*, czynnik transkrypcyjny FoxP3

PKC, *Protein kinase C*, Kinaza białkowa C

PLA₂, *phospholipase A₂*, fosfolipaza A₂

PPAR_γ, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów

PVAT, *perivascular adipose tissue*, tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa

Rag1, *Recombination activating gene 1*, gen aktywujący rekombinację immunoglobulin

RANTES [CCL5] *Chemokine ligand 5*, czynnik chemotaktyczny dla limfocytów T

RLU, *relative light units*, relatywne jednostki światła

ROS, *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu

SEM, *The standard error of the mean*

SOD, *superoxide dismutase*, dysmutaza ponadtlenkowa

SNP, *sodium nitroprusside*, nitroprusydek sodowy

TCR, *T cell receptor*, receptor powierzchniowy limfocytów T

Tiron, *Tiron*, kwas 4,5-dihydro-1,3-benzeno disulfonowy

TG, *triglycerides*, trójglicerydy

Th17, *T helper 17 cells*, limfocyty pomocnicze produkujące IL-17

TNF, *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworów

t-PA, *Tissue plasminogen activator*, tkankowy aktywator plazminogenu
Ucp-1, *uncoupling protein-1*, białko rozprzegające fosforylację oksydacyjną
μM, *micromolar*, stężenie mikromolarne
USG, *ultrasonography*, ultrasonografia
VCAM, *Vascular cell adhesion protein*, naczyniowa cząsteczka adhezyjna
VEGF, *Vascular endothelial growth factor*, naczyniowy czynnik wzrostu śródbłónka
VLA-4 (*Very Late Antigen-4*) *Integrin alpha4beta1*, integryna alpha4beta1

10. SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat kooperacji komórki prezentującej antygen APC. s. 16

Rycina 2. Przekroje histopatologiczne mysiej aorty wstępującej obrazujące znaczne ilości tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej. s. 24

Rycina 3. Reprezentatywne wyniki analizy cytometrycznej zawiesiny komórek frakcji stromalnej tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej IMA s. 33

Rycina 4. Schemat łaźni naczyniowej (*organ-bath*) z umieszczonym w ramionach tensometru krążkiem naczyniowym s. 36

Rycina 5. Przykładowy zapis rozkurczów wywołanych acetylocholiną dwóch naczyń: z prawidłową (panel A) i upośledzoną (panel B) funkcją śródbłónka s. 37

Rycina 6. Reprezentatywny przykład zapisu pomiaru chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5 μ M) we fragmencie naczynia tętniczego IMA s. 39

Rycina 7. Charakterystyka nacieku leukocytarnego i limfocytarnego w tkance tłuszczowej podskórnej oraz okołonaczyniowej w naczyniach IMA i LAD s. 45

Rycina 8. Charakterystyka nacieku limfocytarnego w tkance tłuszczowej podskórnej oraz okołonaczyniowej w naczyniach IMA i fragmencie naczynia LAD s. 47

Rycina 9. Analiza korelacji pomiędzy naciekami leukocytarnym i subpopulacjami limfocytarnymi w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej naczynia dotkniętego procesem miażdżycowym LAD i wolnym od miażdżycy IMA s. 48

Rycina 10. Obrazuje ilość komórek CD 4+ wyrażonych jako liczba komórek / mg tkanki w poszczególnych etapach różnicowania w różnych kompartmentach tkankowych s. 49

Rycina 11 Obrazuje ilość komórek CD 8+ wyrażonych jako liczba komórek / mg tkanki w poszczególnych etapach różnicowania w różnych kompartmentach tkankowych s. 51

Rycina 12. Obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD45+ w PVAT s. 55

Rycina 13. Obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD3+ w PVAT s. 56

Rycina 14. Obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD4+ w PVAT s. 58

Rycina 15. Obrazuje uśrednione wartości rozkurczu krążków naczyniowych IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym CD8+ w PVAT s. 59

Rycina 16. Obrazuje korelację pomiędzy naciekiem leukocytnym i limfocytnym w PVAT IMA wyrażonego jako Log liczby komórek/ mg tkanki a wielkością produkcji anionorodnika ponadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA. s. 61

Rycina 17. Obrazuje zależność pomiędzy wielkością nacieku leukocytnego i limfocytnego w PVAT IMA w grupach pacjentów z niskim, średnim i wysokim naciekiem komórkowym a wielkością produkcji anionorodnika ponadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA s. 62

Rycina 18. Korelacja pomiędzy maksymalnym rozkurczem IMA po podaniu Ach 10^{-5} a naciekiem PVAT IMA komórkami CD4+ efektorowymi o końcowym etapie różnicowania (CD45RA+ CCR7-) wyrażonym jako liczba komórek/mg tkanki s. 63

Rycina 19. Korelacja pomiędzy maksymalnym rozkurczem IMA po podaniu Ach 10^{-5} i wielkością produkcji anionorodnika ponadtlenkowego mierzonej metodą chemiluminescencji w fragmencie naczynia IMA a naciekiem PVAT IMA komórkami CD8+ HLA-DR+ wyrażonym jako liczba komórek/mg tkanki. s. 64

Rycina 20. Korelacja pomiędzy maksymalnym rozkurczem IMA po podaniu Ach 10^{-5} a naciekiem PVAT IMA komórkami CD4+ HLA-DR, komórkami CD8+ CCR5+, komórkami CD8+ CD28+ i komórkami CD8+ CD25+ wyrażonym jako liczba komórek/mg tkanki s. 65

11. SPIS TABEL

Tabela 1. Czynniki naczynioreaktywne wydzielane przez tkankę tłuszczową okołonaczyniową s. 20

Tabela 2. Wykaz użytych przeciwciał w analizie cytometrycznej s. 34

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna pacjentów. s. 42

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna pacjentów – zażywane leki s. 44

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna pacjentów z podziałem na tertyle w zależności od wielkości nacieku PVAT IMA złożonego z komórek CD8+ s. 52

Tabela 6. Charakterystyka kliniczna pacjentów z podziałem na tertyle w zależności od wielkości nacieku PVAT IMA złożonego z komórek CD8+; przyjmowane leki s. 54

Tabela 7. Analiza regresji liniowej wielorakiej dla wielkości nacieku komórek CD8+ w PVAT IMA z uwzględnieniem czynników ryzyka miażdżycy s. 66

Tabela 8. Analiza regresji liniowej wielorakiej dla wielkości nacieku komórek CD8+/HLA-DR+ w PVAT IMA z uwzględnieniem czynników ryzyka miażdżycy. s. 67

Tabela 9. Analiza regresji liniowej dla maksymalnego rozkurczu IMA po podaniu Ach 10^{-5} z uwzględnieniem wielkości nacieku komórek CD3+ i czynników ryzyka miażdżycy. s. 69

Tabela 10. Analiza regresji liniowej dla maksymalnego rozkurczu IMA po podaniu Ach 10^{-5} z uwzględnieniem wielkości nacieku komórek CD8+ i czynników ryzyka miażdżycy. s. 68

Tabela 11. Analiza regresji liniowej dla maksymalnego rozkurczu IMA po podaniu Ach 10^{-5} z uwzględnieniem wielkości nacieku komórek CD8+/CD25+ i czynników ryzyka miażdżycy. s. 69

Tabela 12. Porównanie charakterystyki klinicznej pacjentów w cytowanych badaniach populacji pacjentów poddanych CABG z powodu choroby niedokrwiennej serca s. 72

12. PIŚMIENNICTWO

1. Gao YJ. Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction. *Curr Pharm Des.* 2007;13(21):2185-92.
2. Libby P, Hansson GK. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res.* 2015;116(2):307-11.
3. Libby P, Tabas I, Fredman G, Fisher EA. Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes. *Circ Res.* 2014;114(12):1867-79.
4. Arbab-Zadeh A, Fuster V. The myth of the "vulnerable plaque": transitioning from a focus on individual lesions to atherosclerotic disease burden for coronary artery disease risk assessment. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(8):846-55.
5. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation.* 2012;126(6):753-67.
6. Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J.* 2010;31(9):1142-8.
7. Naruszewicz M. [Homocysteine as a residual risk factor in cardiovascular diseases]. *Kardiol Pol.* 2010;68(3):283-4.
8. Naruszewicz M, Selinger E, Davignon J. Oxidative modification of lipoprotein(a) and the effect of beta-carotene. *Metabolism.* 1992;41(11):1215-24.
9. Naruszewicz M, Mirkiewicz E, Klosiewicz-Latoszek L. Modification of low density lipoproteins from hypertriglyceridemic patients by macrophages in vitro and the effect of bezafibrate treatment. *Atherosclerosis.* 1989;79(2-3):261-5.
10. Jawien J, Chlopicki S, Gryglewski RJ. Interactions between human platelets and eosinophils are mediated by selectin-P. *Pol J Pharmacol.* 2002;54(2):157-60.
11. Tanaka M, Fukui M, Tomiyasu K, Akabame S, Nakano K, Yamasaki M, et al. Eosinophil count is positively correlated with coronary artery calcification. *Hypertens Res.* 2012;35(3):325-8.
12. Jawien J, Csanyi G, Gajda M, Mateuszuk L, Lomnicka M, Korbut R, et al. Ticlopidine attenuates progression of atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 2007;556(1-3):129-35.
13. Jawien J, Gajda M, Mateuszuk L, Olszanecki R, Jakubowski A, Szlachcic A, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(3):483-9.
14. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(8):3203-7.
15. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-6.
16. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1987;84(24):9265-9.

17. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *Journal of cyclic nucleotide research*. 1979;5(3):211-24.
18. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
19. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101(16):1899-906.
20. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001;104(2):191-6.
21. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104(22):2673-8.
22. Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, Jopek A, Kapelak B, Przybylowski P, et al. Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(2):333-9.
23. Halcox JPJ, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;106(6):653-8.
24. Takase B, Hamabe A, Satomura K, Akima T, Uehata A, Matsui T, et al. Comparable prognostic value of vasodilator response to acetylcholine in brachial and coronary arteries for predicting long-term cardiovascular events in suspected coronary artery disease. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2006;70(1):49-56.
25. Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher AM. Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the "vulnerable" patient. *Circulation*. 2004;110(14):1926-32.
26. Heitzer T, Baldus S, von Kodolitsch Y, Rudolph V, Meinertz T. Systemic endothelial dysfunction as an early predictor of adverse outcome in heart failure. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(6):1174-9.
27. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994;24(6):1468-74.
28. Copp BR, Christiansen HC, Lindsay BS, S GF. Identification of heteroarylenamines as a new class of antituberculosis lead molecules. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2005;15(18):4097-9.
29. Witte DR, Westerink J, de Koning EJ, van der Graaf Y, Grobbee DE, Bots ML. Is the association between flow-mediated dilation and cardiovascular risk limited to low-risk populations? *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(12):1987-93.
30. Lind L, Berglund L, Larsson A, Sundstrom J. Endothelial function in resistance and conduit arteries and 5-year risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2011;123(14):1545-51.
31. Fink PJ, Hendricks DW. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):544-9.

32. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.
33. Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*. 2001;410(6824):106-11.
34. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. 2003;101(11):4260-6.
35. Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends in molecular medicine*. 2004;10(3):119-24.
36. Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, et al. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;105(5):570-5.
37. Ghosh P, Buchholz MA, Yano S, Taub D, Longo DL. Effect of rapamycin on the cyclosporin A-resistant CD28-mediated costimulatory pathway. *Blood*. 2002;99(12):4517-24.
38. Dinh TN, Kyaw TS, Kanellakis P, To K, Tipping P, Toh BH, et al. Cytokine therapy with interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody complexes expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and attenuates development and progression of atherosclerosis. *Circulation*. 2012;126(10):1256-66.
39. Salgado FJ, Lojo J, Fernandez-Alonso CM, Vinuela J, Cordero OJ, Nogueira M. Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells. *Immunol Cell Biol*. 2002;80(2):138-47.
40. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2752-61.
41. Ait-Oufella H, Sage AP, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ Res*. 2014;114(10):1640-60.
42. Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Calara F, Yano J, Cercek B, et al. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16(8):1074-9.
43. Meng X, Li W, Yang J, Zhang K, Qin W, An G, et al. Regulatory T cells prevent plaque disruption in apolipoprotein E-knockout mice. *Int J Cardiol*. 2013;168(3):2684-92.
44. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(5):2409-15.
45. Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(11):2276-83.
46. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(11):738-49.
47. Brauersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;97(5):714-21.

48. Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clinical and experimental hypertension Part A, Theory and practice*. 1991;13(2):277-96.
49. Lohn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(9):1057-63.
50. Gollasch M. Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. *British journal of pharmacology*. 2012;165(3):633-42.
51. Gao YJ, Zeng ZH, Teoh K, Sharma AM, Abouzahr L, Cybulsky I, et al. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2005;130(4):1130-6.
52. Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. 2003;144(9):3765-73.
53. Xu A, Vanhoutte PM. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(6):H1231-40.
54. Kohn C, Schleifenbaum J, Szijarto IA, Marko L, Dubrovskaja G, Huang Y, et al. Differential effects of cystathionine-gamma-lyase-dependent vasodilatory H₂S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas. *PloS one*. 2012;7(8):e41951.
55. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Atanasova P, Chaldakov GN, Chylinska-Kula B, Beltowski J. Differential effects of statins on endogenous H₂S formation in perivascular adipose tissue. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2011;63(1):68-76.
56. Meyer MR, Fredette NC, Barton M, Prossnitz ER. Regulation of vascular smooth muscle tone by adipose-derived contracting factor. *PLoS One*. 2013;8(11):e79245.
57. Gao YJ, Lu C, Su LY, Sharma AM, Lee RM. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *British journal of pharmacology*. 2007;151(3):323-31.
58. Ketonen J, Shi J, Martonen E, Mervaala E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circ J*. 2010;74(7):1479-87.
59. Rittig K, Dolderer JH, Balletshofer B, Machann J, Schick F, Meile T, et al. The secretion pattern of perivascular fat cells is different from that of subcutaneous and visceral fat cells. *Diabetologia*. 2012;55(5):1514-25.
60. Cheng KK, Lam KS, Wang Y, Huang Y, Carling D, Wu D, et al. Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes*. 2007;56(5):1387-94.
61. Margaritis M, Antonopoulos AS, Digby J, Lee R, Reilly S, Coutinho P, et al. Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation*. 2013;127(22):2209-21.
62. Fesus G, Dubrovskaja G, Gorzelnik K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovascular research*. 2007;75(4):719-27.
63. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(9):6153-60.

64. Procopio C, Andreozzi F, Laratta E, Cassese A, Beguinot F, Arturi F, et al. Leptin-stimulated endothelial nitric-oxide synthase via an adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/Akt signaling pathway is attenuated by interaction with C-reactive protein. *Endocrinology*. 2009;150(8):3584-93.
65. Haddock RE, Grayson TH, Morris MJ, Howitt L, Chadha PS, Sandow SL. Diet-induced obesity impairs endothelium-derived hyperpolarization via altered potassium channel signaling mechanisms. *PloS one*. 2011;6(1):e16423.
66. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(2):270-8.
67. Belin de Chantemele EJ, Mintz JD, Rainey WE, Stepp DW. Impact of leptin-mediated sympatho-activation on cardiovascular function in obese mice. *Hypertension*. 2011;58(2):271-9.
68. Schleifenbaum J, Kohn C, Voblova N, Dubrovskaya G, Zavarirskaya O, Gloe T, et al. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *Journal of hypertension*. 2010;28(9):1875-82.
69. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 2011;332(6026):243-7.
70. Gao YJ, Takemori K, Su LY, An WS, Lu C, Sharma AM, et al. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovascular research*. 2006;71(2):363-73.
71. Fitzgibbons TP, Kogan S, Aouadi M, Hendricks GM, Straubhaar J, Czech MP. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(4):H1425-37.
72. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*. 2012;151(2):400-13.
73. Wei H, Chiba S, Moriwaki C, Kitamura H, Ina K, Aosa T, et al. A clinical approach to brown adipose tissue in the para-aortic area of the human thorax. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122594.
74. Chang L, Villacorta L, Li R, Hamblin M, Xu W, Dou C, et al. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. *Circulation*. 2012;126(9):1067-78.
75. Bhattacharya I, Dragert K, Albert V, Contassot E, Damjanovic M, Hagiwara A, et al. Rictor in perivascular adipose tissue controls vascular function by regulating inflammatory molecule expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(9):2105-11.
76. Police SB, Thatcher SE, Charnigo R, Daugherty A, Cassis LA. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(10):1458-64.
77. Takaoka M, Nagata D, Kihara S, Shimomura I, Kimura Y, Tabata Y, et al. Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. *Circulation research*. 2009;105(9):906-11.
78. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine*. 2009;360(15):1500-8.

79. Moos MP, John N, Grabner R, Nossmann S, Gunther B, Vollandt R, et al. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(11):2386-91.
80. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circulation research*. 2009;104(4):541-9.
81. Chatterjee TK, Aronow BJ, Tong WS, Manka D, Tang Y, Bogdanov VY, et al. Human coronary artery perivascular adipocytes overexpress genes responsible for regulating vascular morphology, inflammation, and hemostasis. *Physiological genomics*. 2013;45(16):697-709.
82. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445-55.
83. Ohman MK, Luo W, Wang H, Guo C, Abdallah W, Russo HM, et al. Perivascular visceral adipose tissue induces atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):33-9.
84. Wakana N, Irie D, Kikai M, Terada K, Yamamoto K, Kawahito H, et al. Maternal high-fat diet exaggerates atherosclerosis in adult offspring by augmenting periaortic adipose tissue-specific proinflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(3):558-69.
85. Li MW, Mian MO, Barhoumi T, Rehman A, Mann K, Paradis P, et al. Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(10):2306-15.
86. Wang H, Luo W, Wang J, Guo C, Wang X, Wolffe SL, et al. Obesity-induced endothelial dysfunction is prevented by deficiency of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Diabetes*. 2012;61(12):3219-27.
87. Britton KA, Pedley A, Massaro JM, Corsini EM, Murabito JM, Hoffmann U, et al. Prevalence, distribution, and risk factor correlates of high thoracic periaortic fat in the Framingham Heart Study. *Journal of the American Heart Association*. 2012;1(6):e004200.
88. Britton KA, Massaro JM, Murabito JM, Kreger BE, Hoffmann U, Fox CS. Body fat distribution, incident cardiovascular disease, cancer, and all-cause mortality. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(10):921-5.
89. Thanassoulis G, Massaro JM, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Levy D, Ellinor PT, et al. Pericardial fat is associated with prevalent atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology*. 2010;3(4):345-50.
90. Batal O, Schoenhagen P, Shao M, Ayyad AE, Van Wagoner DR, Halliburton SS, et al. Left atrial epicardial adiposity and atrial fibrillation. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology*. 2010;3(3):230-6.
91. Khawaja T, Greer C, Chokshi A, Chavarria N, Thadani S, Jones M, et al. Epicardial fat volume in patients with left ventricular systolic dysfunction. *The American journal of cardiology*. 2011;108(3):397-401.
92. Shields KJ, Barinas-Mitchell E, Gingo MR, Tepper P, Goodpaster BH, Kao AH, et al. Perivascular adipose tissue of the descending thoracic aorta is associated with systemic lupus erythematosus and vascular calcification in women. *Atherosclerosis*. 2013;231(1):129-35.
93. Campeau L. Letter: Grading of angina pectoris. *Circulation*. 1976;54(3):522-3.
94. Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the

- management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis*. 2011;217(1):3-46.
95. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*. 2000;86(9):E85-90.
 96. Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension*. 2002;39(6):1088-94.
 97. Channon KM, Qian H, Neplioueva V, Blazing MA, Olmez E, Shetty GA, et al. In vivo gene transfer of nitric oxide synthase enhances vasomotor function in carotid arteries from normal and cholesterol-Fed rabbits. *Circulation*. 1998;98(18):1905-11.
 98. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105(14):1656-62.
 99. Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, et al. Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free radical biology & medicine*. 2004;36(1):101-11.
 100. Ciprian AB, Cheng B, Sharma S, Yao L, Caldwell RW, Ali MI, et al. Increased Superoxide and eNOS Uncoupling in Blood Vessels of Bmal1-KO mice. *Circulation research*. 2012.
 101. Yamaguchi S, Kishikawa N, Ohyama K, Ohba Y, Kohno M, Masuda T, et al. Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species. *Analytica chimica acta*. 2010;665(1):74-8.
 102. Guzik TJ, Channon KM. Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence. *Methods in molecular medicine*. 2005;108:73-89.
 103. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996;94(6):1298-303.
 104. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340(8828):1111-5.
 105. Shechter M, Shechter A, Koren-Morag N, Feinberg MS, Hirsch L. Usefulness of brachial artery flow-mediated dilation to predict long-term cardiovascular events in subjects without heart disease. *Am J Cardiol*. 2014;113(1):162-7.
 106. Huraux C, Makita T, Kurz S, Yamaguchi K, Szlam F, Tarpey MM, et al. Superoxide production, risk factors, and endothelium-dependent relaxations in human internal mammary arteries. *Circulation*. 1999;99(1):53-9.
 107. Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2009;30(9):1142-50.
 108. Critchley JA, Capewell S, Unal B. Life-years gained from coronary heart disease mortality reduction in Scotland: prevention or treatment? *J Clin Epidemiol*. 2003;56(6):583-90.
 109. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937-52.

110. Owen MK, Witzmann FA, McKenney ML, Lai X, Berwick ZC, Moberly SP, et al. Perivascular adipose tissue potentiates contraction of coronary vascular smooth muscle: influence of obesity. *Circulation*. 2013;128(1):9-18.
111. Pels K, Labinaz M, Hoffert C, O'Brien ER. Adventitial angiogenesis early after coronary angioplasty : correlation with arterial remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(2):229-38.
112. Miyata K, Shimokawa H, Kandabashi T, Higo T, Morishige K, Eto Y, et al. Rho-kinase is involved in macrophage-mediated formation of coronary vascular lesions in pigs in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(11):2351-8.
113. Nohria A, Grunert ME, Rikitake Y, Noma K, Prsic A, Ganz P, et al. Rho kinase inhibition improves endothelial function in human subjects with coronary artery disease. *Circ Res*. 2006;99(12):1426-32.
114. Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P, Shirodaria C, Psarros C, Herdman L, et al. Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall: the regulatory role of perivascular adipose tissue. *Diabetes*. 2015;64(6):2207-19.
115. Vela D, Buja LM, Madjid M, Burke A, Naghavi M, Willerson JT, et al. The role of periadventitial fat in atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(3):481-7.
116. Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR, Jr., Richardson DM, Ritman EL, et al. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovasc Res*. 2001;51(4):762-6.
117. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, O'Connor WN. Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2002;105(21):2504-11.
118. Verhagen SN, Buijsrogge MP, Vink A, van Herwerden LA, van der Graaf Y, Visseren FL. Secretion of adipocytokines by perivascular adipose tissue near stenotic and non-stenotic coronary artery segments in patients undergoing CABG. *Atherosclerosis*. 2014;233(1):242-7.
119. Foster MT, Shi H, Seeley RJ, Woods SC. Removal of intra-abdominal visceral adipose tissue improves glucose tolerance in rats: role of hepatic triglyceride storage. *Physiol Behav*. 2011;104(5):845-54.
120. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004;145(5):2273-82.
121. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009;15(8):921-9.
122. Cheng KH, Chu CS, Lee KT, Lin TH, Hsieh CC, Chiu CC, et al. Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(2):268-74.
123. Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 1983;51(3):606.
124. Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, Motoki T, Akaike M, Nishio C, et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(3):248-55.
125. Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR. T-ing up inflammation in fat. *Nat Med*. 2009;15(8):846-7.

126. Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JH, Basketter DA, et al. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(5):763-81.
127. Ren YR, Pan F, Parvez S, Fleig A, Chong CR, Xu J, et al. Clofazimine inhibits human Kv1.3 potassium channel by perturbing calcium oscillation in T lymphocytes. *PLoS One.* 2008;3(12):e4009.
128. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol.* 2010;185(3):1836-45.
129. Anderson EK, Gutierrez DA, Kennedy A, Hasty AH. Weight cycling increases T-cell accumulation in adipose tissue and impairs systemic glucose tolerance. *Diabetes.* 2013;62(9):3180-8.
130. Morris DL, Oatmen KE, Wang T, DelProposto JL, Lumeng CN. CX3CR1 deficiency does not influence trafficking of adipose tissue macrophages in mice with diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(6):1189-99.
131. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 2009;15(8):914-20.
132. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 2009;15(8):930-9.
133. Aghamohammadzadeh R, Greenstein AS, Yadav R, Jeziorska M, Hama S, Soltani F, et al. Effects of bariatric surgery on human small artery function: evidence for reduction in perivascular adipocyte inflammation, and the restoration of normal anticontractile activity despite persistent obesity. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(2):128-35.
134. Dashwood MR, Dooley A, Shi-Wen X, Abraham DJ, Souza DS. Does periadventitial fat-derived nitric oxide play a role in improved saphenous vein graft patency in patients undergoing coronary artery bypass surgery? *J Vasc Res.* 2007;44(3):175-81.