

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU
Zakład Immunologii, Katedra Histologii i Immunologii
Akademii Medycznej w Gdańsku

Łukasz Hak

**Badanie wpływu infekcji wirusem cytomegalii (CMV) na układ
immunologiczny u chorych operowanych z powodu
niedokrwienia mięśnia serca**

Rozprawa doktorska

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

Praca Finansowana ze środków KBN (nr grantu 2 P05B 054 26)
oraz AMG (praca W-929)

Gdańsk 2006

Pragnę serdecznie podziękować:

Promotorowi pracy Pani Profesor Jolancie Myśliwskiej za okazaną wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość oraz nieocenioną pomoc w prowadzonych badaniach oraz w przygotowaniu rozprawy;

Panu Profesorowi Janu Rogowskiemu, Panu Profesorowi Januszowi Siebertowi oraz Doktorowi Krzysztofowi Szyndlerowi za pomoc przy części klinicznej projektu;

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Immunologii, a szczególnie Joannie Więckiewicz, Pani Krytsynie Wilczewskiej oraz Małgorzacie Jarosz za pomoc w części doświadczalnej oraz w przygotowaniu rozprawy;

Pracownikom Katedry Histologii i Immunologii za życzliwość oraz wszechstronną pomoc.

SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW ZASTOSOWANYCH W PRACY	7
1. WSTĘP	10
1.1. CHOROBA NIEDOKRWIENNA SERCA – CHOROBA O PODŁOŻU ZAPALNYM	10
1.2. WPŁYW PŁCI NA ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNĄ I ROZWÓJ STANU ZAPALNEGO	12
1.3. CZYNNIKI INFEKCYJNE – JAKO PODŁOŻE ZAPALENIA W CHOROBACH SERCOWO-NACZYNIOWYCH	14
1.3.1 <i>Wirus cytomegalii i choroba niedokrwienna serca</i>	16
1.4. WPŁYW CMV NA UKŁAD IMMUNOLOGICZNY	19
1.4.1 <i>CMV i komórki NK</i>	19
1.4.1.1 <i>Subpopulacje komórek NK</i>	21
1.4.2 <i>Rola limfocytów T cytotoksycznych w infekcji CMV</i>	24
1.4.3 <i>CMV i limfocyty T pomocnicze</i>	26
1.4.4 <i>Znaczenie monocytów w indukcji zapalenia oraz w rozwoju infekcji wirusem cytomegalii</i>	27
2. CELE PRACY	31
3. MATERIAŁY I METODY	32
3.1. BADANA POPULACJA	32
3.2. MATERIAŁY	36
3.2.1 <i>Odczynniki</i>	36
3.2.2 <i>Bufory i roztwory</i>	36
3.2.3 <i>Materiały jednorazowego użytku</i>	38
3.2.4 <i>Przeciwciała monoklonalne</i>	38
3.2.5 <i>Podłoża hodowlane</i>	39
3.2.6 <i>Linie komórkowe</i>	40
3.2.7 <i>Aparatura</i>	40
3.2.8 <i>Programy komputerowe</i>	40
3.3. METODY	41
3.3.1 <i>Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC – peripheral blood mononuclear cells)</i>	41
3.3.2 <i>Izolacja limfocytów krwi obwodowej (PBL – peripheral blood lymphocytes)</i>	41

3.3.3. Pomiar aktywności cytotoksycznej komórek NK, test mierzący uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej	42
3.3.4. Uzyskiwanie surowic	43
3.3.5. Oznaczenia cytometryczne	43
3.3.5.1. Analiza antygenów powierzchniowych	44
3.3.5.2. Analiza produkcji wewnątrzplazmatycznego IFN- γ	45
3.3.5.2.1. Przygotowanie do testu szczepionki przeciw wirusowi grypy <i>Vaxigrip</i> (Aventis Pasteur)	45
3.3.5.2.2. Inkubacje komórek PBMC z antygenami wirusa grypy	45
3.3.5.2.3. Barwienie wewnątrzplazmatycznego IFN- γ w komórkach NK	46
3.3.5.3. Badanie stężenia cytokin w surowicy krwi metodą CBA (Cytometric Bead Array)	46
3.3.6. Określenie obecności specyficznych przeciwciał przeciw antygenom wirusa cytomegalii w surowicy krwi	47
3.3.7. Hodowla i pasaż linii komórkowych	49
3.3.8. Mrożenie i rozmrażanie linii komórkowych	49
3.3.9. Pomiar aktywności biologicznej IL-2	50
3.3.10. Morfologia krwi obwodowej z rozmazem układu białokrwinkowego	51
3.3.11. Analizy statystyczne	51
4. WYNIKI	52
4.1. AKTYWNOŚĆ UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO U PACJENTÓW Z CHOROBA NIEDOKRWIENNĄ SERCA	52
4.1.1. Wpływ płci na status komórek NK u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca	53
4.1.2. Wpływ płci na stan układu limfocytów T u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca	54
4.1.3. Wpływ płci na stan monocytów o profilu prozapalnym u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca	54
4.1.4. Wpływ płci na poziom cytokin u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca	55
4.2. PORÓWNANIE AKTYWNOŚCI UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO U PACJENTÓW Z CHOROBA NIEDOKRWIENNĄ SERCA I W GRUPIE KONTROLNEJ	58

4.2.1. Status komórek NK u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i u osób z grupy kontrolnej	59
4.2.2. Stężenie interleukiny-2 w surowicy krwi pacjentów z ChNS i osób z grupy kontrolnej	65
4.2.3. Liczba limfocytów T immunoregulacyjnych u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i w grupie kontrolnej	68
4.2.4. Monocyty o profilu prozapalnym u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i u osób z grupy kontrolnej	73
4.3. PRZECIWCIAŁA IGG ANTY-CMV U PACJENTÓW Z CHNS I U OSÓB Z GRUPY KONTROLNEJ	75
4.3.1 Miano przeciwciał IgG przeciw wirusowi cytomegalii u osób z chorobą niedokrwienną serca	75
4.3.2 Przeciwciała IgG anty-CMV u pacjentów z ChNS i u osób z grupy kontrolnej	77
4.4. WIRUS CYTOMEGALII, AKTYWNOŚĆ UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO I CHOROBA NIEDOKRWIENNA SERCA	79
4.4.1 Analiza parametrów układu immunologicznego u pacjentów z ChNS podzielonych pod względem miana przeciwciał IgG skierowanych przeciw wirusowi cytomegalii	80
4.5. PORÓWNANIE ZMIAN W UKŁADZIE IMMUNOLOGICZNYM W OKRESIE PRZED I PO OPERACJI POMOSTOWANIA TĘTNIC WIEŃCOWYCH U OSÓB Z CHNS Z WYSOKIMI I NISKIMI MIANAMI IGG ANTY-CMV	84
4.5.1. Zmiany ilościowe wśród komórek NK w okresie okołoperacyjnym	84
4.5.2. Limfocyty T w okresie okołoperacyjnym	86
4.5.3. Zmiany stężenia cytokin w surowicy krwi w okresie okołoperacyjnym.	86
4.5.4. Odsetek monocytów prozapalnych w krwi obwodowej przed i po operacji pomostowania tętnic wieńcowych	88
5. DYSKUSJA	91
5.1. NIŻSZA AKTYWNOŚĆ ORAZ LICZBA KOMÓREK NK U PACJENTÓW Z CHOROBA NIEDOKRWIENNA SERCA	91
5.2. LIMFOCYTY CD3+CD8+CD57+ ORAZ CD8+CD28- U PACJENTÓW Z CHNS	98
5.3. LIMFOCYTY T POMOCNICZE I ICH SUBPOPULACJE U PACJENTÓW Z CHNS	101

5.4. MIANO PRZECIWCIAŁ IGG ANTY-CMV JEST PODWYŻSZONE U PACJENTÓW Z CHNS, ALE TYLKO U KOBIET _____	102
5.6. WPŁYW WIRUSA CYTOMEGALII NA UKŁAD IMMUNOLOGICZNY PACJENTÓW z ChNS _____	106
5.7. ZNACZENIE OBECNOŚCI WIRUSA CMV DLA ZMIAN W UKŁADZIE IMMUNOLOGICZNYM W OKRESIE PRZED I PO ZABIEGU POMOSTOWANIA TĘTNIC WIEŃCOWYCH _____	107
6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW _____	113
7. WNIOSKI _____	114
8. STRESZCZENIE PRACY _____	115
9. LITERATURA _____	119

SPIS SKRÓTÓW ZASTOSOWANYCH W PRACY

2-ME – 2-merkaptoetanol

ACEI – inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę

ACIP – (ang. Advisory Committee on Immunization Practices) Komitet Doradczy do spraw Szczepień

ADCC – (ang. antibody dependent cell cytotoxicity), cytoksyczość zależna od przeciwciał

AIDS – (ang. acquired immune deficiency syndrome) zespół nabytego niedoboru odporności

APC – (ang. antigen presenting cells) komórka prezentująca antygen

ApoE – apolipoproteina E

BMI – (ang. body mass index) indeks masy ciała

CABG – (ang. Coronary artery bypass graft) operacja pomostowania tętnic wieńcowych

CCS – (ang. Canadian Cardiovascular Society) klasyfikacja dusznicy bolesnej według Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego

ChNS – choroba niedokrwienna serca

CMV – wirus cytomegalii, cytomegalowirus

CRP – (ang. C-reactive protein) białka C-reaktywne

CTL – wrażliwa na IL-2 linia komórkowa, klon limfocytów T cytotoksycznych uzyskany od myszy C57BL/6

CTLA-4 – (ang. cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) antygen 4 związany z limfocytym T cytotoksycznym

CX – (ang. Circumflex) tętnica okalająca lewej tętnicy wieńcowej

EAE – (ang. encephalomyelitis) zapalenie mózgu i rdzenia

EDTA – (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) kwas etylenodiaminotetraoctowy

EuroSCORE – (ang. European system for cardiac operative risk evaluation) punktacja ryzyka zgonu okołoperacyjnego po zabiegach kardiochirurgicznych

FCS – (ang. fetal calf serum) płodowa surowica cielęca

FSS - (ang. forward scatter) rozproszenie czołowe – ugięcie światła obrazujące wielkość komórki w cytometrii przepływowej

- GRAIL – (ang. Gene Related to Anergy in Lymphocytes) gen powiązany z anergią limfocytów
- HCV – (ang. Hepatitis C virus) wirus zapalenia wątroby typu C
- HDL – (ang. high density lipoproteins) lipoproteiny wysokiej gęstości
- HIV – (ang. human immunodeficiency virus) wirus nabytego niedoboru odporności
- HLA – (ang. human leukocyte antigen) antygen ludzkich leukocytów
- HRP – (ang. horseradish peroxidase) peroksydaza chrzanowa
- Hsp-60 – (ang. heat shock proteins) białka szoku cieplnego
- HSV – (ang. Herpes simplex virus) wirus opryszczki
- HTZ – hormonalna terapia zastępcza
- ICAM – (ang. intracellular cell adhesion molecule) cząsteczka adhezji międzykomórkowej
- ICF – (ang. inhibitor of cytolytic function) inhibitor właściwości cytolitycznych
- IFN – interferon
- Ig – immunoglobulina
- IL – interleukina
- ILT – (ang. Ig-like transcripts) receptory, których transkrypty przypominają cząsteczki immunoglobulin
- IP-10 – (ang. interferon inducible protein) białko indukowane przez interferony
- K562 – linia ciągła komórek ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej
- KIR – (ang. killer inhibitory receptor) receptory hamujące zabijanie
- LAD – (ang. Left Anterior Descendens) gałąź przednia zstępująca lewej tętnicy wieńcowej
- LAK – (ang. lymphokine activated killers) komórka cytotoksyczna aktywowana limfokina
- LDH – (ang. Lactate dehydrogenase) dehydrogenaza mleczanowa
- LDL – (ang. low-density lipoprotein) lipoproteina o małej gęstości
- LPS – lipopolisacharyd
- LVEF – (ang. left ventricular ejection fraction) wartość frakcji wyrzutowej lewej komory serca
- M-CSF – (ang. macrophage colony-stimulating factor) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
- MCP – (ang. monocyte chemoattractant protein-1) białko chemotaktyczne dla monocytów

- MDM – (ang. monocytes derived macrophages) makrofagi powstałe z monocytów
- MHC – (ang. major histocompatibility complex) główny układ zgodności tkankowej
- MIG – (ang. monokine induced by gamma interferon) monokina indukowana przez interferon- γ
- MTT – 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5 difenilo bromek tetrazolu
- N-CAM – (ang. neural-cell adhesion molecule) cząsteczka adhezji komórek nerwowych
- NAC – N-acetylo cysteina
- NK – (ang. natural killer cells) komórki NK
- NYHA – (ang. New York Heart Association) klasyfikacja niewydolności serca według Nowojorskiego Stowarzyszenia Chorób Serca
- oxLDL – (ang. oxidized low-density lipoprotein) utlenione cząsteczki lipoprotein o małej gęstości
- PBL – (ang. peripheral blood lymphocytes) limfocyty krwi obwodowej
- PBMC – (ang. peripheral blood mononuclear cells) komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
- PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
- POP – oddział pooperacyjny
- PWM – (ang. pokeweed mitogen) mitogen szkarłatki
- RANTES – (ang. regulated on activation normal T cells expressed and secreted) chemokina wydzielana przez limfocyty T
- RCA – (ang. Right Coronary Artery) prawa tętnica wieńcowa
- rIL-2 – rekombinowana interleukina 2
- ROS – (ang. reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu
- SDF-1 – (ang. stromal cell-derived factor-1) czynnik pochodzący z komórek zrębowych
- SS – (ang. side scatter) rozroszenie boczne – ugięcie światła obrazujące ilość ziarnistości wewnątrz komórki w cytometrii przepływowej
- T reg – limfocyty T regulatorowe
- TAP – (ang. transporter associated with antigen processing) białko transportujące związane z obróbką antygenu
- TLR – (ang. Toll-like receptor) receptory Toll-podobne
- TNF – (ang. tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworu
- VCAM – (ang. vascular cell adhesion molecule) cząsteczka adhezji komórkowej naczyń
- VLDL – (ang. very low-density lipoprotein) lipoproteina o bardzo małej gęstości

1. WSTĘP

Według Światowego Raportu Zdrowia z 2002 roku ponad 29 procent zgonów w roku 2001 było skutkiem schorzeń układu sercowo-naczyniowego. W Polsce chorobą, która jest przyczyną największej liczby zgonów (około 12 procent), jest choroba niedokrwienna serca (ChNS). Cierpi na nią ponad 1,5 mln Polaków, a każdego roku zapada na tę chorobę od 80 do 100 tysięcy osób. Ryzyko rozwoju ChNS tradycyjnie łączone jest z nadciśnieniem tętniczym, wysokim poziomem cholesterolu, cukrzycą, płcią męską, paleniem papierosów oraz starszym wiekiem. Tymczasem u około 50% pacjentów z wykrytą ChNS nie wykazano wpływu wymienionych czynników (Epstein E. i wsp., 1999). Co więcej, zawał mięśnia sercowego występuje u 25% pacjentów bez wcześniejszych symptomów i czynników ryzyka ChNS, a aż 40% zgonów z powodu zawału mięśnia sercowego występuje u osób charakteryzujących się niższym poziomem cholesterolu aniżeli wartość średnia dla całej populacji (Smith S.C. Jr., 2006). Stąd próby poszukiwania innych czynników, które mogą być zaangażowane w rozwój choroby niedokrwiennej serca.

1.1. Choroba niedokrwienna serca – choroba o podłożu zapalnym

Ostatnie badania dowodzą, że u podłoża choroby niedokrwiennej serca leży stan zapalny, a miażdżyca tętnic, która jest jedną z głównych przyczyn rozwoju tego schorzenia, uzyskała miano przewlekłej choroby zapalnej (Ross R., 1999). Potwierdzają to obserwowane nacieki komórek układu immunologicznego w blaszce miażdżycowej (Hansson G.K. i wsp., 1989, Jonasson L. i wsp., 1986), a także obecność markerów stanu zapalnego w surowicy krwi chorych na miażdżycę i ChNS (Tracy R., 1997). Na komórkach śródbłonna naczyń wieńcowych wykrywano cząsteczki adhezyjnych ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule) i VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), a ich wzmożona ekspresja była powiązana zarówno z hipercholesterolemią (cząsteczki VCAM), jak i nadciśnieniem tętniczym (cząsteczki ICAM). Pojawianie się tych cząsteczek powoduje napływ jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, głównie monocytów i limfocytów, do miejsca formowania blaszki miażdżycowej we wczesnym etapie miażdżycy (Hansson G.K., 2001).

Ponadto podwyższone surowicze poziomy markerów stanu zapalnego: białka C-reaktywnego (CRP), surowiczego amyloidu A oraz interleukiny-6 (IL-6) uznawane są za czynniki ryzyka ChNS (Ridker P.M. i wsp., 2000). Transkrypty cytokin promujących rozwój stanu zapalnego, takich jak interleukina-12 (IL-12), czy interferon- γ (IFN- γ) były już przed laty wykrywane w blaszce miażdżycowej (Frostegard J. i wsp., 1999, Uyemura K. i wsp., 1996). Wykazano również powiązanie rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i ich komplikacji z podwyższonym poziomem cytokin prozapalnych (TNF- α , interleukiny-1 β) (Kishikawa H. i wsp., 1993, Libby P. i wsp., 1995). Komórki śródbłonna są zdolne także do produkcji i wydzielania M-CSF (macrophage colony stimulating factor) czynnika indukującego przejście monocytów w makrofagi, uznawanych za główne komórki efektorowe reakcji zapalnej (Smith J.D. i wsp., 1995). Wymienione cytokiny nie tylko wzmagają aktywność komórek układu immunologicznego, ale też indukują wydzielanie czynników chemotaktycznych i ekspresję cząsteczek adhezyjnych. Immunohistochemiczna analiza miejsca uszkodzenia śródbłonna naczynia ujawniła obecność znacznej liczby komórek układu immunologicznego. Około 80% spośród wykrytych leukocytów stanowiły makrofagi powstałe z przekształconych monocytów (MDM – monocytes derived macrophages) (Gerszten R.E. i wsp., 2000). Rolę monocytów w rozwoju miażdżycy udowodniły badania prowadzone na zwierzętach. Myszy pozbawione genu dla ApoE szybciej rozwijają miażdżycę w związku z wysokimi poziomami cholesterolu frakcji LDL i VLDL. Dodatkowy „knockout” genowy w genie dla M-CSF u tych myszy nie tylko obniżył liczbę monocytów we krwi obwodowej, ale również obserwowane uszkodzenia naczyń były mniejsze aniżeli w grupie kontrolnej (Breslow J.L., 1993).

Duże znacznie w rozwoju miażdżycy odgrywiają chemokiny. Te małe cząsteczki chemotaktyczne, na podstawie położenia cysteiny w łańcuchu białkowym zostały podzielone na cztery rodziny: CC, CXC, C, CXXXC. Chemokiny CXC pełnią rolę chemoatraktantów głównie dla neutrofilii i monocytów, a chemokiny CC dla monocytów i limfocytów. Badania *in vivo* i *in vitro* dowiodły, że produkcja i wydzielanie chemokin są indukowane procesami powiązanymi z miażdżycą, takimi jak: bezpośrednie uszkodzenia śródbłonna naczyń krwionośnych, wpływ oksydowanych lipidów, czynnik wzrostu (P-DGF – platelet derived growth factor) oraz cytokina (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ). Ekspresja chemokin, zarówno z rodziny CC (MCP-1, MCP-4, RANTES),

jak i CXC (IL-8, SDF-1, IP-10, MIG) była obserwowana w miejscu uszkodzenia naczynia. Ponadto chemokiny te wykrywano w monocytach, komórkach śródbłonna i mięśniówki gładkiej, czyli we wszystkich komórkach zaangażowanych w rozwój ChNS (Nelken N.A. i wsp., 1991, Reape T.J. i wsp., 1999, Wilcox J.N. i wsp., 1994). Badania prowadzone na zwierzętach transgenicznych dowiodły znaczenia chemokin w rozwoju tej choroby. Pozbawienie myszy zarówno genu, jak i receptora dla MCP-1 spowodowało mniejszą podatność tych zwierząt na rozwój miażdżycy, a ponadto obniżało liczbę monocytów w blaszce miażdżycowej w porównaniu do zwierząt stanowiących grupę kontrolną (Nelken N.A. i wsp., 1991). Podobne wyniki uzyskano dla myszy pozbawionych genu dla receptora IL-8 (Boisvert W.A. i wsp., 1998). Badania te dowodzą nie tylko udziału chemokin w ChNS, ale też znaczącej roli monocytów i makrofagów w patogenezie tej choroby. Uwidaczniają również zaangażowanie czynników zapalnych w indukcję ChNS.

1.2. Wpływ płci na odpowiedź immunologiczną i rozwój stanu zapalnego

Badanie wskazały, że układ immunologiczny kobiet i mężczyzn różni się. Kobiety charakteryzują się intensywniejszą odpowiedzią komórkową oraz humoralną w porównaniu do mężczyzn. Układ immunologiczny kobiet lepiej radzi sobie z infekcjami wirusowymi i pasożytniczymi, z drugiej jednak strony częściej u kobiet występują choroby o podłożu autoimmunizacyjnym (Bouman A. i wsp., 2005). W związku z tym kobiety dwa razy częściej zapadają na stwardnienie rozsiane oraz reumatoidalne zapalenie stawów i aż dziewięć razy częściej na toczeń układowy aniżeli mężczyźni (Beeson P.B. i wsp., 1994). Różnice te są zależne od działania hormonów płciowych, które w dużym stopniu modyfikują aktywność komórek układu immunologicznego.

Już w 1967 roku Butterworth M. i współpracownicy wskazali, że kobiety charakteryzują się wyższą produkcją przeciwciał aniżeli mężczyźni (Butterworth M. i wsp., 1967). Wyższe miana przeciwciał stanowią jedną z dróg tłumaczenia wyższej zachorowalności na choroby autoimmunizacyjne u kobiet. Czynnikiem, który wpływa na komórki stymulując wydzielanie przeciwciał, są estrogeny. W badaniu Kanda N. i Tamaki K. z 1999 roku hodowla komórek PBMC z różnymi dawkami estrogenów wzmacniała wydzielanie przeciwciał (Kanda N. i Tamaki K., 1999). Co więcej, hormony te zwiększały produkcję IL-10 w monocytach. Badanie to sugeruje stymulację

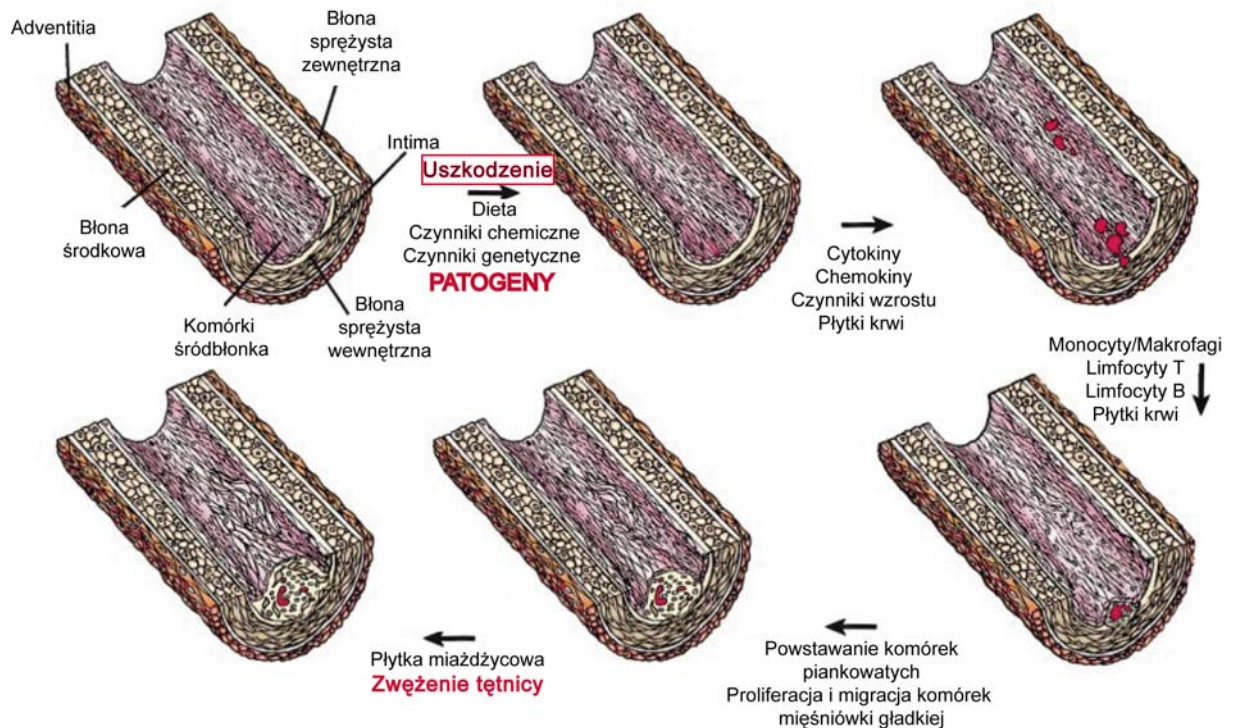
odpowiedzi Th2 przez estrogeny. Dowodzi tego też badanie przeprowadzone u pacjentów po zmianie płci. W badaniu tym podanie mężczyznom estrogenów oraz leków antyandrogennych spowodowało obniżenie produkcji IFN- γ przez limfocyty krwi obwodowej po stymulacji mitogenami. Podanie kobietom androgenów wywołało odwrotny efekt. Hormony te zwiększyły produkcję IFN- γ oraz TNF- α przez limfocyty krwi obwodowej (Giltay E.J. i wsp., 2000). Badania te sugerują, że estrogeny promują odpowiedź typu Th2 i hamują odpowiedź typu Th1.

Takie działanie estrogenów chroni kobiety przed rozwojem chorób o podłożu zapalnym. Po menopauzie, gdy poziom hormonów płciowych obniża się zaobserwowano wzrost IL-6 i TNF- α , czyli cytokin prozapalnych, w surowicy krwi kobiet (Bouman A. i wsp., 2005, Rachoń D. i wsp., 2002). Jednocześnie menopauza była powiązana ze wzrostem liczby monocytów. Efekt ten był odwracalny podczas zastosowania hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) (Ben-Hur H. i wsp., 1995). Można więc powiedzieć, że estrogeny regulują też liczbę monocytów we krwi. Komórki te są jednym z głównych źródeł cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α w surowicy krwi.

Wraz z menopauzą spada poziom estrogenów, co prowadzi do zwiększenia poziomu cytokin prozapalnych. Jak wspomniano wcześniej ChNS jest chorobą o podłożu zapalnym i rozwija się 10 lat później u kobiet aniżeli u mężczyzn (Keil U., 2000). Być może przesunięcie równowagi cytokinowej w kierunku zapalnym u kobiet po menopauzie może tłumaczyć tę różnicę.

1.3. Czynniki infekcyjne – jako podłoże zapalenia w chorobach sercowo-naczyniowych

Rycina 1.3.1. Model Streblowa rozwoju miażdżycy. Opis w tekście. Na podstawie Streblow D.N. i wsp., 2001.



Zgodnie z modelem Streblowa rozwoju miażdżycy, a także choroby niedokrwiennej serca pierwszym krokiem w patogenezie tych schorzeń jest uszkodzenie komórek śródbłonna (Streblow D.N. i wsp., 2001). Uszkodzenie to jest wywoływane przez takie czynniki, jak nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia, czynniki chemiczne, w tym palenie papierosów, czynniki immunologiczne, ale także przez infekcje patogenami, które w ostatnich latach zwróciły uwagę wielu badaczy. Uszkodzenie komórek śródbłonna prowadzi do lokalnego wyrzutu cytokin i czynników chemotaktycznych, co powoduje napływ monocytów/makrofagów i płytek krwi do miejsca uszkodzenia. Akumulacja lipidów w aktywowanych monocytach/makrofagach oraz ich oddziaływanie z limfocytami T prowadzi do powstania nacieków tłuszczowych. Dalsze przemiany powodują akumulację płytek krwi w miejscu uszkodzenia oraz proliferację komórek mięśniówki gładkiej.

Ostatecznym etapem tego procesu jest powstanie blaszki miażdżycowej złożonej z komórek piankowatych, czyli makrofagów ze złogami lipidów w przestrzeni wewnątrzkomórkowej, komórek śródbłonka, komórek mięśniówki gładkiej oraz płytek krwi (Streblov D.N. i wsp., 2001) (Rycina 1.3.1.). Blaszka miażdżycowa może powodować zwężenie lub całkowicie zamknięcie światła naczynia, co w przypadku naczyń wieńcowych prowadzi do niedokrwienia mięśnia sercowego.

Dlaczego rola patogenów jest tak podkreślana w etiologii chorób naczyniowych? Są one bowiem uznawane za czynniki indukujące pierwsze uszkodzenie ściany naczynia. Do czynników infekcyjnych zaliczanych do tej grupy należą głównie te, które charakteryzują się powszechnością występowania. Takie podejście mogłoby tłumaczyć rozwój chorób naczyniowych u osób bez tradycyjnych czynników ryzyka ich rozwoju, takich jak na przykład hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze czy palenie papierosów.

Znaczenie czynników infekcyjnych dla rozwoju miażdżycy zostało potwierdzone przez badanie Prasada i współpracowników z 2002 roku (Prasad A. i wsp., 2002). Przeprowadzono je na 395 osobach, u których wykazano, że czynnikiem ryzyka zapadalności na miażdżycę tętnic wieńcowych jest łączne obciążenie patogenami („pathogen burden”) mierzone liczbą pozytywnych testów na obecność przeciwciał przeciw szerokiemu zestawowi bakterii i wirusów. Do bakterii biorących udział w tym procesie należą głównie wewnątrzkomórkowe drobnoustroje takie jak: *Chlamydia pneumoniae* czy *Helicobacter pylori*. Do wirusów przypuszczalnie zaangażowanych w rozwój choroby niedokrwiennej serca (ChNS) należą wirusy powodujące wirusowe zapalenie wątroby (WZW) różnych typów, a także wirusy typu *Herpes*, w tym wirus cytomegalii (CMV) (Epstein S.E. i wsp., 1999). Infekcje bakteryjne w śródbłonku naczyń krwionośnych mogą prowadzić nie tylko do rozwoju stanu zapalnego, ale również do powstania zjawisk autoimmunizacyjnych. Białko Hsp-60 (heat shock proteins – białka szoku cieplnego) występuje jednocześnie u bakterii podejrzanych o przyczynianie się do rozwoju ChNS, jak i w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych (Danesh J. i wsp., 1997, Xu Q. i Wick G., 1996). Odporność przeciwbakteryjna, obejmująca odpowiedź przeciw białku Hsp-60, mogłaby na drodze mimikry molekularnej prowadzić do uszkodzenia śródbłonek naczyń. W obrębie blaszki miażdżycowej Hsp-60 bakteryjne kolokalizuje z Hsp-60 śródbłonka. Co więcej, badania nad patogennym działaniem tego białka sugerują, że na drodze mimikry molekularnej (podobieństwa

strukturalnego pomiędzy Hsp-60 a epitopami miozyny) może dochodzić do inicjacji zapalenia mięśnia sercowego, którego ostatecznym efektem jest kardiomiopatia rozstrzeniowa (Kol A. i Libby P., 1999). Jednocześnie należy zauważyć, że także białka wirusowe mogą brać udział w reakcji immunologicznej zależnej od mimikry molekularnej (Naucler C.S. i wsp., 1996).

1.3.1 Wirus cytomegalii i choroba niedokrwienna serca

Wirus cytomegalii jest powszechnie występującym czynnikiem infekcyjnym. W krajach rozwiniętych około 60% populacji osób dorosłych jest zakażonych tym wirusem, w Polsce odsetek ten wynosi około 70% (Siwak E. i wsp., 1992). Zakażenie CMV następuje zwykle w młodym wieku, a przebieg infekcji może być objawowy lub bezobjawowy, co zależy od stanu układu immunologicznego chorego – niska aktywność układu odpornościowego sprzyja rozwojowi pełnoobjawowych zakażeń.

CMV zakaża komórki śródbłonna, nabłonka, monocyty/makrofagi, komórki mięśniówki gładkiej, a także granulocyty (Mocarski E.S., 2001). Jak wszystkie wirusy *Herpes*, CMV po infekcji przechodzi w stan długotrwałej latencji. Reaktywacja wirusa następuje w stanie obniżenia aktywności układu immunologicznego (Bowen E.F. i wsp., 1996, Reinke P. i wsp., 1999). Jakkolwiek wirus może zakażać wymienione wcześniej komórki, to jedynymi komórkami, w których obserwowano właściwy proces latencji i reaktywacji są, monocyty/makrofagi oraz komórki progenitorowe o fenotypie CD33+CD34+ (von Laer D. i wsp., 1995, Taylor-Wiedeman J. i wsp., 1991). Reaktywacja CMV może prowadzić do zapalenia siatkówki oka, przelyku, okrężnicy, mózgu, a także śródmiąższowego zapalenia płuc. Jednak nie tylko immunosupresja jest warunkiem reaktywacji wirusa, oprócz niej musi zaistnieć także stan zapalny. Może to tłumaczyć reaktywację wirusa po zabiegach transplantacji narządów, a także w chorobach charakteryzujących się długotrwałym stanem zapalnym, w tym również w miażdżycy (Streblow D.N. i Nelson J.A., 2003).

Pierwotna infekcja oraz reaktywacja wirusa cytomegalii może sprzyjać obniżeniu aktywności układu immunologicznego, a także indukować stan zapalny (Schrier R.D. i wsp., 1986). Mechanizm immunosupresji wywoływanej przez CMV jest w dużej mierze oparty na zmianach proporcji subpopulacji komórek układu immunologicznego oraz na zaburzeniu równowagi cytokinowej. W 1986 Schrier R.D. wykazał, że dodanie izolatów CMV do hodowli komórek krwi obwodowej powoduje obniżenie aktywności

cytotoksycznej komórek NK (natural killers), a także upośledza rozpoznawanie antygenów i odpowiedź limfocytów T na mitogeny (Schrier R.D. i wsp., 1986). Sugeruje to bezpośredni wpływ CMV na komórki układu immunologicznego. Co więcej, podczas reaktywacji wirus powoduje zwiększony wyrzut IL-10, cytokiny, która ma działanie immunosupresyjne i powoduje obniżenie ekspresji MHC klasy II (major histocompatibility complex) na komórkach prezentujących antygen, a także obniżenie aktywności limfocytów T i komórek NK (Redpath S. i wsp., 1999).

W ostatnich latach wykazano powiązania wirusa cytomegalii z rozwojem ChNS. Hendrix M.G. i współpracownicy (1990) zaobserwowali, że obecność CMV w ścianie tętnic jest częstsza u osób z chorobą niedokrwienną serca aniżeli u osób zdrowych (Hendrix M.G. i wsp., 1990). Dalsze badania ujawniły, że poziom przeciwciał przeciw białkom wirusa CMV jest wyższy u osób z klinicznymi objawami ChNS w porównaniu do chorych bezobjawowych. Co więcej, wysokie miana przeciwciał przeciw CMV mogą być traktowane jako czynnik ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca oraz ponownego zwężenia tętnic wieńcowych po zabiegu ich poszerzania (Blum A. i wsp., 1998). W 2003 roku ci sami autorzy zasugerowali, że wysokie miana przeciwciał przeciw CMV mogą być uznawane za wczesny czynnik predykcyjny rozwoju miażdżycy. Wysokie miana tych przeciwciał są traktowane jako marker długotrwałej antywirusowej odpowiedzi immunologicznej indukującej stan zapalny i prowadzącej do rozwoju klinicznej postaci miażdżycy (Blum A. i wsp., 2003). Obserwowano, że wysokie miana przeciwciał anti-CMV oraz wysoki poziom białka C-reaktywnego we krwi pacjentów z chorobą niedokrwienną serca wiązał się z ich wyższą śmiertelnością (Muhlestein J.B. i wsp., 2000).

Infekcje wirusem cytomegalii wpływają też na poziom cholesterolu w surowicy krwi badanych. Szkaradkiewicz i współpracownicy (2002) dowiedli, że u dzieci z wykazaną obecnością przeciwciał przeciw wirusowi CMV poziom cholesterolu frakcji HDL był obniżony w porównaniu z wartościami referencyjnymi. Autorzy ci przypuszczają, że ostra infekcja CMV prowadzi do zakłócenia transportu endogenego cholesterolu do wątroby poprzez obniżenie frakcji HDL, co może przyczyniać się do rozwoju ChNS (Szkaradkiewicz A. i wsp., 2002).

Także modele zwierzęce popierają hipotezę o powiązaniu infekcji wirusem cytomegalii z chorobą niedokrwienną serca. Infekcja CMV u myszy z „knockoutem” genu ApoE przyspieszyła rozwój miażdżycy oraz powiększyła rozmiar uszkodzeń

w naczyniach. Zmianom tym towarzyszył podwyższony poziom IFN- γ , który został przez badaczy uznany za jeden z możliwych mechanizmów oddziaływania wirusa na rozwój miażdżycy. Co ciekawe, zmiany te dotyczyły tylko samców, u samic nie wykazano powiększenia uszkodzeń w związku z infekcją CMV (Burnett M.S. i wsp., 2001).

Wirus cytomegalii może także wpływać bezpośrednio na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych. Odkryto, że ludzki CMV podczas latentnej infekcji indukował proliferację komórek śródbłonka naczyń krwionośnych szczura (Zhou Y.F. i wsp., 1999). Dalsze badania dowiodły, że zainfekowane ludzkie komórki śródbłonka nie tylko nie ulegały apoptozie, ale też wykazywały większy potencjał migracyjny (Kovacs A. i wsp., 1996). Można więc przypuszczać, że CMV w znacznym stopniu przyczynia się do rozrostu błony wewnętrznej naczyń krwionośnych. Dodatkowe badania ujawniły, że wirus cytomegalii może wpływać na metabolizm komórkowy i promować akumulację cholesterolu (Melnick J.L. i wsp., 1996). Co ciekawe, udowodniono w badaniu Nerheima i współpracowników (2004), że wirus cytomegalii zakaża preferencyjnie naczynia zmienione miażdżycowo. W badaniu tym próba zakażenia CMV naczyń miażdżycowych kończyła się 100% infekcyjnością, gdy tymczasem z 14 naczyń niezmienionych tylko 2 zostały zakażone. Infekcja objęła błonę wewnętrzną naczynia (intima) i przydanekę (adventitia) tętnic, nie wykryto wirusa w komórkach mięśniówki gładkiej (Nerheim P.L. i wsp., 2004).

Rozwój infekcji CMV i jego ewentualna reaktywacja są powiązane ze zmianami poziomu cytokin i chemokin. Według badań Soderberg-Naucler C. i współpracowników (1997a) monocyty spełniają rolę rezerwuaru latentnej formy wirusa (Söderberg-Naucler C. i wsp., 1997a). Dalsze badania *in vitro* dowiodły, że do pełnej reaktywacji wirusa cytomegalii wymagana jest transformacja monocytów w makrofagi oraz odpowiednie środowisko cytokinowe. Makrofagi, w których może dojść do pełnej reaktywacji wirusa, to komórki o fenotypie powierzchniowym przypominającym zarówno monocyty (CD14+CD64+), jak i komórki dendrytyczne (CD1a+CD83+) oraz dodatkowo charakteryzujące się wysoką ekspresją cząsteczek MHC klasy I oraz II na swojej powierzchni. Przy reaktywacji zakażenia duże znaczenie odgrywały poziomy cytokin: IFN- γ , IL-2, oraz TNF- α (Soderberg-Naucler C. i wsp., 1998). Podobne wyniki uzyskano *in vivo* u chorych na AIDS (ang. Acquired Immune Deficiency Syndrome – zespół nabytego niedoboru odporności) podczas rozwoju zapalenia wywołanego przez CMV,

a także pacjentów CMV-seropozytywnych po przeszczepach płuc, u których wykazano podwyższone poziomy TNF- α (Magnan A. i wsp., 1994, Smith P.D. i wsp., 1992). U pacjentów po przeszczepach płuc podczas reaktywacji CMV wykazano również podwyższone poziomy interleukiny-6, cytokiny będącej czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy (Humbert M. i wsp., 1993). Dowiedziono ponadto, że infekcje CMV są powiązane ze zmianami poziomu chemokin. U osób cierpiących na cytomegalowirusowe zapalenie płuc notowano wysokie stężenia RANTES (regulated on activation normal T cells expressed and secreted) przez cały okres trwania infekcji, aż do jej całkowitego opanowania (Monti G. i wsp., 1996). Podobnie podwyższone poziomy MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) wykazano w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z AIDS z cytomegalowirusowym zapaleniem mózgu (Bernasconi S. i wsp., 1996). Wszystkie te czynniki biorą udział w rozwoju choroby niedokrwiennej serca zwiększając aktywację komórek oraz ich migrację w miejsce uszkodzenia miażdżycowego. Sama obecność wirusa może też wspierać migrację komórkową, gdyż DNA wirusa koduje receptory dla chemokin układu immunologicznego. Białko wirusowe US28 jest receptorem dla chemokin typu CC – MCP-1, RANTES. Jego ekspresja w komórkach mięśniówki gładkiej zwiększała migrację tych komórek w kierunku miejsca o większym stężeniu tych chemokin (Bodaghi B. i wsp., 1998). Może to być jeden z potencjalnych mechanizmów wpływu wirusa na rozwój ChNS.

1.4. Wpływ CMV na układ immunologiczny

1.4.1 CMV i komórki NK

Prawdopodobnie wirus cytomegalii bierze bezpośrednio udział tylko w inicjacji procesu miażdżycowego, gdyż był rzadko znajdowany w późnej blaszce miażdżycowej (Pampou S.Y. i wsp., 2000). Jednakże wiadomo, że przewlekła infekcja tym wirusem może przyczyniać się do rozwoju ChNS poprzez indukcję stanu immunosupresyjnego i torowanie drogi wtórnym infekcjom bakteryjnym i zjawiskom autoimmunizacyjnym. Także pierwotna infekcja CMV i reaktywacja tego wirusa może indukować obniżenie kompetencji układu immunologicznego. Zachodzi to prawdopodobnie poprzez stymulację wydzielania interleukiny-10 (IL-10), cytokiny wpływającej supresyjnie na odpowiedź komórkową (Schrier R.D. i wsp., 1986) oraz poprzez zmiany ilościowe w subpopulacjach limfocytów T i komórek NK.

Komórki NK (natural killers) biorą udział we wczesnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko wirusom. Komórki te charakteryzowane są jako cytotoksyczne komórki efektorowe zdolne do spontanicznego niszczenia komórek zainfekowanych wirusem i transformowanych nowotworowo (Herberman R.B. i Oratldo J.R., 1981) w sposób niespecyficzny, to znaczy bez uprzedniej immunizacji (Nunn M.E. i wsp., 1977). Rozpoznawanie zmienionych patologicznie komórek zachodzi na podstawie łączenia się receptorów hamujących KIR (killer inhibitory receptor), znajdujących w błonie komórkowej komórek NK, z białkami głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I (MHC I) obecnych na komórkach docelowych (Lanier L.L. i Phillips J.H., 1996). Brak cząsteczek MHC I indukuje atak cytotoksyczny. Receptory hamujące klasy KIR2DL1 i KIR2DL2 rozpoznają różne peptydy cząsteczek HLA-C (human leukocyte antigen) (Winter C.C. i Long E.O., 1997). Natomiast receptory ILT (Ig-like transcripts) łączą się z cząsteczkami HLA-E (Colonna M. i wsp., 1997). Wirus cytomegalii może wzmacniać ekspresję cząsteczek MHC i w ten sposób „chronić” zainfekowane komórki przed atakiem komórek NK. Białko wirusowe UL40 ma podobną sekwencję liderową do HLA-E. W fibroblastach zakażonych CMV wykazano wzmożoną ekspresję tych cząsteczek, co może przyczyniać się do zmniejszonej podatności na lizę tych komórek przez komórki NK (Tomasec P. i wsp., 2000). Dalsze badania ujawniły, że UL90 indukuje IFN- γ , cytokinę o działaniu zapalnym, dodatkowo zwiększając efekt ochronny poprzez wyższą ekspresję HLA-E (Cerboni C. i wsp., 2001). Nieklasyczna cząsteczka MHC I klasy – HLA-G, w normalnych warunkach występująca na komórkach łożyska i hamująca odpowiedź komórkową, może być stymulowana podczas reaktywacji CMV w monocytach. Dodatkowo obserwowano, że wzrost ekspresji HLA-G pociągał za sobą obniżenie ekspresji klasycznych cząsteczek MHC klasy I. Wykazano, że wczesne białka wirusowe pp72 i pp86 stymulują wydzielanie rozpuszczalnej formy MHC klasy I (Onno M., i wsp., 2000). Wirus cytomegalii wytwarza także białko UL18, będące homologiem cząsteczek HLA klasy I. Białko to wiąże się z receptorami ILT z większym powinowactwem aniżeli cząsteczki MHC klasy I (Chapman T.L. i wsp., 1999), jednak znaczenie ochronne tego procesu nie jest do końca udowodnione i pewne. W badaniu Reyburna H.T. i współpracowników (1997) ekspresja UL18 faktycznie chroniła przed cytotoksycznym efektem komórek NK, tymczasem w innych badaniach obserwowano, że produkcja tego białka wręcz zwiększała wrażliwość zainfekowanych komórek na atak komórek NK (Leong C.C. i wsp., 1998, Reyburna H.T. i wsp., 1997). Innym białkiem wirusowym imitującym MHC klasy I jest białko UL142, które chroni

przed lizą ze strony komórek NK, ale nie całkowicie. Z drugiej strony blokowanie ekspresji białka UL142, przyspieszało lizę komórek zakażonych CMV (Wills M.R. i wsp., 2005).

Wymienione mechanizmy umożliwiają wirusowi ukrycie się i chronią komórki zakażone przed niszczącym efektem komórek NK, a także wpływają na aktywność tych komórek.

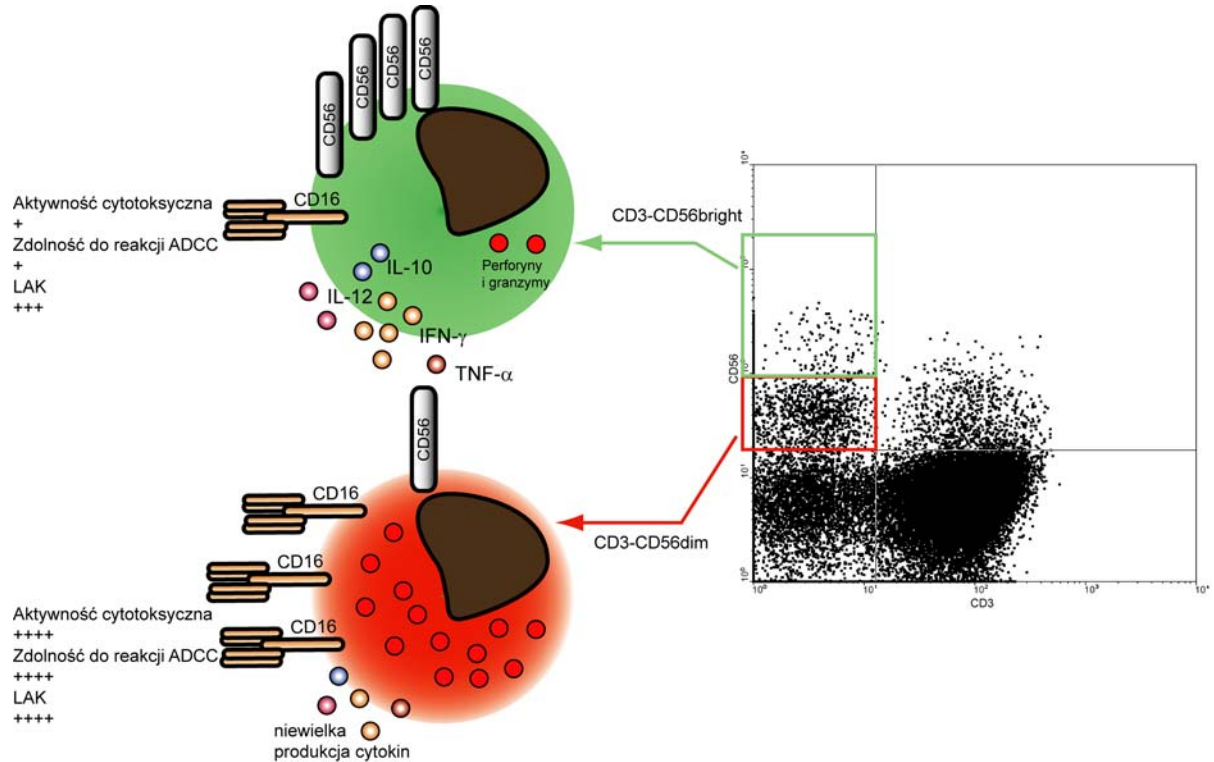
1.4.1.1 Subpopulacje komórek NK

Wśród komórek NK (CD3-CD56+) na podstawie ekspresji specyficznych cząsteczek w błonie komórkowej można wyróżnić dwie subpopulacje (Jonges L.E. i wsp., 2001):

- CD56bright – charakteryzujące się wysoką ekspresją cząsteczek CD56 i niską ekspresją cząsteczek CD16,
- CD56dim – charakteryzujące niską ekspresją cząsteczek CD56 oraz wysoką cząsteczek CD16.

Na rycinie 1.4.1.1.1. przedstawiono podstawowe różnice między subpopulacjami komórek NK.

Rycina 1.4.1.1.1. Subpopulacje komórek NK: CD3-CD56bright i CD3-CD56dim. ADCC – (antibody dependent cell cytotoxicity), cytotoxiczność zależna od przeciwciał; LAK – (lymphokine activated killers) komórka cytotoksyczna aktywowana limfokiną. Na podstawie Cooper M.A. i wsp., 2001a.



Różnice morfologiczne pomiędzy tymi populacjami są związane z różnicami w ich funkcji. Komórki NK CD56bright charakteryzują się wyższą produkcją cytokin: TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-12 i wydają się być bardziej czułe na sygnały płynące od innych komórek układu immunologicznego (Cooper M.A. i wsp., 2001c). We wczesnej odpowiedzi immunologicznej subpopulacja ta kontroluje rozwój odpowiedzi na infekcje poprzez wpływ na poziom aktywacji monocytów, makrofagów oraz innych komórek prezentujących antygen (APC – antigen presenting cells) (Cooper M.A. i wsp., 2001a). Regulacja ta ma charakter pozytywnego sprzężenia zwrotnego. Pod wpływem interleukiny-1 oraz interleukiny-12, wydzielanej przez APC we wczesnej fazie odpowiedzi na infekcje, komórki NK CD56bright zwiększają wydzielanie TNF- α , IFN- γ , czyli cytokin aktywujących APC (Cooper M.A. i wsp., 2001a, Cooper M.A. i wsp., 2001b, Fehniger T.A. i wsp., 1999). NK o fenotypie CD56dim także produkują i uwalniają cytokiny, jednak na znacznie niższym poziomie. Spoczynkowa cytotoxiczność komórek CD56dim jest wyższa aniżeli komórek CD56bright, ale pod wpływem interleukiny-2, ich cytotoxiczność wzrasta i osiąga podobne wartości

jak komórek CD56dim (Caligiuri M.A. i wsp., 1990, Nagler A. i wsp., 1989, Nagler A. i wsp., 1990) (Rycina 1.4.1.1.1.).

Chociaż w krwi obwodowej jest więcej komórek o fenotypie powierzchniowym CD56dim, to jednak w węzłach chłonnych występuje przewaga komórek CD56bright. Regulatorowe komórki NK na swojej powierzchni posiadają wyższą ekspresję receptora dla IL-2, a ligandem dla niego w węzłach chłonnych jest IL-2 wydzielana przez limfocyty T. W odpowiedzi na taką stymulację komórki CD56bright, obecne w węzłach chłonnych, zaczynają produkować i wydzielać IFN- γ . Wydaje się więc, że komórki CD56bright stanowią połączenie między specyficzną a niespecyficzną odpowiedzią immunologiczną (Fehniger T.A. i wsp., 2003).

Komórki CD56bright są nie tylko zaangażowane w regulację wczesnej odpowiedzi immunologicznej, ale stanowią również frakcję komórkową zaangażowaną w indukcję i rozwój stanu zapalnego, wykrywano je w miejscu zapalenia. Na drodze interakcji z monocytami komórki CD56bright zwiększały wyrzut cytokin prozapalnych, zaś ich aktywacja przez takie cytokiny, jak IL-12, IL-15 i IL-18 prowadziła następnie do stymulacji monocytów do wydzielania TNF- α . Stymulacja ta odbywała się na drodze bezpośredniego kontaktu komórkowego. Podobnie monocyty poprzez kontakt komórkowy stymulowały komórki CD56bright do wydzielania IFN- γ (Dalbeth N. i wsp., 2004).

Czy komórki NK wpływają na rozwój choroby niedokrwiennej serca? Jednym z potencjalnych mechanizmów jest obniżenie aktywności komórek NK, co stwarza możliwość rozwoju infekcji wirusowych i bakteryjnych (Garcia-Penarrubia P. i wsp., 1989). Prawdopodobnie komórki NK zaangażowane są również bezpośrednio w indukcję zmian w błonie naczyń wieńcowych, o czym może świadczyć fakt, że komórki te znajdowano w blaszce miażdżycowej. Komórki NK inflirtujące blaszkę miażdżycową charakteryzowały się wzmożoną produkcją perforyn, które bezpośrednio uszkadzają ścianę naczyń wieńcowych (Seko Y. i wsp., 1997), a także oddziałują na miocyty serca, powodując powstawanie porów w ich błonie komórkowej (Seko Y i wsp., 1993). Jednak nie tylko komórki NK są zaangażowane w ten proces. Uszkodzenia takie mogą też powodować inne komórki zdolne do wydzielania perforyn, między innymi limfocyty T cytotoksyczne. Udowodniono, że limfocyty T w blaszce miażdżycowej są w stanie ciągłej aktywacji i także są zdolne do wydzielania perforyn

(Hansson G.K. i wsp., 1989).

Zmiany aktywności cytotoksycznej komórek NK były opisywane w licznych publikacjach, jednakże niewiele prac traktuje o zmianach ilościowych populacji komórek NK w stanach chorobowych. Z nielicznych doniesień wynika, że wzrost liczby komórek NK obserwowano w śluzówce żołądka w chorobie wrzodowej (del Mar Cabrera M. i wsp., 2001), u której podstaw, tak jak i ChNS, leży stan zapalny. Wykazano wpływ infekcji wirusowych na obie subpopulacje komórek NK. Infekcje wywołane wirusem HIV powodowały obniżenie liczby komórek NK (Lucia B. i wsp., 1995), notowano również wpływ infekcji CMV na liczbę tych komórek (Stephan F. i wsp., 2001).

Komórki NK stanowią populację chroniącą przed infekcjami wirusowymi i bakteryjnymi. Jednocześnie obecność tych komórek nie jest obojętna dla rozwoju stanu zapalnego. Są one także populacją, na którą CMV wywiera duży wpływ. W tym kontekście wydaje się, że mogą one odgrywać znaczącą rolę w ChNS.

1.4.2. Rola limfocytów T cytotoksycznych w infekcji CMV

Limfocyty T cytotoksyczne biorą udział w nabytej odpowiedzi immunologicznej. Charakteryzują się one zdolnością niszczenia komórek zainfekowanych wirusem w reakcji cytotoksycznej podlegającej restrykcji MHC, a także regulacją odpowiedzi immunologicznej poprzez wydzielanie cytokin. Wirus CMV wytwarza mechanizmy ochronne także przed atakiem cytotoksycznym ze strony limfocytów T. Białka wirusowe US11 i US2 powodują degradację cząsteczek MHC klasy I; łączą się z nimi w siateczce śródplazmatycznej i transportują do cytosolu, gdzie białka MHC I są trawione przez proteasomy (Story C.M. i wsp, 1999, Wiertz E.J. i wsp., 1996). Ponadto białko wirusowe US3 może zatrzymywać cząsteczki MHC w siateczce śródplazmatycznej (Jones T.R. i wsp., 1996). Zmniejszenie ekspresji cząsteczek głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) chroni komórki zakażone przed rozpoznaniem i zniszczeniem przez limfocyty T. W innych mechanizmach ochronnych bierze udział białko wirusowe US6, zakłócające prezentację antygenów wirusowych w kontekście MHC I. Białko to łączy się z kompleksem TAP (transporter associated with antigen processing), hamując transport peptydów do siateczki śródplazmatycznej, a także hamuje ekspresję MHC klasy I na powierzchni komórki (Ahn K. i wsp., 1997, Lopez-Botet M. i wsp., 2001).

Obecność w błonie komórkowej kompleksu CD3 jest charakterystyczna dla wszystkich limfocytów T, a cząsteczką wyróżniającą limfocyty T cytotoksyczne

jest CD8. Badania nad fenotypem limfocytów T ujawniły istnienie komórek charakteryzujących się obecnością kompleksu CD3, wysoką ekspresją CD8 oraz obecnością cząsteczki CD57 (Wang E.C.Y. i wsp., 1993). Komórki te wykazują niespecyficzne właściwości cytotoksyczne i immunosupresyjne. Badania prowadzone nad tą subpopulacją ujawniły jej hamujący wpływ na aktywność cytotoksyczną limfocytów T, proliferację i różnicowanie komórek NK, LAK (lymphokine activated killer) oraz limfocytów T cytotoksycznych (Autran B. i wsp., 1991). Komórki te wydają się mieć także podobny wpływ supresyjny na limfocyty B (Gratama J.W. i wsp., 1989). Wykazano wzrost liczby komórek CD8+CD57+ podczas infekcji wirusem cytomegalii, a także po transplantacji nerek, serca i szpiku kostnego (Fregona I. i wsp., 1985, Leroy E. i wsp., 1986, Maher P. i wsp., 1985, Plaeger-Marshall S. i wsp., 1987, Wang E.C.Y. i wsp., 1995).

Badanie Rowbottoma A.W. i współpracowników z 2000 roku wykazało, że podwyższona liczba limfocytów T o fenotypie powierzchniowym CD8+CD57+ zmniejsza zdolność układu immunologicznego do niszczenia komórek zakażonych wirusem cytomegalii. Co więcej, wykazano w tym badaniu, że komórki CD8+CD57+ charakteryzują się niższą produkcją TNF- α i IFN- γ , a z drugiej strony prawdopodobnie zwiększonym wydzielaniem IL-10 (Rowbottoma A.W. i wsp., 2000).

Z komórkami CD3+CD8+CD57+ wiązana jest też populacja CD8+CD28- wykazująca podobne funkcje. Receptor CD28 stanowi cząsteczkę kostymulacyjną limfocyta T, jej połączenie z ligandem CD80/CD86 na powierzchni komórki prezentującej antygen wzmacnia sygnał stymulacji limfocytów T (Myśliwska J., 1999a). Nasze wcześniejsze badania wskazały pozytywne powiązanie komórek CD8+CD28- oraz miana przeciwciał IgG anty-CMV (Trzonkowski P. i wsp., 2003). Wzrost liczby tych komórek obserwowano po operacji transplantacji organów oraz u osób zainfekowanych wirusem HIV (Colovai A.I. i wsp., 2003, Niehues T. i wsp., 2000). Komórki CD8+CD28- są limfocytami T immunosupresyjnymi zaangażowanymi w procesy tolerancji immunologicznej (Suciufoca N. i wsp., 2003). Oddziałują one głównie na komórki prezentujące antygen blokując ekspresję cząsteczek CD80 i CD86 i w ten sposób hamując aktywację odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów T pomocniczych (Liu Z. i wsp., 1998).

Liczba komórek CD3+CD8+CD57+ oraz CD8+CD28- wzrasta w czasie infekcji

CMV. Obie te populacje są związane ze stanami immunosupresji dlatego też ich wzrost może stanowić jedną ze strategii obniżania aktywności układu immunologicznego przez wirusa. Z drugiej jednak strony komórki te mogą chronić organizm przed skutkami nadmiernej aktywacji tego układu podczas infekcji wirusowej.

1.4.3. CMV i limfocyty T pomocnicze

Limfocyty T o fenotypie powierzchniowym CD3+CD4+CD25+, określane „limfocytami T regulatorowymi” – T reg, stanowią frakcję komórkową powiązaną z indukcją tolerancji na własne antygeny, pełnią ważną rolę w zapobieganiu reakcjom autoimmunologicznym oraz zapobiegają odrzucaniu przeszczepów (June C.H. i Blazar B.R., 2006). Działanie komórek CD4+CD25+ w regulacji tych procesów jest oparte na obniżeniu aktywności i zdolności proliferacyjnej limfocytów T oraz komórek NK. Komórki T reg są zaangażowane nie tylko w regulację odpowiedzi immunologicznej na antygeny endogenne lub autoantygeny, ale stanowią też jedną z głównych populacji komórkowych zaangażowanych w monitorowanie reaktywności układu immunologicznego na antygeny egzogenne. Ich znaczenie udowodniono w odpowiedzi alergicznej oraz w odpowiedzi na patogeny egzogenne (Mills K.H., 2004, Umetsu, D.T. i wsp., 2003). Komórki T reg biorą udział nie tylko w indukcji stanu immunosupresji, ale także w obronie przeciw patogenom. Jednak ich rola przeciwbakteryjna i przeciwwirusowa jest nie do końca poznana, a ich aktywność podczas infekcji może zarówno zapewniać protekcję, jak i umożliwiać przyspieszony rozwój infekcji.

Suvas i współpracownicy w 2003 roku dowiedli, że aktywność limfocytów T cytotoksycznych u myszy zakażonych wirusem HSV (*Herpes simplex virus*) z zablokowanymi specyficznymi przeciwciałami komórkami CD4+CD25+ jest wyższa aniżeli u myszy z w pełni funkcjonalnymi limfocytami T reg. Co więcej, limfocyty T cytotoksyczne pozbawione wpływu komórek T reg charakteryzowały się wyższym potencjałem proliferacyjnym i przez dłuższy czas utrzymywały fenotyp świadczący o ich aktywacji (Suvas S. i wsp., 2003).

Także podczas infekcji wirusem HCV (*Hepatitis C virus*) wykazano, że komórki CD4+CD25+ wyizolowane od zakażonych pacjentów mają supresyjny wpływ na proliferację komórek CD3+CD4+ oraz CD3+CD8+. Hamowały one także

produkcję perforyn i IFN- γ przez limfocyty T cytotoksyczne (Rushbrook S.M. i wsp., 2005).

Mechanizm indukcji immunosupresji przez komórki CD4+CD25+ jest kompleksowy i składa się na niego kilka elementów. Komórki T reg wywołują stan anergii w innych limfocytach pomocniczych, który mediowany jest poprzez kontakt komórkowy i prowadzi do indukcji genu GRAIL – markera anergii limfocytów. Jedyną możliwość ustąpienia anergii limfocyta T to traktowanie go dużymi dawkami IL-2 (Ermann J. i wsp., 2001). Jednym z mechanizmów tłumaczących immunosupresję kontaktową przez limfocyty CD4+CD25+ jest połączenie receptora B7 na powierzchni komórki docelowej z receptorem CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) na powierzchni komórki T reg. Połączenie to gwarantuje transmisję sygnału supresyjnego (Paust S. i wsp., 2004).

Komórki CD4+CD25+ powodują też obniżenie produkcji IL-2 przez limfocyty T, co wpływa na ich mniejszy potencjał proliferacyjny i może stanowić jedną ze składowych immunosupresji (Vahlenkamp T.W. i wsp., 2005). Oprócz tego limfocyty T reg zdolne są do produkcji cytokin o właściwościach immunosupresyjnych, takich jak IL-10 czy TGF- β (Chen M.L. i wsp., 2005, Suri-Payer E. i Cantor H., 2001). Jednakże działanie za pomocą cytokin nie wydaje się być głównym mechanizmem immunosupresji stosowanym przez limfocyty T reg.

Limfocyty CD4+CD25+, mimo wielu funkcji regulacyjnych, mogą stanowić jeden z mechanizmów immunosupresji indukowanej przez infekcję wirusową. Jak pokazano powyżej, w mediowaniu tego typu zmian biorą udział głównie wirusy z rodziny *Herpes*. Jak dotąd nie ma prac wskazujących na powiązanie komórek CD4+CD25+ z CMV, jednak przypuszcza się, że mechanizmy immunosupresji są wspólne dla całej rodziny *Herpes*. Nie można więc wykluczyć, że CMV działa podobnie jak HBV i HCV.

1.4.4. Znaczenie monocytów w indukcji zapalenia oraz w rozwoju infekcji wirusem cytomegalii

Wszystkie monocyty posiadają na swojej powierzchni cząsteczkę CD14 receptor dla lipopolisacharydu (LPS) oraz lipopeptydu Pam3Cys. LPS połączony przez CD14 przekazuje następnie sygnał pobudzenia poprzez receptor TLR-4 (Toll-like receptor),

natomiast cząsteczka Pam3Cys działa przez receptor TLR-2 (Poltorak A. i wsp., 1998). Połączenia te aktywują komórkę i prowadzą do wyrzutu szeregu cytokin, w tym TNF- α .

Wśród populacji krążących monocytów wyróżnia się dwie subpopulacje:

- klasyczne monocyty charakteryzujące się ekspresją CD14 na powierzchni komórki,
- monocyty charakteryzujące się obecnością zarówno cząsteczki CD14, jak i CD16, uznawane za komórki prozapalne (Ziegler-Heitbrock H.W., 1996).

Monocyty CD14+CD16+ są bardziej dojrzałe i charakteryzują się wyższą ekspresją cząsteczki HLA-DR na swojej powierzchni (Ziegler-Heitbrock H.W. i wsp., 1993). Są one uznawane za monocyty prozapalne ze względu na wysoką produkcję TNF- α oraz brak lub niską produkcję cytokin antyzapalnych, takich jak IL-10 (Frankenberger M. i wsp., 1996). Monocyty CD14+CD16+ stanowią główne źródło TNF- α we krwi. Porównanie frakcji monocytarnych CD14+CD16- i CD14+CD16+ po stymulacji LPS-em oraz Pam3Cys wykazało, że monocyty CD14+CD16+ charakteryzują się trzykrotnie wyższą produkcją TNF- α po stymulacji LPS-em oraz prawie dziesięciokrotnie wyższą po stymulacji Pam3Cys. Tak wysoki wzrost produkcji TNF po działaniu Pam3Cys jest związany z dwukrotnie wyższą ekspresją receptorów TLR-2 na powierzchni monocytów CD14+CD16+ (Belge K.U. i wsp., 2002). Co ciekawe, także białka otoczki wirusa cytomegalii są rozpoznawane na drodze współdziałania cząsteczek CD14+ oraz TLR-2 i prowadzą do wyrzutu cytokin prozapalnych. Stanowi to zapewne jeden z mechanizmów obronnych przeciw infekcji CMV, ale z drugiej strony cytokiny te mogą również przygotowywać odpowiednie środowisko do reaktywacji wirusa (Compton T. i wsp., 2003).

Monocyty o fenotypie CD14+CD16+ dzielą wiele wspólnych cech z makrofagami. Charakteryzują się one silnymi właściwościami żernymi oraz wysoką ekspresją cząsteczek HLA-DR, -DP i -DQ (Scherberich J.E., 2003). Świadczy to o zaangażowaniu tych komórek w prezentację antygenów egzogennych w kontekście MHC klasy II i stymulację odpowiedzi immunologicznej. Ich profil prozapalny – produkcja cytokin TNF- α i IL-1 – sprzyja rozwojowi chorób o podłożu zapalnym. Podwyższoną liczbę tych komórek zauważono w takich stanach chorobowych jak: ostre i przewlekłe infekcje, zespół uogólnionej reakcji zapalnej, hyperlipidemia, AIDS i niewydolność nerek (Nockher W.A. i Scherberich J.E., 1998, Scherberich J.E., 2003, Rothe G. i wsp., 1996). Co ciekawe, kuracja sterydowa lub działanie cytokin o profilu antyzapalnym obniża liczbę komórek CD14+CD16+. Stosowanie takich terapii

u osób z przewlekłym stanem zapalnym lub w posocznicy wykazało powiązanie pomiędzy spadkiem liczby monocytów CD14+CD16+ i obniżeniem ekspresji MHC klasy II na tych komórkach a powrotem do zdrowia (Scherberich J.E., 2003). Jak można zauważyć, ta frakcja komórkowa odgrywa istotną rolę w rozwoju reakcji zapalnej, a jednocześnie monitorowanie zmian ich liczby stanowi jedną z potencjalnych dróg śledzenia przebiegu choroby i powrotu do zdrowia pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym oraz w pozostających w stanie immunosupresji (Scherberich J.E., 2003).

Choroba niedokrwienna serca jest schorzeniem o podłożu zapalnym, czy w związku z tym monocyty o profilu prozapalnym odgrywają w niej jakąkolwiek rolę?

W badaniu Schlitta i współpracowników (2004) pacjenci chorzy na chorobę niedokrwienną serca charakteryzowali się wyższą liczbą komórek CD14+CD16+ we krwi obwodowej niż osoby z grupy kontrolnej. Co więcej, analiza regresji w tym samym badaniu wykazała, że podwyższona liczba monocytów o profilu prozapalnym stanowi czynnik ściśle wiązany z chorobą niedokrwienną serca. Pacjenci z wysoką liczbą komórek CD14+CD16+ charakteryzowali się też wysokim poziomem TNF- α w surowicy krwi. Badanie to dowodzi silnego powiązania obecności monocytów CD14+CD16+, stanu zapalnego i choroby niedokrwiennej serca (Schlitt A. i wsp., 2004). Monocyty te, fenotypowo przypominając makrofagi, mogą być też jednymi z komórek zaangażowanych w powstawanie blaszki miażdżycowej.

Ponadto monocyty o profilu prozapalnym mogą również stanowić potencjalny cel dla infekcji wirusem cytomegalii, a także dogodne miejsce do reaktywacji tego wirusa. CMV preferencyjnie zakaża monocyty, a do jego reaktywacji dochodzi podczas produkcji i wydzielania cytokin prozapalnych przez te komórki. Monocyty CD14+CD16+ mogą być ogniwem łączącym chorobą niedokrwienną serca z zakażeniem CMV.

Choroba niedokrwienna serca jest schorzeniem o podłożu zapalnym; układ immunologiczny oraz infekcje wirusowe są istotnymi czynnikami biorącymi udział w rozwoju tego procesu. Jednak powiązanie tych zdarzeń nie jest do końca poznane i wyjaśnione. W świetle najnowszych poglądów efektem zakażenia CMV jest jednoczesne wyzwolenie mechanizmów zapalnych i immunosupresyjnych. Nie wiadomo jednak czy w chorobie niedokrwiennej serca układy te pozostają w stanie

równowagi, czy też istnieją czynniki wyzwalające dominację stanu zapalnego lub immunosupresji. Poza tym, o ile udowodniono rolę zapalenia w ChNS, to istnienia immunosupresji można się tylko domyślać. W związku z tym podjęto próby wyjaśnienia zależności pomiędzy stanem zapalnym i immunosupresją u pacjentów z ChNS.

2. CELE PRACY

Celem pracy było określenie:

1. Czy pacjentów z wielonaczyniową chorobą niedokrwienną serca charakteryzują zaburzenia stanu układu immunologicznego?
2. Czy kobiety i mężczyźni chorzy na chorobę niedokrwienną serca różnią się pod względem parametrów immunologicznych?
3. Czy istnieje zależność pomiędzy przewlekłą infekcją wirusem cytomegalii a stanem układu immunologicznego u chorych z ChNS?

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Badana populacja

Do badania włączono 139 pacjentów z Kliniki Kardiologii Akademii Medycznej w Gdańsku (kierownik: prof. dr hab. Jan Rogowski) operowanych w latach 2003-2005, wybranych losowo spośród osób kwalifikowanych do operacji pomostowania tętnic wieńcowych z powodu choroby niedokrwiennej serca. U wszystkich określono liczbę przebytych zawałów serca, epizody wystąpienia migotania przedsionków i wartość frakcji wyrzutowej lewej komory serca (LVEF). Koronografia została wykonana u wszystkich pacjentów. Pacjenci byli kwalifikowani do zabiegu na podstawie co najmniej 75% zwężenia jednego z głównych naczyń wieńcowych [gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej (LAD) i/lub tętnicy okalającej lewej tętnicy wieńcowej (CX) i/lub prawej tętnicy wieńcowej (RCA)]. Odsetek pacjentów z zwężonymi jedną, dwoma lub trzema naczyniami wieńcowymi wynosił odpowiednio – 12,16, 56,08, 31,76. Z grupy badanych pacjentów wykluczono osoby z chorobami autoimmunizacyjnymi, chorobami nowotworowymi oraz przechodzących ostrą infekcję. Oceniano także stopień niewydolności serca według klasyfikacji New York Heart Association (NYHA) oraz nasilenie dolegliwości dławicowych według klasyfikacji Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego (Canadian Cardiovascular Society CCS). Ryzyko zgonu okołoperacyjnego określono za pomocą punktacji EuroSCORE.

Grupę kontrolną stanowiły 74 osoby, słuchacze Sopotkiego Uniwersytetu Trzeciego Wieku, którzy zgłosili się dobrowolnie na szczepienie przeciw wirusowi grypy. Krew obwodowa była pobierana przed szczepieniem, po uprzednim wyrażeniu zgody na pobranie krwi. Grupa tych osób pozostawała pod opieką Rejonowych Zakładów Opieki Zdrowotnej i poddawała się okresowym badaniom kontrolnym. Osoby te nigdy nie prezentowały objawów ChNS, a w podejrzanych przypadkach wykluczano chorobę na podstawie badania EKG oraz próby wysiłkowej. Z grupy kontrolnej wykluczono też osoby z czynnikami ryzyka ChNS, takimi jak cukrzyca i nadciśnienie tętnicze, a także z chorobami autoimmunizacyjnymi, chorobami nowotworowymi oraz przechodzące ostrą infekcję.

Nadciśnienie określano na podstawie ciśnienia skurczowego (≥ 140 mm Hg) lub rozkurczowego (≥ 90 mm Hg) krwi, a także na podstawie przyjmowania leków

obniżających ciśnienie. Cukrzyca była diagnozowana na podstawie kryteriów przyjętych przez American Diabetes Association (American Diabetes Association, 2005).

Kliniczą część bazy danych przygotował dr. Krzysztof Szyndler.

Od wszystkich badanych pobierano 15ml krwi żyłnej, która następnie rozdzielano do 3 probówek zawierających EDTA (oznaczenie aktywności NK testem pomiaru uwalniania dehydrogenazy mleczanowej), heparynę (oznaczenia cytometryczne) oraz nie zawierające żadnego antykoagulanta (pomiar poziomu przeciwciał i cytokin w surowicy krwi).

Wszystkie osoby zakwalifikowane do badania zostały poinformowane o ich celu. Wszystkie wyraziły też pisemną zgodę na udział w badaniu. Projekt badania został zaakceptowany przez Komisję Etyczną Akademii Medycznej w Gdańsku. Przeprowadzone badania są też zgodne z zasadami wprowadzonymi w „World Medical Association Declaration of Helsinki” (World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects, 1997).

Tabela. 3.1.1. Charakterystyka kliniczna pacjentów

Czynniki ryzyka ChNS oraz charakterystyka kliniczna pacjentów	Średnia ± odchylenie standardowe lub procent
Płeć męska, (n) %	97, (69,78%)
Wiek, lata	62,02±8,21
BMI, kg/m ²	28,92±3,77
Nadciśnienie tętnicze, %	75,71
Czas trwania nadciśnienia tętniczego, lata	10,61±8,6
Ciśnienie skurczowe, mmHg	136,21±22,73
Ciśnienie rozkurczowe, mmHg	81,86±13,04
Cukrzyca, %	32,86
Czas trwania cukrzycy, lata	9,35±6,45
Zawał mięśnia sercowego w wywiadzie, %	63,57
Palenie papierosów, %	
niepalący	25,83
palacz	14,17
ex-palacz	60
Wartość frakcji lipidowych	
Cholesterol całkowity, mg/dl	5,36±1,25
Cholesterol LDL, mg/dl	3,33±1,13
Cholesterol HDL, mg/dl	1,19±0,27
Trójglicerydy, mg/dl	4,05±2,05
Kreatynina, mg/dl	1,09±0,21
Migotanie przedsionków w wywiadzie, %	10,45
Dławica piersiowa niestabilna, %	0
Fracja wyrzutowa lewej komory, %	37±53
Zwężone istotnie naczynia wieńcowych, %	
LAD	92,65
CX	75
RCA	83,82
NYHA, mediana, rozstęp kwartylny	0, 0-1
CCS, mediana, rozstęp kwartylny	2, 2-3
EuroSCORE, mediana, rozstęp kwartylny	3, 1-4

Leki przyjmowane przez badanych pacjentów przedstawiono w tabeli 3.1.2.

Tabela 3.1.2. Farmakoterapia choroby niedokrwiennej serca

Przyjmowane leki	Odsetek pacjentów przyjmujących leki
Kwas acetylosalicylowy	96,99
Beta-blokery	87,97
Nitraty	57,14
Statyny	90,98
Inhibitory konwertazy angiotensyny – ACEI	79,7
Blokery kanału wapniowego	18,05

Przebieg operacji pomostowania tętnic wieńcowych (CABG) oraz charakterystyka okresu pooperacyjnego zostały przedstawione w tabeli 3.1.3. Zabieg został opisany liczbą wykonanych pomostów tętnicznych oraz zastosowaniem i czasem trwania krążenia pozaustrojowego. Okres pooperacyjny scharakteryzowano czasem pobytu na oddziale pooperacyjnym (POP) oraz łącznym czasem pobytu chorego w szpitalu po zabiegu.

Tabela 3.1.3. Charakterystyka zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych oraz przebieg okresu pooperacyjnego u badanych pacjentów

Zabieg oraz okres pooperacyjny	Średnia ± odchylenie standardowe lub procent
Liczba wykonanych pomostów tętnicznych	2,47±0,74
Zabieg wykonany w krążeniu pozaustrojowym, %	44,21
Czas trwania krążenia pozaustrojowego, min.	78,26±32,84
Czas pobytu na POP, godziny	1,32±0,82
Czas do wypisu, dni	6,30±0,88

POP – oddział pooperacyjny

U 49 pacjentów zbadano także przebieg zmian w zakresie subpopulacji komórek układu immunologicznego i w stężeniu cytokin podczas operacji. W tym celu krew od tych pacjentów pobrano: przed zabiegiem oraz 3, 24 i 72 godziny po CABG.

3.2 Materiały

3.2.1. Odczynniki

2-merkaptoetanol (Serva, Niemcy)
cielęca surowica płodowa (FCS) (Gibco BRL, USA)
EDTA (Sigma, USA)
Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia, Szwecja)
GolgiStop zawierający monenzynę (BD Pharmingen, USA)
rekombinowana interleukina 2 (rIL-2, Roche)
roztwór penicylina/streptomycyna (Sigma, USA)
RPMI 1640; (BioMed, Polska)
saponina (Sigma, USA)
Uropolina (POCh, Polska)
TRITON X-100 (Sigma, Niemcy)
Szczepionka przeciw grypowi *Vaxigrip* (Aventis Pasteur)

3.2.2. Bufory i roztwory

Bufor PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} – barwienia cytometryczne

NaCl 8,59g

Na_2HPO_4 1,25g

NaN_3 0,98g

EDTA (dwusodowy) 3,7g

Woda redestylowana 1000ml

Ustalono pH 7,4, autoklawowano, przechowywano w 4°C w ciemności

Bufor Aw – barwienie cytometryczne antygenów wewnątrzplazmatycznych

Inaktywowana FCS 1ml

NaN_3 0,098g

PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} do 100ml

Ustalono pH 7,4, przefiltrowano (filtr 0,22 μm), przechowywano w 4°C w ciemności

Bufor Bw – barwienie cytometryczne antygenów wewnątrzplazmatycznych

Saponina 0,1g
NaN₃ 0,098g
PBS bez Ca²⁺ i Mg²⁺ do 100ml
pH 7,4-7,6, przefiltrowano (filtr 0,22μm), przechowywano w 4°C w ciemności

Bufor Cw – barwienie cytometryczne antygenów wewnątrzplazmatycznych

Inaktywowana FCS 1ml
Saponina 0,1
NaN₃ 0,098g
PBS bez Ca²⁺ i Mg²⁺ do 100ml
pH 7,4-7,6, przefiltrowano (filtr 0,22μm), przechowywano w 4°C w ciemności

Bufor utrwalający – barwienie cytometryczne antygenów wewnątrzplazmatycznych

Paraformaldehyd 4g
PBS bez Ca²⁺ i Mg²⁺ 100ml
pH 7,4-7,6, paraformaldehyd rozpuszczony w PBS w 56°C, przechowywany w 4°C w ciemności

Mieszanina Ficoll/Uropolina, gęstość 1,007g/cm³

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

Roztwory lizujące erytrocyty oraz utrwalające komórki krwi do barwień cytometrycznych antygenów powierzchniowych

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

Kwas mrówkowy 0,6ml
Woda destylowana do 500ml

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

Węglan sodu 1,5g
Chlorek sodu 3,63g

Siarczan sodu	7,83g
Woda destylowana	250ml

Roztwór C – utrwalający komórki (100 μ l/50 μ l krwi)

Paraformaldehyd	1g
Woda destylowana	100ml

3.2.3. Materiały jednorazowego użytku

Butelki do hodowli komórkowych (NUNC, Dania)

Filtry strzykawkowe 0,22 μ m (Milipore)

Pipety pasteurowskie jednorazowe (Sigma, USA)

Płytki 24-dołkowe (NUNC, Dania)

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

Płytki 96-dołkowe, okrągłodenne (Corning Incorporated, USA)

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

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

Probówki typu Falcone 15ml (Medlab, Polska)

Probówki typu Falcone 50ml (Medlab, Polska)

Szalki hodowlane (NUNC, Dania)

Końcówki do pipet (Medlab, Polska)

3.2.4. Przeciwciała monoklonalne

CD3 ECD, klon UCHT1, mysie IgG1 (Immunotech, Beckman Coulter, Francja)

CD3 FITC, klon UCHT1, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)

CD4 PE-Cy5, klon RPA-T4, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)

CD8 FITC klon 3B5, mysie IgG_{2a} (Caltag Laboratories, USA)

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

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

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

CD16 FITC, klon 3G8, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)

CD16 PE-Cy5, klon 3G8, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)

CD25 Cy-Chrome, klon M-A251, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)
CD28 PE, klon CD28.2, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)
CD56 PE-Cy5, klon B159, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)
CD56 PE, klon B159, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)
CD57 FITC, klon NK-1, mysie IgM, κ (BD Pharmingen, USA)
HLA-DR PE-Cy5, klon G46-6 (L243), mysie IgG_{2a}, κ (BD Pharmingen, USA)
IFN-γ FITC, klon B27, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)
Kontrola izotypowa FITC, klon G155-228, mysie IgM₁, κ (BD Pharmingen, USA)
Kontrola izotypowa FITC, klon MOPC-21, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)
Kontrola izotypowa FITC, klon G155-178, mysie IgG_{2a}, κ (BD Pharmingen, USA)
Kontrola izotypowa FITC, klon DAK-GO5, mysie IgG_{2a} (DakoCytomation, Dania)
Kontrola izotypowa PE, klon MOPC-21, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)
Kontrola izotypowa PE-Cy5, klon MOPC-21, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)
Kontrola izotypowa ECD, klon 679,1Mc7, mysie IgG₁ (Immunotech, Beckman Coulter, Francja)
Kontrola izotypowa FITC do barwień wewnątrzkomórkowych, klon MOPC-21, mysie IgG₁, κ (BD Pharmingen, USA)

3.2.5. Podłoża hodowlane

Podłoże do hodowli komórek PBMC

RPMI z 5% FCS, L-glutaminą, pirogronianem

Podłoże do hodowli komórek linii CTL

RPMI 1640 z 10% FCS, 20μM 2-merkaptetanolu (2-ME), penicyliną, streptomycyną i 10U/ml rekombinowanej ludzkiej IL-2 (Roche)

Podłoże do hodowli komórek linii K562

RPMI 1640 z 5% FCS, 20μM 2-merkaptetanolu (2-ME), penicyliną i streptomycyną

3.2.6. Linie komórkowe

CTL – wrażliwa na IL-2 linia komórkowa, klon limfocytów T cytotoksycznych uzyskany od myszy C57BL/6 (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław)

K562 – linia ciągła komórek ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław)

3.2.7. Aparatura

cytometr przepływowy Epics XL (Coulter, USA)

cytometr przepływowy LSR II (BD, USA)

czytnik płytek Sumal PE2 (Niemcy)

czytnik płytek Multiscan MCC/340 (Labsystem, Finlandia)

inkubator z regulowanym przepływem CO₂ (Heraeus, Niemcy)

komora laminarna (Heraeus, Niemcy)

mieszadło magnetyczne (IKA, Niemcy)

mikroskop odwrócony TELEVAL2R (Carl Zeiss, Jena, Niemcy)

mikroskop świetlny Studer E (PZO Warszawa, Polska)

pH-metr uniwersalny Φ 32 (Beckman, USA)

urządzenie do lizy i utrwalania komórek Qprep Epics Immunology Workstation (Coulter, USA)

wytrząsarka typu „vortex” (IKA, Niemcy)

waga elektroniczna (Rad-Wag, Polska)

wirówka 3K15 (Sigma, USA)

zamrażarka -80°C Polar 550H (AS Biomedica, Włochy)

3.2.8. Programy komputerowe

System II 3.0 (Coulter, USA) – oprogramowanie zarządzający cytometrem przepływowym Epics XL (Coulter, USA), zbieranie danych, analiza wyników

FacsDiva (BD, USA) – oprogramowanie zarządzające cytometrem przepływowym LSR II (BD, USA), zbieranie danych, analiza wyników

KC5 (Biotec, Japonia) – analiza wyników uzyskanych w czytnikach płytek

BD Cytometric Bead Array Software (BD, USA) – analiza danych uzyskanych po wykonaniu testu CBA

Statistica, wersja 7.1 (StatSoft Inc., USA) – analiza statystyczna wyników

WinMDI 2.8 – analiza wyników badań cytometrycznych, program został napisany przez Josepha Trottera, program jest rozpowszechniany na licencji freeware i dostępny pod adresem: <http://facs.scripps.edu/software.html>

3.3. Metody

3.3.1. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC – peripheral blood mononuclear cells)

Krew żylna umieszczona w sterylnych probówkach z zawartością EDTA była rozcieńczana buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) (Gibco BRL, Life Technologies, Berlin) w stosunku 1:1 i nawarstwiana na mieszaninie Ficollu (Amersham Pharmacia Biotech AG, Uppsala) i Uropoliny (Polfa, Starogard) o gęstości 1,077g/ml. Następnie była wirowana przez 15min przy prędkości 2500obrotów/min. Interfaza zawierająca obłoczek jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) została ściągnięta pipetą pasterowską. Po trzykrotnym płukaniu komórek w PBS, były one zawieszane w medium RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Berlin) z dodatkiem 5% płodowej surowicy cielęcej (FCS) (Flow Lab.).

3.3.2. Izolacja limfocytów krwi obwodowej (PBL – peripheral blood lymphocytes)

Limfocyty krwi obwodowej (PBL) uzyskano po inkubacji komórek PBMC na plastikowej szalce Petriego. Po 30min inkubacji w temperaturze 37°C z ciągłym przepływem 5% CO₂ komórki nie przylegające do plastiku zostały zebrane i użyte do testu aktywności cytotoksycznej NK.

3.3.3. Pomiar aktywności cytotoksycznej komórek NK, test mierzący uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej

Test pomiaru aktywności komórek NK został przeprowadzony za pomocą zestawu Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche) z użyciem komórek K-562 jako komórek docelowych. Test ten nie mierzy bezpośrednio zdolności cytotoksycznej komórek NK; pozwala on na ustalenie ilości komórek zniszczonych w czasie reakcji cytotoksycznej na podstawie pomiaru uwolnionej dehydrogenazy mleczanowej (LDH) z komórek docelowych (K-562) do środowiska reakcji.

Na płytce 96-dółkowej okrągłodennej zostały założone następujące próby:

- próba spontaniczna – zawierająca 200tys. komórek K-562 zawieszonych w 200μl medium RPMI (Gibco BRL, Life Technologies, Berlin), próba ta została założona w 3 powtórzeniach,
- próba maksymalna – zawierająca 200tys. komórek K-562 zawieszonych w 100 μl medium RPMI oraz 100μl 2% TRITONU X-100 (Sigma, Niemcy), próby te zostały założone w 3 powtórzeniach,
- próby badane – zawierające 20tys. komórek PBL i 200tys. komórek K-562 zawieszonych w 200μl medium RPMI, próby te zostały założone w 6 powtórzeniach.

Przygotowane w wyżej wymieniony sposób testy były inkubowane przez 4 godziny w temperaturze 37°C z ciągłym przepływem 5% CO₂. Po inkubacji próby wirowano przez 10min przy 1200obr/min, a następnie z każdego dołka zbierano po 100μl nadsącza i przenoszono do 96-dółkowej płytki płaskodennej.

Do każdego dołka, zgodnie z instrukcją zestawu Cytotoxicity Detection Kit, dodano 100μl mieszaniny reaktywnej (Reaction mixture). Absorbancja była mierzona przy długości fali 492nm w aparacie Multiscan MCC/340 (Labsystem, Finlandia).

Procent cytotoksyczności obliczono według wzoru:

$$\% \text{ cytotoksyczności} = \frac{\text{Ex} - \text{Sp}}{\text{MR} - \text{Sp}} \times 100,$$

gdzie: Ex- absorbanca próby badanej (Experimental)

Sp- absorbanca próby spontanicznej (Spontaneous Release)

MR- absorbanca próby maksymalnej (Maximum Release)

Mieszanina reaktywna (Reaction mixture) zawiera:

- mleczan sodu,
- NAD⁺,
- sól tetrazolium.

Dodanie tej mieszaniny do nadsącza zawierającego dehydrogenazę mleczanową (LDH) uwolnioną z komórek zniszczonych podczas ataku cytotoksycznego w pierwszym etapie prowadzi do redukcji NAD⁺ do NADH katalizowanej przez LDH podczas przekształcania mleczanu do pirogronianu. W drugim etapie wodór z NADH jest przenoszony na sól tetrazolium, redukując ją do formazanu. Sól formazanu jest produktem barwnym absorbującym światło przy długości fali 492 nm.

3.3.4. Uzyskiwanie surowic

Surowicę uzyskano z 5ml krwi żyłnej pobranej do probówki nie zawierającej środków antykoagulujących. Krew była wirowana przez 15 minut przy prędkości 2500obrotów/min. Następnie surowicę w ilości około 500μl zbierano do sterylnych plastikowych probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5ml. Próbkę zostały zamrożone i przechowywane w temperaturze -80 C do dnia badania.

3.3.5. Oznaczenia cytometryczne

Antygeny powierzchniowe komórek krwi obwodowej oraz analizę produkcji cytokin wewnątrzplazmatycznych wykonano za pomocą cytometru przepływowego Epics XL (Coulter). Pomiar stężenia cytokin w surowicy krwi metodą CBA wykonano za pomocą cytometru przepływowego LSR II (BD).

3.3.5.1. Analiza antygenów powierzchniowych

Barwienie przeprowadzono we krwi pobranej do próbek zawierających heparynę w ciągu godziny od pobrania. Do próbek cytometrycznych przenoszono po 50µl krwi i dodawano 100µl PBS z 1% FCS zawierające rozcieńczenia odpowiednich przeciwciał monoklonalnych. Następnie próbki inkubowano, delikatnie wytrząsając w temperaturze pokojowej przez 30min. Po inkubacji w próbkach krwi lizowano erytrocyty oraz utrwalano barwienia przy pomocy QPrep Epics Immunology Workstation (Coulter) z użyciem odpowiednich buforów (A,B,C – opis w rozdziale 3.2.2.). Tak przygotowane próbki krwi analizowano w cytometrze przepływowym. Ażeby wykluczyć niespecyficzne wiązanie się przeciwciał, do badania przygotowano też próbki krwi wybarwionej odpowiednimi przeciwciałami, będącymi kontrolami izotopowymi. Kompensacja widm fluorescencji, wykonana przed badaniem cytometrycznym, zapobiegała ewentualnemu nakładaniu się widm fluorescencji barwników zastosowanych podczas barwienia. Bramkowanie limfocytów i monocytów zostało przeprowadzone na podstawie obrazu FSS (ang. forward scatter; rozproszenie czołowe – ugięcie światła obrazujące wielkość komórki) i SS (ang. side scatter; rozproszenie boczne – ugięcie światła obrazujące ilość ziarnistości wewnątrz komórki). Dokładniejsze bramkowanie odpowiednich subpopulacji komórkowych wykonywano na podstawie fluorescencji odpowiednich barwników (obrazy bramkowania wybranych populacji zawarte są w rozdziale Wyniki).

W badaniu zastosowano następujące barwienia:

- barwienie komórek NK – CD3, CD16, CD56,
- barwienie komórek immunosupresyjnych CD8 – CD3, CD8, CD57 oraz CD8, CD28,
- barwienie komórek Treg – CD3, CD4, CD25,
- barwienie monocytów – CD14, CD16, HLA-DR.

Wyniki uzyskane podczas pomiarów cytometrycznych analizowano za pomocą programu WinMDI 2.8.

3.3.5.2. Analiza produkcji wewnątrzplazmatycznego IFN- γ

Pomiar produkcji wewnątrzplazmatycznego IFN- γ wykonano w komórkach NK. Przed pomiarem komórki inkubowano z odpowiednimi dawkami szczepionki przeciwgrypowej *Vaxigrip* (Aventis Pasteur). Stymulacja ta zwiększa produkcję IFN- γ przez komórki NK i była wcześniej stosowana w badaniach Katedry Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku (Trzonkowski P. i wsp., 2004, Myśliwska J. i wsp., 2004) oraz w pracy doktorskiej dr. Piotra Trzonkowskiego pod tytułem: „Ocena zjawisk immunologicznych towarzyszących szczepieniom przeciw wirusowi grypy u ludzi w wieku starszym”.

3.3.5.2.1. Przygotowanie do testu szczepionki przeciw wirusowi grypy *Vaxigrip* (Aventis Pasteur)

Stosowana szczepionka *Vaxigrip* była standardową, triwalentną inaktywowaną szczepionką o składzie zalecanym na dany sezon szczepień przez Komitet Doradczy ds. Szczepień (ACIP). Jedna dawka szczepionki (0,5ml) zawierała równowartość 15 μ g hemaglutyniny.

Przygotowanie szczepionki do testu obejmowało wirowanie przy szybkości 250000obrotów/min. przez 30min. W ten sposób usuwano ze szczepionki tiomersal. Następnie antygeny wirusa grypy ponownie rozpuszczano w 1ml RPMI 1640.

3.3.5.2.2. Inkubacje komórek PBMC z antygenami wirusa grypy

Hodowle komórek PBMC zakładano na 24-dołkowych plastikowych płytkach (Sterillin), zawieszając 1×10^6 komórek PBMC na 1ml medium RPMI 1640 (Gibco) z dodatkiem 5% FCS (Flow Lab.); komórki stymulowano, dodając 10 μ l/ml szczepionki przeciwgrypowej (około 0,3 μ g hemaglutyniny wirusa grypy) (*Vaxigrip*, Aventis Pasteur). Przy każdym pomiarze zakładano hodowlę kontrolną nie zawierającą szczepionki przeciwgrypowej.

Hodowle inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37 °C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂, w 100% wilgotności.

3.3.5.2.3. Barwienie wewnątrzplazmatycznego IFN- γ w komórkach NK

Po zakończeniu inkubacji komórek PBMC ze szczepionką przeciw grypową do hodowli dodawano 2 μ l GolgiStop, ażeby zahamować transport IFN- γ na zewnątrz komórki. Po 4 godzinach zbierano z każdej hodowli po 200 μ l próbki i przenoszono do probówek cytometrycznych. Komórki płukano za pomocą buforu „Aw”, po czym do probówek dodawano po 20 μ l przeciwciał przeciw antygenom zewnątrzkomórkowym CD3, CD56 rozpuszczonych w 100 μ l buforu „Aw”. Próbki były inkubowane przez 20 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki ponownie płukano buforem „Aw”. Następnie utrwalano za pomocą 200 μ l buforu utrwalającego i inkubowano przez 20 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po czym do każdej probówki dodawano po 2ml buforu „Cw” i ponownie inkubowano przez 20 minut w ciemności. Po inkubacji komórki wirowano przez 5 minut przy 1500obrotach/min i usuwano nadsącz. Następnie do każdej probówki dodawano po 100 μ l buforu „Bw” zawierającego 1 μ l przeciwciała skierowanego przeciw wewnątrzplazmatycznemu IFN- γ , próbki były rozpipetowywane i inkubowane przez 30min w ciemności. Następnie komórki płukano buforem „Bw” i utrwalano 500 μ l buforu utrwalającego. Tak przygotowane próbki były analizowane w cytometrze przepływowym.

3.3.5.3. Badanie stężenia cytokin w surowicy krwi metodą CBA (Cytometric Bead Array)

Stężenie cytokin IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α i IFN- γ w surowicy krwi zbadano za pomocą metody Cytometric Bead Array (CBA) testem Human Th1/Th2 Kit II (BD). Metoda CBA jest cytometrycznym odpowiednikiem testów immunoenzymatycznych ELISA i pozwala na pomiar stężenia wielu białek w pojedynczej próbce. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu kulek fluorescencyjnych o różnej wielkości opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciw określonym cytokinom. Następnie do próbki dodawane jest przeciwciało sprzężone z barwnikiem PE i rozpoznające kompleks kulka-

cytokina. Dodanie przeciwciała pozwala na odczytanie testu, a różne wielkości kulek umożliwiają rozróżnienie cytokin.

Przeprowadzenie testu

Przed przystąpieniem do wykonania testu w buforze dla standardów rozpuszczono liofilizowane standardy każdej cytokiny (wartości od 0pg/ml do 5000pg/ml). Następnie wymieszano ze sobą kulki i przeniesiono po 50µl mieszaniny do probówek cytometrycznych. Następnie do każdej probówki dodano po 50µl przeciwciała przeciw kompleksom cytokina-kulka (PE Detection Reagent). Do tak przygotowanej mieszaniny dodawano po 50µl standardów oraz surowic. Próbki były delikatnie wytrząsane przez 3 godziny w ciemności, po czym każda z próbek była płukana za pomocą buforu płuczającego (Wash Buffer). Tak przygotowane próbki były gotowe do analizy w cytometrze przepływowym.

Analiza cytometryczna

Test odczytano w cytometrze przepływowym LSR II (BD) z użyciem oprogramowania FacsDIVA (BD). Przed analizą dokonano kalibracji cytometru za pomocą kulek kalibracyjnych dostępnych w teście (Cytometer Setup Beads). Bramkowanie kulek przeprowadzono na podstawie obrazu FSS/SS, fluorescencje odczytywano przy detektorach FL1, FL2 i FL3. Podczas odczytu zbierano 1800 sygnałów. Dalszą analizę wykonano za pomocą oprogramowania BD CBA Software.

3.3.6. Określenie obecności specyficznych przeciwciał przeciw antygenom wirusa cytomegalii w surowicy krwi

Obecność specyficznych przeciwciał IgM i IgG przeciw wirusowi cytomegalii wykonano techniką immunoenzymatyczną (ELISA) – zestawem firmy Genesis Diagnostics (CMV IgM ELISA kit, CMV IgG ELISA kit, Genesis Diagnostics, Cambridgeshire, UK). Test został wykonany zgodnie z instrukcją producenta.

Określenie miana przeciwciał IgG anty-CMV

Do każdego dołka 96-dołkowej płytki opłaszczonej nieaktywnymi antygenami wirusa cytomegalii naniesiono po 100µl rozcieńczonych surowic krwi badanych osób. Zgodnie z zaleceniami producenta surowice rozcieńczono 1:100 za pomocą Sample diluent (Reagent 1, dostępny w teście). Oprócz tego na płytkę naniesiono 100µl kontroli negatywnej (Sample diluent) oraz 100µl dostępnych w teście standardów zawierających 3 IU/ml, 10 IU/ml i 30 IU/ml przeciwciał IgG anty-CMV. Tak przygotowana płytka była inkubowana w temperaturze pokojowej przez 20 minut. W tym czasie przeciwciała IgG anty-CMV zawarte zarówno w surowicy, jak i w standardach łączyły się z antygenami CMV na płycie 96-dołkowej. Po inkubacji płytka była płukana trzykrotnie za pomocą Wash buffer (Reagent 2, dostępny w teście). Nadmiar płynu płuczającego był usuwany przy użyciu waty celulozowej. Płukanie miało na celu usunięcie niespecyficznie związanych przeciwciał. Po zakończeniu płukania do każdego dołka płytki dodano Reagent 3. Zawierał on przeciwciała królicze skierowane przeciwko przeciwciałom ludzkim. Przeciwciała królicze były dodatkowo sprzężone z enzymem peroksydazą chrzanową (HRP). Tak przygotowana płytka była inkubowana przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie nadmiar przeciwciał króliczych, które nie związały przeciwciał ludzkich, został usunięty poprzez czterokrotne płukanie z użyciem Wash buffer (Reagent 2). Ponownie nadmiar płynu został usunięty za pomocą waty celulozowej. Następnie do każdego dołka płytki dodano po 100µl tetrametylobenzydiny (TMB), substratu dla peroksydazy chrzanowej. Ponownie płytka była inkubowana przez 10 minut bez dostępu światła. W tym czasie zachodziła reakcja barwna, produkt reakcji enzymatycznej katalizowanej przez HRP jest koloru niebieskiego. Miano przeciwciał IgG anty-CMV było proporcjonalne do natężenia tego koloru. Po inkubacji reakcja była zatrzymywana poprzez dodanie 100µl „Stop solution” zawierającego stężony kwas siarkowy. Pod wpływem kwasu płyn przyjął żółtą barwę. Absorpcja poszczególnych próbek była odczytana w czytniku płytek Multiscan MCC/340 przy długości fali 450nm (Labsystem, Finlandia).

Seropozytywność pod względem miana IgG anty-CMV została określona na podstawie wartości absorpcji dla standardu 3 IU/ml. Wartość próbki powyżej tej wartości oznaczała seropozytywność, wynik identyczny lub niższy określał brak przeciwciał IgG anty-CMV.

Miano przeciwciał zostało określone ilościowo na podstawie porównania uzyskanych wartości absorpcji dla danej próbki z krzywą wzorcową wykreśloną na podstawie standardów (0, 3, 10, 30 IU/ml).

Określenie obecności przeciwciał IgM anty-CMV

Protokół stosowany do określenia obecności przeciwciał IgM anty-CMV był podobny do stosowanego w badaniu miana przeciwciał IgG anty-CMV. Różnica dotyczyła antygenów opłaszczających płytkę oraz użytych przeciwciał króliczych, które w tym teście były skierowane przeciw ludzkim przeciwciałom IgM.

Test ten pozwalał tylko na określenie obecności przeciwciał IgM anty-CMV na podstawie porównania wyniku absorpcji danej próbki z absorpcją standardu 10 IU/ml. W teście tym nie stosuje się innych standardów.

3.3.7. Hodowla i pasaż lini komórkowych

Komórki CTL

Komórki CTL hodowano w pożywce RPMI 1640 zawierającej 10% FCS, streptomycynę, penicylinę, 2-merkaptoetanol oraz 10IU/ml IL-2.

Komórki K562

Komórki K562 hodowano w pożywce RPMI 1640 zawierającej 5% FCS, penicylinę oraz streptomycynę.

Pasazowanie hodowli komórkowych

Komórki pasażowano co 2 dni. Hodowlę rozpipetowywano i usuwano większość pożywki wraz z częścią komórek. Następnie do pozostałych komórek dodawano świeżą pożywkę.

3.3.8. Mrożenie i rozmrażanie linii komórkowych

Mrożenie i rozmrażanie komórek K562 oraz CTL zachodziło w ten sam sposób.

Mrożenie komórek

Przed zamrożeniem komórki wirowano przez 4min przy 1500 obrotów/min. i zawieszano w 1ml pożywki zawierającej DMSO (Dimetylosulfotlenek).

Tak przygotowane próbki przenoszono do probówek – krioampulek. Zamrożenie wykonywano stopniowo poczynając od -80°C , a następnie przenosząc do ciekłego azotu.

Rozmrażanie komórek

Rozmrażane komórki najpierw umieszczano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C na czas wystarczająco długi do usunięcia wszystkich kryształków lodu. Następnie próbkę wirowano przez 5 minut przy 1500 obrotów/min.; usuwano nadsącz, a komórki zawieszano w odpowiedniej pożywce i przenoszono do butelki hodowlanej.

3.3.9. Pomiar aktywności biologicznej IL-2

Poziom bioaktywnej IL-2 w surowicy krwi został określony za pomocą komórek IL-2-zależnych – CTL. Komórki CTL zawieszono w medium RPMI 1640 z 5% FCS umieszczono na płytce 96-dołkowej płaskodennej w ilości $2 \times 10^4/50\mu\text{l}$. Do każdego z dołków dodano po $5\mu\text{l}$ badanej surowicy. Wszystkie próby wykonano w 3 powtórzeniach. Dodatkowo na płytce umieszczono seryjne rozcieńczenia rekombinowanej IL-2 (rIL-2, Roche) w zakresie stężeń od $0,1\text{pg/ml}$ do 10000pg/ml , które w dalszym etapie posłużyły jako standardy. Następnie płytkę umieszczono w cieplarni na 48 godzin w temperaturze 37°C , w atmosferze zawierającej 5% CO_2 , przy wysokiej wilgotności. Aktywność biologiczną IL-2 określono na podstawie pomiaru proliferacji komórek CTL pomiar ten wykonano metodą kolorymetryczną z użyciem MTT (3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5 difenylobromek tetrazolu). Po zakończeniu inkubacji do każdego z dołków dodawano po $20\mu\text{l}$ sterylnego MTT o stężeniu 5mg/ml i inkubowano kolejne 3 godziny w cieplarni. Następnie do każdego dołka dodawano po $100\mu\text{l}$ kwaśnego izopropanolu z $0,04\text{HCl}$, po czym płytkę wytrząsano aż do całkowitego rozpuszczenia kryształków MTT. Gęstość optyczną mierzono za pomocą czytnika mikropłytek FL600 (Biotek). Wartość aktywności biologicznej ustalano poprzez porównanie wartości gęstości optycznej badanych próbek z wartościami standardów.

Specyficzność testu potwierdzono poprzez dodawanie do dołków przeciwciał blokujących anty-IL2 (Genzyme) w mianie 1:10, 1:20, 1:50, hamowało to wykrywalność IL-2. Procedurę tą oparto na wcześniej opracowanym modelu (Myśliwska J. i wsp., 2000b).

3.3.10. Morfologia krwi obwodowej z rozmazem układu białokrwinkowego

Morfologia krwi obwodowej badanych osób została wykonana w Centralnym Laboratorium Klinicznym Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego Nr 1 Akademickiego Centrum Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku. Badanie to wykonano za pomocą cytometru przepływowego LH 750 Analyzer (Coulter, USA) lub CELL-DYN 3200 (Abbott Laboratories, Francja).

3.3.11. Analizy statystyczne

Analiza danych została przeprowadzona za pomocą programu Statistica 7.1 (Statsoft, Polska). Zgodność rozkładu zmiennych ilościowych z rozkładem normalnym badano testem Kołmogorowa-Smirnowa. Do porównania dwóch zmiennych ilościowych zgodnych z rozkładem normalnym stosowano test t Studenta. Większość zmiennych ilościowych analizowana w badaniu nie była zgodna z rozkładem normalnym. Dlatego też do porównania dwóch zmiennych ilościowych stosowano test nieparametryczny U Manna-Whitneya, a do porównania wielu zmiennych stosowano test nieparametryczny ANOVA rang Kruskala Wallisa. Zmienne jakościowe były analizowane za pomocą testu χ^2 . Do analizy korelacji pomiędzy zmiennymi ilościowymi zastosowano test R Spearmana.

Jedno- i wielowymiarową analizę wariancji dla zmiennych z powtarzalnymi pomiarami wykonano testem ANOVA z powtarzającymi pomiarami.

Do badania związków pomiędzy zmienną zależną (kryterialną, objaśnianą) a wieloma zmiennymi niezależnymi (objaśniającymi) stosowano test regresji wielorakiej.

4. WYNIKI

4.1. Aktywność układu immunologicznego u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca

Płeć jest jednym z ważniejszych czynników warunkujących rozwój choroby niedokrwiennej serca. Jest ona też czynnikiem, który w znaczący sposób wpływa na aktywność układu immunologicznego. Dlatego w dalszych rozważaniach grupa pacjentów z ChNS i grupa kontrolna zostały podzielone dodatkowo pod względem płci.

Tabela 4.1.1. Charakterystyka kliniczna pacjentów z ChNS.

	Mężczyźni z ChNS	Kobiety z ChNS	<i>P</i>
N	97	42	
Wiek (lata)	60,60±8,57	65,31±6,23	0,001
BMI (indeks masy ciała)	29±3,51	28,74±4,34	0,53
Nadciśnienie tętnicze (%)	65	87,5	0,05
Cukrzyca (%)	20	41,67	0,06
Czas trwania ChNS (lata)	7,24±7,03	8,74±5,92	0,09
Cholesterol całkowity (mmol/L)	5,47±1,27	5,13±1,2	0,11
Cholesterol LDL (mmol/L)	3,45±1,15	3,08±1,07	0,06
Cholesterol HDL (mmol/L)	1,16±0,26	1,25±0,29	0,29
Trójglicerydy (mmol/L)	4,2±2,16	3,75±1,81	0,36
Palenie papierosów (%)			
niepalący	17,86	44,44	0,02
Palacz	19,05	2,78	
Ex-palacz	63,1	52,78	
Przyjmowanie statyn (%)	91,3	90,24	0,84
Przyjmowanie blokerów receptorów β-adrenergicznych (%)	88,04	87,8	0,96

Dane są przedstawione jako średnia i odchylenia standardowe. Analizy wykonano za pomocą testu U Manna-Whitneya.

Porównanie kobiet i mężczyzn z chorobą niedokrwienną serca pod względem parametrów klinicznych ujawniło, że grupa kobiet charakteryzowała się starszym wiekiem. Wśród kobiet większy był również odsetek osób z nadciśnieniem tętniczym oraz cukrzycą.

4.1.1. Wpływ płci na status komórek NK u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca

Następnym krokiem było zbadanie statusu komórek NK. Wykazano, że aktywność i liczba komórek NK nie różniła się istotnie statystycznie w grupie kobiet i mężczyzn z chorobą niedokrwienną serca (tabela 4.1.1.1.).

Tabela. 4.1.1.1. Porównanie subpopulacji komórek NK w grupie kobiet i mężczyzn z ChNS.

Status komórek NK	Mężczyźni	Kobiety	<i>p</i>
Aktywność cytotoksyczna komórek NK (%) #	28,37±17,58	22,52±7,46	0,49
CD3-CD56+ *	12,63±7,46	10,04±4,76	0,09
CD3-CD56dim *	12,2±7,40	9,61±4,73	0,10
CD3-CD56bright *	0,42±0,27	0,47±0,39	0,90
CD3-CD56+ **	229,71±133,45	207,41±109,23	0,66
CD3-CD56dim **	221,83±131,99	197,96±105,93	0,64
CD3-CD56bright **	7,88±5,19	9,45±8,37	0,97
Procent komórek CD3-CD56+ produkujących wewnątrzplazmatyczny IFN-γ	4,85±2,65	4,61±3,45	0,79

- wartość obliczono według wzoru zawartego w rozdziale Materiał i Metody (rozdział 3.3.3.)

*- procent komórek wśród limfocytów

** - bezwzględna liczba komórek w 1 mm³ krwi obwodowej

Dane są przedstawione jako średnia i odchylenia standardowe. Analizy wykonano za pomocą testu U Manna-Whitneya.

4.1.2. Wpływ płci na stan układu limfocytów T u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca

W dalszych badaniach przeprowadzono analizę liczby limfocytów T. Do analizy wybrano limfocyty powiązane z rozwojem stanu immunosupresji, do których należą komórki CD3+CD8+CD57+ oraz komórki CD4+CD25+.

Tabela 4.1.2.1. Porównanie subpopulacji limfocytów T u pacjentów z ChNS pod względem płci.

Status limfocytów T	Mężczyźni	Kobiety	<i>P</i>
CD3+CD8+ *	15,03±7,64	16,87±8,51	0,29
CD3+CD8+CD57+ *	4,91 ± 3,94	5,95±4,08	0,26
CD3+CD8+ **	299,47±194,31	364,95±230,73	0,26
CD3+CD8+CD57+ **	99,2±86,05	133,77±112,85	0,32
CD3+CD4+ *	39,11±9,64	43,25±12,41	0,17
CD3+CD4+CD25+ *	2,24±2,1	2,97±3,32	0,23
CD3+CD4+ **	795,76±327,41	912,07±322,27	0,18
CD3+CD4+CD25+ **	45,43±44,91	66,25±77,55	0,12

*- procent komórek wśród limfocytów

** - bezwzględna liczba komórek w 1 mm³ krwi obwodowej

Dane są przedstawione jako średnia i odchylenia standardowe. Analizę wykonano za pomocą testu U Manna-Whitneya.

Porównanie pacjentów z ChNS z uwzględnieniem płci nie wykazało żadnych istotnych statystycznie różnic w odsetku i liczbie limfocytów T pomocniczych (CD3+CD4+) i T cytotoksycznych (CD3+CD8+). Analiza limfocytów T regulatorowych o fenotypie CD3+CD4+CD25+ i CD3+CD8+CD57+ także nie ujawniła różnic w badanych grupach.

4.1.3. Wpływ płci na stan monocytów o profilu prozapalnym u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca

Monocyty CD14+CD16+ są monocytami charakteryzującymi się wysoką produkcją cytokin prozapalnych. Komórki CD14+CD16+HLA-DR+ stanowią

ich aktywną subpopulację. Monocyty te mogą być zaangażowane w rozwój ChNS, dlatego też następnym krokiem było porównanie liczby tych komórek w grupie kobiet i mężczyzn z ChNS.

Tabela. 4.1.3.1. Porównanie subpopulacji monocytów o fenotypie CD14+CD16+ i CD14+CD16+HLA-DR+ u pacjentów z ChNS. Grupę podzielono pod względem płci.

Monocyty o profilu prozapalnym	Mężczyźni	Kobiety	<i>p</i>
CD14+CD16+ *	10,21±3,34	10,04±3,5	0,92
CD14+CD16+HLA-DR+ *	4,62±2,99	3,78±2,31	0,75
CD14+CD16+ **	65,27±30,33	61,06±28,75	0,68
CD14+CD16+HLA-DR+ **	28,26±24,16	21,02±11,67	0,75

*- procent komórek wśród monocytów

** - bezwzględna liczba komórek w 1 mm³ krwi obwodowej

Dane są przedstawione jako średnia i odchylenia standardowe. Analizę wykonano za pomocą testu U Manna-Whitneya.

Porównanie kobiet i mężczyzn chorych na chorobę niedokrwienną serca pod względem liczby monocytów o profilu prozapalnym (tabela 4.1.3.1) nie wykazało istotnych różnic zarówno po włączeniu do analizy monocytów o fenotypie powierzchniowym CD14+CD16+, jak i CD14+CD16+HLA-DR+.

4.1.4. Wpływ płci na poziom cytokin u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca

Stan zapalny odgrywa kluczową rolę w rozwoju choroby niedokrwiennej serca, jak i w procesie reaktywacji wirusa cytomegalii. Dlatego też przeprowadzono badania statusu cytokinowego w grupie kobiet i mężczyzn z ChNS.

Tabela 4.1.4.1. Porównanie poziomu interleukiny-2, interleukiny-4, interleukiny-6, interelukiny-10, interferonu- γ i TNF- α w surowicy krwi pacjentów z ChNS podzielonych pod względem płci.

Stężenie surowicze cytokin (pg/ml)	Mężczyźni	Kobiety	<i>p</i>
IL-2	1,57±4,77	0,53±1,23	0,73
IL-10	1,86±3,47	0,18±0,44	0,03
IFN- γ	2,63±5,68	2,29±5,65	0,81
TNF- α	1,26±2,54	2,72±2,29	0,02
IL-4	4,01±9,87	0,99±2,21	0,11
IL-6	1,79±5,80	1,27±2,97	0,89

Dane są przedstawione jako średnia i odchylenia standardowe. Analizę wykonano testem U Manna-Whineya.

Badanie przeprowadzono za pomocą testu CBA (Cytometric Bead Array).

Stężenie TNF- α w surowicy krwi było znamienne wyższe u kobiet aniżeli u mężczyzn, natomiast analiza stężenia IL-10 w surowicy krwi ujawniła wyższy poziom tej cytokiny u mężczyzn. Badane grupy nie różniły się istotnie statystycznie pod względem stężenia IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-6.

Wyniki te wykazują, że kobiety charakteryzują się wyższym profilem prozapalnym i słabszym anty-zapalnym.

Ponadto przeprowadzono analizę wpływu przyjmowanych leków (statyn, blokerów receptorów β -adrenergicznych, nitratów, kwasu acetylosalicylowego, inhibitorów konwertazy angiotensyny oraz blokerów kanałów wapniowych) na przedstawione parametry układu immunologicznego u obu płci. Leki te nie miały żadnego wpływu na badane czynniki układu odpornościowego ($p > 0,05$).

PODSUMOWANIE:

Grupa kobiet i mężczyzn z ChNS różniła się między sobą wiekiem występowaniem nadciśnienia tętniczego i cukrzycy. W momencie badania kobiety były starsze od mężczyzn i większa ich liczba miała stwierdzone nadciśnienie tętnicze oraz cukrzycę typu drugiego.

Kobiety i mężczyźni chorzy na chorobę niedokrwinną serca nie różnili się między sobą istotnie statystycznie pod względem profilu komórek układu immunologicznego.

Kobiety charakteryzowały się wyższym stężeniem surowiczego TNF- α oraz niższym IL-10 w porównaniu do mężczyzn z ChNS.

4.2. Porównanie aktywności układu immunologicznego u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i w grupie kontrolnej

Ażeby wykazać czy układ immunologiczny pacjentów z chorobą niedokrwienną serca różni się od układu osób w podobnym wieku bez ChNS, do badania wprowadzono grupę kontrolną.

Grupa kontrolna została dobrana pod względem wieku. Z grupy tej wykluczono osoby z objawami ChNS oraz z głównymi czynnikami ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca, takimi jak nadciśnienie tętnicze i cukrzyca.

Tabela 4.2.1. Porównanie parametrów klinicznych pomiędzy grupą pacjentów z ChNS i grupą kontrolną. Obie grupy zostały podzielone pod względem płci.

	Mężczyźni z ChNS	Mężczyźni grupa kontrolna	<i>p</i>	Kobiety z ChNS	Kobiety grupa kontrolna	<i>p</i>
<i>N</i>	97	25		42	49	
Wiek (lata)	60,60±8,57	63,05±12,51	0,1	65,31±6,23	63,63±8,69	0,26
BMI	29±3,51	25,25±2,37	0,0002	28,74±4,34	24,31±2,71	0,00001
Nadciśnienie tętnicze (%)	65	-		87,5	-	
Cukrzyca (%)	20	-		41,67	-	
Palenie papierosów (%)						
niepalący	17,86	63,64	0,0001	44,44	38,24	0,33
Palacz	19,05	4,55		2,78	11,76	
Ex-palacz	63,1	31,82		52,78	50	

Pacjenci z chorobą niedokrwienną serca zarówno w grupie kobiet, jak i mężczyzn charakteryzowali się wyższymi wartościami indeksu masy ciała (BMI) w porównaniu do grupy kontrolnej. Wśród mężczyzn z chorobą niedokrwienną serca było więcej palaczy i ex-palaczy w porównaniu do mężczyzn zdrowych. Kobiety nie różniły się istotnie statystycznie pod względem tego parametru.

W tabeli 4.2.2. zawarto bezwzględne liczby leukocytów, limfocytów i monocytów uzyskane na podstawie badania morfologii krwi. Dane te zostały wykorzystane

w dalszych analizach do obliczenia bezwzględnej liczby komórek układu immunologicznego badanych za pomocą metod cytometrii przepływowej.

Tabela 4.2.2. Porównanie bezwzględnej liczby leukocytów, limfocytów i monocytów w grupie pacjentów z ChNS i grupie kontrolnej.

Bezwzględna liczba komórek *	Pacjenci z ChNS			Grupa kontrolna		<i>p</i>
Leukocyty	7451,53±1573,91			6678,75±1891,12		0,006
Limfocyty	1989,78±590,36			2156,2±708,83		0,3
Monocyty	569,01±150,46			357,83±127,88		0,000001
	Mężczyźni z ChNS	Mężczyźni grupa kontrolna	<i>p</i>	Kobiety z ChNS	Kobiety grupa kontrolna	<i>p</i>
Leukocyty	7466,47±1612,69	6901,33±1604,04	0,15	7417,67±1508,45	6545,2±2064,24	0,04
Limfocyty	1942,68±591,77	2024,58±560,59	0,65	2096,55±582,82	2235,17±784,75	0,6
Monocyty	592,99±161,35	361,33±119,28	0,00007	534,93±130,02	351,25±151,23	0,003209

*- bezwzględna liczba komórek w 1 mm³ krwi obwodowej

Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenie standardowe. Do analizy użyto testu U Manna-Whitneya

Jak można zauważyć, w powyższej tabeli pacjenci z ChNS charakteryzowali się wyższą bezwzględną liczbą leukocytów oraz monocytów.

4.2.1. Status komórek NK u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i u osób z grupy kontrolnej

Aktywność komórek NK jest uznawana za miarę ogólnej sprawności układu immunologicznego. Dlatego, zbadano bezwzględną i względną liczbę komórek NK oraz ich subpopulacji: regulatorowej o fenotypie powierzchniowym CD3-CD56bright i cytotoksycznej – CD3-CD56dim (tabela 4.2.1.1., rycina 4.2.1.2.). By wykazać czy osoby z chorobą niedokrwienną serca cechuje stan immunosupresji oszacowano także aktywność cytotoksyczną komórek NK zarówno w grupie osób chorych, jak i w grupie kontrolnej (tabela 4.2.1.3).

Bezwzględną liczbę komórek NK wyliczono na podstawie badania morfologii krwi obwodowej. Jak można zaobserwować w tabeli 4.2.1.1. bezwzględna liczba komórek NK, a także bezwzględna liczba komórek CD3-CD56dim była niższa u osób z ChNS w porównaniu do grupy kontrolnej. Bezwzględna liczba komórek CD3-CD56bright była podobna w obu badanych grupach.

Tabela 4.2.1.1. Porównanie bezwzględnej liczby komórek NK w grupie pacjentów z ChNS i w grupie kontrolnej.

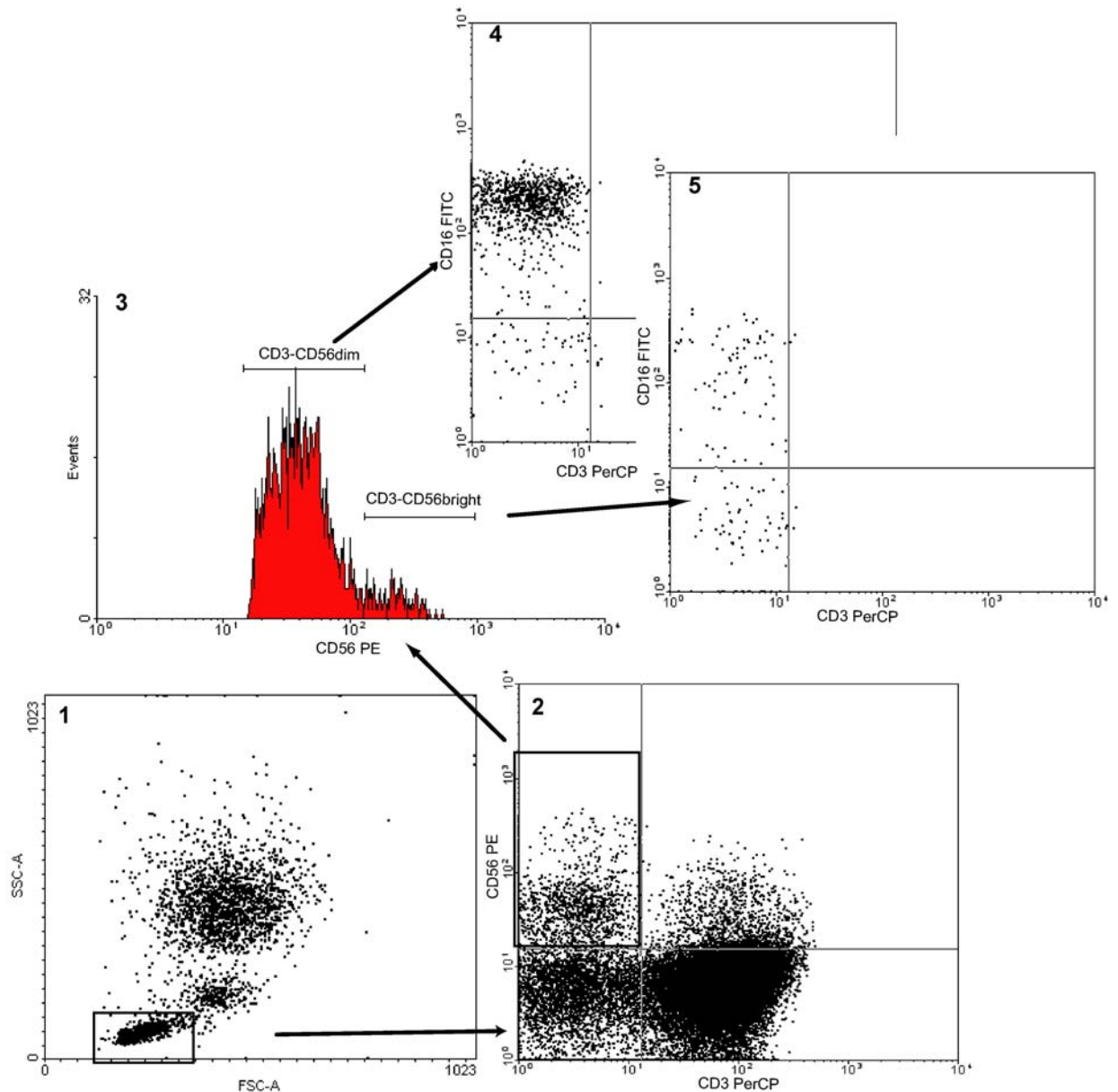
Liczba bezwzględna komórek NK *	Pacjenci z ChNS			Grupa kontrolna		<i>p</i>
CD3-CD56+	222,06±125,32			390,42±235,89		0,0005
CD3-CD56dim	213,65±123,42			378,57±233,28		0,0006
CD3-CD56bright	8,42±6,44			11,85±11,1		0,38
	Mężczyźni z ChNS	Mężczyźni grupa kontrolna	<i>p</i>	Kobiety z ChNS	Kobiety grupa kontrolna	<i>p</i>
CD3-CD56+	229,71±133,45	371,01±204,47	0,007	207,41±109,23	404,45±261,13	0,02
CD3-CD56dim	221,83±131,99	358,31±203,82	0,008	197,96±105,93	393,20±257,22	0,02
CD3-CD56bright	7,88±5,19	12,69±9,99	0,12	9,45±8,37	11,25±12,09	0,98

*- bezwzględna liczba komórek w 1 mm³ krwi obwodowej

Dane przedstawione są jako średnie i odchylenia standardowe. Analiza została wykonana testem U Manna-Whitneya.

Kobiety z grupy kontrolnej nie różniły się istotnie od mężczyzn z grupy kontrolnej pod względem bezwzględnej liczby komórek NK oraz poszczególnych subpopulacji komórek NK.

Rycina 4.2.1.1. Schemat bramkowania subpopulacji komórek NK. Bramkowanie limfocytów zostało przeprowadzone na podstawie obrazu FSS (ang. forward scatter; rozproszenie czołowe – ugięcie światła obrazujące wielkość komórki) i SS (ang. side scatter; rozproszenie boczne – ugięcie światła obrazujące liczbę ziarnistości wewnątrz komórki) (1). Następnie na podstawie obrazu fluorescencji uzyskanej z barwników fluorescencyjnych sprzężonych z przeciwciałami anti-CD3 oraz anti-CD56 wybramkowano komórki NK (CD3-CD56+) (2). Na podstawie tej bramki stworzono histogram, który pozwolił na rozdzielenie komórek CD3-CD56bright i CD3-CD56dim (3). Obie te populacje bramkowano i sprawdzano czy komórki te charakteryzują się wysoką (komórki CD3-CD56dim) (4), czy niską ekspresją cząsteczki CD16 (komórki CD3-CD56bright) (5).



Odsetek komórek NK (CD3-CD56+) wśród limfocytów krwi badano metodami cytometrii przepływowej. Rycina 4.2.1.1. przedstawia schemat bramkowania

odpowiednich populacji. Warto zauważyć, że kobiety z grupy kontrolnej w porównaniu do mężczyzn z tej grupy charakteryzowały się niższym odsetkiem komórek NK (CD3-CD56+), a także niższym odsetkiem komórek cytotoksycznych CD3-CD56dim i regulatorowych CD3-CD56bright (odpowiednio $p=0,01$, $p=0,02$, $p=0,06$).

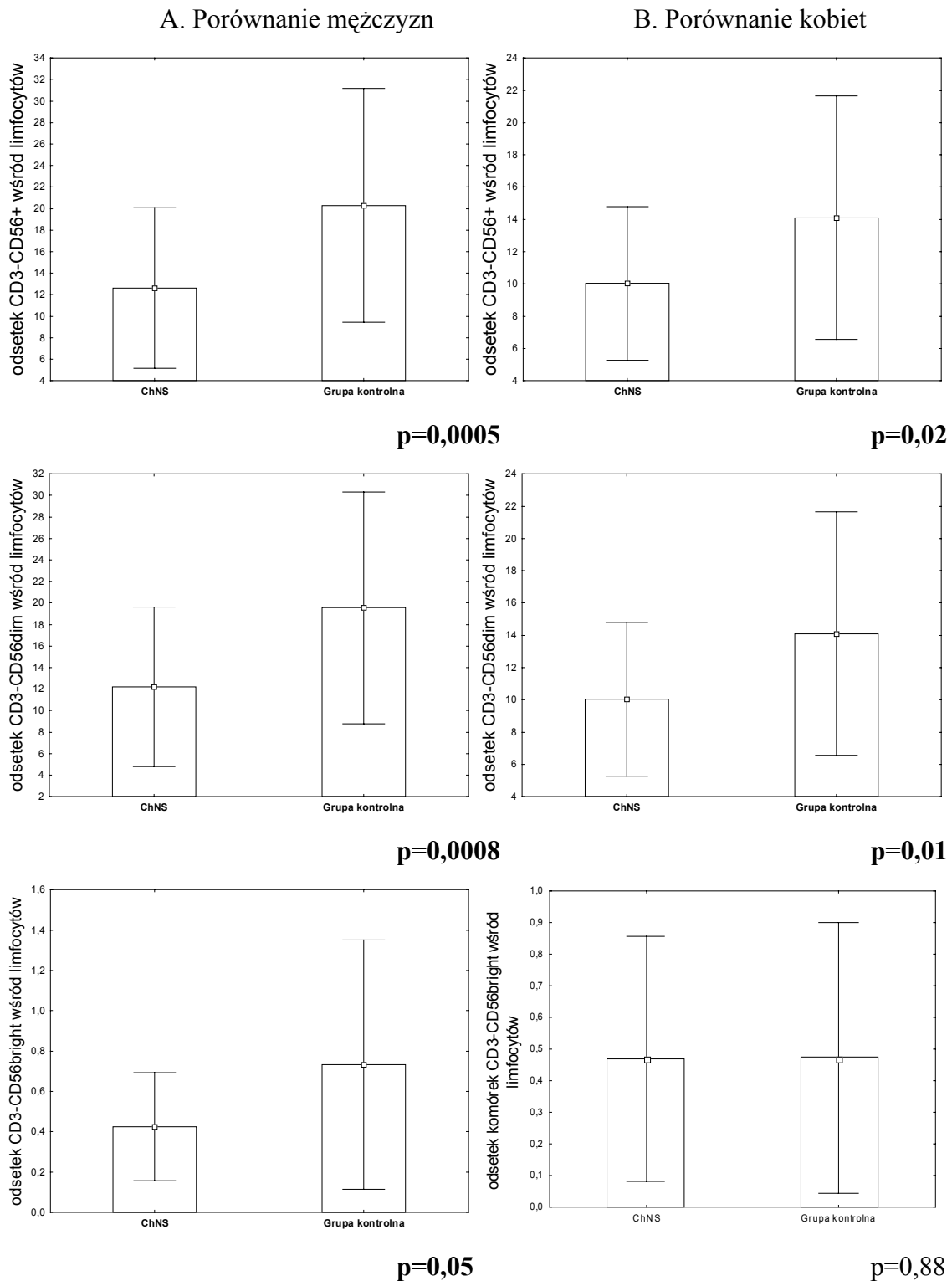
Tabela 4.2.1.2. Porównanie odsetka komórek NK u pacjentów z ChNS i osób z grupy kontrolnej. Dane przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. Analizę przeprowadzono testem U Manna-Whitneya.

Liczba względna komórek NK (%)	Pacjenci z ChNS	Grupa kontrolna	<i>p</i>
CD3-CD56+	11,8±6,8	16,13±9,17	0,001
CD3-CD56dim	11,38±6,75	15,79±8,90	0,0005
CD3-CD56bright	0,44±0,31	0,56±0,51	0,48

Analiza grup wykazała, że pacjenci z ChNS charakteryzują się niższym odsetkiem komórek NK oraz komórek CD3-CD56dim w stosunku do osób z grupy kontrolnej. Względna liczba komórek CD3-CD56bright nie różniła się istotnie statystycznie u pacjentów z ChNS oraz u osób z grupy kontrolnej nie podzielonych pod względem płci. Podobne wyniki uzyskano przy porównaniu bezwzględnej liczby komórek NK w badanych grupach.

Porównanie mężczyzn z chorobą niedokrwienną serca i mężczyzn z grupy kontrolnej ujawniło niższą względną liczbę komórek NK (CD3-CD56+), a także niższą względną liczbę komórek obu subpopulacji – CD56dim i CD56bright, u pacjentów z ChNS (Rycina 4.2.1.2. A). Podobne wyniki uzyskano przy porównaniu kobiet, jednak w tej grupie nie zaobserwowano różnic w liczbie komórek CD3-CD56bright (Rycina 4.2.1.2. B).

Rycina 4.2.1.2. Porównanie względnej liczby komórek NK (CD3-CD56+) oraz ich subpopulacji u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i u osób z grupy kontrolnej



Kolumna A przedstawia porównanie mężczyzn, kolumna B kobiet. Porównanie wykonano testem U Manna-Whitneya. Dane przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe.

Aktywność komórek NK była określana w obu badanych grupach za pomocą szeregu testów. Ogólną aktywność cytotoksyczną komórek NK badano za pomocą pomiaru stężenia dehydrogenazy mleczanowej w nadsączy znad hodowli komórek NK z komórkami docelowymi (linia białaczkowa K562). Wynik tego testu świadczy o ogólnej aktywności komórek zdolnych do ataku cytotoksycznego.

Aktywność indywidualną komórek NK ustalono poprzez pomiar odsetka komórek CD3-CD56+ produkujących IFN- γ w hodowli stymulowanej antygenami szczepionki przeciw grypie. Wynik tego badania pozwala na oszacowanie aktywności pojedynczej komórki NK.

Tabela 4.2.1.3. Aktywność komórek NK u pacjentów z ChNS i u osób z grupy kontrolnej. Aktywność mierzona dwoma testami – uwalniania dehydrogenazy mleczanowej oraz produkcji wewnątrzplazmatycznego interferonu- γ .

Aktywność komórek NK	Pacjenci z ChNS			Grupa kontrolna		<i>p</i>
Aktywność cytotoksyczna komórek NK (%) *	26,91±15,58			35,44±15,12		0,007
Odsetek komórek CD3-CD56+ produkujących wewnątrzplazmatyczny IFN- γ (%)	4,78±2,82			10,88±7,49		0,001
	Mężczyźni z ChNS	Mężczyźni grupa kontrolna	<i>p</i>	Kobiety z ChNS	Kobiety grupa kontrolna	<i>p</i>
Aktywność cytotoksyczna komórek NK (%) *	28,37±17,58	38,35±14,18	0,03	22,52±7,46	33,33±15,74	0,02
Odsetek komórek CD3-CD56+ produkujących wewnątrzplazmatyczny IFN- γ (%)	4,85±2,65	14,83±4,34	0,006	4,61±3,45	10,19±7,80	0,06

* - wartość obliczono według wzoru zawartego w rozdziale Materiał i Metody (rozdział 3.3.3.)

Dane przedstawione są jako średnie i odchylenia standardowe. Porównania wykonano testem U Manna-Whitneya.

Porównanie mężczyzn i kobiet z ChNS oraz mężczyzn i kobiet z grupy kontrolnej ujawniło niską aktywność cytotoksyczną komórek NK w grupie pacjentów z ChNS mierzoną zarówno testem pomiaru dehydrogenazy mleczanowej, jak i badaniem odsetka komórek produkujących wewnątrzplazmatyczny IFN- γ .

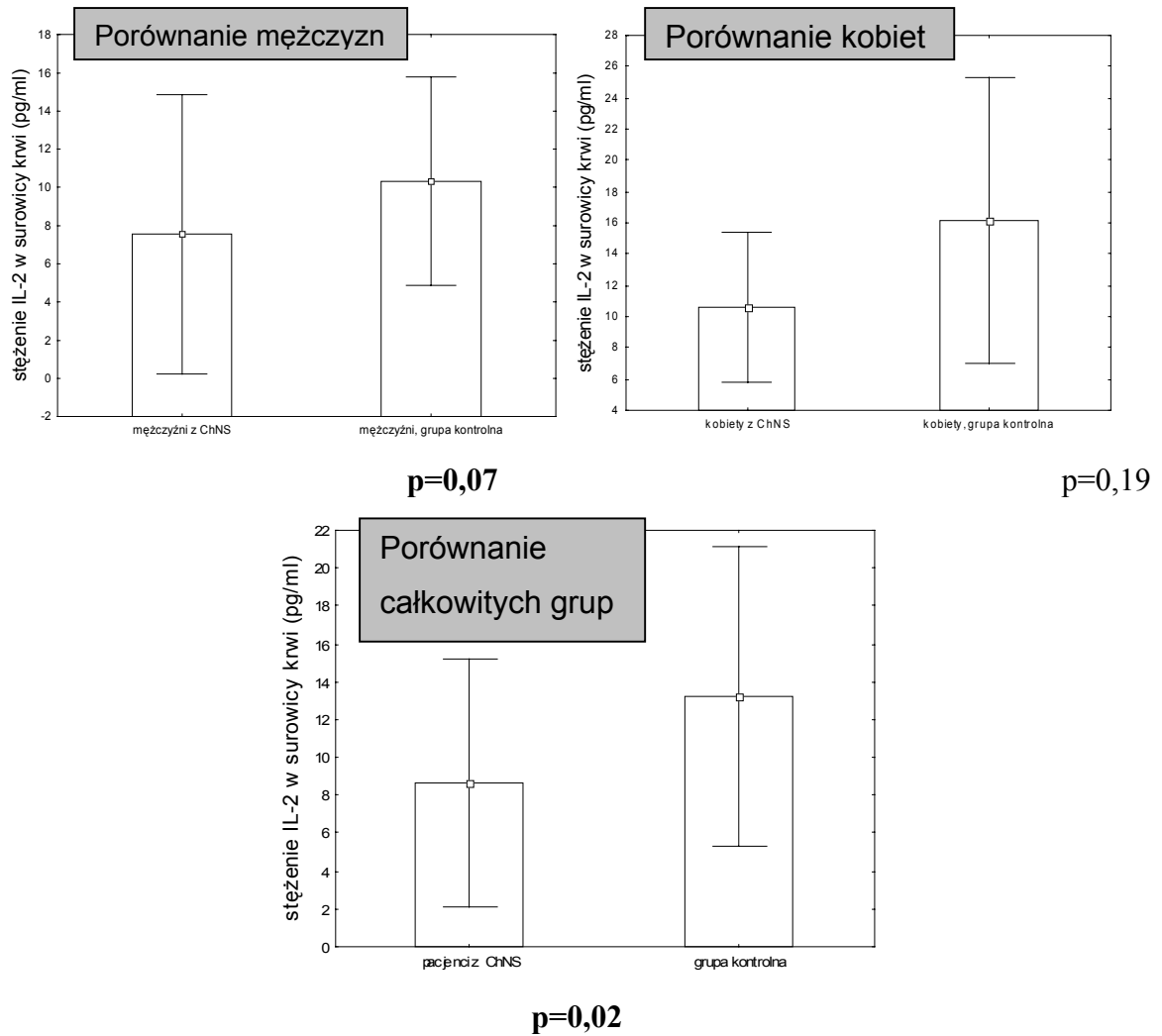
Warto zauważyć, że kobiety z grupy kontrolnej nie różniły się istotnie statystycznie od mężczyzn z tej grupy pod względem aktywności cytotoksycznej komórek NK.

4.2.2. Stężenie interleukiny-2 w surowicy krwi pacjentów z ChNS i osób z grupy kontrolnej

Interleukina-2 jest jedną z głównych cytokin stymulujących odpowiedź komórkową układu immunologicznego. Dlatego też, aby zbadać jej potencjalny związek z niską aktywnością komórek NK u pacjentów z ChNS, zmierzono jej poziom w surowicy krwi zarówno u badanych pacjentów, jak i u osób z grupy kontrolnej (Rycina 4.2.2.1.).

Należy zauważyć, że pomiar wykonano testem biologicznym z użyciem komórek wrażliwych na IL-2 – CTL. Wynik więc wskazuje nie tylko na stężenie tej cytokiny w surowicy krwi, ale też na jej aktywność.

Rycina 4.2.2.1. Porównanie stężenia IL-2 w surowicy krwi u pacjentów z ChNS i w grupie kontrolnej.



Dane przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. Analizę przeprowadzono za pomocą testu U Manna-Whitneya.

Kobiety bez ChNS i kobiety z ChNS nie różniły się istotnie pod względem stężenia IL-2 w surowicy krwi. Podobne porównanie w grupie mężczyzn ujawniło, że pacjenci z ChNS wykazują tendencją do niższego stężenia tej cytokiny w surowicy krwi.

Analiza całkowitych grup wskazała na niższy poziom IL-2 w surowicy krwi u pacjentów z ChNS.

PODSUMOWANIE

Pacjenci z chorobą niedokrwinną serca charakteryzowali się niższą bezwzględną i względną liczbą komórek NK (CD3-CD56+) oraz ich subpopulacji CD3-CD56dim w porównaniu do osób z grupy kontrolnej.

Porównanie obu badanych grup podzielonych pod względem płci wykazało niższą liczbę komórek CD3-CD56bright u mężczyzn z ChNS w porównaniu do mężczyzn z grupy kontrolnej.

Badanie aktywności komórek NK wykazało niższą aktywność tych komórek u pacjentów z ChNS.

Pacjenci z ChNS charakteryzowali się niższym stężeniem IL-2 w surowicy krwi.

4.2.3. Liczba limfocytów T immunoregulacyjnych u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i w grupie kontrolnej

Badanie komórek NK ujawniło, że pacjenci z ChNS charakteryzują się obniżoną aktywnością układu immunologicznego, dlatego też następnym krokiem było zbadanie różnic w statusie limfocytów T. Badania koncentrowały się na specyficznych limfocytach T o właściwościach immunosupresyjnych.

Tabela 4.2.3.1. Limfocyty T cytotoksyczne (CD3+CD8+) i pomocnicze (CD3+CD4+) u pacjentów z ChNS i u osób z grupy kontrolnej.

Limfocyty T	Pacjenci z ChNS			Grupa kontrolna		<i>p</i>
CD3+CD8+*	15,56±7,89			21,82±8,75		0,0008
CD3+CD8+**	319,40±206,58			548,77±401,48		0,04
CD3+CD4+ *	40,26±10,56			38,16±9,63		0,27
CD3+CD4+**	828,75±327,80			878,71±399,07		0,74
	Mężczyźni z ChNS	Mężczyźni grupa kontrolna	<i>p</i>	Kobiety z ChNS	Kobiety grupa kontrolna	<i>p</i>
CD3+CD8+*	15,03±7,64	24,83±9,54	0,01	16,87±8,51	21,09±8,53	0,18
CD3+CD8+**	299,47±194,31	433,75±201,83	0,26	364,95±230,73	575,31±436,61	0,26
CD3+CD4+ *	39,11±9,64	33,69±14,16	0,27	43,25±12,41	39,06±8,46	0,13
CD3+CD4+**	795,76±327,41	416,11±342,22	0,16	912,07±322,27	955,81±363,55	0,37

*- procent komórek wśród limfocytów

** - bezwzględna liczba komórek w 1 mm³ krwi obwodowej

Analizę przeprowadzono testem U Manna-Whitneya. Dane przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe.

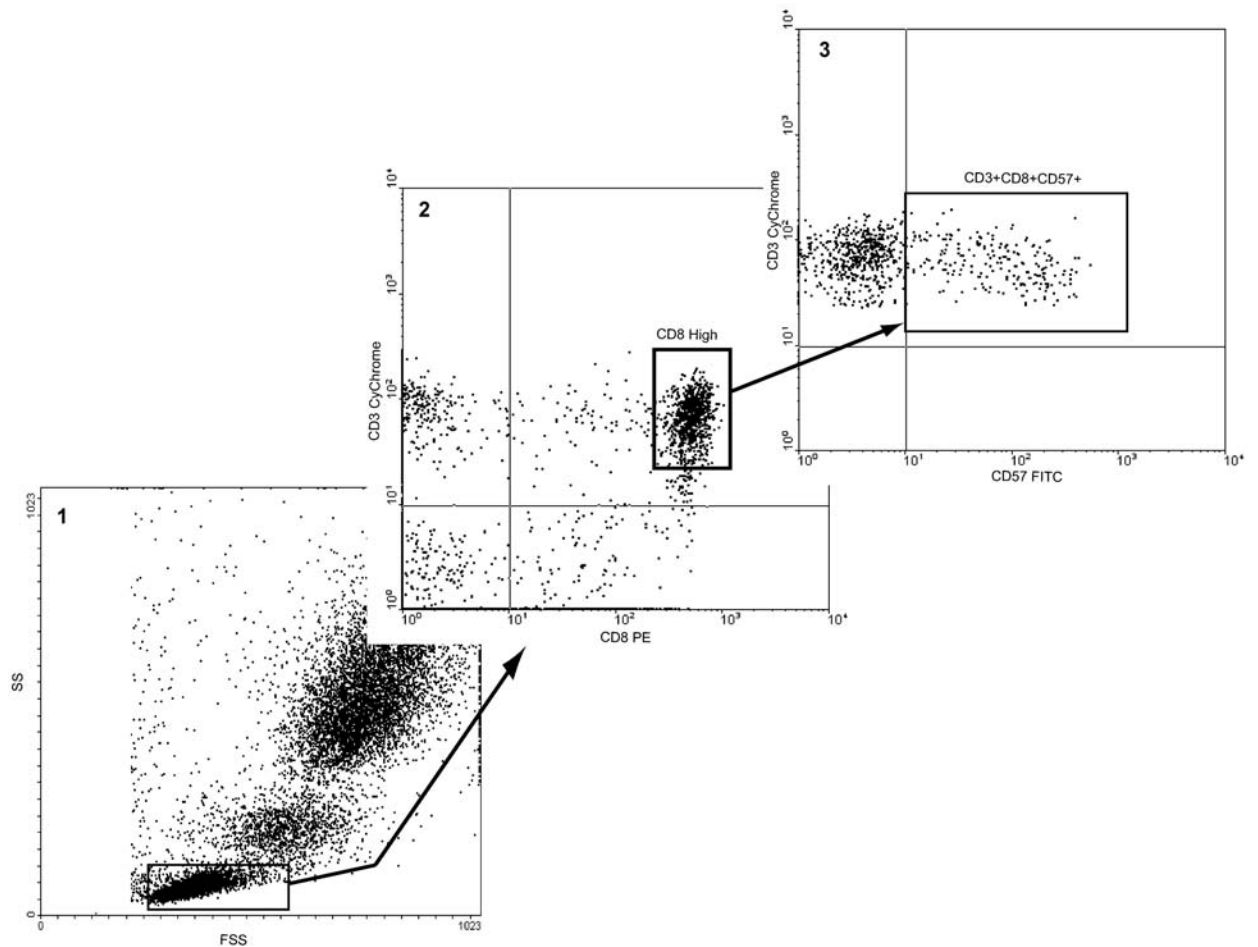
Porównanie bezwzględnej liczby limfocytów cytotoksycznych (CD3+CD8+) pomiędzy grupą pacjentów z ChNS i grupą kontrolną ujawniło niższy odsetek tych komórek we krwi obwodowej pacjentów z ChNS. Podobne wyniki uzyskano po porównaniu względnej liczby limfocytów T cytotoksycznych między mężczyznami z ChNS i mężczyznami z grupy kontrolnej. Kobiety nie różniły się istotnie pod względem tych komórek.

Analiza statystyczna nie wykazała ponadto żadnych różnic w liczbie limfocytów T pomocniczych (CD3+CD4+) między grupą pacjentów z ChNS a grupą kontrolną.

Porównanie pod względem dwóch głównych subpopulacji limfocytów T (limfocytów T pomocniczych – CD3+CD4+ oraz cytotoksycznych – CD3+CD8+) kobiet i mężczyzn z grupy kontrolnej nie ujawniło żadnych istotnych różnic.

Limfocyty T o fenotypie CD3+CD8+CD57+ stanowią populację komórek o właściwościach immunosupresyjnych. Procent limfocytów T wśród limfocytów został określony za pomocą metod cytometrii przepływowej, następnie do oceny odsetka limfocytów T CD3+CD8+CD57+ zastosowano podwójne bramkowanie przedstawione na rycinie 4.2.3.1. Bezwzględna liczbę komórek obliczono na podstawie badania morfologii krwi obwodowej.

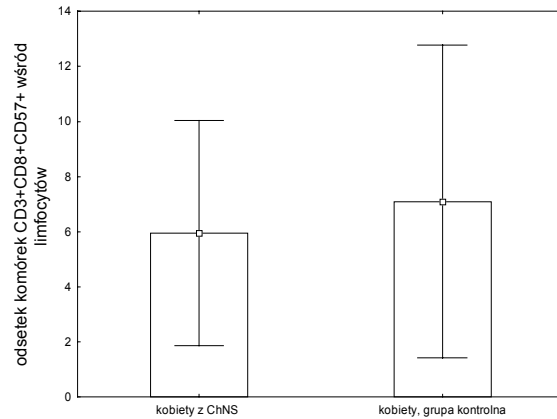
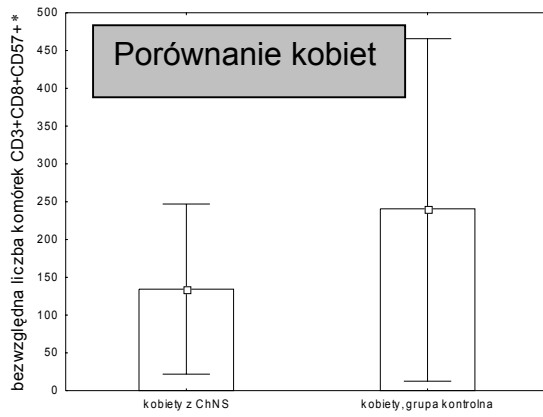
Rycina 4.2.3.1. Schemat bramkowania limfocytów T o fenotypie powierzchniowym CD3+CD8+CD57+. Bramkowanie limfocytów zostało przeprowadzone na podstawie obrazu FSS (ang. forward scatter; rozproszenie czołowe – ugięcie światła obrazujące wielkość komórki) i SS (ang. side scatter; rozproszenie boczne – ugięcie światła obrazujące liczbę ziarnistości wewnątrz komórki) (1). Następnie na podstawie obrazu fluorescencji uzyskanej z barwników fluorescencyjnych sprzężonych z przeciwciałami anti-CD3 oraz anti-CD8 wybramkowano komórki charakteryzujące się wysoką ekspresją cząsteczki CD8 – CD8high (2). Następnym krokiem było stwierdzenie obecności cząsteczek CD57 na powierzchni limfocytów CD3+CD8high (3).



Rycina. 4.2.3.2. Limfocyty CD3+CD8+CD57+ u pacjentów z ChNS i u osób z grupy kontrolnej.

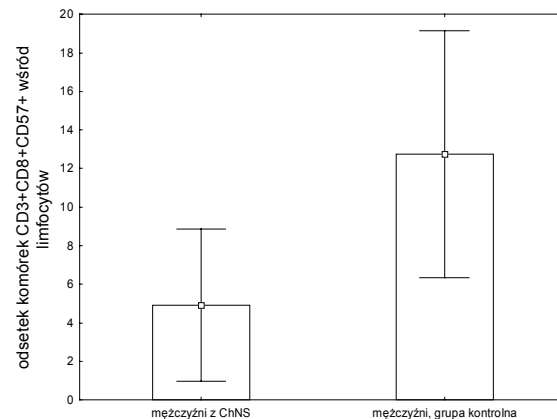
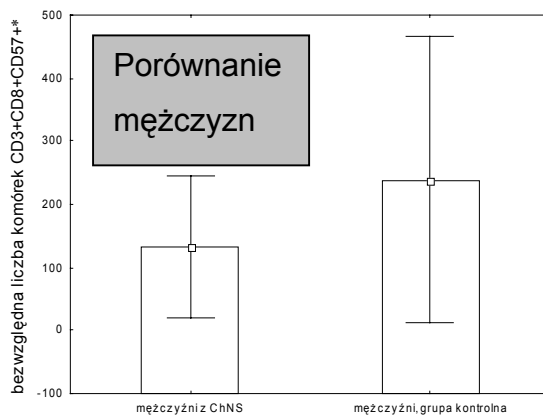
A. bezwzględna liczba komórek CD3+CD8+CD57+ *

B. Odsetek komórek CD3+CD8+CD57+ wśród limfocytów



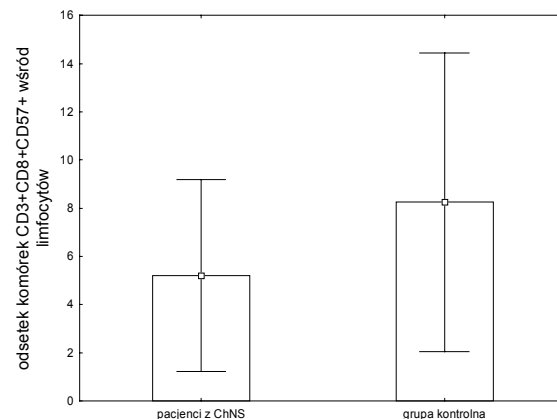
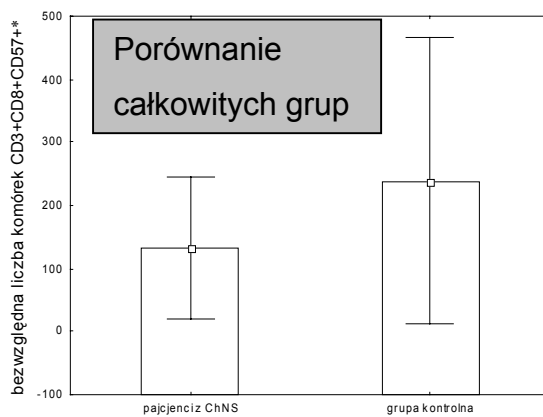
p=0,18

p=0,56



p=0,05

p=0,0001



p=0,01

p=0,005

*- bezwzględna liczba komórek w 1 mm³ krwi obwodowej

Analizę przeprowadzono testem U Manna-Whitneya. Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe.

Wyniki przedstawiono

Porównanie względnej i bezwzględnej liczby komórek CD3+CD8+CD57+ pomiędzy mężczyznami z ChNS i mężczyznami z grupy kontrolnej wykazało znamienne statystycznie niższą liczbę tych komórek u pacjentów z ChNS. O ile niższy odsetek tych komórek może być tłumaczony niższą względną liczbą komórek CD3+CD8+ u tych pacjentów, to ich niższa bezwzględna liczba stanowi dowód na obniżenie liczby komórek CD3+CD8+CD57+ u mężczyzn z ChNS.

Wyniki te potwierdza porównanie wszystkich pacjentów z ChNS z wszystkimi osobami z grupy kontrolnej, które ujawniło niższą względną i bezwzględną liczbę komórek CD3+CD8+CD57+ u pacjentów z ChNS (rycina 4.2.3.2.).

Co ciekawe, porównanie kobiet z ChNS i kobiet z grupy kontrolnej pod względem komórek CD3+CD8+CD57+ nie ujawniło żadnych istotnych statystycznie różnic. Taką rozbieżność między wynikami w porównaniu grup mężczyzn i grup kobiet można tłumaczyć wyższą liczbą komórek CD3+CD8+CD57+ u mężczyzn bez ChNS niż u kobiet bez ChNS.

Do badania włączono także komórki CD8+CD28-, które podobnie jak komórki CD3+CD8+CD57+ zaangażowane są w mechanizmy immunosupresji oraz regulacji stanu zapalnego i reakcji o podłożu autoimmunizacyjnym.

Porównanie liczby tych komórek pomiędzy pacjentami z ChNS i osobami z grupy kontrolnej wskazało na niższą bezwzględną liczbę tych komórek w grupie pacjentów z ChNS (tabela 4.2.3.2.).

Zmiany w populacjach immunoregulatorowych limfocytów T cytotoksycznych, zasugerowały, że różnice ta mogą dotyczyć także innych subpopulacji układu immunologicznego o funkcji immunoregulacyjnej. Dlatego następnym krokiem było zbadanie limfocytów T regulatorowych o fenotypie powierzchniowym CD3+CD4+CD25+.

Tabela 4.2.3.2. Porównanie limfocytów T o fenotypie powierzchniowym CD3+CD4+CD25+ oraz CD8+CD28- pomiędzy grupą pacjentów z ChNS i grupą kontrolną.

Limfocyty T	Pacjenci z ChNS			Grupa kontrolna		<i>p</i>
CD3+CD4+CD25+*	2,44±2,50			1,88±1,36		0,64
CD3+CD4+CD25+**	51,33±56,26			58,05±35,23		0,13
CD8+CD28-*	13,33±6,70			14,96±6,38		0,26
CD8+CD28-**	279,17±166,29			446,75±216,30		0,04
	Mężczyźni z ChNS	Mężczyźni, grupa kontrolna	<i>p</i>	Kobiety z ChNS	Kobiety grupa kontrolna	<i>p</i>
CD3+CD4+CD25+*	2,24±2,1	1,15±0,41	0,16	2,97±3,32	2,06±1,45	0,19
CD3+CD4+CD25+**	45,43±44,91	24,89±17,84	0,55	66,25±77,55	64,07± 34,61	0,29

*- procent komórek wśród limfocytów

** - bezwzględna liczba komórek w 1 mm³ krwi obwodowej

Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. Wszystkie analizy zostały przeprowadzone za pomocą testu U Manna-Whitneya.

Włączenie do analizy komórek regulatorowych CD3+CD4+CD25+ o właściwościach immunoregulacyjnych nie ujawniło żadnych istotnych statystycznie różnic w ich bezwzględnej i względnej liczbie pomiędzy pacjentami z ChNS a grupą kontrolną.

4.2.4. Monocyty o profilu prozapalnym u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i u osób z grupy kontrolnej

Monocyty CD14+CD16+ stanowią populację komórkową zaangażowaną w proces zapalenia. Ponadto wykazują one podobieństwo fenotypowe i funkcjonalne z makrofagami i komórkami dendrytycznymi, a więc komórkami znajdującymi w blaszce miażdżycowej. Dlatego też następnym krokiem było porównanie liczby tych komórek u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i u osób z grupy kontrolnej.

Tabela 4.2.3.1. Liczba monocytów CD14+CD16+ u pacjentów z ChNS i u osób z grupy kontrolnej.

Monocyty	Pacjenci z ChNS			Grupa kontrolna		<i>p</i>
CD14+CD16+*	10,16±3,34			6,02±2,26		0,000
CD14+CD16+**	64,03±29,50			24,63±19,25		0,000
	Mężczyźni z ChNS	Mężczyźni grupa kontrolna	<i>p</i>	Kobiety z ChNS	Kobiety grupa kontrolna	<i>p</i>
CD14+CD16+*	10,21±3,34	5,91±2,29	0,00008	10,04±3,50	6,15±2,32	0,01
CD14+CD16+**	65,27±30,33	28,15±23,26	0,0002	61,06±28,75	18,90±8,42	0,001

*- procent komórek wśród monocytów

** - bezwzględna liczba komórek w 1 mm³ krwi obwodowej

Dane przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. Analizę przeprowadzono za pomocą testu U Manna-Whitneya.

Odsetek oraz liczba monocytów o fenotypie powierzchniowym CD14+CD16+ była znamienne wyższa u pacjentów z ChNS. Różnice te dotyczyły zarówno kobiet, jak i mężczyzn.

PODSUMOWANIE

U pacjentów z ChNS ujawniono niższą liczbę limfocytów T cytotoksycznych (CD3+CD8+) oraz niższą liczbę limfocytów o właściwościach immunosupresyjnych (CD3+CD8+CD57+ oraz CD8+CD28-).

Względna i bezwzględna liczba monocytów o profilu prozapalnym była wyższa u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca.

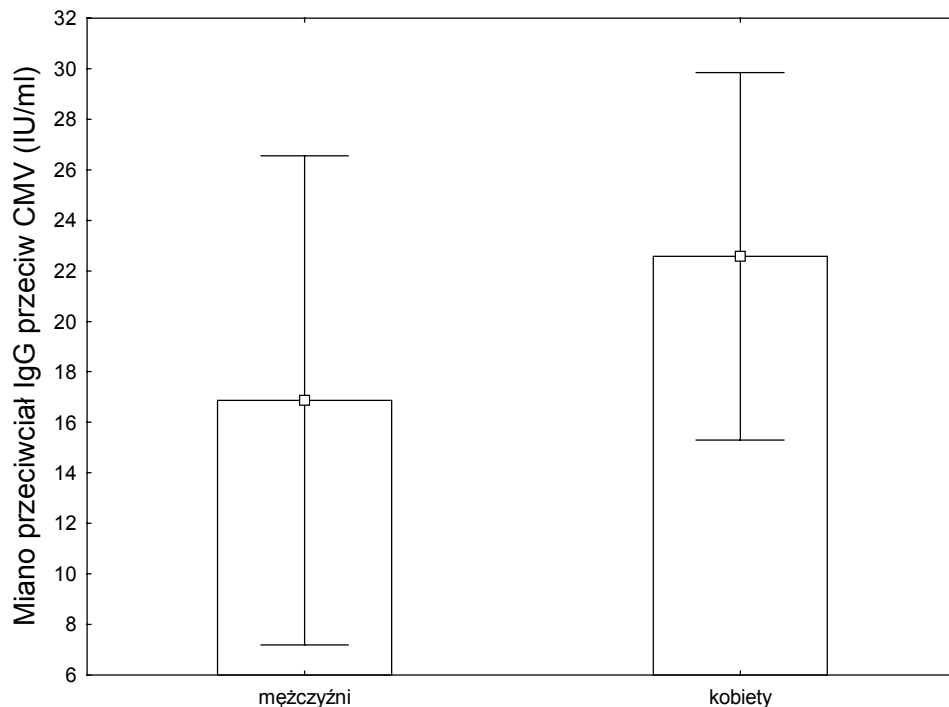
4.3. Przeciwciała IgG anty-CMV u pacjentów z ChNS i u osób z grupy kontrolnej

4.3.1 Miano przeciwciał IgG przeciw wirusowi cytomegalii u osób z chorobą niedokrwienną serca

Wyniki pomiaru aktywności komórek NK świadczą o tym, że choroba niedokrwienna serca jest chorobą powiązaną ze stanem supresji tych komórek. Wirus cytomegalii jest patogenem zdolnym do modyfikacji aktywności układu immunologicznego, a także wykorzystującym stan immunosupresji do reaktywacji.

Wysokie miana przeciwciał IgG świadczą o przewlekłej infekcji tym wirusem, a także o jego reaktywacji, stąd pomiar ich mógłby wskazać czy wirus ten odgrywa rolę w patogenezie choroby niedokrwiennej serca.

Rycina 4.3.1.1. Porównanie miana przeciwciał IgG przeciw wirusowi cytomegalii u kobiet i mężczyzn chorych na ChNS.



p=0,003

Dane przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. Analizę wykonano za pomocą testu U Manna-Whitneya

Tabela 4.3.1.1. Porównanie liczby osób pozytywnych pod względem przeciwciał IgG skierowanych przeciw wirusowi cytomegali pomiędzy kobietami i mężczyznami z chorobą niedokrwienną serca.

	Mężczyźni	Kobiety	<i>p</i>
Osoby pozytywne pod względem przeciwciał IgG anty-CMV (%)	84,27	100	0,007

Porównanie wykonano za pomocą testu χ^2 Pearsona.

Porównanie miana przeciwciał IgG pomiędzy kobietami i mężczyznami z ChNS wykazało, że kobiety charakteryzują się wyższym mianem tych przeciwciał (rycina 4.3.1.1.). Ponadto u wszystkich kobiet z ChNS stwierdzono obecność przeciwciał IgG anty-CMV w surowicy (tabela 4.3.1.1.).

U badanych osób z chorobą niedokrwienną serca określono także miano przeciwciał IgM anty-CMV, obrazujących świeżą infekcję wirusem. U żadnego z badanych pacjentów nie wykryto tych przeciwciał, dlatego wyniki te wykluczono z dalszych rozważań.

4.3.2 Przeciwciała IgG anty-CMV u pacjentów z ChNS i u osób z grupy kontrolnej

Następnym krokiem było sprawdzenie czy pacjenci z ChNS i grupa kontrolna różnią się pomiędzy sobą mianem oraz obecnością przeciwciał klasy IgG przeciwko CMV.

Tabela 4.3.2.1. Przeciwciała IgG skierowane przeciw wirusowi cytomegalii u pacjentów z ChNS i u osób z grupy kontrolnej.

Profil przeciwciał IgG anty-CMV	Pacjenci z ChNS			Grupa kontrolna		<i>p</i>
Miano przeciwciał IgG (IU/ml)	18,6±9,32			18,85±8,07		0,95
Osoby pozytywne pod względem przeciwciał IgG anty-CMV (%)	89,31			90,24		0,76
	Mężczyźni z ChNS	Mężczyźni grupa kontrolna	<i>p</i>	Kobiety z ChNS	Kobiety grupa kontrolna	<i>p</i>
Miano przeciwciał IgG (IU/ml)	16,87±9,75	19,93±7,44	0,25	22,39±7,19	18,16±8,53	0,07
Osoby pozytywne pod względem przeciwciał IgG anty-CMV (%)	84,27	93,75	0,31	100	88	0,02

Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. Analizę przeprowadzono testem U Manna-Whitneya oraz testem χ^2 Pearsona.

Porównanie miana przeciwciał IgG przeciw wirusowi CMV pomiędzy dwoma badanymi grupami nie ujawniło żadnych istotnych statystycznie różnic. Jednak dodatkowy podział tych grup pod względem płci wykazał, że miano przeciwciał IgG jest wyższe u pacjentów z ChNS, ale tylko w grupie kobiet (Tabela 4.3.2.1.). Warto

też zauważyć, że podział ten nie ujawnił istotnych różnic pomiędzy mężczyznami i kobietami z grupy kontrolnej.

Analiza liczby osób, u których wykryto przeciwciała IgG anty-CMV częściowo pokrywała się z wynikami uzyskanymi z badania wysokości miana przeciwciał. Porównanie grup kobiet ujawniło, że wśród pacjentek z ChNS jest więcej osób pozytywnych pod względem IgG.

PODSUMOWANIE

Porównanie miana przeciwciał IgG skierowanych przeciwko wirusowi cytomegalii pomiędzy kobietami z ChNS, mężczyznami z ChNS oraz kobietami i mężczyznami z grupy kontrolnej ujawniło, że pacjentki z ChNS charakteryzują się wyższym mianem przeciwciał aniżeli kobiety bez ChNS oraz mężczyźni z ChNS.

Co więcej, w grupie kobiet z ChNS było najwięcej osób pozytywnych pod względem obecności przeciwciał IgG anty-CMV.

4.4. Wirus cytomegalii, aktywność układu immunologicznego i choroba niedokrwienna serca

Wirus cytomegalii jest wirusem modyfikującym aktywność układu immunologicznego oraz potencjalnie związanym z rozwojem choroby niedokrwiennej serca. Dlatego następnym krokiem było badanie powiązań pomiędzy poziomem przeciwciał IgG anty-CMV w surowicy krwi a parametrami układu immunologicznego u pacjentów z ChNS.

Aby zbadać czynniki nieimmunologiczne wpływające na wielkość miana przeciwciał przeciw CMV przeprowadzono analizę regresji wielorakiej, w której miano przeciwciał anty-CMV przyjęto jako zmienną zależną. Wyniki analizy wskazały na wpływ wieku, płci oraz poziomu cholesterolu LDL na miano przeciwciał IgG. Należy zauważyć, że wpływ ten był pozytywny, wraz z wiekiem oraz wzrostem poziomu cholesterolu LDL wzrastało miano przeciwciał (tabela 4.4.1.).

Tabela 4.4.1. Wyniki testu regresji wielorakiej przeprowadzonej tylko w grupie pacjentów z ChNS. Miano przeciwciał IgG anty-CMV zostało włączone jako zmienna zależna, jako zmienne niezależne włączono: wiek, płeć, cukrzycę, nadciśnienia tętnicze oraz poziom cholesterolu LDL.

	BETA	Błąd st.	B	Błąd st.	t(89)	p
Wyraz wolny			-10,98	8,80	-1,25	0,22
Wiek	0,20	0,10	0,25	0,13	1,97	0,05
Płeć	0,24	0,10	4,73	2,08	2,27	0,03
Cukrzyca	0,17	0,10	3,34	2,00	1,67	0,10
Nadciśnienie tętnicze	0,09	0,10	2,25	2,35	0,96	0,34
Poziom surowiczy cholesterolu LDL	0,31	0,10	0,07	0,02	3,09	0,00

Poprawione $R^2=0,16$, $F=5,55$, istotność statyczna odrzucenia niezgodności modelu $p=0,0005$.

Następnym krokiem było zbadanie czy istnieją współzależności między stanem układu immunologicznego a mianem przeciwciał IgG anty-CMV. Przeprowadzona

analiza korelacji pomiędzy mianem przeciwciał IgG anty-CMV a badanymi parametrami układu immunologicznego wykazała ujemną korelację pomiędzy mianem przeciwciał a odsetkiem komórek CD3+CD8+ ($p < 0,05$, $R = -0,22$). Inne parametry nie wykazały żadnego istotnego powiązania z badanymi przeciwciałami. Jednocześnie regresja wieloraka, w której jako zmienną zależną przyjęto miano przeciwciał IgG anty-CMV, a jako zmienne niezależne zostały wprowadzone liczby komórek regulatorowych (CD3+CD8+CD57+, CD3+CD4+CD25+) oraz parametry związane z komórkami NK (aktywność cytotoksyczna, liczba komórek CD3-CD56+ oraz liczba komórek CD3+CD56-IFN- γ), nie wskazała na żadne istotne powiązanie między badanymi parametrami.

4.4.1 Analiza parametrów układu immunologicznego u pacjentów z ChNS podzielonych pod względem miana przeciwciał IgG skierowanych przeciw wirusowi cytomegalii

Miano przeciwciał IgG przeciw CMV charakteryzowało się dużym odchyleniem standardowym u osób z ChNS ($18,6 \pm 9,32$). Podział pacjentów pod względem płci ujawnił wyższe miano przeciwciał IgG anty-CMV u kobiet. Jednocześnie analiza parametrów komórkowych układu immunologicznego pod względem płci nie ujawniła żadnych istotnych statystycznie różnic. By zbadać, czy istnieją jakiegokolwiek różnice w parametrach układu immunologicznego u osób zakażonych CMV, badanych podzielono dodatkowo na 3 grupy:

- grupę osób charakteryzujących się wysokim mianem przeciwciał przeciw CMV (++)
- grupę osób charakteryzujących się niskim mianem przeciwciał przeciw CMV (+)
- grupę osób, u których nie wykryto przeciwciał IgG przeciw CMV (-) – grupa ta składała się z małej liczby osób, dlatego została wykluczona z dalszych rozważań.

Podział na osoby o niskim i wysokim mianie przeciwciał IgG anty-CMV przeprowadzono na podstawie mediany obliczonej w grupie pacjentów z ChNS pozytywnych pod względem przeciwciał IgG anty-CMV (mediana=20,265).

Tabela 4.4.1.1. Charakterystyka kliniczna pacjentów z ChNS podzielonych pod względem wysokiego i niskiego miana przeciwciał IgG przeciw wirusowi cytomegalii.

	Pacjenci o niskim mianie przeciwciał IgG anty-CMV	Pacjenci o wysokim mianie przeciwciał IgG anty-CMV	<i>p</i>
Płeć męska (%)	68,42	61,02	0,4
Wiek (lata)	61,3±8,39	63,51±7,84	0,1
BMI	29,38±4,21	28,72±3,67	0,47
Nadciśnienie tętnicze (%)	76,36%	82,46%	0,43
Cukrzyca (%)	29,09%	36,84%	0,38
Cholesterol całkowity (mmol/L)	207,65±48,87	213,61±44,00	0,44
Cholesterol LDL (mmol/L)	129,07±42,34	134,19±40,81	0,58
Cholesterol HDL (mmol/L)	46,83±9,62	46,43±11,05	0,73
Trójglicerydy (mmol/L)	151,84±69,14	165,14±94,09	0,78
Palenie papierosów (%)			
niepalący	28	27,08	0,99
palacz	14	14,58	
ex-palacz	58	58,33	

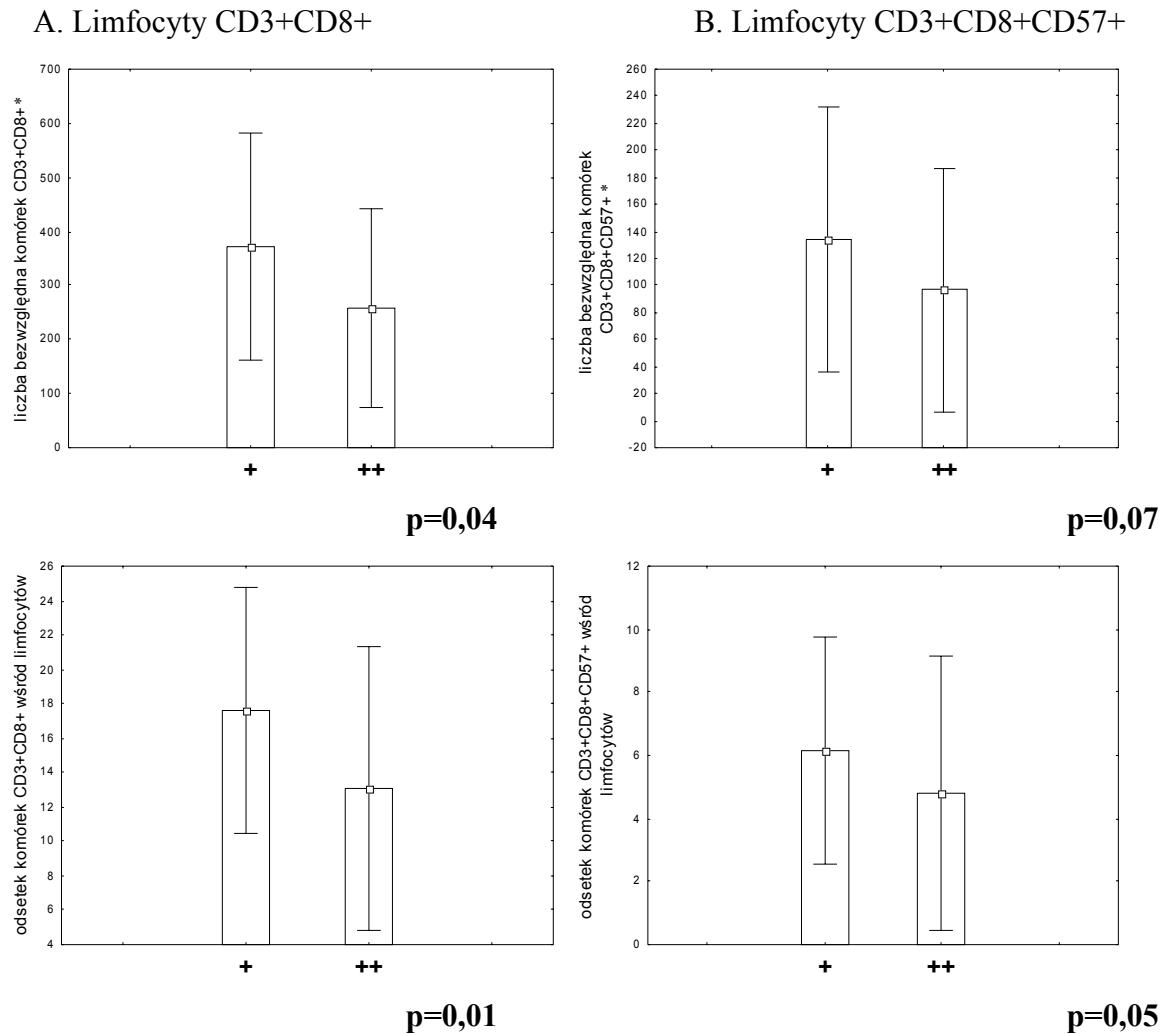
Pacjenci z wysokimi mianami przeciwciał IgG przeciw CMV nie różnili się istotnie statystycznie pod względem parametrów klinicznych od pacjentów z niskimi mianami przeciwciał przeciw CMV (tabela 4.4.1.1.).

Kolejnym krokiem było sprawdzenie czy grupy te różnią się od siebie pod względem statusu układu immunologicznego.

Do analizy zostały włączone komórki NK. Porównanie pod względem ich liczby i aktywności nie ujawniło żadnych istotnych statystycznie różnic.

Również przeprowadzenie analizy porównawczej limfocytów T pomocniczych (CD3+CD4+) nie wykazało żadnych istotnych różnic pod względem bezwzględnej i względnej liczby komórek. Analiza komórek T regulatorowych o fenotypie CD3+CD4+CD25+ także nie ujawniła statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami.

Rycina 4.4.1.1. Limfocyty T cytotoksyczne CD3+CD8+ (kolumna A) i komórki CD3+CD8+CD57+ (kolumna B) u pacjentów z ChNS podzielonych pod względem wysokości miana przeciwciał IgG przeciwko wirusowi CMV. ++ - wysokie miano przeciwciał, wartość powyżej mediany, + - niskie miano przeciwciał, wartość poniżej mediany (mediana=20,265).



*- bezwzględna liczba komórek w 1 mm^3 krwi obwodowej

Analizy wykonano testem U Manna-Whitneya. Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe.

Badanie różnic w liczbie limfocytów T cytotoksycznych wykazało, że pacjenci z wysokimi mianami przeciwciał IgG przeciwko CMV mają mniejszą względną i bezwzględną liczbę tych komórek. Analiza komórek CD3+CD8+CD57+ wykazała tendencje do niższej liczby tych komórek u pacjentów z wysokimi mianami przeciwciał (Rycina 4.4.1.1.).

Pacjenci z wysokimi i niskimi mianami przeciwciał przeciw CMV nie różnili się także istotnie statystycznie stężeniem cytokin w surowicy krwi, a także pod względem liczby monocytów o profilu prozapalnym.

PODSUMOWANIE

Analiza regresji wielorakiej wskazała na pozytywne powiązanie pomiędzy mianem przeciwciał IgG skierowanych przeciwko wirusowi CMV a wiekiem, płcią i stężeniem cholesterolu LDL w surowicy krwi.

Miano przeciwciał IgG anty-CMV wykazywało odwrotną korelację z odsetkiem komórek CD3+CD8+.

Porównanie między sobą grup pacjentów z ChNS podzielonych pod względem mediany miana przeciwciał IgG anty-CMV na grupy o wysokim i niskim mianie, wskazało na brak istotnych różnic w parametrach klinicznych tych pacjentów. Grupy te różniły się istotnie statystycznie wyłącznie pod względem komórek CD3+CD8+ oraz CD3+CD8+57+, których było mniej u pacjentów z wysokimi mianami IgG anty-CMV.

4.5. Porównanie zmian w układzie immunologicznym w okresie przed i po operacji pomostowania tętnic wieńcowych u osób z ChNS z wysokimi i niskimi mianami IgG anty-CMV

Obecność wirusa cytomegalii może modulować aktywność układu immunologicznego. Właściwości immunomodulacyjne odgrywają szczególną rolę w stanie zapalnym. Jako model obciążenia stanem zapalnym u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca przyjęto operację pomostowania tętnic wieńcowych, przeprowadzaną w krążeniu pozaustrojowym.

Krew pobierana była od 49 pacjentów przed zabiegiem pomostowania tętnic wieńcowych oraz 3, 24 i 72 godziny po zakończeniu krążenia pozaustrojowego. Pacjentów podzielono na dwie grupy pod względem miana przeciwciał:

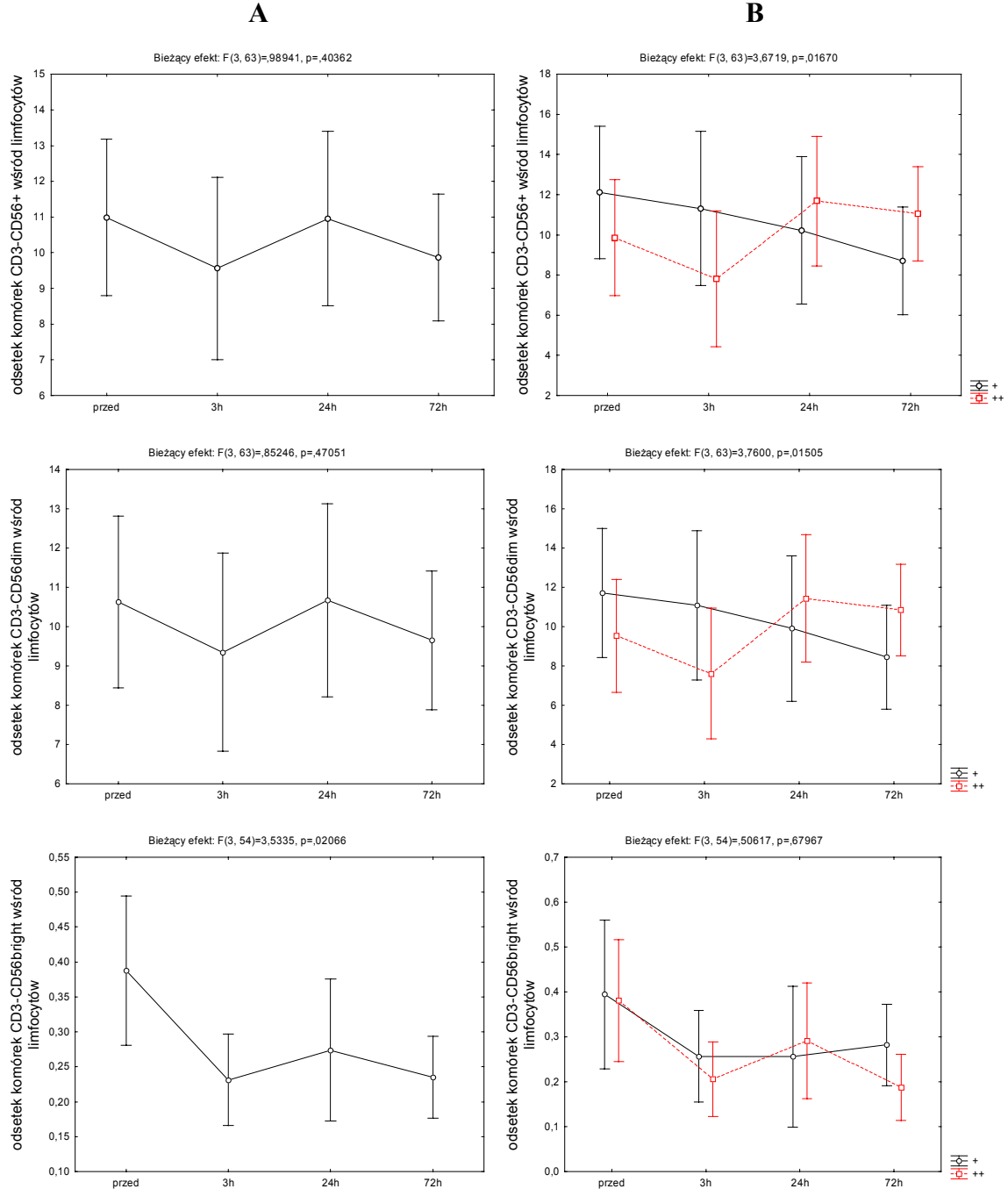
- grupę z wysokim mianem przeciwciał IgG anty-CMV (++),
- grupę z niskim mianem przeciwciał IgG anty-CMV (+).

Grupy wydzielono na podstawie mediany, obliczonej w badanej grupie, jej wartość wynosiła 17,981. Pacjenci z wyższym mianem niż mediana zostali włączeni do grupy z wysokim mianem przeciwciał, pacjenci z niższym mianem niż mediana – do grupy z niskim mianem przeciwciał.

4.5.1. Zmiany ilościowe wśród komórek NK w okresie okołoperacyjnym

Wirus cytomegalii posiada szereg mechanizmów wpływających na aktywność oraz liczbę komórek NK, dlatego pierwszą populacją komórkową poddaną analizie w okresie okołoperacyjnym były komórki NK oraz ich subpopulacje.

Rycina 4.5.1.1. Zmiany odsetka komórek NK (CD3-CD56+) oraz ich subpopulacji przed i po operacji pomostowania tętnic wieńcowych. Pacjentów podzielono na grupy z wysokim (++) i niskim (+) mianem przeciwciał przeciw CMV. Kolumna A przedstawia przebieg zmian w okresie okołoperacyjnym w całej badanej grupie. Kolumna B przedstawia przebieg zmian u pacjentów podzielonych pod względem miana przeciwciał przeciw CMV.



Analizę wykonano testem ANOVA.

Dynamika zmian komórek NK (CD3-CD56+) po operacji pomostowania tętnic wieńcowych była odmienna u pacjentów z wysokim i niskim mianem przeciwciał IgG

anty-CMV. U pacjentów z niskim mianem IgG odsetek komórek NK wśród limfocytów krwi wzrastał w 3 godzinie po operacji, gdy tymczasem u pacjentów z wysokim mianem odsetek ten spadał. Jak można zaobserwować na rycinie 4.5.1.1., zmiany ilościowe w populacji komórek NK po zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych są pochodną przesunięć w subpopulacji komórek CD3-CD56dim. Dynamika ilościowych zmian CD3-CD56dim była podobna do zmian ilościowych wśród komórek CD3-CD56+ w obu grupach.

Pacjenci z wysokimi i niskimi mianami przeciwciał IgG anty-CMV nie różnili się między sobą dynamiką zmian komórek CD3-CD56bright przed zabiegiem oraz w 3, 24 i 72 godziny po zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych. Jednak analiza jednoczesna obu tych grup wykazała, że odsetek tych komórek zmniejszał się po zabiegu operacyjnym.

4.5.2. Limfocyty T w okresie okołoperacyjnym

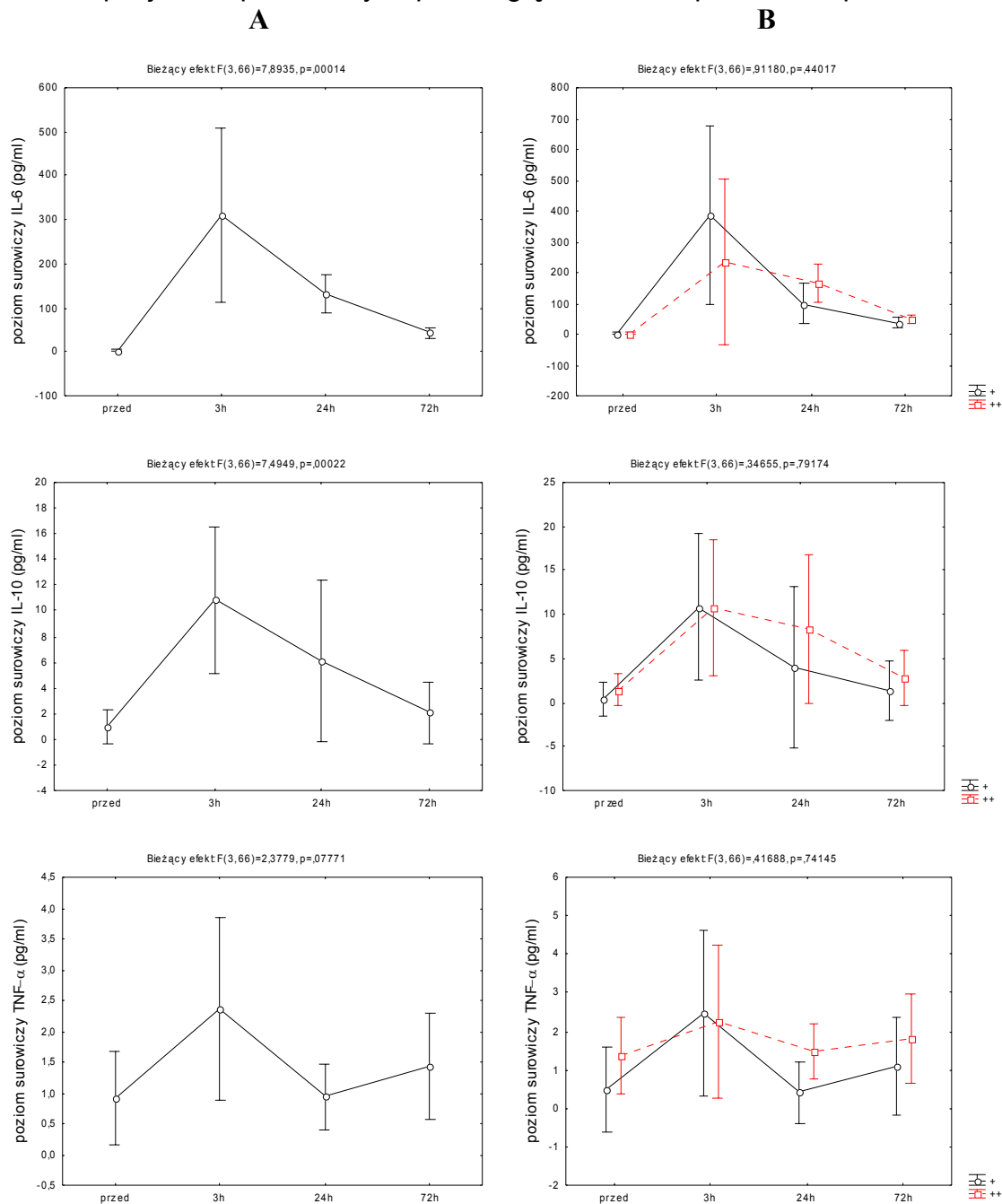
W okresie okołoperacyjnym mierzono też dynamikę subpopulacji limfocytów T. Analiza nie wykazała jednak żadnych istotnych statystycznie zmian w odsetku komórek CD3+CD4+, CD3+CD4+CD25+, CD3+CD8+, CD3+CD8+CD57+ i CD8+CD28- zarówno w czasie badania przebiegu zmian w całej grupie badanej, jak i przy porównywaniu zmian pomiędzy pacjentami z wysokimi i niskimi mianami przeciwciał przeciw wirusowi cytomegalii.

4.5.3. Zmiany stężenia cytokin w surowicy krwi w okresie okołoperacyjnym.

We wszystkich punktach czasowych oznaczono też stężenia surowicze cytokin: IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α . Istotne statystyczne różnice w przebiegu zmian stężenia cytokin w surowicy krwi mierzone w całej grupie wykazano jedynie w stosunku do IL-6 oraz IL-10. W obu przypadkach zanotowano wzrost stężenia w 3 godzinie od zakończenia krążenia pozaustrojowego. Zmiany stężenia TNF- α były podobne, ale nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej.

Porównanie zmian w stężeniu cytokin w okresie okołoperacyjnym pomiędzy pacjentami z wysokim i niskim mianem przeciwciał IgG anty-CMV nie wykazało żadnych istotnych statystycznie różnic.

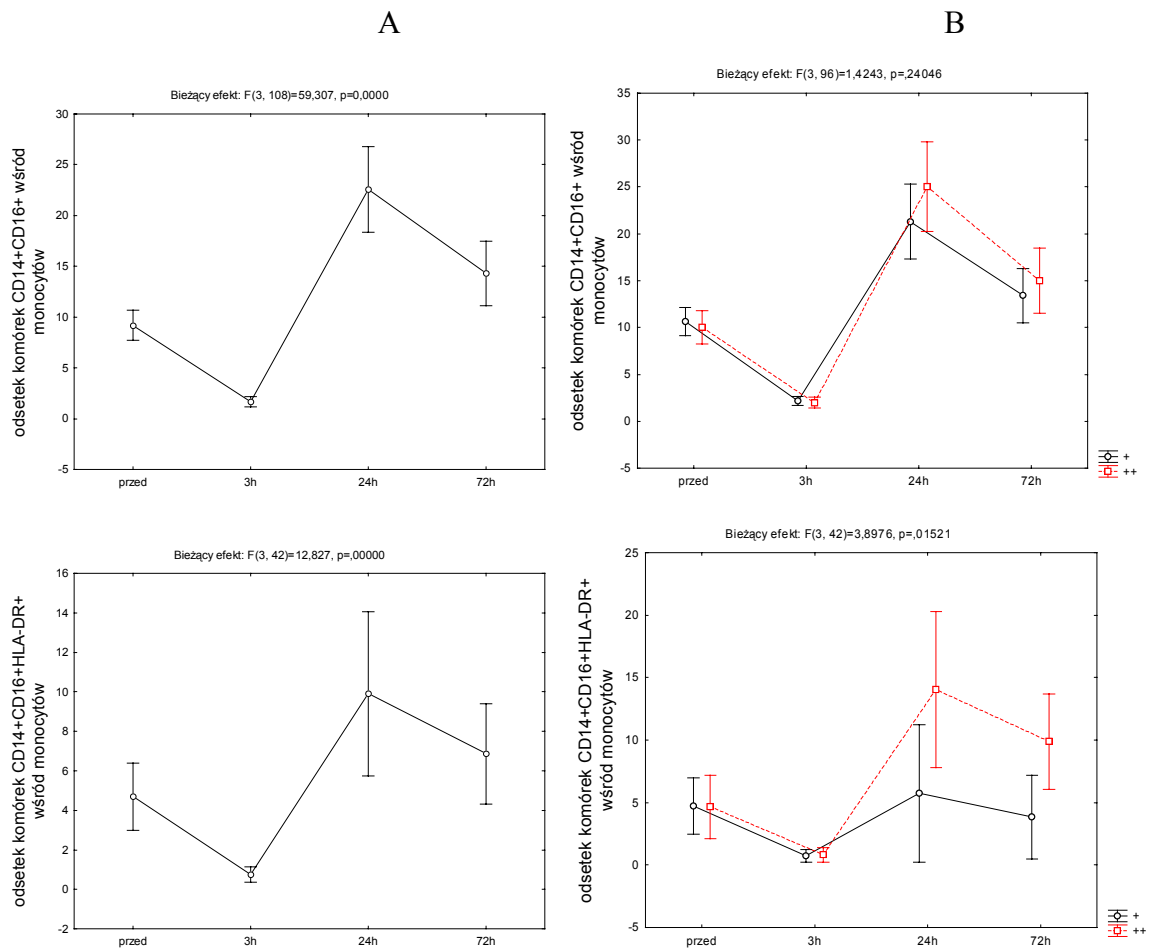
Rycina 4.5.3.1. Zmiany stężenia IL-6, IL-10 oraz TNF- α w surowicy krwi w okresie przed i po operacji pomostowania tętnic wieńcowych. Pacjentów podzielono na grupy z wysokim (++) i niskim (+) mianem przeciwciał przeciw CMV. Kolumna A przedstawia przebieg zmian w okresie okołoperacyjnym w całej badanej grupie. Kolumna B przedstawia przebieg zmian u pacjentów podzielonych pod względem miana przeciwciał przeciw CMV.



Analizę wykonano testem ANOVA.

4.5.4. Odsetek monocytów prozapalnych w krwi obwodowej przed i po operacji pomostowania tętnic wieńcowych

Rycina 4.5.4.1. Zmiany odsetka komórek CD14+CD16+ oraz CD14+CD16+HLA-DR+ w okresie okołoperacyjnym. Pacjentów podzielono na grupy z wysokim (++) i niskim (+) mianem przeciwciał przeciw CMV. Kolumna A przedstawia przebieg zmian w okresie okołoperacyjnym w całej badanej grupie. Kolumna B przedstawia przebieg zmian u pacjentów podzielonych pod względem miana przeciwciał przeciw CMV.

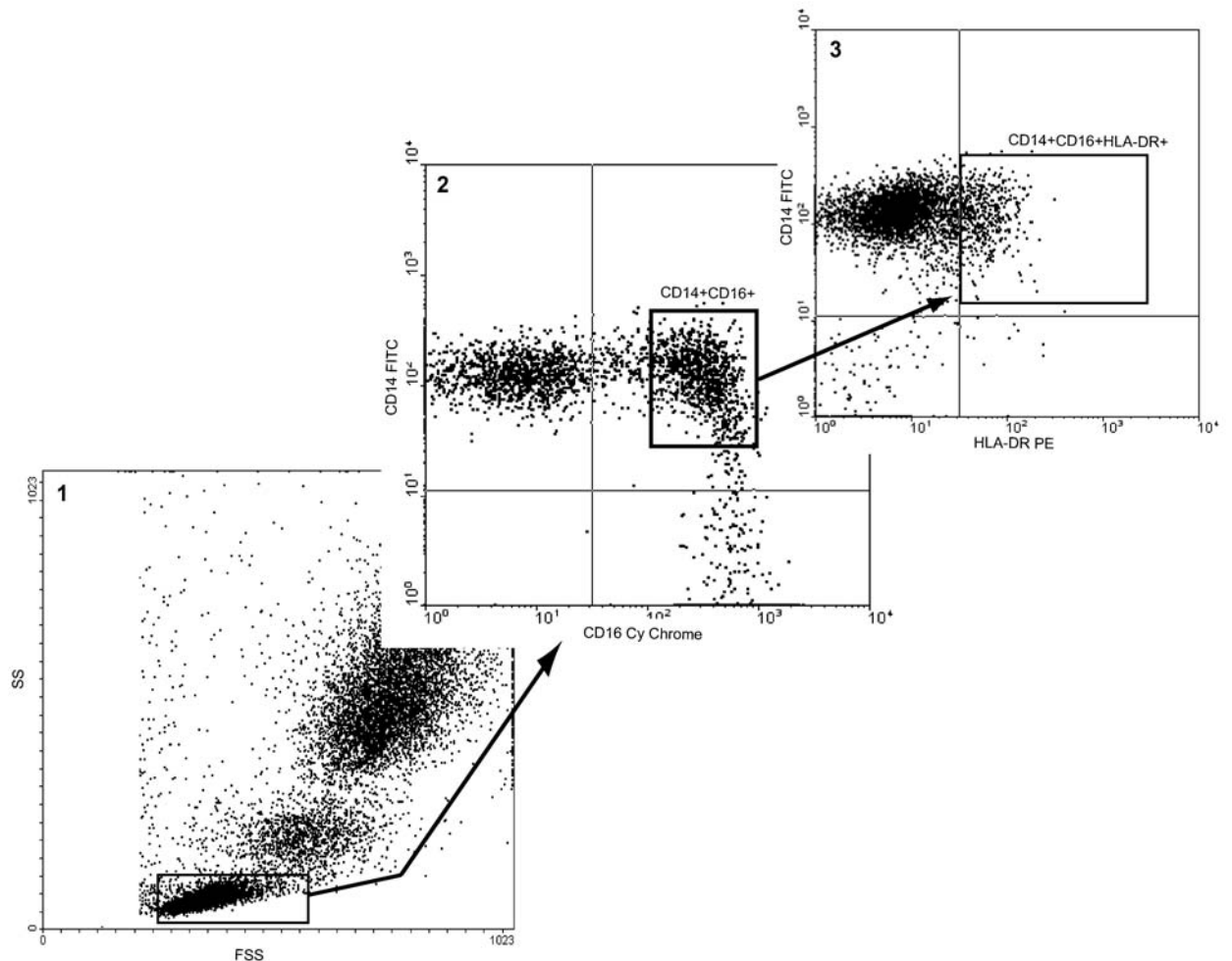


Analizę wykonano testem ANOVA.

Odsetek komórek CD14+CD16+HLA-DR+ wzrastał po operacji pomostowania tętnic wieńcowych, ale tylko u pacjentów z wysokimi mianami przeciwciał IgG anty-CMV, co jest o tyle ciekawe, że właśnie te komórki stanowią cel dla infekcji CMV oraz potencjalne miejsce jego reaktywacji. Dynamika zmian w odsetku komórek CD14+CD16+ była podobna w obu badanych grupach i obserwowano wzrost odsetka

tych komórek po zabiegu. Sposób bramkowania monocytów CD14+CD16+HLA-DR+ przedstawiono na rycinie 4.5.4.2.

Rycina 4.5.4.2. Schemat bramkowania monocytów o fenotypie powierzchniowym CD14+CD16+HLA-DR+. Bramkowanie monocytów zostało przeprowadzone na podstawie obrazu FSS (ang. forward scatter; rozproszenie czołowe – ugięcie światła obrazujące wielkość komórki) i SS (ang. side scatter; rozproszenie boczne – ugięcie światła obrazujące liczbę ziarnistości wewnątrz komórki) (1). Następnie na podstawie obrazu fluorescencji uzyskanej z barwników fluorescencyjnych sprzężonych z przeciwciałami anti-CD14 oraz anti-CD16 wybramkowano monocyty o fenotypie CD14+CD16+ (2). Następnym krokiem było stwierdzenie obecności cząsteczek HLA-DR na powierzchni monocytów CD14+CD16+ (3).



PODSUMOWANIE

U pacjentów z wysokimi mianami przeciwciał IgG anty-CMV po operacji pomostowania tętnic wieńcowych dochodziło do spadku odsetka komórek NK oraz wzrostu liczby względnej monocytów CD14+CD16+HLA-DR+, komórek będących potencjalnym celem zakażenia i rezydowania CMV.

Można więc powiedzieć, że obecność silnie wyrażonej infekcji wirusem cytomegalli u chorych z chorobą niedokrwienną serca moduluje aktywność układu immunologicznego w kierunku supresji układu komórek NK i wzrostu aktywności monocytów prozapalnych w warunkach obciążenia układu stanem zapalnym.

5. DYSKUSJA

Celem prezentowanej pracy było określenie czy pacjentów z chorobą niedokrwienną serca charakteryzują zmiany immunosupresyjne, a jeśli tak, to jaki przyjmują one profil. Dalszym etapem badań było wskazanie czy zmiany w układzie immunologicznym są powiązane z obecnością wirusa cytomegalii.

Ażeby odpowiedzieć na te pytania, badania przeprowadzono na komórkach NK i limfocytach T o funkcjach immunoregulacyjnych. Do badań włączono zarówno pacjentów z ChNS, jak i grupę kontrolną złożoną z osób w podobnym wieku bez objawów choroby niedokrwiennej serca. Analizę przeprowadzono w grupach całkowitych, a także podzielonych pod względem płci. Jak wynika z badań, kobiety zapadają na tę chorobę o 10 lat później niż mężczyźni, dlatego też płeć męska jest uznawana za czynnik ryzyka rozwoju ChNS (Keil U., 2000). Także układ immunologiczny wykazuje różnice związane z płcią, stąd podział badanych osób pod względem płci miał uwzględnić tego typu zróżnicowanie.

5.1. Niższa aktywność oraz liczba komórek NK u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca

Analiza komórek NK nie ujawniła żadnych istotnych różnic pomiędzy kobietami i mężczyznami z ChNS. Jednak porównanie całkowitej grupy pacjentów z ChNS z grupą kontrolną wykazało niższą bezwzględną i względną liczbę komórek NK oraz ich cytotoksycznej subpopulacji CD3-CD56dim u pacjentów z ChNS. Badanie to nie wykazało natomiast istotnych różnic w liczbie komórek regulatorowych CD3-CD56bright w badanych grupach. Porównanie kobiet z obu grup wykazało podobne różnice, jak przy porównaniu grup całkowitych. Mężczyźni z ChNS dodatkowo różnili się niższą względną liczbą komórek CD3-CD56bright.

Dalsza analiza aktywności komórek NK przeprowadzona dwoma testami – uwalniania dehydrogenazy mleczanowej oraz produkcji wewnątrzplazmatycznego IFN- γ wskazała na niższą aktywność komórek NK u pacjentów z ChNS zarówno gdy grupy były porównywane pod względem płci, jak i gdy porównanie wykonano w całkowitych grupach.

Komórki NK stanowią główną linię obrony antywirusowej i antybakteryjnej, oprócz efektu cytotoksycznego są one też zaangażowane w funkcje regulacyjne, związane z produkcją cytokin takich jak TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-12 (Cooper M.A. i wsp., 2001c). Ponadto aktywność komórek NK jest markerem ogólnej plastyczności i sprawności układu immunologicznego. Układ komórek NK wraz z innymi elementami odporności naturalnej dominuje u osób starszych w stosunku do odporności swoistej oznacza to, że jego aktywność oraz liczba komórek wzrasta przy spadku aktywności odporności swoistej (Franceschi C. i wsp., 2000). Tak więc uzyskane w tej pracy wyniki wskazują na supresję aktywności istotnej składowej układu immunologicznego u pacjentów z ChNS.

Jakie mogą być przyczyny obniżenia aktywności NK w chorobie niedokrwiennej serca? Jedną z przyczyn może być wpływ utlenionych LDL – oxLDL.

Utlenione LDL są czynnikami, które w znaczący sposób wpływają na rozwój miażdżycy (Steinberg D., 1997). Modyfikowane cząsteczki LDL przyczyniają się do łatwiejszej akumulacji cholesterolu przez monocyty i makrofagi, co może przyczyniać się do formowania komórek piankowatych, a następnie blaszki miażdżycowej (Henriksen T. i wsp., 1981). Działają one jako czynnik chemotaktyczny dla monocytów i limfocytów T oraz mogą indukować produkcję i wydzielanie innych czynników chemotaktycznych, takich jak np. MCP-1 (Cushing S.D. i wsp., 1990, McMurray H.F. i wsp., 1993, Quinn M.T. i wsp., 1987). Badania ostatnich lat wykazały, że pacjenci z chorobą niedokrwinną serca charakteryzują się podwyższonym poziomem oxLDL. Co więcej stwierdzono też, że wysoki poziom oxLDL w surowicy krwi stanowi czynnik ryzyka rozwoju ChNS (Weinbrenner T. i wsp., 2003).

Utlenione LDL mogą wpływać na komórki NK, stymulując je do produkcji reaktywnych form tlenu (ROS). Na tej drodze modyfikują ich aktywność, funkcję, a nawet prowadzą do nekrozy lub apoptozy komórek. Działanie proapoptotyczne oxLDL na komórki układu immunologicznego było obserwowane w badaniach *in vitro* (Alcouffe J. i wsp., 1999). Hodowla komórek NK z oxLDL w badaniu Viora M. i współpracowników z 2001 roku doprowadziła do obniżenia ich aktywności cytotoksycznej. Efekt ten był odwracalny, gdy do hodowli dodawano N-acetylo cysteinę (NAC) – związek, który jest zmiataczem wolnych rodników (Viora M. i wsp., 2001). Wcześniejsze prace tego samego zespołu wykazały, że utlenione LDL nie wpływają na morfologię komórek NK i ekspresję ich cząsteczek powierzchniowych. Działanie

oxLDL nie zmieniało też liczby tworzonych koniugatów pomiędzy komórkami NK i komórkami docelowymi. Jednak dokładniejsza analiza molekularna wykazała, że utlenione LDL spowodowały depolaryzację elementów cytoszkieletu oraz zmianę organizacji mikrotubul. Wiadomo natomiast, że cytoszkielet odgrywa kluczową rolę w procesie lizy cytotoksycznej (Malorni W. i wsp., 1997). Granule zawierające perforyny i granzymy, enzymy biorące udział w ataku cytotoksycznym, są przesuwane przez ruch mikrotubul cytoszkieletu. Dowiodły tego badania, w których dodanie kolchicyny, związku uszkadzającego mikrotubule, doprowadziło do upośledzenia właściwości cytotoksycznych komórek NK (Katz P. i wsp., 1982).

Inną przyczyną może być wpływ cytokin prozapalnych. Nasze wcześniejsze badania wskazały na związek wzrostu cytokin prozapalnych z supresją aktywności cytotoksycznej komórek NK (Myśliwska J. i wsp., 1997). Badania te przeprowadzono u osób starszych, których stan zdrowia był określany za pomocą kryteriów protokołu seniora (dokładną charakterystykę tego protokołu można znaleźć w publikacjach: Ligthart G.J. i wsp., 1990, Pawelec G. i wsp., 2001). Nasze badania dowiodły, że osoby starsze nie spełniające wszystkich kryteriów protokołu seniora, a więc nie w pełni zdrowe, charakteryzują się niższą aktywnością komórek NK aniżeli osoby zdrowe w tym samym wieku. W badaniu tym przeprowadzono także pomiar uwalnianego TNF- α i IL-6 podczas reakcji cytotoksycznej komórek NK przeciwko komórkom K562. Wyniki tego badania wskazały na wyższe stężenie tych cytokin podczas reakcji cytotoksycznej u pacjentów z niską aktywnością cytotoksyczną. Opisane powyżej procesy obrazują zmiany zachodzące wraz z wiekiem, u osób starszych nie w pełni zdrowych dochodzi do wzrostu poziomu cytokin prozapalnych oraz obniżenia aktywności komórek NK (Myśliwska J. i wsp., 1998, Myśliwska J. i wsp., 1999b, Myśliwska J. i wsp., 2000a). Czy podobne zależności występują u osób z ChNS? Wydaje się to prawdopodobne, gdyż u tych pacjentów obserwowaliśmy obniżenie aktywności cytotoksycznej komórek NK, a także inne prace wskazują na powiązanie patogenezy ChNS z zapaleniem i wzmożoną produkcją TNF- α oraz IL-6 (Cesari M. i wsp., 2003).

Analizując zmiany aktywności NK u pacjentów z ChNS należy wspomnieć o naszych wcześniejszych badaniach, które wskazały, że zdrowe starsze osoby charakteryzują się wyższą aktywnością cytotoksyczną komórek NK a także wyższą produkcją cytokin typu Th1 po szczepieniu przeciwko grypowym (Myśliwska J. i wsp.,

2004). Tymczasem osoby starsze chore na przewlekłe choroby, do których można zaliczyć także ChNS, charakteryzowały się niższą aktywnością komórek NK i mniejszą sekrecją cytokin typu Th1 po szczepieniu przeciw grypie. Cytokiny Th1 odgrywają krytyczną rolę w stymulacji aktywności komórek NK (Cheknev S.B., 2002). W odpowiedzi na tę stymulację komórki NK inicjują produkcję IFN- γ , który autokrynnie aktywuje właściwości cytotoksyczne komórek NK (Das S. i wsp., 2001). Dlatego też poziom wewnątrzplazmatycznego IFN- γ jest uznawany za miarę aktywności komórek NK. Produkcja tej cytokiny ma jednak dalsze konsekwencje, czego dowiodło badanie, w którym myszom podano równocześnie IL-12 oraz antygeny Leishmani. Spowodowało to wykształcenie się swoistej odporności przeciwko temu patogenowi. Jednak gdy dokonano tego samego u myszy pozbawionych komórek NK, odporność nie została wykształcona. Proces ten jest prawdopodobnie uzależniony od regulacyjnego wpływu IFN- γ na komórki odpowiedzi specyficznej (Afonso L.C. i wsp., 1994). Obserwowane u naszych pacjentów z ChNS obniżenie produkcji wewnątrzplazmatycznego IFN- γ przez komórki NK oraz obniżenie surowiczego poziomu IL-2 może nie tylko tłumaczyć niższą aktywność komórek NK, ale wskazywać też na potencjalne zaburzenie rozwoju odpowiedzi Th1 oraz specyficznej odpowiedzi immunologicznej przeciw infekcyjnej.

Na zależność między układem komórek NK a miażdżycą, główną przyczyną ChNS, wskazuje doniesienie Bruunsgaard H. i współpracowników z 2001 roku. Badaniu temu poddano niewielką grupę chorych we wczesnym, wyprzedzającym ujawnienie się objawów klinicznych, etapie rozwoju miażdżycy. Bruunsgaard H. i współpracownicy dowiedli, że pacjenci na tym etapie choroby charakteryzują się niższą aktywnością pojedynczej komórki NK oraz podobną ogólną aktywnością tych komórek w porównaniu do osób zdrowych (Bruunsgaard H. i wsp., 2001). Opisani pacjenci charakteryzowali się także wyższą liczbą komórek NK. Sugeruje to, że zanim dojdzie do ujawnienia objawów związanych z progresją miażdżycy, supresja aktywności pojedynczej komórki NK jest rekompensowana wzrostem liczby cytotoksycznych komórek NK. W tym kontekście należy też wspomnieć o hipotezie Seko Y. i współpracowników z 1997 roku, w której to nadmierna aktywność komórek NK miałaby przyczyniać się do rozwoju miażdżycy (Seko Y. i wsp., 1997). Autorzy ci zaobserwowali w blaszce miażdżycowej komórki NK aktywnie wydzielające perforyny. Sugerują oni, że to te komórki mogą być przyczyną pierwotnego uszkodzenia ściany naczynia. W naszym badaniu osoby

z zaawansowaną wielonaczyniową ChNS charakteryzowała supresja odpowiedzi komórek NK. Należy stwierdzić, że grupa naszych pacjentów osiągnęła krytyczne dla dalszego funkcjonowania i życia objawy kliniczne związane z istotnym zwężeniem co najmniej jednej z głównych tętnic wieńcowych. Dlatego na tym etapie choroby obserwowaliśmy bardziej zaawansowane zmiany w układzie komórek NK prowadzące do supresji ich aktywności.

Taką hipotezę potwierdza badanie Jonasson L. i współpracowników z 2005, w którym aktywność cytotoksyczna NK wraz z względną i bezwzględną liczbą tych komórek oraz ich subpopulacji CD3-CD56dim były obniżone. Można więc zauważyć, że w badaniu tym uzyskano podobne wyniki jak w naszej pracy. Jednak osoby badane przez Jonasson L. i współpracowników były młodsze i charakteryzowały się niższym stopniem CCS (Canadian Cardiovascular Society) od włączonych przez nas pacjentów (Jonasson L. i wsp., 2005). Może to świadczyć o tym, że stan zaawansowania ChNS u pacjentów z prezentowanej pracy był w stopniu poprzedzającym obserwowany przez nas. Nasi pacjenci osiągnęli punkt końcowy lub prawie końcowy, gdyż zostali zakwalifikowani i następnie poddani zabiegowi pomostowania tętnic wieńcowych. Wskazuje to na pogłębianie się zmian w układzie komórek NK wraz z rozwojem ChNS, gdyż w naszej pracy mężczyźni z ChNS nie tylko charakteryzowali się obniżeniem aktywności oraz liczby komórek NK i komórek CD3-CD56dim, ale także obniżeniem liczby CD3-CD56bright, czego nie wykazali Jonasson L. i współpracownicy (2005).

Obniżenie liczby komórek CD3-CD56dim obserwowano także u pacjentów zakażonych wirusem HIV-1. Spadek ten nie dotyczył komórek o fenotypie CD56bright. Co więcej, obniżenie ogólnej liczby komórek NK ściśle korelowało z postępem tego zakażenia. Autorzy tłumaczą obserwowane zmiany brakiem dojrzewania komórek NK w kierunku CD56dim u pacjentów z AIDS (Tarazona R., i wsp. 2002). Być może podobny mechanizm występuje u pacjentów z ChNS.

Nie można też wykluczyć potencjalnego wpływu wirusa cytomegalii na aktywność komórek NK. Większość badanych pacjentów charakteryzowała przewlekła infekcja CMV. W obecności prozapalnych cytokin, takich jak TNF- α , dochodzi do reaktywacji wirusa (Soderberg-Naulcer C i wsp., 1997a). Podwyższone poziomy tych cytokin obserwowano w ChNS. Podczas reaktywacji wirus ten powoduje wydzielanie dużej ilości interleukiny-10, cytokiny obniżającej aktywność odpowiedzi

komórkowej, a więc też komórek NK (Redpath S. i wsp., 1999). Może to być jedna z przyczyn niskiej aktywności tych komórek u pacjentów z ChNS.

Jakie znaczenie dla pacjentów z ChNS może mieć obniżenie aktywności cytotoksycznej komórek NK? Komórki te stanowią pierwszą linię obrony przeciwko infekcjom wirusowym, bakteryjnym oraz grzybiczym (Hidore M.R. i Murphy J.W., 1989). Ponadto u starszych osób niska aktywność komórek jest ściśle związana z rozwojem infekcji, głównie górnych dróg oddechowych. Wcześniejsze badania wykazały, że niska cytotoksyczność komórek NK jest czynnikiem ryzyka śmierci z powodu tego typu infekcji (Ogata K. i wsp., 2001). Dlatego zaburzenie aktywności komórek NK występujące u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca może stanowić u nich jedną z dróg umożliwiających rozwój infekcji bakteryjnych i wirusowych.

Bezwzględna i względna liczba komórek NK o fenotypie powierzchniowym CD56bright była podobna u pacjentów z ChNS i w grupie kontrolnej. Porównanie liczby tych komórek tylko u mężczyzn wykazało, że mężczyźni z chorobą niedokrwienną serca charakteryzują się ich niższą liczbą. Komórki CD56bright są subpopulacją komórek NK zaangażowaną w regulację odpowiedzi immunologicznej oraz kontrolującą rozwój reakcji zapalnej (Fehniger T.A. i wsp., 1999), a choroba niedokrwienna serca jest schorzeniem o podłożu zapalnym, w związku z tym niższa liczba tych komórek w krwi pacjentów z ChNS jest dość zaskakująca.

Obniżenie liczby komórek CD56bright we krwi może być tłumaczone przesunięciem się ich puli do miejsca stanu zapalnego. Takie zachowanie tych komórek obserwował Dalbeth N. i współpracownicy w 2004 roku. Porównanie odsetka komórek CD56bright we krwi i w tkance objętej stanem zapalnym wykazało, że komórki te gromadzą się w ogniskach zapalnych. W pracy tej komórki CD56bright były aktywne i na drodze kontaktu komórkowego indukowały produkcję TNF- α przez monocyty. Proces ten może przyczyniać się do szybszego rozwoju stanu zapalnego oraz jego podtrzymania. Nie można wykluczyć podobnego działania tych komórek w chorobie niedokrwiennej serca i ich akumulacji w uszkodzonej ścianie naczynia wieńcowego.

Drugim miejscem akumulacji komórek CD56bright są węzły chłonne. Ich większą liczbę w stosunku do obserwowanej we krwi obwodowej wykrywano w węzłach chłonnych, gdzie oddziałują one z limfocytami T. Limfocyty T wydzielają IL-2,

na którą komórki CD56bright odpowiadają ekspresją IFN- γ . Cytokiny te gwarantują rozwój odpowiedzi Th1 oraz odpowiedzi komórkowej (Fehniger T.A. i wsp., 2003). W węzle chłonnym komórki CD56bright są położone w strefie grasiczozależnej i sąsiadują z komórkami dendrytycznymi. Cooper M.A. i współpracownicy w 2004 zaproponowali hipotezę o bliskiej interakcji obu typów komórek. Rola komórek CD56bright nie miałaby ograniczać się jedynie do interakcji z limfocytami T, ale obejmowałaby też regulację ekspresji antygenów w kontekście MHC, produkcji cytokin oraz stopnia aktywacji komórek dendrytycznych. Mechanizmy te miałyby w pośredni sposób wpływać na limfocyty T pomocnicze i brać udział w regulacji specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Przesunięcie się komórek subpopulacji CD56bright do węzłów chłonnych mogłoby tłumaczyć obniżenie się odsetka tych komórek w grupie badanych mężczyzn (Cooper M.A. i wsp., 2004).

W surowicy krwi osób z chorobą niedokrwienną serca obserwowano niski poziom interleukiny-2, cytokiny wpływającej na aktywność cytotoksyczną oraz proliferację komórek NK. Pomiar tej cytokiny był przeprowadzony za pomocą testu biologicznego z użyciem komórek wrażliwych na IL-2. Test ten umożliwia nie tylko pomiar stężenia tej cytokiny w surowicy krwi, ale ocenia również jej aktywność biologiczną.

Niskie dawki IL-2 stymulują proliferację komórek CD56bright (Baume D.M. i wsp., 1992), a dalsza stymulacja tą cytokiną podnosi aktywność cytotoksyczną komórek CD56bright do poziomu podobnego, jak u komórek CD56dim (Caligiuri M.A. i wsp., 1990). Komórki NK o fenotypie powierzchniowym CD56dim są mniej wrażliwe na działanie IL-2 i tylko duże dawki tej cytokiny zwiększają ich proliferację (Cooper M.A. i wsp., 2001a). Obserwowany w naszej pracy niższy poziom tej cytokiny może być jedną z przyczyn niższej aktywności oraz liczby komórek NK u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca. Może on mieć szczególne znaczenie dla mężczyzn z ChNS, u których zaobserwowano niższe stężenia tej cytokiny w surowicy krwi w porównaniu do mężczyzn z grupy kontrolnej. Zmianom tym towarzyszyło obniżenie liczby komórek CD56bright. Różnic takich nie zaobserwowano u kobiet z ChNS, u których stwierdzono wyższy poziom IL-2 w surowicy krwi w porównaniu do mężczyzn z ChNS i poziom podobny jak w grupie kobiet bez ChNS.

Nie można też wykluczyć potencjalnego wpływu terapii stosowanej w chorobie niedokrwiennej serca na status komórek NK. Jednym z czynników wpływających na aktywność oraz proliferację komórek NK mogą być statyny. Przyjmowanie tych leków w znaczący sposób obniża cytotoksyczność oraz zdolność do podziału tych komórek (Hillyard D.Z. i wsp., 2004). Należy jednak zauważyć, że część pacjentów włączonych do niniejszego badania nie przyjmowała statyn, a porównanie tej niewielkiej grupy pacjentów z pacjentami przyjmującymi statyny nie wykazało istotnych statystycznie różnic w liczbie komórek NK oraz ich subpopulacji CD56dim i CD56bright. Badanie to nie wykazało też wpływu przyjmowania statyn na aktywność NK mierzoną zarówno testem uwalniania dehydrogenazy mleczanowej, jak i produkcji wewnątrzplazmatycznego IFN- γ .

5.2. Limfocyty CD3+CD8+CD57+ oraz CD8+CD28- u pacjentów z ChNS

Następnym krokiem było wykazanie czy supresji aktywności komórek NK towarzyszą zmiany limfocytów T. W tym celu oceniono subpopulację immunoregulacyjną CD3+CD8+CD57+ i CD8+CD28-. Komórki te odgrywają szczególną rolę w procesach autoimmunizacyjnych oraz immunosupresyjnych i mogą wpływać na aktywność komórek NK (Mollet L. i wsp., 1998).

Porównanie liczby tych komórek pomiędzy pacjentami z ChNS i osobami z grupy kontrolnej wskazało na niższą liczbę komórek CD3+CD8+CD57+ oraz CD8+CD28- u pacjentów z ChNS. Porównanie mężczyzn wykazało podobne różnice, gdy tymczasem wśród kobiet nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic. Wyniki te mogą wskazywać na zaburzenie procesów regulujących rozwój stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z ChNS.

Komórki o fenotypie powierzchniowym CD3+CD8+CD57+ są limfocytami T terminalnie zróżnicowanymi o niespecyficznymi właściwościami immunosupresyjnymi i cytotoksycznymi. Receptor CD57 jest częścią z rodziny N-CAM i po raz pierwszy został opisany jako marker komórek NK (Abo T. i Balch C.M., 1981). Wzrost liczby tych komórek obserwowano w procesach powiązanych z immunosupresją, takich jak infekcja HIV, CMV, a także po transplantacji nerek, serca oraz szpiku kostnego (Fregona I. i wsp., 1985, Leroy E. i wsp., 1986, Maher P. i wsp., 1985, Plaeger-Marshall S. i wsp., 1987, Wang E.C.Y. i wsp., 1995). Komórki te izolowane od osób zdrowych hamowały

prolifrację limfocytów B oraz produkcję przeciwciał indukowaną mitogenem szkarłatki (PWM) (Gratama J.W. i wsp., 1989). Dalsze badania wykazały, że komórki te mogą też wpływać supresyjnie na aktywność cytotoksyczną limfocytów T i komórek NK (Mollet L. i wsp., 1998). Oddziaływanie komórek CD3+CD8+CD57+ polega na wydzielaniu czynnika o masie 30 kilodaltonów i oznaczonego skrótem ICF (inhibitor of cytolytic function) (Sadat-Sowti B. i wsp., 1991). Jego wpływ na komórki cytotoksyczne opiera się na indukcji wzrostu stężenia cyklicznego AMP w komórkach efektorowych, co zakłóca rozwój reakcji cytotoksycznej. ICF nie wpływał na ekspresję antygenów powierzchniowych na komórce efektorowej (Sadat-Sowti B. i wsp., 1994).

Porównanie między sobą pacjentów z chorobą niedokrwinną serca i osób z grupy kontrolnej wykazało, że pacjenci z ChNS charakteryzują się niższą bezwzględną i względną liczbą limfocytów T cytotoksycznych CD3+CD8+ i komórek CD3+CD8+CD57+. Różnice te były bardziej widoczne przy porównaniu mężczyzn, gdy tymczasem w grupie kobiet nie obserwowano takich różnic. Należy jednak podkreślić, że wykazana niższa liczba komórek CD3+CD8+CD57+ może być wynikiem ogólnego obniżania się liczby komórek subpopulacji CD3+CD8+.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki odbiegają od wyników uzyskanych przez Jonasson L. i współpracowników w 2003 roku. U pacjentów z chorobą niedokrwinną serca obserwowali oni wzrost bezwzględnej i względnej liczby komórek CD3+CD8+ oraz limfocytów T immunosupresyjnych CD3+CD8+CD57+ i CD8+CD28-. Autorka sugeruje, że wzrost liczby tych komórek jest spowodowany chorobą autoimmunizacyjną towarzyszącą ChNS. Należy jednak zauważyć, że z grupy pacjentów badanych w cytowanej pracy wyłączono osoby kwalifikowane do zabiegu operacyjnego, a ponadto pacjenci ci byli młodszy niż badani w naszej pracy. Można więc stwierdzić, że chorzy włączeni do naszego badania byli w późniejszym stadium rozwoju ChNS. Stąd prawdopodobne różnice w wynikach. Wpływ supresyjny komórek CD3+CD8+CD57+ na inne komórki ma za zadanie wyciszenie odpowiedzi immunologicznej, co ma ograniczyć uszkodzenia tkanek podczas wzmożonej aktywności układu immunologicznego oraz w zapaleniu (Mollet L. i wsp., 1998). W świetle tym obniżenie liczby tych komórek u pacjentów z zaawansowaną ChNS w naszej pracy świadczyłoby o zakłóceniu procesów immunoregulacyjnych, czego następstwem mogłaby być dalsza stymulacja stanu zapalnego. Można więc przypuszczać, że we wczesnym etapie ChNS następuje wzrost liczby komórek immunosupresyjnych. Jednak

w późniejszej fazie choroby dochodzi do zakłócenia procesów immunoregulacyjnych i liczba tych komórek obniża się, co prowadzi do wzmożonego stanu zapalnego.

Warto też zauważyć, że komórki CD3+CD8+CD57+ są uznawane za limfocyty pochodzenia pozagasiczego. Ich liczba wzrasta u osób starszych, zastępując grasiczo-pochodne limfocyty T. Co więcej, im lepszy stan zdrowia stulatków tym większa względna i bezwzględna liczba tych komórek (Myśliwska J., 1999a). Ich obniżenie u pacjentów z ChNS może świadczyć o załamaniu się mechanizmów kompensujących odpowiedzi immunologicznej.

W naszej pracy obserwowaliśmy też niższą liczbę komórek CD8+CD28- u pacjentów z ChNS. Komórki CD8+CD28- są wiązane z frakcją komórkową CD3+CD8+CD57+. Uważa się, że u noworodków wszystkie limfocyty T cytotoksyczne posiadają receptor kostymulujący CD28, a wraz z wiekiem liczba komórek CD8+CD28- rośnie (Fagnoni F.F. i wsp., 1996). Podwyższoną liczbę tych komórek obserwowano w stanach autoimmunizacji, a także w chorobach o podłożu zapalnym (Najafian N. i wsp., 2003, Schirmer M. i wsp., 2002). W chorobach autoimmunizacyjnych komórki te stanowią subpopulację nadzorującą rozwój choroby i zapobiegającą nadmiernej aktywacji komórek. W badaniu Najafian N. i współpracowników z 2003 roku myszy pozbawione komórek CD8+CD28- szybciej rozwijały chorobę autoimmunizacyjną zależną od limfocytów T pomocniczych – zapalenie mózgu i rdzenia (encephalomyelitis – EAE). Podanie zwierzętom komórek CD8+CD28- spowalniało rozwój choroby, a także obniżało poziom IFN- γ w surowicy krwi. Dalsze badania *in vitro* wykazały, że komórki te hamowały produkcję IFN- γ przez komórki CD3+CD4+ specyficzne wobec mieliny oligodendrocytów. Efekt ten był zależny od kontaktu komórkowego, ale nie między komórkami CD8+CD28- i CD3+CD4+, lecz między komórkami CD8+CD28- i komórkami prezentującymi antygen (APC). Mechanizm ten polegał na obniżeniu ekspresji cząsteczek kostymulujących CD80, CD86 i CD40 na powierzchni komórek APC. W ten sposób komórki CD8+CD28- pośrednio wpływają na limfocyty T zmniejszając ich aktywność oraz zdolność do produkcji cytokin prozapalnych (Najafian N. i wsp., 2003).

Należy też pamiętać, że komórki CD8+CD28- są komórkami terminalnie zróżnicowanymi, ich liczba rośnie wraz z liczbą kontaktów z antygenami. Dlatego też liczba tych komórek jest większa u zdrowych osób starszych. Uważa się, że pula tych komórek skierowanych przeciw różnorodnym antygenom powinna stanowić ochronę starzejącego się organizmu przeciw infekcjom (Myśliwska J. i wsp., 1999a). Można więc przypuszczać, że obniżenie się liczby tych komórek u pacjentów z ChNS stanowi jeden z potencjalnych mechanizmów rozprzestrzeniania się infekcji u tych osób.

Niska liczba komórek CD8+CD28- oraz CD3+CD8+CD57+ w przedstawianej pracy wskazuje na przewagę aktywnego procesu zapalnego u pacjentów na badanym etapie rozwoju ChNS. Wskazuje to na upośledzenie generowania komórek terminalnie zróżnicowanych, tak jak się to dzieje w przewlekłych chorobach o podłożu zapalnym. Przeważa aktywny proces zapalny, którego jedną z przyczyn może być niedobór komórek CD8+CD28- oraz CD3+CD8+CD57+. Zaburzenie w generowaniu tych komórek można uznać za objaw immunosupresji regulacyjnych limfocytów T cytotoksycznych.

5.3. Limfocyty T pomocnicze i ich subpopulacje u pacjentów z ChNS

Dalsza analiza objęła limfocyty T pomocnicze, w tym subpopulację regulatorową CD3+CD4+CD25+. Porównanie liczby tych komórek pomiędzy grupą pacjentów z ChNS i grupą kontrolną nie wykazało istotnych statystycznie różnic.

W przedstawianej pracy nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w liczbie komórek CD3+CD4+ pomiędzy pacjentami z ChNS i osobami z grupy kontrolnej. Wszyscy badani pacjenci cierpieli z powodu dławicy piersiowej stabilnej. Wynik ten potwierdza obserwacje Neri Seneri G.G. i współpracowników z 1997 roku, który wskazuje, że pacjenci z dławicą piersiową stabilną, niestabilną oraz osoby z grupy kontrolnej nie różniły się pod względem liczby komórek CD3+ i CD3+CD4+. Badanie ekspresji cząsteczki MHC II (HLA-DR) na powierzchni limfocytów przez tych autorów T, wykazało jej wyższą ekspresję, ale tylko u pacjentów z dławicą piersiową niestabilną. Wskazuje to na aktywację limfocytów T u tych osób. Autorzy tłumaczą ten wynik zaangażowaniem zaaktywowanych limfocytów T pomocniczych w mediowanie stanu zapalnego (Neri Seneri G.G. i wsp., 1997). Z drugiej jednak strony inne badania wskazują, że pacjenci ze stabilną dławicą piersiową mają wyższą bezwzględną i względną

liczbę limfocytów T pomocniczych w porównaniu do grupy kontrolnej (Jonasson L. i wsp., 2002). W badaniu tym charakteryzowali się oni także podwyższoną liczbą komórek CD4+CD25+ oraz CD4+HLA-DR. Zjawisko to zdaniem autorów jest pochodną procesów autoimmunizacyjnych w ChNS zależnych głównie od form oxLDL oraz infekcji bakteryjnych, na przykład *Chlamydia pneumoniae*. W badaniu tym obserwowano też, że przyjmowanie statyn obniża liczbę komórek CD3+CD4+, CD4+CD25+ oraz CD4+HLA-DR. W naszym badaniu porównanie pacjentów z ChNS pod względem przyjmowania statyn nie ujawniło żadnych istotnych statystycznie różnic w komórkach układu immunologicznego.

Limfocyty T pomocnicze w świetle uzyskanych wyników wydają się nie wpływać na rozwój ChNS i indukcję supresji funkcji układu immunologicznego.

5.4. Miano przeciwciał IgG anty-CMV jest podwyższone u pacjentów z ChNS, ale tylko u kobiet

Następnym krokiem było zbadanie czy pacjenci z ChNS charakteryzują się wyższym mianem przeciwciał IgG skierowanych przeciwko wirusowi CMV niż grupa kontrolna. Wirus ten jest uznawany za czynnik potencjalnie wpływający na rozwój ChNS, a także zaangażowany w proces indukcji stanów immunosupresyjnych. Porównanie miana przeciwciał wskazało, że kobiety z ChNS charakteryzują się wyższym mianem przeciwciał IgG aniżeli mężczyźni z ChNS i kobiety z grupy kontrolnej.

Porównano też poziomy cytokin u kobiet i mężczyzn z ChNS – ich pomiar wykazał, że pacjentki z ChNS charakteryzują się przesunięciem równowagi cytokinowej w kierunku prozapalnym w porównaniu do mężczyzn z ChNS. Kobiety cechowały się wyższym poziomem TNF- α , a niższym IL-10 w surowicy krwi.

Nieobecność przeciwciał IgM anty-CMV u pacjentów z ChNS oraz u osób z grupy kontrolnej wskazuje na brak świeżej infekcji wirusem cytomegalii. Jako wirus *Herpes*, CMV po infekcji przechodzi w stan latentny w komórkach gospodarza, gdzie zintegrowany z DNA jest niedostępny dla układu immunologicznego. Uważa się, że podczas reaktywacji wirusa dochodzi do wzrostu poziomu specyficznych przeciwciał klasy IgG (Flo R.W. i wsp., 1995). Dlatego też podwyższone miana przeciwciał przeciw CMV obserwowane w naszej pracy mogą sugerować reaktywację wirusa.

Z drugiej jednak strony wzrost miana przeciwciał może świadczyć o intensywniejszym kontakcie z antygenem. Taki zwiększony kontakt jest nie tylko symptomem reaktywacji. Cooper M.A. i współpracownicy w 2004 roku zasugerowali, że komórki CD56bright mogą brać udział w procesie zagęszczenia stężenia antygenów czynników infekcyjnych. Komórki te miałyby gromadzić się lokalnie w miejscu stanu zapalnego i powodować lizę komórek dendrytycznych „napęcznionych” antygenami. Mechanizm ten przyczyniałby się do efektywniejszej prezentacji antygenów. Nie można wykluczyć zaangażowania tego procesu u pacjentek z ChNS, tym bardziej, że mimo ogólnego upośledzenia funkcji komórek NK u tych pacjentek, liczba komórek CD56bright była u nich podobna jak u osób z grupy kontrolnej. Co więcej, wirus cytomegalii zakaża preferencyjnie monocyty, posiadające wiele cech komórek dendrytycznych (Cooper M.A. i wsp., 2004).

Doniesienia literaturowe nie wskazują jednoznacznie na powiązanie miana przeciwciał IgG anty-CMV z rozwojem choroby niedokrwiennej serca. Część z nich opisuje bezpośrednie powiązanie IgG anty-CMV i ChNS, jak na przykład badanie Eryol N.K. i współpracowników z 2005 roku. W badaniu tym nie tylko wykryto wysokie miana tych przeciwciał w surowicy krwi osób chorych na ChNS, ale także wykazano, że wysokie miana są predyktorem rozwoju tej choroby. Podobne wyniki uzyskał Sorlie P.D. i współpracownicy w 2000 roku, u którego miana przeciwciał były ściśle powiązane z chorobą niedokrwinną serca. Wskazał on także, że ryzyko rozwoju ChNS przy wysokich mianach przeciwciał jest większe u osób z cukrzycą (Sorlie P.D. i wsp., 2000). Dalsze badania wykazały, że wysokie miano przeciwciał wraz z wysokim poziomem CRP w surowicy krwi chorych na ChNS stanowi czynnik ryzyka zgonu (Muhlestein J.B. i wsp., 2000). Wysokie miana przeciwciał przeciw CMV zostały zaproponowane także jako czynnik ryzyka rozwoju miażdżycy, autorzy sugerują, że wirus cytomegalii jest czynnikiem podtrzymującym stan zapalny w rozwoju tej choroby (Blum A. i wsp., 2003). Z drugiej jednak strony wiele badań wskazuje na brak powiązań pomiędzy mianem przeciwciał przeciw wirusowi cytomegalii a ChNS (Adler S.P. i wsp., 1998, Danesh J. i wsp., 1997, Havlik R.J. i wsp., 1989).

Żadna z powyżej cytowanych prac nie tłumaczy, dlaczego podwyższone miano przeciwciał anty-CMV zanotowano tylko u kobiet z ChNS. Jedynie w pracy z 2000 roku Zhu J. i współpracowników podnoszony jest temat płci. Wskazali oni, że u mężczyzn z ChNS wysoki poziom białka C-reaktywnego jest predyktorem rozwoju choroby niedokrwiennej serca. U mężczyzn tych miano przeciwciał IgG anty-CMV nie było powiązane z ChNS, ale z poziomem CRP. Wysznuło stąd teorię, że wirus

cytomegalii odgrywa rolę u mężczyzn z ChNS tylko w warunkach stanu zapalnego. Badanie kobiet ujawniło, że poziom przeciwciał IgG anty-CMV stanowi niezależny predyktor rozwoju ChNS. Autorzy sugerują, że w rozwoju infekcji CMV u kobiet zaangażowane są inne mechanizmy aniżeli u mężczyzn (Zhu J. i wsp., 2000). Jednym z mechanizmów zaproponowanych w tej pracy jest mechanizm autoimmunoagresji zależnej od przeciwciał, gdy wysokie miana IgG anty-CMV miałyby stanowić przeciwciała autoimmunizacyjne, rozpoznające białka organizmu na podstawie reakcji mimikry molekularnej. Wytlumaczenie to jest możliwe, gdyż wirus cytomegalii jest zdolny do indukcji chorób autoimmunizacyjnych zależnych od mimikry molekularnej (Naucler C.S. i wsp., 1996). Jednak dopóki nie ukażą się prace dowodzące słuszności autorów, możliwość autoimmunizacji pozostanie hipotezą.

Niezależność działania CMV od stanu zapalnego u kobiet z chorobą niedokrwinną serca nie do końca tłumaczy mechanizm oddziaływania tego wirusa, gdyż większość badań przeprowadzonych *in vitro* wskazuje na zależność reaktywacji tego wirusa od poziomu cytokin o profilu prozapalnym. W niniejszym badaniu kobiety z ChNS charakteryzowały się wyższym poziomem TNF- α i niższym IL-10 aniżeli mężczyźni z ChNS. Dodatkowo można zauważyć nieistotną statystycznie tendencję do niższego poziomu IL-4 u pacjentek. Wskazuje to na przesunięcie się równowagi cytokinowej w kierunku cytokin prozapalnych u kobiet z ChNS. Takie warunki sprzyjają reaktywacji wirusa cytomegalii.

Wcześniejsze doniesienia zespołu Zakładu Immunologii AMG wskazują, że surowiczy poziom IL-6, cytokiny o właściwościach prozapalnych, jest wyższy u kobiet w wieku pomenopauzalnym (Rachoń D. i wsp., 2002). W badaniu tym poziom IL-6 w surowicy krwi kobiet młodych był niższy w porównaniu do stwierdzonego u kobiet w wieku pomenopauzalnym. Co więcej, hodowle komórkowe jednojądrzastych komórek krwi obwodowej z różnymi stężeniami 17- β -estradiolu wskazały na znaczące obniżenie się produkcji i wydzielania IL-6 do nadsącza. Wskazuje to na antyzapalne działanie estrogenów.

Wszystkie kobiety oceniane w naszym badaniu były w wieku pomenopauzalnym. Okres menopauzy jest uznawany za czynnik ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Kardioprotekcyjne działanie estrogenów jest najczęściej tłumaczone wpływem tych hormonów na metabolizm lipidów i glukozy. U kobiet po menopauzie wzrasta poziom triglicerydów i glukozy, obniża się też poziom cholesterolu HDL, przy czym rośnie masa ciała oraz ciśnienie tętnicze krwi (Expert Panel on Detection,

Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001). Estrogeny były też uznawane za hormony o działaniu prozapalnym, gdyż przyjmowanie doustnej hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) podnosiło poziom białka C-reaktywnego w surowicy krwi (Yilmazer M. i wsp., 2003). Jednak dokładniejsze badania wykazały, że choć poziom CRP był podwyższony podczas stosowania HTZ, to jednak inne markery stanu zapalnego, takie jak rozpuszczalny receptor IL-1, cząsteczki VCAM-1, selektyna E oraz poziom IL-6 uległy obniżeniu. Uznaje się więc, że podwyższony poziom CRP w tym przypadku nie świadczy o zapalnej aktywacji białek ostrej fazy, ale o bezpośredniej aktywacji metabolicznej wątroby przez przyjmowane hormony (Silvestri A. i wsp., 2003). To Badanie oraz cytowana wcześniej praca Rachonia D. i współpracowników wskazuje na antyzapalne działanie estrogenów (Rachoń D. i wsp., 2002).

ChNS jest chorobą o podłożu zapalnym, wzrost ilości cytokin prozapalnych jest uznawany za czynnik ryzyka rozwoju tej choroby (Ridker P.M. i wsp., 2000). Antyzapalne działanie estrogenów może być jednym z możliwych wytłumaczeń wzrostu zachorowalności na ChNS u kobiet po menopauzie. Może to też tłumaczyć wyższe stężenie cytokin prozapalnych u kobiet z ChNS obserwowane w naszej pracy. Co więcej, wzrost ten może być też zaangażowany w indukcję wyższego poziomu przeciwciał IgG anty-CMV u badanych kobiet. Podwyższony poziom TNF- α i IFN- γ wydaje się być krytyczny dla reaktywacji wirusa cytomegalii (Soderberg-Naucler C. i wsp., 1998), a profil prozapalny obserwowany u kobiet z ChNS stwarza sprzyjające warunki dla reaktywacji CMV.

Innym wytłumaczeniem jest wzrost miana przeciwciał anty-CMV wraz z wiekiem. Istnieją dowody na to, że ogólne miano przeciwciał wzrasta u osób starszych (Paganelli R. i wsp., 1992). Kobiety w prezentowanym badaniu były również w starszym wieku i nie można u nich wykluczyć tego typu powiązania. Tym bardziej, że wynik regresji wielorakiej wskazał na powiązanie wieku oraz miana przeciwciał IgG anty-CMV.

Ocena parametrów przy pomocy regresji wielorakiej ujawniła też powiązanie pomiędzy mianem przeciwciał IgG a poziomem cholesterolu LDL. Wysoki poziom cholesterolu całkowitego, a także jego frakcji LDL stanowią czynniki ryzyka miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca (Henkin Y. i wsp., 1992). Wcześniejsze badania nie wykazały wpływu wirusa na frakcję LDL, jednak wiadomo, że wirusy typu *Herpes* wpływają na metabolizm cholesterolu. Udowodniły to badania na zakażonych

komórkami mięśniówki gładkiej, w których dochodzi do szybkiej i intensywnej akumulacji cholesterolu (Hajjar D.P., 1986). W procesie miażdżycowym dużą rolę odgrywają modyfikowane LDL – oxLDL. Akumulacja LDL w komórkach zachodzi na drodze działania receptora zmiatacza. Komórki zakażone CMV posiadają większą ekspresję receptora zmiatacza typu A na powierzchni, a także charakteryzują się większą akumulacją lipidów we wnętrzu komórki (Zhou Y.F. i wsp., 1996). Dalsze badanie ujawniły, że za zwiększoną ekspresję receptora dla oxLDL są odpowiedzialne geny wczesne wirusa, których ekspresja zachodzi nawet bez pełnej jego reaktywacji. Autorzy sugerują, że pojawianie się oxLDL jest sygnałem do reaktywacji wirusa, który w odpowiedzi zwiększa gęstość receptora zmiatacza typu A. Hipoteza ta ściśle łączy reaktywację wirusa i rozwój miażdżycy. Przyjmując tę hipotezę, można stwierdzić, że obserwowane w naszym badaniu powiązanie LDL i IgG anty-CMV może świadczyć o gotowości reaktywacyjnej wirusa.

Podwyższone miana przeciwciał IgG anty-CMV charakteryzowały tylko kobiety z ChNS, fakt ten może świadczyć o gotowości reaktywacyjnej wirusa u kobiet w związku z prozapalnym profilem cytokinowym u kobiet w okresie pomenopauzalnym.

Ponadto przeciwciała IgG były powiązane z wiekiem i płcią oraz z poziomem LDL, co sugeruje wpływ samej obecności CMV na rozwój ChNS poprzez modyfikację metabolizmu cholesterolu.

5.6. Wpływ wirusa cytomegalii na układ immunologiczny pacjentów z ChNS

Korelacja pomiędzy mianem przeciwciał IgG anty-CMV a parametrami układu immunologicznego wskazała na ujemne powiązanie pomiędzy mianem przeciwciał a odsetkiem limfocytów T cytotoksycznych. Także podział pacjentów pod względem wysokich i niskich mian przeciwciał przeciw CMV wskazał na niższą liczbę komórek CD3+CD8+ oraz CD3+CD8+CD57+ u pacjentów z wysokimi mianami przeciwciał anty-CMV.

Jest to wynik zaskakujący, gdyż większość wcześniejszych prac wskazuje na powiązanie pozytywne między CD3+CD8+CD57+ i mianem przeciwciał IgG anty-CMV (Wang E.C.Y. i wsp., 1993). Wzrost liczby komórek CD3+CD8+CD57+ jest uznawany za jeden z mechanizmów immunosupresyjnych wirusa (Wang E.C.Y. i wsp., 1993), w takim świetle brak wzrostu liczby tych komórek mógłby sugerować brak

wpływu CMV na układ immunologiczny. Z drugiej strony komórki CD3+CD8+CD57+ uznawane są też za komórki protekcyjne, ograniczające aktywność układu odpornościowego w przewlekłych stanach zapalnych, infekcjach wirusowych i procesach autoimmunizacyjnych. W takim przypadku brak tych komórek może sugerować nasilenie patologicznych procesów w układzie immunologicznym i torować drogę szybszemu rozwojowi infekcji. Taką hipotezę potwierdza badanie Jonasson L. i współpracowników z 2003 roku, w którym u pacjentów z ChNS obserwowano wzrost komórek CD3+CD8+ oraz CD3+CD8+CD57+ powiązany z seropozytywnością pod względem IgG anty-CMV. W badaniu tym pacjenci analizowani byli we wczesnej fazie ChNS, w której wzrost liczby tych komórek mógł powstrzymać stan zapalny oraz ograniczać aktywność układu immunologicznego, pozwalając na rozwój infekcji (Jonasson L. i wsp., 2003). W naszym badaniu wszyscy pacjenci byli kwalifikowani do zabiegu pomostowania naczyń wieńcowych ze względu na niedrożność głównych tętnic wieńcowych, co może świadczyć o wysokim stopniu zaawansowania zmian patologicznych w naczyniach. Być może obniżenie odsetka komórek CD3+CD8+CD57+ jest konsekwencją nasilenia dolegliwości klinicznych i stanowi obraz zaburzenia funkcji układu immunologicznego. Spadek liczby tych komórek sprzyja rozwojowi stanu zapalnego i intensyfikacji zmian patologicznych.

5.7. Znaczenie obecności wirusa CMV dla zmian w układzie immunologicznym w okresie przed i po zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych

Operacja pomostowania tętnic wieńcowych z krążeniem pozaustrojowym charakteryzuje się wysokim wyrzutem cytokin prozapalnych oraz indukcją stanu zapalnego. Warunki te odpowiadają tym, jakie są wymagane do reaktywacji CMV *in vitro* (Soderberg-Naucler C. i wsp., 1998). Dlatego, uwzględniając ten fakt, w okresie okołoperacyjnym zbadano zmiany liczby komórek układu immunologicznego u pacjentów podzielonych pod względem miana przeciwciał IgG anty-CMV na pacjentów z wysokim i niskim mianem.

Pacjenci z wysokim mianem przeciwciał charakteryzowali się obniżeniem liczby komórek NK i komórek CD3-CD56dim w trzeciej godzinie od zakończenia krążenia pozaustrojowego oraz wzrostem liczby monocytów CD14+CD16+HLA-DR+, uznawanych za rezerwuar CMV w formie latentnej. Wyniki te wskazują, że pacjenci

z mocno wyrażoną infekcją CMV w okresie dużego obciążenia układu charakteryzującą się supresją odpowiedzi immunologicznej objawiającą się niską odpowiedzią komórek NK ze współtowarzyszącą ekspansją monocytów .

Reaktywacja wirusa cytomegalii *in vitro* jest szeroko opisana (Soderberg-Naucler C. i wsp., 1998), ale mechanizm tego procesu *in vivo* ciągle nie jest do końca poznany. Przyjmuje się, że do reaktywacji CMV w organizmie dochodzi w trzech głównych sytuacjach: w okresie immunosupresji, podczas różnicowania monocytów w makrofagi, po transplantacji z użyciem organów allogenicznych (Hummel M. i Abecassis M.M., 2002).

To co łączy te wszystkie procesy, to indukcja stanu zapalnego bądź wysoki poziom cytokin prozapalnych. Stanom immunosupresyjnym często towarzyszy stan zapalny, jak choćby podczas zażywania leków immunosupresyjnych (Book B. i wsp., 1998). Monocyty nie mogą być bezpośrednio zakażone przez CMV, nie może w nich też dojść do reaktywacji wirusa, oba te procesy są zależne od różnicowania monocytów w makrofagi. Różnicowanie to zachodzi w odpowiednim środowisku cytokinowym, kluczową rolę odgrywają tu cytokiny prozapalne, głównie TNF- α i IFN- γ (Soderberg-Naucler C. i wsp., 1997a). Należy jednak zwrócić uwagę, że różnicowanie to jest odmienne od naturalnego dojrzewania monocytów, gdyż zachodzi pod wpływem rozwoju stanu zapalnego. Wydaje się też prawdopodobne, że reaktywacja wirusa cytomegalii obserwowana po operacji transplantacji, szczególnie w przypadku przeszczepów allogenicznych, jest zależna od rozwoju reakcji zapalnej. Dowiodły tego badania, w których wspólna hodowla komórek PBMC pochodzących od dwóch osób stanowiła wystarczający sygnał do pełnej reaktywacji wirusa (Soderberg-Naucler C. i wsp., 1997b). Jednocześnie reaktywacja ta była zależna od wydzielania cytokin prozapalnych.

Operacja pomostowania tętnic wieńcowych (CABG) przy użyciu krążenia pozaustrojowego stanowi zabieg powodujący wyrzut cytokin prozapalnych oraz powstanie stanu zapalnego. Stan zapalny jest zależny od samej interwencji chirurgicznej i reperfuzji mięśnia sercowego, a także – w przypadku operacji w krążeniu pozaustrojowym – od kontaktu komórek krwi z materiałem sztucznym aparatury (Menasche P., 1995, Sawa Y. i wsp., 1998). Zjawiska te w pełni odpowiadają środowisku

niezbędnemu do reaktywacji wirusa cytomegalii. Dlatego też w niniejszym badaniu CABG zostało obrane jako model wpływu CMV na układ immunologiczny w warunkach sprzyjających dla indukcji aktywności wirusa. Pacjentów podzielono na dwie grupy na podstawie mediany miana przeciwciał: na osoby z wysokim oraz osoby z niskim mianem przeciwciał IgG anty-CMV. Jeśli obecność wirusa miałyby jakikolwiek wpływ na aktywność układu immunologicznego, to w takich warunkach powinna się ona ujawnić.

Pierwszym krokiem było zbadanie czy w czasie zabiegu powstaje odpowiednie środowisko cytokinowe: w tym celu badano poziomy surowicze cytokin: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ . Przebieg zmian stężenia tych cytokin w okresie okołoperacyjnym nie różnił się pomiędzy osobami z wysokim i niskim mianem przeciwciał IgG anty-CMV. Stężenie IL-6 i IL-10 wzrosło w trzeciej godzinie od operacji CABG, obserwowano też nieistotny statystycznie wzrost stężenia TNF- α w trzeciej godzinie od operacji. Stężenia pozostałych badanych cytokin były na podobnym poziomie we wszystkich badanych punktach.

Wysokie stężenie IL-6 jest powszechnie uznawane za marker stanu zapalnego. Podwyższony poziom tej cytokiny obserwowano już wcześniej po operacji pomostowania tętnic wieńcowych (Prondzinsky R. i wsp., 2005). Co więcej, wcześniejsze badania dowiodły, że mięsień sercowy jest głównym źródłem tej cytokiny (Wan S. i wsp., 1996).

IL-10 jest cytokiną antyzapalną hamującą odpowiedź komórkową (Pasnik J., 2006). Poprzednie badania koncentrujące się nad śledzeniem zmian w stężeniu cytokin w okresie okołoperacyjnym wskazały, że wzrost IL-10 hamuje wzrost zarówno IL-6, TNF- α , jak i IL-8 (Giomarelli P. i wsp., 2003). W obecnym badaniu obserwowano zarówno wzrost IL-6, jak i IL-10, co nie zaprzecza poprzednim doniesieniom, ale wskazuje na potencjalną rolę IL-10 w hamowaniu stanu zapalnego powstałego na skutek zabiegu CABG.

Badanie cytokin wskazało na obecność stanu zapalnego po CABG, jednocześnie ujawniło brak wpływu miana przeciwciał IgG anty-CMV na poziom tych cytokin.

Następnym krokiem było zbadanie komórek układu immunologicznego po zabiegu. Należy nadmienić, że zabieg nie miał wpływu na limfocyty T

oraz ich subpopulacje, a badanie komórek NK w okresie okołoperacyjnym wykazało brak wpływu zabiegu na odsetek komórek CD3-CD56⁺ oraz komórek CD3-CD56dim. Tymczasem odsetek komórek CD3-CD56bright zmniejszył się po operacji CABG. Badanie Tonnesen E. i współpracowników z 1987 roku wskazało, że po operacji pomostowania tętnic wieńcowych aktywność komórek NK oraz ich zdolność do proliferacji była obniżona (Tonnesen E. i wsp., 1987). Doniesienie to jest zgodne z naszymi wynikami. Subpopulacja komórek NK CD56bright charakteryzuje się wyższymi zdolnościami proliferacyjnymi aniżeli komórki CD56dim (Cooper M.A. i wsp., 2001a). Obniżenie się odsetka komórek CD56bright może więc odpowiadać za zmniejszoną proliferację komórek NK.

Dalsze badanie zmian liczby komórek NK po CABG przeprowadzone u pacjentów podzielonych pod względem miana przeciwciał IgG anty-CMV wskazało na obniżenie liczby tych komórek u pacjentów z wysokim mianem przeciwciał w trzeciej godzinie od zakończenia krążenia pozaustrojowego. Obniżenie to było spowodowane zmianami w liczbie komórek CD3-CD56dim. Pomiędzy pacjentami z wysokimi i niskimi mianami nie wykazano istotnych różnic dotyczących komórek CD3-CD56bright. Wskazuje to na związek między CMV a układem komórek NK. Wcześniejsze badania wykazały, że komórki NK gromadzą się w miejscu infekcji CMV (Dokun A.O. i wsp., 2001), co mogłoby tłumaczyć obniżenie się liczby tych komórek we krwi, a także wskazywać na reaktywację wirusa po operacji pomostowania tętnic wieńcowych. Szereg prac również wskazuje, że komórki NK stanowią główną frakcję komórkową aktywną w pierwszej fazie infekcji oraz reinfekcji CMV, dlatego też wirus cytomegalii posiada szereg mechanizmów zapobiegających interwencji tych komórek. Do podstawowych mechanizmów obronnych należy imitowanie białek MHC przez białka UL18 i UL142 kodowane przez geny wirusa. Pojawienie się tych białek na powierzchni hamuje aktywność lityczną komórek NK w stosunku do zakażonych wirusem komórek (Chapman T.L. i wsp., 1999, Wills M.R. i wsp., 2005). Nie można wykluczyć, że obecność tych białek i ich kontakt z receptorami komórek NK może przyczyniać się do spadku aktywności litycznej NK.

Liczba monocytów CD14⁺CD16⁺ uznawanych za monocyty o profilu prozapalnym i główne źródło takich cytokin, jak IL-6 i TNF- α , była wyższa u pacjentów z ChNS aniżeli u osób z grupy kontrolnej. Podobny wynik uzyskano w innych badaniach nad tymi komórkami w ChNS, w których jednocześnie wykazano, że monocyty

prozapalne powiązane są z przyspieszonym rozwojem choroby niedokrwiennej serca (Schlitt A. i wsp., 2004). Warto też zauważyć, że nasze wcześniejsze badania wskazały, że monocyty są odpowiedzialne za obniżenie aktywności komórek NK (Myśliwska J. i wsp., 1992). Nie można więc wykluczyć potencjalnego wpływu tych komórek na komórki NK u pacjentów z ChNS.

Monocyty, jako komórki zaangażowane w indukcję procesu zapalnego, zostały także zbadane w okresie okołoperacyjnym. Liczba monocytów o fenotypie CD14+CD16+ oraz CD14+CD16+HLA-DR+ obniżyła się w trzeciej godzinie od zakończenia krążenia pozaustrojowego. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia, w których frakcja monocytarna zachowywała się podobnie po zabiegu CABG (Wehlin L. i wsp, 2005). Także po hemodializie obserwowano obniżenie liczby komórek CD14+CD16+. Być może zaburzenie liczby tych komórek jest zależne od wpływu samego zabiegu operacyjnego lub od kontaktu elementów krwi z materiałem sztuczną aparatury stosowanej w czasie operacji.

Porównanie pacjentów z wysokimi i niskimi mianami przeciwciał anti-CMV pod względem przebiegu zmian w liczbie monocytów CD14+CD16+ oraz CD14+CD16+HLA-DR+ po zabiegu CABG wykazało brak istotnych różnic w liczbie komórek CD14+CD16+. Jednakże liczba CD14+CD16+HLA-DR+ wzrosła w 24 godzinie od zakończenia krążenia pozaustrojowego u pacjentów z wysokimi mianami przeciwciał IgG anti-CMV. Komórki te dzielą zarówno właściwości makrofagów, jak i komórek dendrytycznych (Wehlin L. i wsp, 2005), a dodatkowa silna ekspresja cząsteczki HLA-DR, czyli białka MHC klasy II, świadczy o ich aktywacji. Taki profil komórkowy był wskazywany jako profil preferencyjnie wybierany przez CMV do infekcji lub w jego ułatwionej reaktywacji (Soderberg-Naucler C. i wsp., 1998). Wynik ten może sugerować reaktywację oraz rozprzestrzenianie infekcji CMV.

Analiza zmian w układzie immunologicznym u pacjentów z wysokimi mianami przeciwciał IgG anti-CMV w okresie pooperacyjnym wskazuje na upośledzenie odpowiedzi komórek NK oraz na ekspansję monocytów o profilu prozapalnym. Procesy te mogą wpływać na ogólny stan pacjenta. Dalsze obniżenie liczby komórek NK, a co za tym idzie ich aktywności, może stanowić drogę do rozwoju potencjalnych infekcji wtórnych. Wzrost liczby monocytów, będących rezerwuarem i jednocześnie celem dla CMV, może wskazywać na rozprzestrzenianie się infekcji. W rezultacie procesy te mogą prowadzić do powstania rozległych stanów zapalnych oraz zakażenia dalszych

komórek organizmu.

Tak więc infekcja CMV, poprzez hamujący wpływ na komórki odpowiedzi immunologicznej, toruje sobie drogę ku dalszej ekspansji.

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. Pacjentów z ChNS charakteryzuje dysfunkcja komórek NK (CD3-CD56+, CD3-CD56dim) a także zmiany w subpopulacjach limfocytów T o fenotypie powierzchniowym CD3+CD8+CD57+ i CD3+CD8+CD28-.
2. Pacjentki z chorobą niedokrwinną serca charakteryzują się wyższym poziomem surowiczym TNF- α oraz niższym IL-10 w porównaniu do mężczyzn z ChNS. U kobiet z ChNS wykazano też wysokie miana przeciwciał IgG anty-CMV w porównaniu zarówno do mężczyzn z ChNS, jak i kobiet grupy kontrolnej
- 3a. Przewlekłe zakażenie CMV u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca wiąże się z obniżeniem liczby limfocytów T cytotoksycznych (CD3+CD8+) oraz komórek o fenotypie powierzchniowym CD3+CD8+CD57+.
- 3b. Zabieg operacyjny u pacjentów z silnie wyrażonym przewlekłym zakażeniem CMV wnosi dodatkowe ryzyko supresji układu NK (CD3-CD56+, CD3-CD56dim) oraz ekspansji monocytów o profilu prozapalnym (CD14+CD16+HLA-DR).

7. WNIOSKI

1. Pacjentów z ChNS cechuje stan immunosupresji zależny od dysfunkcji komórek NK oraz zaburzenia równowagi limfocytów immunoregulacyjnych (CD3+CD8+CD57+, CD3+CD8+CD28-). Stan ten może sprzyjać pogłębieniu zapalenia i przez to wzmacnia objawy kliniczne choroby niedokrwiennej serca.
2. Obserwowane przez nas różnice, występujące między kobietami i mężczyznami, wskazują na przesunięcie równowagi cytokinowej w kierunku stanu zapalnego i większej odpowiedzi na CMV u kobiet. Z drugiej strony, kobiety charakteryzują się bardziej korzystnym profilem subpopulacji komórek NK; być może profil ten jest przyczyną późniejszego rozwinięcia pełnoobjawowego ChNS u tej płci.
- 3a. Przewlekłe zakażenie wirusem cytomegalii u pacjentów z ChNS powiązane z efektem immunosupresyjnym w limfocytach T cytotoksycznych (CD3+CD8+) i regulatorowych (CD3+CD8+CD57+), wnosi ryzyko dalszego pogłębienia stanu zapalnego charakterystycznego dla ChNS.
- 3b. Silne obciążenie stresem operacyjnym, pociągające za sobą stan zapalny, wiążący się z supresją komórek NK i ekspansją monocytów, daje szansę na reaktywację CMV, która na zasadzie pozytywnego sprzężenia zwrotnego może nasilać zapalenie i prowadzić do wzmocnienia objawów klinicznych.

8. STRESZCZENIE PRACY

Choroba niedokrwienna serca (ChNS) jest chorobą o podłożu zapalnym i jej progresja jest zależna od czynników zapalnych. Do czynników ryzyka rozwoju ChNS, oprócz tradycyjnych, takich jak nadciśnienie tętnicze, wysoki poziom cholesterolu, cukrzyca czy palenie papierosów, w ostatnich latach zaliczono również infekcje. Wszystkie te czynniki są powiązane z indukcją i utrwaleniem zapalenia. Jednym z czynników infekcyjnych zaangażowanych w rozwój ChNS jest powszechnie występujący wirus cytomegalli (CMV) zdolny do długotrwałej latencji w komórkach gospodarza. Jego znaczenie dla rozwoju ChNS dowiedziono podczas badań na zwierzętach, u których zakażenie CMV przyspieszało rozwój choroby naczyń serca. Badanie naczyń wieńcowych osób z ChNS wskazało na obecność DNA tego wirusa w ścianie naczyń. Co więcej, niektórzy badacze wskazują na bezpośrednie powiązanie wysokich mian przeciwciał IgG skierowanych przeciw CMV z rozwojem ChNS.

Do pierwotnego zakażenia i reaktywacji CMV wymaga stanu zapalnego oraz supresji aktywności układu immunologicznego. Dlatego też celem prezentowanej pracy było określenie czy pacjentów z chorobą niedokrwienną serca charakteryzują zaburzenia stanu układu immunologicznego, a jeśli tak, to jaki przyjmują one profil. Dalszym etapem badań było wskazanie czy istnieje zależność pomiędzy przewlekłą infekcją CMV a stanem układu immunologicznego u chorych z ChNS.

Ażeby odpowiedzieć na te pytania, badania przeprowadzono na komórkach NK i limfocytach T o funkcjach immunoregulacyjnych oraz immunosupresyjnych. Do badań włączono 139 pacjentów z ChNS z Kliniki Kardiologii Akademii Medycznej w Gdańsku oraz grupę kontrolną złożoną z 74 osób w podobnym wieku bez objawów choroby niedokrwiennej serca. Z grupy kontrolnej wykluczono osoby z czynnikami ryzyka ChNS takimi jak cukrzyca i nadciśnienie tętnicze. Analizę przeprowadzono na grupach całkowitych, a także na grupach podzielonych pod względem płci. Płeć męska jest jednym z czynników ryzyka ChNS, a jak wynika z badań, kobiety zapadają na tę chorobę o 10 lat później. Także układ immunologiczny wykazuje różnice związane z płcią, stąd podział badanych osób pod względem płci miał wykluczyć tego typu zróżnicowanie. Dlatego dodatkowym celem pracy było sprawdzenie czy kobiety

i mężczyźni z chorobą niedokrwienną serca różnią się pod względem parametrów immunologicznych.

Analiza komórek NK nie ujawniła żadnych istotnych różnic pomiędzy kobietami i mężczyznami z ChNS. Jednak porównanie całkowitej grupy pacjentów z ChNS z grupą kontrolną wykazało niższą bezwzględną i względną liczbę komórek NK oraz ich cytotoksycznej subpopulacji CD3-CD56dim u pacjentów z ChNS. Badanie nie wykazało natomiast istotnych różnic w komórkach regulatorowych CD3-CD56bright w badanych grupach. Porównanie kobiet z obu grup wykazało podobne różnice jak przy porównaniu grup całkowitych. Mężczyźni z ChNS dodatkowo różnili się niższą względną liczbą komórek CD3-CD56bright.

Dalsza analiza aktywności komórek NK przeprowadzona dwoma testami – uwalniania dehydrogenazy mleczanowej oraz produkcji wewnątrzplazmatycznego IFN- γ , wskazała na niższą aktywność komórek NK u pacjentów z ChNS, zarówno gdy grupy były porównywane pod względem płci, jak i gdy porównanie wykonano na całkowitych grupach.

Komórki NK stanowią główną linię obrony antywirusowej i antybakteryjnej u osób starszych. Ponadto aktywność tych komórek jest uznawana za miarę statusu układu immunologicznego. Dlatego uzyskane wyniki wskazują na supresję aktywności układu immunologicznego u pacjentów z ChNS.

Do badania włączono także subpopulację immunoregulatorowych limfocytów T: CD3+CD8+CD57+ i CD8+CD28-. Komórki te odgrywają szczególną rolę w procesach autoimmunizacyjnych, immunosupresyjnych, a także regulują rozwój stanu zapalnego.

Kobiety i mężczyźni z ChNS nie różnili się między sobą istotnie statystycznie pod względem liczebności komórek CD3+CD8+CD57+. Porównanie liczby tych komórek pomiędzy pacjentami z ChNS i osobami z grupy kontrolnej wskazało na niższą liczbę komórek CD3+CD8+CD57+ oraz CD8+CD28- u pacjentów z ChNS. Porównanie mężczyzn wykazało podobne różnice, gdy tymczasem wśród kobiet nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic. Wyniki te mogą wskazywać na zaburzenie regulacji rozwoju stanu zapalnego ze strony limfocytów T immunoregulacyjnych u pacjentów z ChNS. Może wskazywać na szybszy i intensywniejszy rozwój zapalenia u tych pacjentów.

Dalsza analiza objęła limfocyty T pomocnicze, w tym subpopulację regulatorową CD3+CD4+CD25+. Porównanie liczby tych komórek pomiędzy grupą pacjentów z ChNS i grupą kontrolną nie wykazało istotnych statystycznie różnic.

Następnym etapem było badanie poziomu cytokin u pacjentów z ChNS, ich pomiar wykazał, że pacjentki z ChNS charakteryzują się przesunięciem równowagi cytokinowej w kierunku prozapalnym w porównaniu do mężczyzn z ChNS. Kobiety cechowały się wyższym poziomem TNF- α , a niższym IL-10 w surowicy krwi.

Porównanie pacjentów z ChNS i osób z grupy kontrolnej pod względem poziomu IL-2 w surowicy krwi wykazało, że osoby chore charakteryzują się niższym stężeniem tej cytokiny. Analiza mężczyzn z obu grup potwierdziła ten wynik, gdy tymczasem wśród kobiet nie wykazano istotnych statystycznie różnic. Obniżenie stężenia IL-2 w surowicy krwi, głównej cytokiny stymulującej odpowiedź komórkową, czyli także komórki NK, może być jedną z przyczyn obniżenia ich aktywności u pacjentów z ChNS.

Do badań dodatkowo wprowadzono monocyty CD14+CD16+ o profilu prozapalnym, charakteryzujące się wysoką produkcją IL-6 oraz TNF- α i podtrzymujące stan zapalny. Liczba tych komórek była wyższa u pacjentów z ChNS w porównaniu do osób z grupy kontrolnej.

Następnym krokiem było zbadanie czy pacjenci z ChNS charakteryzują się wyższym mianem przeciwciał IgG skierowanych przeciwko wirusowi CMV. Wirus ten jest uznawany za potencjalny czynnik wpływający na rozwój ChNS, a także zaangażowany w proces indukcji stanów immunosupresyjnych. Porównanie miana przeciwciał wskazało, że kobiety z ChNS charakteryzują się wyższym mianem przeciwciał IgG aniżeli mężczyźni z ChNS czy kobiety z grupy kontrolnej.

Dalsze analizy skoncentrowały się na zależności między infekcją CMV a układem immunologicznym pacjentów z ChNS. Badania wskazały na ujemną korelację pomiędzy mianem przeciwciał IgG anty-CMV a liczbą limfocytów T CD3+CD8+. Podział pacjentów pod względem mediany miana przeciwciał IgG na grupy o wysokim i niskim mianie przeciwciał wskazał na niższą liczbę komórek CD3+CD8+ oraz CD3+CD8+CD57+ u pacjentów z wysokimi mianami tych przeciwciał. Wyniki te sugerują wpływ supresyjny CMV na limfocyty T cytotoksyczne oraz subpopulację immunoregulacyjną CD3+CD8+CD57+.

Operacja pomostowania tętnic wieńcowych (CABG) w krążeniu pozaustrojowym charakteryzuje się wysokim wyrzutem cytokin prozapalnych oraz indukcją stanu zapalnego. Warunki te odpowiadają tym, jakie są wymagane do reaktywacji CMV *in vitro*. Dlatego w okresie okołoperacyjnym zbadano zmiany liczby komórek układu

immunologicznego u pacjentów podzielonych pod względem miana przeciwciał IgG anty-CMV na pacjentów z wysokim i niskim mianem.

Pacjenci z wysokim mianem przeciwciał charakteryzowali się obniżeniem liczby komórek NK i komórek CD3-CD56dim w trzeciej godzinie od zakończenia krążenia pozaustrojowego oraz wzrostem liczby monocytów CD14+CD16+HLA-DR+, uznawanych za rezerwuar CMV w formie latentnej. Wyniki te wskazują, że pacjenci z mocno wyrażoną infekcją CMV charakteryzują się supresją odpowiedzi immunologicznej zależnej od komórek NK, a także ekspansją prozapalnych monocytów w okresie obciążenia układu.

Dane uzyskane w tej pracy wskazują, że pacjenci z ChNS charakteryzują się stanem immunosupresji zależnym od statusu komórek NK, a także zaburzeniem równowagi limfocytów T (CD3+CD8+CD57+, CD3+CD8+CD28-). Taki stan układu immunologicznego może sprzyjać pogłębieniu zapalenia, a przez to może wzmacniać objawy kliniczne choroby niedokrwiennej serca.

Kobiety z ChNS charakteryzowały się z przesunięciem równowagi cytokinowej w kierunku prozapalnym i większej odpowiedzi na CMV. Mimo to badane kobiety później rozwijały pełnoobjawową ChNS i w późniejszym wieku zostały poddane zabiegowi pomostowania tętnic wieńcowych. Być może ma to związek z bardziej korzystną równowagą subpopulacji komórek NK.

Silnie wyrażone, przewlekłe zakażenie CMV u pacjentów z ChNS jest powiązane z pogłębieniem stanu zapalnego charakterystycznego dla choroby niedokrwiennej serca. Reaktywacja oraz zakażenie CMV wymaga środowiska zapalnego, a dalszy rozwój tego wirusa wzmacnia procesy zapalne. Obecność więc tego wirusa na zasadzie pozytywnego sprzężenia zwrotnego może nasilać zapalenie i prowadzić do wzmocnienia objawów klinicznych.

9. Literatura

- Abo T, Balch CM. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol.* 1981 Sep;127(3):1024-9.
- Adler SP, Hur JK, Wang JB, Vetrovec GW. Prior infection with cytomegalovirus is not a major risk factor for angiographically demonstrated coronary artery atherosclerosis. *J Infect Dis.* 1998 Jan;177(1):209-12.
- Afonso LC, Scharton TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science.* 1994 Jan 14;263(5144):235-7.
- Ahn K, Gruhler A, Galocha B, Jones TR, Wiertz EJ, Ploegh HL, Peterson PA, Yang Y, Fruh K. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity.* 1997; 6(5): 613-621.
- Alcouffe J, Caspar-Bauguil S, Garcia V, Salvayre R, Thomsen M, Benoist H. Oxidized low density lipoproteins induce apoptosis in PHA-activated peripheral blood mononuclear cells and in the Jurkat T-cell line. *J Lipid Res.* 1999 Jul;40(7):1200-10.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2005 Jan;28 Suppl 1:S37-42.
- Autran B, Leblond V, Sadat-Sowti B, Lefranc E, Got P, Sutton L, Binet JL, Debre P. A soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. *Blood.* 1991; 77(10): 2237-2241.
- Baume DM, Robertson MJ, Levine H, Manley TJ, Schow PW, Ritz J. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol.* 1992 Jan;22(1):1-6.
- Beeson PB. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med.* 1994 May;96(5):457-62.
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3536-42.
- Ben-Hur H, Mor G, Insler V, Blickstein I, Amir-Zaltsman Y, Sharp A, Globerson A, Kohen F. Menopause is associated with a significant increase in blood monocyte number and a relative decrease in the expression of estrogen receptors in human peripheral monocytes. *Am J Reprod Immunol.* 1995 Dec;34(6):363-9.
- Bernasconi S, Cinque P, Peri G, Sozzani S, Crociati A, Torri W, Vicenzi E, Vago L, Lazzarin A, Poli G, Mantovani A. Selective elevation of monocyte chemotactic

- protein-1 in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with cytomegalovirus encephalitis. *Journal of Infectious Diseases*. 1996; 174(5): 1098-1101.
- Blum A, Giladi M, Weinberg M, Kaplan G, Pasternack H, Laniado S, Miller H. High anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer is associated with coronary artery disease and may predict post-coronary balloon angioplasty restenosis. *Am J Cardiol*. 1998; 81(7): 866-888.
- Blum A, Peleg A, Weinberg M. Anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer in patients with risk factors to atherosclerosis. *Clin Exp Med*. 2003 Nov;3(3):157-60.
- Bodaghi B, Jones TR, Zipeto D, Vita C, Sun L, Laurent L, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Michelson S. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med*. 1998 Sep 7;188(5):855-66.
- Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 1998; 101(2): 353-363.
- Book B, Pescovitz M, Leapman S, Filo R. Polyclonal antilymphocyte sera induce immune activation in human renal allograft recipients. *Transplant Proc*. 1998 Jun;30(4):1348-50.
- Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*. 2005 Jul-Aug;11(4):411-23.
- Bowen EF, Griffiths PD, Davey CC, Emery VC, Johnson MA. Lessons from the natural history of cytomegalovirus. *AIDS*. 1996 Nov;10 Suppl 1:S37-41.
- Breslow JL. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8314-8.
- Bruunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhoj P, Pedersen BK. Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans. *Exp Gerontol*. 2001 Dec;37(1):127-36.
- Burnett MS, Gaydos CA, Madico GE, Glad SM, Paigen B, Quinn TC, Epstein SE. Atherosclerosis in apoE knockout mice infected with multiple pathogens. *J Infect Dis*. 2001 Jan 15;183(2):226-231.
- Butterworth M, McClellan B, Allansmith M. Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature*. 1967 Jun 17;214(94):1224-5.
- Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*. 1990 May 1;171(5):1509-26.

- Caligiuri MA, Zmuidzinis A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*. 1990; 171(5): 1509-1526.
- Carboni C, Mousavi-Jazi M, Wakiguchi H, Carbone E, Karre K, Soderstrom K. Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 2001; 31(10): 2926-2935.
- Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, Pahor M. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation*. 2003 Nov 11;108(19):2317-22.
- Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity*. 1999; 11(5): 603-613.
- Cheknev SB. Measurement of NK cells' cytotoxicity and IFN production as square of the area under the functional curve. *Russ J Immunol*. 2002 Jul;7(2):123-8.
- Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 11;102(2):419-24.
- Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2486-97.
- Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, Angman L, Cella M, Lopez-Botet M. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med*. 1997; 186(11): 1809-1818.
- Colovai AI, Mirza M, Vlad G, Wang S, Ho E, Cortesini R, Suci-Foca N. Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol*. 2003 Jan;64(1):31-7.
- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*. 2003 Apr;77(8):4588-96.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001a; 22(11): 633-640.
- Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol*. 2004 Jan;25(1):47-52.

- Cooper MA, Fehniger TA, Ponnappan A, Mehta V, Wewers MD, Caligiuri MA. Interleukin-1beta costimulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Eur J Immunol.* 2001b; 31(3): 792-801.
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001c; 97(10): 3146-3151.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jul;87(13):5134-8.
- Dalbeth N, Gundle R, Davies RJ, Lee YC, McMichael AJ, Callan MF. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol.* 2004 Nov 15;173(10):6418-26.
- Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet.* 1997; 350: 430-436.
- Das S, Varalakshmi C, Kumari AL, Patel M, Khar A. Target cell induced activation of NK cells in vitro: cytokine production and enhancement of cytotoxic function. *Cancer Immunol Immunother.* 2001 Oct;50(8):428-36.
- Dokun AO, Chu DT, Yang L, Bendelac AS, Yokoyama WM. Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):5286-93.
- Epstein SE, Zhou YF, Zhu J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation.* 1999; 100(4): e20-e28.
- Ermann J, Szanya V, Ford GS, Paragas V, Fathman CG, Lejon K. CD4(+)CD25(+) T cells facilitate the induction of T cell anergy. *J Immunol.* 2001 Oct 15;167(8):4271-5.
- Eryol NK, Kilic H, Gul A, Ozdogru I, Inanc T, Dogan A, Topsakal R, Basar E. Are the high levels of cytomegalovirus antibodies a determinant in the development of coronary artery disease? *Int Heart J.* 2005 Mar;46(2):205-9.
- Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P. Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology.* 1996 Aug;88(4):501-7.
- Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 2003 Apr 15;101(8):3052-7. Epub 2002 Dec 12.
- Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechsler M, Goodsaid F, Caligiuri MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with

- IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol.* 1999 Apr 15;162(8):4511-20.
- Flo RW, Haukenes G, Nilsen A, Skjaerven R, Forsgren M, Fehniger TE. Longitudinal study of cytomegalovirus antibodies in individuals infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995 Jun;14(6):504-11.
- Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De Benedictis G. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol.* 2000 Sep;35(6-7):879-96.
- Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood.* 1996 Jan 1;87(1):373-7.
- Fregona I, Guttman RD, Jean R. HNK-1+ (Leu-7) and other lymphocyte subsets in long-term survivors with renal allotransplants. *Transplantation.* 1985; 39(1): 25-29.
- Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999; 145(1): 33-43.
- Garcia-Penarrubia P, Koster FT, Kelley RO, McDowell TD, Bankhurst AD. Antibacterial activity of human natural killer cells. *J Exp Med.* 1989 Jan 1;169(1):99-113.
- Gerszten RE, Mach F, Sauty A, Rosenzweig A, Luster AD. Chemokines, leukocytes, and atherosclerosis. *J Lab Clin Med.* 2000; 136(2): 87-92.
- Giltay EJ, Fonk JC, von Blomberg BM, Drexhage HA, Schalkwijk C, Gooren LJ. In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Apr;85(4):1648-57.
- Giomarelli P, Scolletta S, Borrelli E, Biagioli B. Myocardial and lung injury after cardiopulmonary bypass: role of interleukin (IL)-10. *Ann Thorac Surg.* 2003 Jul;76(1):117-23.
- Gratama JW, Langelaar RA, Oosterveer MA, van der Linden JA, den Ouden-Noordermeer A, Naipal AM, Visser JW, de Gast GC, Tanke HJ. Phenotypic study of CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in relation to cytomegalovirus carrier status and its correlate with pokeweed mitogen-induced B lymphocyte differentiation. *Clin Exp Immunol.* 1989; 77(2): 245-251.
- Hajjar DP. Herpesvirus infection prevents activation of cytoplasmic cholesteryl esterase in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1986 Jun 15;261(17):7611-4.

- Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol.* 1989; 135: 169-175.
- Hansson GK: Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(12): 1876-1890.
- Havlik RJ, Blackwelder WC, Kaslow R, Castelli W. Unlikely association between clinically apparent herpesvirus infection and coronary incidence at older ages. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis.* 1989 Nov-Dec;9(6):877-80.
- Hendrix MG, Salimans MM, van Boven CP, Bruggeman CA. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1990; 136(1): 23-28.
- Henkin Y, Como JA, Oberman A. Secondary dyslipidemia. Inadvertent effects of drugs in clinical practice. *JAMA.* 1992 Feb 19;267(7):961-8.
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Oct;78(10):6499-503.
- Herberman RB, Oratldo JR. Natural killer cells- their role in defence against disease. *Science.* 1981; 214: 24-30.
- Hidore MR, Murphy JW. Murine natural killer cell interactions with a fungal target, *Cryptococcus neoformans.* *Infect Immun.* 1989 Jul;57(7):1990-7.
- Hillyard DZ, Cameron AJ, McDonald KJ, Thomson J, MacIntyre A, Shiels PG, Panarelli M, Jardine AG. Simvastatin inhibits lymphocyte function in normal subjects and patients with cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2004 Aug;175(2):305-13.
- Humbert M, Delattre RM, Fattal S, Rain B, Cerrina J, Dartevelle P, Simonneau G, Duroux P, Galanaud P, Emilie D. In situ production of interleukin-6 within human lung allografts displaying rejection or cytomegalovirus pneumonia. *Transplantation.* 1993; 56(3): 623-627.
- Hummel M, Abecassis MM. A model for reactivation of CMV from latency. *J Clin Virol.* 2002 Aug;25 Suppl 2:S123-36.
- Jonasson L, Backteman K, Ernerudh J. Loss of natural killer cell activity in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2005 Dec;183(2):316-21.
- Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis.* 1986; 6: 131-138.
- Jonasson L, Linderfalk C, Olsson J, Wikby A, Olsson AG. Systemic T-cell activation in stable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2002 Mar 15;89(6):754-6.

- Jonasson L, Tompa A, Wikby A. Expansion of peripheral CD8+ T cells in patients with coronary artery disease: relation to cytomegalovirus infection. *J Intern Med.* 2003 Nov;254(5):472-8.
- Jones TR, Wiertz EJ, Sun L., Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(21): 11327-11333.
- Jonges LE, Albertsson P, van Vlierberghe RL, Ensink NG, Johansson BR, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Nannmark U, Kuppen PJ. The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood. *Scand J Immunol.* 2001; 53(2): 103-110.
- June CH, Blazar BR. Clinical application of expanded CD4(+)25(+) cells. *Semin Immunol.* 2006 Apr;18(2):78-88.
- Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Feb;103(2 Pt 1):282-8.
- Katz P, Zaytoun AM, Lee JH Jr. Mechanisms of human cell-mediated cytotoxicity. III. Dependence of natural killing on microtubule and microfilament integrity. *J Immunol.* 1982 Dec;129(6):2816-25.
- Keil U. Coronary artery disease: the role of lipids, hypertension and smoking. *Basic Res Cardiol.* 2000;95 Suppl 1:152-8.
- Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Arch A. Pathol Anat Histopathol.* 1993; 423(6): 433-442.
- Kol A, Libby P. Molecular mediators of arterial inflammation: a role for microbial products. *Am Heart J.* 1999; 138: 450-452.
- Kovacs A, Weber ML, Burns LJ, Jacob HS, Vercellotti GM. Cytoplasmic sequestration of p53 in cytomegalovirus-infected human endothelial cells. *Am J Pathol.* 1996; 149(5): 1531-1539.
- Laer von D, Meyer-Koenig U, Serr A, Finke J, Kanz L, Fauser AA, Neumann-Haefelin D, Brugger W, Hufert FT. Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow. *Blood.* 1995 Dec 1;86(11):4086-90.
- Lanier LL, Philips JH. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells. *Immunol Today.* 1996; 17: 86-91.
- Leong CC, Chapman TL, Bjorkman PJ, Formankova D, Mocarski ES, Phillips JH, Lanier LL. Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J Exp Med.* 1998; 187(10): 1681-1687.

- Leroy E, Calvo CF, Divine M, Gourdin MF, Baujean F, Ben Aribia MH, Mishal Z, Vernant JP, Farcet JP, Senik A. Persistence of T8+/HNK-1+ suppressor lymphocytes in the blood of long-term surviving patients after allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol.* 1986; 137(7): 2180-2189.
- Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS: Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995; 25 Suppl 2: S9-S12.
- Ligthart GJ, Corberand JX, Geertzen HG, Meinders AE, Knook DL, Hijmans W. Necessity of the assessment of health status in human immunogerontological studies: evaluation of the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev.* 1990 Jul;55(1):89-105.
- Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol.* 1998 Jun;10(6):775-83.
- Lopez-Botet M, Llano M, Ortega M. Human cytomegalovirus and natural killer-mediated surveillance of HLA class I expression: a paradigm of host-pathogen adaptation. *Immunol Rev.* 2001 Jun;181:193-202.
- Lucia B, Jennings C, Cauda R, Ortona L, Landay AL. Evidence of a selective depletion of a CD16+ CD56+ CD8+ natural killer cell subset during HIV infection. *Cytometry.* 1995; 22(1): 10-15.
- Magnan A, Mege JL, Reynaud M, Thomas P, Capo C, Garbe L, Meric B, Badier M, Bongrand P, Viard L, et al. Monitoring of alveolar macrophage production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in lung transplant recipients. Marseille and Montreal Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Sep;150(3):684-9.
- Maher P, O'Toole CM, Wreghitt TG, Spiegelhalter DJ, English TA. Cytomegalovirus infection in cardiac transplant recipients associated with chronic T cell subset ratio inversion with expansion of a Leu-7+ TS-C+ subset. *Clin Exp Immunol.* 1985; 62(3): 515-524.
- Malorni W, Straface E, Di Genova G, Fattorossi A, Rivabene R, Camponeschi B, Masella R, Viora M. Oxidized low-density lipoproteins affect natural killer cell activity by impairing cytoskeleton function and altering the cytokine network. *Exp Cell Res.* 1997 Nov 1;236(2):436-45.
- Mar Cabrera del M, Valle J, Pajares JM, Romero I, Zomeno M, Mate J. Expression of the Kp43 (CD 94) receptor by natural killer (NK) cells in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 2001; 48(41): 1316-1320.
- McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest.* 1993 Aug;92(2):1004-8.
- Melnick JL, Adam E, DeBakey ME. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1996; 44(5-6): 297-302.

- Menasche P. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its impact on postoperative myocardial function. *Curr Opin Cardiol.* 1995 Nov;10(6):597-604.
- Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 2004 Nov;4(11):841-55.
- Mocarski ES, Cytomegaloviruses and their replication. *Fields Virology (Vol. 4)* (Knipe, D. et al., eds), *InFields Virology 2001*, Lippincott-Raven: 2629–2673,
- Mollet L, Sadat-Sowti B, Duntze J, Leblond V, Bergeron F, Calvez V, Katlama C, Debre P, Autran B. CD8hi+CD57+ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity. *Int Immunol.* 1998 Mar;10(3):311-23.
- Monti G, Magnan A, Fattal M, Rain B, Humbert M, Mege JL, Noirclerc M, Dartevielle P, Cerrina J, Simonneau G, Galanaud P, Emilie D. Intrapulmonary Production Of Rantes During Rejection and Cmv Pneumonitis After Lung Transplantation. *Transplantation.* 1996; 61(12): 1757-1762.
- Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Madsen TE, Bair TL, Pearson RR, Anderson JL. Cytomegalovirus seropositivity and C-reactive protein have independent and combined predictive value for mortality in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Circulation.* 2000 Oct 17;102(16):1917-23.
- Myśliwska J, Bryl E, Foerster J, Myśliwski A. Increase of interleukin 6 and decrease of interleukin 2 production during the ageing process are influenced by the health status. *Mech Ageing Dev.* 1998 Feb 16;100(3):313-28.
- Myśliwska J, Bryl E, Foerster J, Myśliwski A. The upregulation of TNF alpha production is not a generalised phenomenon in the elderly between their sixth and seventh decades of life. *Mech Ageing Dev.* 1999b Feb 1;107(1):1-14.
- Myśliwska J, Bryl E, Trzonkowski P, Myśliwski A. Compensatory effect of TNFalpha on low natural killer activity in the elderly. *Acta Biochim Pol.* 2000a;47(2):301-11.
- Myśliwska J, Bryl E, Zorena K, Balon J, Foerster J, Myśliwski A. Overactivity of tumor necrosis factor-alpha but not interleukin 6 is associated with low natural killer cytotoxic activity in the elderly. *Gerontology.* 1997;43(3):158-67.
- Myśliwska J, Myśliwski A, Romanowski P, Bigda J, Sosnowska D, Foerster J. Monocytes are responsible for depressed natural killer (NK) activity in both young and elderly low NK responders. *Gerontology.* 1992;38(1-2):41-9.
- Myśliwska J, Trzonkowski P, Bryl E, Lukaszuk K, Myśliwski A. Lower interleukin-2 and higher serum tumor necrosis factor-a levels are associated with perimenstrual, recurrent, facial Herpes simplex infection in young women. *Eur Cytokine Netw.* 2000b Sep;11(3):397-406.

- Myśliwska J, Trzonkowski P, Szmit E, Brydak LB, Machala M, Myśliwski A. Immunomodulating effect of influenza vaccination in the elderly differing in health status. *Exp Gerontol.* 2004 Oct;39(10):1447-58.
- Myśliwska J. Age-related changes of the surface receptors of T lymphocytes. *Advances in cell biology* 1999a; 26 sup 13
- Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol.* 1989; 143(10): 3183-3191.
- Nagler A, Lanier LL., Phillips JH. Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J Exp Med.* 1990; 171(5): 1527-1533.
- Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, Clarkson MR, Sayegh MH, Khoury SJ. Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest.* 2003 Oct;112(7):1037-48.
- Naucler CS, Larsson S, Moller E. A novel mechanism for virus-induced autoimmunity in humans. *Immunol Rev.* 1996 Aug;152:175-92.
- Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest.* 1991; 88(4): 1121-1127.
- Nerheim PL, Meier JL, Vasef MA, Li WG, Hu L, Rice JB, Gavrila D, Richenbacher WE, Weintraub NL. Enhanced cytomegalovirus infection in atherosclerotic human blood vessels. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):589-600.
- Neri Serneri GG, Prisco D, Martini F, Gori AM, Brunelli T, Poggesi L, Rostagno C, Gensini GF, Abbate R. Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation.* 1997 Apr 1;95(7):1806-12.
- Niehues T, Horneff G, Knipp S, Adams O, Wahn V. Treatment-resistant expansion of CD8+CD28-cells in pediatric HIV infection. *Pediatr Res.* 2000 Mar;47(3):418-21.
- Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2782-90.
- Nunn ME, Herberman RB, Holden HT. Natural cell mediated cytotoxicity in mice against non- lymphoid tumor cells and some normal cells. *Int J Cancer.* 1977; 20: 381-389.
- Ogata K, An E, Shioi Y, Nakamura K, Luo S, Yokose N, Minami S, Dan K. Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. *Clin Exp Immunol.* 2001 Jun;124(3):392-7.

- Onno M, Le Friec G, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Drenou B, Caulet-Maugendre S, Andre P, Fauchet R. Modulation of HLA-G antigens expression in myelomonocytic cells. *Hum Immunol*. 2000 Nov;61(11):1086-94.
- Paganelli R, Quinti I, Fagiolo U, Cossarizza A, Ortolani C, Guerra E, Sansoni P, Pucillo LP, Scala E, Cozzi E, et al. Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. *Clin Exp Immunol*. 1992 Nov;90(2):351-4.
- Pampou SY, Gnedoy SN, Bystrevskaya VB, Smirnov VN, Chazov EI, Melnick JL, DeBakey ME. Cytomegalovirus genome and the immediate-early antigen in cells of different layers of human aorta. *Virchows Arch*. 2000; 436(6): 539-552.
- Pasnik J. Role of interleukin 10 in inflammatory response after cardiovascular surgery with cardiopulmonary bypass. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2006;60:8-14.
- Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 13;101(28):10398-403.
- Pawelec G, Ferguson FG, Wikby A. The SENIEUR protocol after 16 years. *Mech Ageing Dev*. 2001 Feb;122(2):132-4.
- Plaeger-Marshall S, Spina CA, Giorgi JV, Mitsuyasu R, Wolfe P, Gottlieb M, Beall G. Alterations in cytotoxic and phenotypic subsets of natural killer cells in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J Clin Immunol*. 1987; 7(1): 16-23.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.
- Prasad A, Zhu J, Halcox JP, Waclawiw MA, Epstein SE, Quyyumi AA. Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002; 106(2): 164-166.
- Prondzinsky R, Knupfer A, Loppnow H, Redling F, Lehmann DW, Stabenow I, Witthaut R, Unverzagt S, Radke J, Zerkowski HR, Werdan K. Surgical trauma affects the proinflammatory status after cardiac surgery to a higher degree than cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Apr;129(4):760-6.
- Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):2995-8.
- Rachoń D, Myśliwska J, Suchecka-Rachoń K, Więckiewicz J, Myśliwski A. Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women. *J Endocrinol*. 2002 Feb;172(2):387-95.

- Reape TJ, Rayner K, Manning CD, Gee AN, Barnette MS, Burnand KG, Groot PH. Expression and cellular localization of the CC chemokines PARC and ELC in human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1999; 154(2): 365-374.
- Redpath S, Angulo A, Gascoigne NR, Ghazal P. Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J Immunol.* 1999 Jun 1;162(11):6701-7.
- Reinke P, Prosch S, Kern F, Volk HD. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis.* 1999; 1(3): 157-164.
- Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature.* 1997; 386(6624): 514-517.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342(12): 836-843.
- Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999; 138(5 Pt 2): 419-420.
- Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Dec;16(12):1437-47.
- Rowbottom AW, Garland RJ, Lepper MW, Kaneria SS, Goulden NJ, Oakhill A, Steward CG. Functional analysis of the CD8+CD57+ cell population in normal healthy individuals and matched unrelated T-cell-depleted bone marrow transplant recipients. *Br J Haematol.* 2000 Aug;110(2):315-21.
- Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, Vowler SL, Lucas M, Klenerman P, Alexander GJ. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2005 Jun;79(12):7852-9.
- Sadat-Sowti B, Debre P, Idziorek T, Guillon JM, Hadida F, Okzenhendler E, Katlama C, Mayaud C, Autran B. A lectin-binding soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from AIDS patients inhibits T cell cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 1991 Mar;21(3):737-41.
- Sadat-Sowti B, Debre P, Mollet L, Quint L, Hadida F, Leblond V, Bismuth G, Autran B. An inhibitor of cytotoxic functions produced by CD8+CD57+ T lymphocytes from patients suffering from AIDS and immunosuppressed bone marrow recipients. *Eur J Immunol.* 1994 Nov;24(11):2882-8.
- Sawa Y, Ichikawa H, Kagisaki K, Ohata T, Matsuda H. Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes promotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Sep;116(3):511-7.

- Scherberich JE. Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003 Oct;41(10):459-64.
- Schirmer M, Goldberger C, Wurzner R, Duftner C, Pfeiffer KP, Clausen J, Neumayr G, Falkenbach A. Circulating cytotoxic CD8(+) CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res.* 2002;4(1):71-6.
- Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost.* 2004 Aug;92(2):419-24.
- Schrier RD, Rice GP, Oldstone MB. Suppression of natural killer cell activity and T cell proliferation by fresh isolates of human cytomegalovirus. *J Infect Dis.* 1986; 153(6): 1084-1091.
- Seko Y, Sato O, Takagi A, Tada Y, Matsuo H, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Perforin-secreting killer cell infiltration in the aortic tissue of patients with atherosclerotic aortic aneurysm. *Jpn Circ J.* 1997 Dec;61(12):965-70.
- Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by Coxsackie virus B3. *J Pathol.* 1993 May;170(1):53-8.
- Silvestri A, Gebara O, Vitale C, Wajngarten M, Leonardo F, Ramires JA, Fini M, Mercurio G, Rosano GM. Increased levels of C-reactive protein after oral hormone replacement therapy may not be related to an increased inflammatory response. *Circulation.* 2003 Jul 1;107(25):3165-9.
- Siwak E, Kondrusik M, Daniluk J. Cytomegalovirus infection. Epidemiology, CMV and pregnancy, CMV and recipients of vaccine, CMV and HIV infection, CMV after transfusion. *Pol Tyg Lek.* 1992; 47(36-37): 814-818.
- Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(18): 8264-8268.
- Smith PD, Saini SS, Raffeld M, Manischewitz JF, Wahl SM. Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and mucosal macrophages. *J Clin Invest.* 1992 Nov;90(5):1642-8.
- Smith SC Jr. Current and future directions of cardiovascular risk prediction. *Am J Cardiol.* 2006 Jan 16;97(2A):28A-32A.
- Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Growth of human cytomegalovirus in primary macrophages. *Methods.* 1998 Sep;16(1):126-38.
- Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest.* 1997a Dec 15;100(12):3154-63.

- Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*. 1997b Oct 3;91(1):119-26.
- Sorlie PD, Nieto FJ, Adam E, Folsom AR, Shahar E, Massing M. A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arch Intern Med*. 2000 Jul 10;160(13):2027-32.
- Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997 Feb 18;95(4):1062-71
- Stephan F, Bernaudin JF, Cesari D, Fajac A, Grenet DD, Caubarrere I, Stern M. Blood and alveolar lymphocyte subsets in pulmonary cytomegalovirus infection after lung transplantation. *BMC Infect Dis*. 2001; 1(1): 15.
- Story CM, Furman MH, Ploegh HL. The cytosolic tail of class I MHC heavy chain is required for its dislocation by the human cytomegalovirus US2 and US11 gene products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(15): 8516-8521.
- Streblow DN, Nelson JA. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends Microbiol*. 2003 Jul;11(7):293-5.
- Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA. Do pathogens accelerate atherosclerosis? *J Nutr*. 2001; 131(10): 2798S-2804S.
- Suciu-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol*. 2003 Jul-Sep;11(3-4):235-44.
- Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun*. 2001 Mar;16(2):115-23.
- Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med*. 2003 Sep 15;198(6):889-901.
- Szkaradkiewicz A, Bogaczynska-Staniewicz J, Torlinski L, Wal M. Cytomegalovirus infection and atherogenesis. *Med Sci Monit*. 2002; 8(2): CR104-CR107.
- Tarazona R, Casado JG, Delarosa O, Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Sanchez B, Galiani MD, Gonzalez R, Solana R, Pena J. Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals. *J Clin Immunol*. 2002 May;22(3):176-83.
- Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol*. 1991 Sep;72 (Pt 9):2059-64.
- Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, Cerundolo V, Borysiewicz LK, McMichael AJ, Wilkinson GW. Surface expression

- of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*. 2000; 287: 1031.
- Tonnesen E, Brinklov MM, Christensen NJ, Olesen AS, Madsen T. Natural killer cell activity and lymphocyte function during and after coronary artery bypass grafting in relation to the endocrine stress response. *Anesthesiology*. 1987 Oct;67(4):526-33.
- Tracy R. Atherosclerosis, thrombosis and inflammation: a question of linkage. *Fibrinol Proteolysis*. 1997; 11(Suppl 1): 137-142.
- Trzonkowski P, Myśliwska J, Szmit E, Więckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak LB, Machała M, Myśliwski A. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. *Vaccine*. 2003 Sep 8;21(25-26):3826-36.
- Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, Dobyszuk A, Myśliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol*. 2004 Sep;112(3):258-67.
- Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Sep;112(3):480-7.
- Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK, Warriar RR, Pham N, Fogelman AM, Modlin RL. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1996; 97(9): 2130-2138.
- Vahlenkamp TW, Tompkins MB, Tompkins WA. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005 Oct 18;108(1-2):219-25.
- Viora M, Quaranta MG, Straface E, Vari R, Masella R, Malorni W. Redox imbalance and immune functions: opposite effects of oxidized low-density lipoproteins and N-acetylcysteine. *Immunology*. 2001 Dec;104(4):431-8.
- Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL. Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996 Sep;112(3):806-11.
- Wang ECY, Moss PA, Frodsham P, Lehner PJ, Bell JI, Borysiewicz LK. CD8^{high}CD57⁺ T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. *J Immunol*. 1995; 155(10): 5046-5056.
- Wang ECY, Taylor-Wiedeman J, Perera P, Fischer J, Borysiewicz K. Subset of CD8⁺, CD57⁺ cells in normal, Healthy individuals: correlation with HCMV carrier status, phenotypic and functional analyses. *Clin Exp Immunol*. 1993; 94: 297.
- Wehlin L, Vedin J, Vaage J, Lundahl J. Peripheral blood monocyte activation during coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass. *Scand Cardiovasc J*. 2005 Apr;39(1-2):78-86.

- Weinbrenner T, Cladellas M, Isabel Covas M, Fito M, Tomas M, Senti M, Bruguera J, Marrugat J. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2003 May;168(1):99-106.
- Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*. 1996; 84(5): 769-779.
- Wilcox JN, Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Schall TJ. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques. *J Atheroscler Thromb*. 1994; 1 Suppl 1: S10-S13.
- Wills MR, Ashiru O, Reeves MB, Okecha G, Trowsdale J, Tomasec P, Wilkinson GW, Sinclair J, Sissons JG. Human cytomegalovirus encodes an MHC class I-like molecule (UL142) that functions to inhibit NK cell lysis. *J Immunol*. 2005 Dec 1;175(11):7457-65.
- Winter CC, Long EO. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol*. 1997; 158(9): 4026-4028.
- World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Cardiovasc Res*. 1997 Jul;35(1):2-3.
- Xu Q, Wick G. The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. *Mol Med Today*. 1996; 2: 372-379.
- Yilmazer M, Fenkci V, Fenkci S, Sonmezer M, Aktepe O, Altindis M, Kurtay G. Hormone replacement therapy, C-reactive protein, and fibrinogen in healthy postmenopausal women. *Maturitas*. 2003 Dec 10;46(4):245-53.
- Zhou YF, Guetta E, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE. Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1996 Nov 1;98(9):2129-38.
- Zhou YF, Yu ZX, Wanishsawad C, Shou M, Epstein SE. The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 256(3): 608-613.
- Zhu J, Shearer GM, Norman JE, Pinto LA, Marincola FM, Prasad A, Waclawiw MA, Csako G, Quyyumi AA, Epstein SE. Host response to cytomegalovirus infection as a determinant of susceptibility to coronary artery disease: sex-based differences in inflammation and type of immune response. *Circulation*. 2000 Nov 14;102(20):2491-6.
- Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*. 1993 Sep;23(9):2053-8.

Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺ CD16⁺ subpopulation. *Immunol Today*. 1996 Sep;17(9):424-8.