

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Ryszard Nosalski

**Charakterystyka stanu zapalnego okolonaczyniowej tkanki
tłuszczowej w patogenezie nadciśnienia tętniczego
zależnego od angiotensyny II**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Tomasz Guzik

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

Kraków 2017

Praca została sfinansowana
z funduszy przyznanych w ramach projektu WELCOME S/FS0/0081,
Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej,
współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego,
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



*Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej*



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



*Składam serdeczne podziękowania,
Panu Profesorowi Tomaszowi Guzikowi
za umożliwienie realizacji powyższej pracy,
za opiekę merytoryczną, za cenne uwagi i sugestie,
a także za wieloletnią edukację i nieocenione naukowe wsparcie*

*Pragnę również podziękować:
Dr Tomaszowi Mikołajczykowi
Dr Mateuszowi Siedlińskiemu
całemu zespołowi Laboratorium Medycyny Translacyjnej,
pracownikom Katedry Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi UJ CM
za okazaną pomoc w realizacji badań*

Spis treści

I. WSTĘP	8
I.1. NADCIŚNIENIE TĘTNICZE	8
<i>I.1.1. Epidemiologia</i>	9
I.2. PATOGENEZA NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO	10
<i>I.2.1. Ośrodkowy układ nerwowy</i>	11
<i>I.2.2. Nerki</i>	13
<i>I.2.3. Naczynia krwionośne</i>	14
I.3. ROLA UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO W PATOGENEZIE NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO	16
<i>I.3.1. Rola limfocytów w patogenezie nadciśnienia tętniczego</i>	16
I.3.1.1. Rola subpopulacji limfocytów T w patogenezie nadciśnienia tętniczego.....	19
<i>I.3.2. Rola komórek dendrytycznych w patogenezie nadciśnienia tętniczego</i>	22
<i>I.3.3. Rola monocytów/makrofagów w patogenezie nadciśnienia tętniczego</i>	23
<i>I.3.4. Rola komórek NK w patogenezie nadciśnienia tętniczego</i>	24
<i>I.3.5. Rola neutrofilii w patogenezie nadciśnienia tętniczego</i>	24
<i>I.3.6. Dowody kliniczne na udział układu odpornościowego w patogenezie nadciśnienia tętniczego</i>	25
I.4. OKOŁONACZYNIOWA TKANKA TŁUSZCZOWA	26
<i>I.4.1. Rola tkanki tłuszczowej w regulacji napięcia naczyń krwionośnych</i>	28
<i>I.4.2. Okołonaczyiniowa tkanka tłuszczowa jako rezerwuar komórek zapalnych</i>	28
<i>I.4.3. Rola okołonaczyiniowej tkanki tłuszczowej w rozwoju dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i patogenezie nadciśnienia tętniczego</i>	29
<i>I.4.4. Rola okołonaczyiniowej tkanki tłuszczowej w procesach patofizjologicznych naczyń krwionośnych</i>	31
I.5. CYTOKINY, CHEMOKINY I ADIPOKINY W REGULACJI CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI I FUNKCJONOWANIA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH	31
<i>I.5.1. Cytokiny w patogenezie nadciśnienia tętniczego</i>	31
I.5.1.1. Interleukina 17	32
I.5.1.2. Interferon gamma	33
I.5.1.3. TNF	34
I.5.1.4. Interleukina 6	34
I.5.1.5. Interleukina 10	35
I.5.1.6. Interleukina 33	36
<i>I.5.2. Chemokiny</i>	37
I.5.2.1. RANTES	37
I.5.2.2. Chemokiny CXCL9, CXCL10 oraz CXCL11	38

I.5.2.3.	MCP-1.....	39
I.5.3.	Adipokiny.....	40
I.5.3.1.	Adiponektyna.....	40
I.5.3.2.	Rezystyna.....	41
I.5.3.3.	Chemeryna.....	42
I.5.3.4.	Białko C-reaktywne.....	42
I.6.	PODSUMOWANIE.....	43
II.	CEL PRACY.....	46
III.	MATERIAŁ I METODY.....	47
III.1.	MODEL BADAWCZY.....	47
III.1.1.	<i>Mysi model nadciśnienia tętniczego zależnego od angiotensyny II.....</i>	<i>47</i>
III.1.2.	<i>Model spontanicznego nadciśnienia tętniczego u szczurów.....</i>	<i>48</i>
III.2.	POMIARY CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI.....	48
III.3.	EUTANAZJA I POBIERANIE TKANEK/NARZĄDÓW.....	49
III.4.	IZOLACJA KOMÓREK.....	49
III.4.1.	<i>Izolacja PBMC.....</i>	<i>49</i>
III.4.2.	<i>Izolacja frakcji naczyniowo-stromalnej tkanek.....</i>	<i>50</i>
III.4.3.	<i>Izolacja subpopulacji limfocytów T.....</i>	<i>50</i>
III.5.	CHEMOTAKSJA LIMFOCYTÓW T.....	51
III.5.1.	<i>Wytwarzanie nadsęczy z okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej.....</i>	<i>52</i>
III.5.2.	<i>Neutralizacja chemokiny RANTES.....</i>	<i>52</i>
III.6.	ANALIZA CYTOMETRYCZNA LEUKOCYTÓW.....	52
III.6.1.	<i>Badanie receptorów zewnątrz komórkowych.....</i>	<i>53</i>
III.6.2.	<i>Badanie cytokin oraz receptorów wewnątrz komórkowych.....</i>	<i>54</i>
III.6.3.	<i>Cytometryczna analiza komórek układu odpornościowego.....</i>	<i>54</i>
III.7.	OCENA FUNKCJI ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO.....	55
III.8.	BADANIE EKSPRESJI GENÓW.....	56
III.9.	BADANIE PROFILU CYTOKIN WYTWARZANYCH PRZEZ OKOŁONACZYNIOWĄ TKANKĘ TŁUSZCZOWĄ.....	57
III.10.	STATYSTYCZNA ANALIZA DANYCH.....	58
IV.	WYNIKI.....	59
IV.1.	OCENA PROFILU CYTOKIN/CHEMOKIN W OKOŁONACZYNIOWEJ TKANCE TŁUSZCZOWEJ W NADCIŚNIENIU TĘTNICZYM INDUKOWANYM ANGIOTENSYNĄ II.....	59
IV.2.	CHARAKTERYSTYKA LEUKOCYTÓW INFILTRUJĄCYCH OKOŁONACZYNIOWĄ ORAZ WISCERALNĄ TKANKĘ TŁUSZCZOWĄ W NADCIŚNIENIU ZALEŻNYM OD ANGIOTENSYNY II.....	60
IV.2.1.	<i>Makrofagi.....</i>	<i>61</i>

IV.2.2.	<i>Komórki dendrytyczne</i>	62
IV.2.3.	<i>Komórki NK</i>	62
IV.2.4.	<i>Limfocyty</i>	63
IV.2.4.1.	Limfocyty B	63
IV.2.4.2.	Limfocyty T	64
IV.2.4.2.1.	Ekspresja markerów aktywacji na powierzchni limfocytów T	65
IV.2.4.2.2.	Limfocyty naiwne, pamięci i efektorowe.....	66
IV.2.5.	<i>Poziom ekspresji RANTES w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej</i>	68
IV.2.6.	<i>Ekspresja receptorów dla chemokiny RANTES na powierzchni limfocytów T...</i>	68
IV.2.7.	<i>Ekspresja innych chemokin będących ligandami dla receptorów CCR1, CCR3 i CCR5</i>	69
IV.3.	CHARAKTERYSTYKA OKOŁONACZYNIOWEGO STANU ZAPALNEGO W SPONTANICZNYM NADCIŚNIENIU TĘTNICZYM U SZCZURÓW	70
IV.3.1.	<i>Infiltracja okołonaczyniowej oraz wisceralnej tkanki tłuszczowej przez leukocyty</i>	70
IV.3.1.1.	Makrofagi	71
IV.3.1.2.	Komórki dendrytyczne	72
IV.3.1.3.	Komórki NK.....	72
IV.3.1.4.	Limfocyty	73
IV.3.1.4.1.	Limfocyty B	73
IV.3.1.4.2.	Limfocyty T	74
IV.3.1.4.2.1.	Limfocyty T _{reg} oraz T _H 17	74
IV.4.	CHEMOTAKTYCZNE WŁAŚCIWOŚCI LIMFOCYTÓW T	75
IV.4.1.	<i>Chemotaksja limfocytów T w kierunku okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej.</i>	75
IV.4.2.	<i>Chemotaktyczne właściwości limfocytów krwi obwodowej w kierunku chemokiny RANTES</i>	76
IV.4.2.1.	Wpływ blokady RANTES na chemotaksje limfocytów T w kierunku okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej	77
IV.4.3.	<i>Chemotaksja limfocytów T rezydujących w okołonaczyniowej i wisceralnej tkance tłuszczowej</i>	78
IV.5.	ROLA CHEMOKINY RANTES W REGULACJI CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI I FUNKCJI NACZYŃ KRWIONOŚNYCH.....	79
IV.5.1.	<i>Wpływ RANTES na rozwój nadciśnienia tętniczego krwi</i>	79
IV.5.2.	<i>Wpływ RANTES na czynność naczyń krwionośnych</i>	80
IV.5.2.1.	Naczynia oporowe (krezkowe)	80
IV.5.2.2.	Aorta.....	81
IV.6.	ROLA CHEMOKINY RANTES W INDUKCJI OKOŁONACZYNIOWEGO STANU ZAPALNEGO	81

IV.6.1.	<i>Wpływ chemokiny RANTES na infiltrację leukocytów do okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej.....</i>	<i>81</i>
IV.6.2.	<i>Wpływ usunięcia RANTES na infiltrację limfocytów T do okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej.....</i>	<i>83</i>
IV.6.2.1.	Infiltracja okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej przez komórki regulatorowe	84
IV.6.2.2.	Ekspresja markera CCR5 na powierzchni limfocytów T rezydujących w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej	85
IV.6.2.3.	Ekspresja markera CCR6 na powierzchni limfocytów T rezydujących w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej	86
IV.7.	WPŁYW USUNIĘCIA RANTES NA PRODUKCJĘ CYTOKIN PROZAPALNYCH PRZEZ LIMFOCYTY T INFILTRUJĄCE OKOŁONACZYNIOWĄ TKANKĘ TŁUSZCZOWĄ.....	88
IV.7.1.	<i>Produkcja interleukiny 17.....</i>	<i>88</i>
IV.7.2.	<i>Produkcja interferonu gamma</i>	<i>88</i>
V.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW	90
VI.	DYSKUSJA	92
VI.1.	CHARAKTERYSTYKA STANU ZAPALNEGO OKOŁONACZYNIOWEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ W NADCIŚNIENIU ZALEŻNYM OD ANGIOTENSYNY II.	92
VI.2.	CHARAKTERYSTYKA STANU ZAPALNEGO OKOŁONACZYNIOWEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ W SPONTANICZNYM NADCIŚNIENIU TĘTNICZYM U SZCZURÓW.	95
VI.3.	ROLA RANTES W MECHANIZMIE MIGRACJI LIMFOCYTÓW W KIERUNKU OKOŁONACZYNIOWEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ.....	96
VI.4.	ROLA RANTES W REGULACJI CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI, OKOŁONACZYNIOWEGO STANU ZAPALNEGO ORAZ FUNKCJI NACZYŃ KRWIONOŚNYCH.....	97
VI.5.	SŁABE STRONY BADANIA	101
VII.	PODSUMOWANIE	102
VIII.	WNIOSKI.....	103
IX.	STRESZCZENIE	104
IX.1.	SUMMARY.....	108
X.	SPIS SKRÓTÓW	112
XI.	SPIS RYCIN	114
XII.	SPIS TABEL.....	117
XIII.	LITERATURA.....	118

I. WSTĘP

I.1. *Nadciśnienie tętnicze*

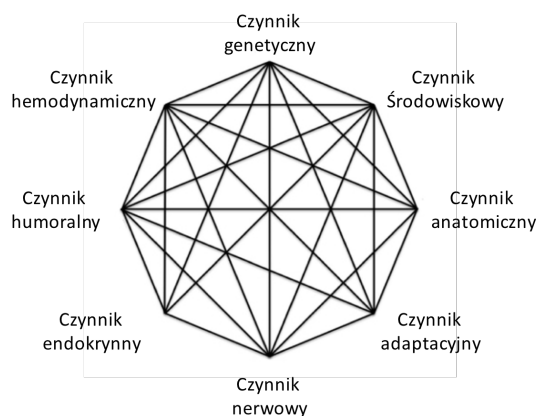
Nadciśnienie tętnicze (zwanym dalej NT) jest stanem patologicznym charakteryzującym się podwyższonym ciśnieniem tętniczym krwi. Zgodnie z wytycznymi AHA (American Heart Association), ESH (Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego) oraz ESC (Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne), NT definiuje się jako ciśnienie skurczowe większe lub równe 140 mmHg i/lub ciśnienie rozkurczowe większe lub równe 90 mmHg^{1,2}. Szczegółowa klasyfikacja NT została przedstawiona w tabeli 1.

Tabela 1. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego².

Kategoria ciśnienia tętniczego	Ciśnienie skurczowe [mm Hg]		Ciśnienie rozkurczowe [mm Hg]
Optymalne	<120	i	<80
Prawidłowe	120-129	i/lub	80-84
Wysokie prawidłowe	130-139	i/lub	85-89
Nadciśnienie tętnicze 1. stopnia	140-159	i/lub	90-99
Nadciśnienie tętnicze 2. stopnia	160-179	i/lub	100-109
Nadciśnienie tętnicze 3. stopnia	≥180	i/lub	≥110
Izolowane nadciśnienie tętnicze skurczowe	≥140	i	<90

Nadciśnienie tętnicze może mieć charakter pierwotny albo być następstwem np.: choroby lub niewydolności nerek, guza chromochłonnego bądź też hiperaldosteronizmu - wówczas definiuje się je jako NT wtórne. Nadciśnienie tętnicze pierwotne stanowi powyżej 90% przypadków i jego geneza ciągle pozostaje nieznana³.

W 1949 roku I.H. Page sformułował mozaikową teorię NT w której jako pierwszy zwrócił uwagę na wieloczynnikowy charakter patogenezy NT. Teoria graficznie wyrażona w postaci ośmiokąta uwzględniała czynniki regulujące ciśnienie krwi będące ze sobą ściśle powiązane strzałkami (Ryc. 1). Zgodnie z teorią czynniki te tworzą wzajemnie połączony układ, który w warunkach fizjologicznych znajduje się w stanie równowagi i zapewnia utrzymanie prawidłowego ciśnienia krwi. Zmiana w obrębie jednego czynnika powoduje zachwianie równowagi i pociąga za sobą zmiany pozostałych czynników co prowadzi do rozregulowania układu, skutkując rozwojem NT krwi^{4,5}.



Ryc. 1. Mozaikowa teoria Page'a.

Pomimo upływu czasu i odkrycia wielu nowych czynników odgrywających kluczową rolę w patogenezie NT, teoria Page'a wciąż pozostaje aktualna, niemniej jednak wymaga uzupełnienia o nowe aspekty regulujące ciśnienie krwi takie jak: rola układu naczyniowego, układu nerwowego, stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego oraz układu immunologicznego, a w szczególności komórek infiltrujących tkanki otaczające naczynia krwionośne.

1.1.1. Epidemiologia

Według organizacji WHO (Światowa Organizacja Zdrowia) NT zajmuje pierwsze miejsce pod względem przyczyn zgonów na całym świecie. W 2010 roku NT stanowiło wiodący, odrębny czynnik ryzyka odpowiedzialny za około 9,5 miliona zgonów na świecie. Szacuje się, że częstość występowania NT na świecie w 2000 roku wynosiła 26,4% i w 2025 wzrośnie do 29,2%⁶. Ogólnopolskie badanie NATPOL 2011

wykazało, że liczba osób chorujących na NT wynosi około 10,5 mln dorosłych Polaków (ok. 30-32%), natomiast aż 3 mln Polaków nie zdaje sobie sprawy z tego, że choruje na NT. Na uwagę zasługują również fakt, iż pomimo większej skuteczności leczenia NT, liczba chorych zwiększyła się o 2 % w porównaniu do badań NATOPL z 2002 roku⁷. Również grupa osób z ciśnieniem wysokim prawidłowym, obejmuje znaczą część populacji w różnych krajach. Zgodnie z kryteriami ESH/ECS ciśnienie wysokie prawidłowe stwierdzono u 30% dorosłych w Polsce⁸. Z kolei amerykańskie kryteria *Joint National Committee 7 (JNC7)* podają, iż stan przednadciśnieniowy (stan pomiędzy 120/80 i 139/89 mm) i NT obejmuje łącznie 79% populacji^{8,9}. Osoby z ciśnieniem wysokim prawidłowym cechują się znacząco większym ryzykiem rozwinięcia utrwalonego NT¹⁰. Co więcej, w porównaniu z osobami z optymalnym ciśnieniem tętniczym krwi, ciśnienie wysokie prawidłowe stanowi niezależny predyktor rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych¹¹. W ostatnim czasie zidentyfikowano grupę osób cechujących się prawidłowym ciśnieniem krwi w pomiarze wykonanym w gabinecie lekarskim, ale z podwyższonymi wartościami w przypadku monitorowania całodobowego ciśnienia tętniczego krwi (tzw. utajone NT). Grupa ta charakteryzuje się bardziej nasilonymi zmianami narządowymi oraz wyższym ryzykiem sercowo-naczyniowym w porównaniu z osobami z prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi¹². Permanentne i niekontrolowane NT prowadzi do uszkodzenia narządów docelowych takich jak nerki, mózg i serce. Podwyższenie ciśnienia skurczowego o 10 mmHg lub/i rozkurczowego o 5 mmHg może wiązać się z wyższym o 40% ryzykiem zgonu spowodowanym udarem mózgu i wyższym o około 30% ryzykiem zgonu z powodu choroby wieńcowej. Podwojenie wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego zwiększa ryzyko zgonu dwukrotnie¹³. Koszty leczenia NT w USA za rok 2011 wyniosły 46,4 mld. dolarów, natomiast najnowsze prognozy wskazują, że całkowity koszt leczenia w roku 2030 może wzrosnąć do 247 mld. dolarów¹⁴.

1.2. Patogeneza nadciśnienia tętniczego

Pomimo postępów w diagnostyce i leczeniu NT wraz z jego komplikacjami wywiera ogromny wpływ na zdrowie publiczne i pozostaje wciąż nierozwiązanym problemem zdrowotnym. Wynika to po części z faktu, iż wielu chorych nie stać na leki,

ale również z uwagi na fakt to, że mechanizm powstawania tej choroby wciąż pozostaje niewyjaśniony. Istotną rolę w NT odgrywają: ośrodkowy układ nerwowy, nerki oraz naczynia krwionośne, a ich działanie jest ze sobą ściśle powiązane. Badania ostatnich lat wskazują na istotne znaczenie procesów zapalnych w patogenezie NT, co najprawdopodobniej znacząco moduluje dysfunkcję wymienionych narządów.

1.2.1. Ośrodkowy układ nerwowy

Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) odgrywa ważną rolę w regulacji ciśnienia tętniczego krwi, wpływając na funkcję układu autonomicznego i wydzielanie hormonów regulujących czynność układu krążenia oraz gospodarkę wodno-elektrolitową^{15,16}. Nadrzędną rolę w neurogennej regulacji ciśnienia tętniczego krwi odgrywają interneurony przedmotoryczne. Wśród neuronów przedmotorycznych najważniejszą rolę odgrywają przedwspółczulne interneurony dogłowego brzuszno-bocznego obszaru rdzenia przedłużonego (RVLM)¹⁵. Neurony unerwiające RVLM uwalniają neurotransmitery takie jak: glutaminian, kwas gamma-aminomasłowy, acetylocholinę i serotoninę oraz peptydy opioidowe, wazopresynę, neuropeptyd Y oraz angiotensynę, które pełnią funkcje regulatorowe. Drażnienie RVLM prądem elektrycznym wywołuje gwałtowny wzrost ciśnienia tętniczego krwi, natomiast ich uszkodzenie powoduje jego spadek¹⁷. Równie ważną rolę odgrywają neurony jądra przykomorowego (PVN). Syntetyzują one neurotransmitery i neurohormony (np. wazopresyna, oksytocyna, kortykoliberyna) regulujące ciśnienie tętnicze krwi oraz gospodarkę wodno-elektrolitową. Uszkodzenie PVN u zdrowych zwierząt nie powoduje spadku ciśnienia tętniczego krwi, najprawdopodobniej za sprawą przejęcia funkcji PVN przez inne neurony przedmotoryczne (np. RVLM). Znaczenie PVN wzrasta w regulacji ciśnienia tętniczego w niewydolności serca i nadciśnieniu neurogennym^{17,18}. Zarówno do RVLM oraz PVN za pośrednictwem interneuronów jądra pasma samotnego (NTS) dociera informacja z baroreceptorów, mechanoreceptorów oraz chemoreceptorów. Ponadto NTS otrzymuje informację z innych struktur układu nerwowego odpowiedzialnych za regulację ciśnienia tętniczego krwi, dzięki czemu jest jednym z kluczowych integracyjnych obszarów krążeniowych mózgu^{15,17,19}. Szczególnym regionem mózgu są narządy okołokomorowe. Narządy te są bogato unaczynione, a ich charakterystyczną cechą jest brak ścisłej bariery krew-mózg.

Dzięki okienkowej budowie śródbłonna naczyń krwionośnych na neurony tego regionu mózgu mogą oddziaływać związki docierające z krwią takie jak np. angiotensyna II (Ang II) czy endotelina-1 (ET-1)^{15,18}. Jednym z narządów okołokomorowych jest obszar otaczający przednio-brzuszną ścianę komory trzeciej (AV3V). Uszkodzenie tego regionu wywołuje spadek ciśnienia tętniczego krwi¹⁹, a myszy z uszkodzeniem AV3V chronione są przed rozwojem NT, a także aktywacją limfocytów T po infuzji Ang II²⁰. Genetyczne usunięcie dysmutazy ponadtlenkowej w narządach okołokomorowych mózgu zwiększa produkcję RFT (reaktywne formy tlenu) co skutkuje przyspieszoną akcją serca oraz podnosi ciśnienie tętnicze krwi u zwierząt laboratoryjnych²¹. Również podanie niskiej dawki Ang II, normalnie niepowodującej wzrostu ciśnienia tętniczego krwi, powoduje indukcję NT u tych myszy²². Ponadto wyciszenie dysmutazy ponadtlenkowej w tym regionie mózgu powoduje wzrost odsetka zaktywowanych limfocytów T oraz zwiększa okołonaczyniowy stan zapalny towarzyszący infuzji Ang II²³.

Jak wspomniano wcześniej OUN wpływa na układ współczulny, który jest odpowiedzialny za krótkoterminową zmienność ciśnienia tętniczego krwi, jak również stanowi kluczowy element w patogenezie NT. Jego aktywacja wpływa na zwiększenie pojemności minutowej serca oraz oporu obwodowego poprzez skurcz naczyń krwionośnych^{24,25}. W nerkach podnosi się wydzielanie reniny poprzez aktywację układu RAAS (układ renina-angiotensyna-aldosteron) oraz zwiększonego oporu naczyń nerkowych, co prowadzi do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi²⁴. Ablacja nerwów współczulnych tętnic nerkowych wywiera korzystny wpływ na obniżenie wartości ciśnienia tętniczego krwi u ludzi chorych na NT²⁶. Utrzymująca się wzmożona aktywacja układu współczulnego prowadzi do przerostu lewej komory serca oraz przebudowy naczyń krwionośnych^{2,27}. Istnieje również coraz więcej dowodów wskazujących na znaczenie czynników emocjonalnych i stresu w rozwoju NT. Wykazano, że populacje żyjące w izolacji od współczesnej cywilizacji charakteryzują się niskim ciśnieniem tętniczym, natomiast u osób przeniesionych z tych obszarów do regionów wysoko uprzemysłowionych obserwuje się wzrost występowania NT. Wzrost ciśnienia tętniczego krwi powodują również silne bodźce psychiczne powiązane z traumatycznymi wydarzeniami^{18,28}. W czasie przedłużonego stresu psychicznego zaczyna dominować pobudzenie receptorów α -adrenergicznych i obserwuje się wzrost oporu obwodowego²⁹, zwężenia naczyń krwionośnych w nerkach, a także wzrostu filtracji kłębuszkowej pod wpływem działania Ang II³⁰.

1.2.2. Nerki

Nerki odgrywają istotną rolę w regulacji ciśnienia tętniczego krwi za pośrednictwem kontroli bilansu wodno-sodowego, układów renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS), wegetatywnego i sympatycznego, jak również w oparciu o inne substancje regulujące jak np. ET-1 oraz tlenek azotu (NO). Dowodów na ważną rolę nerek w patogenezie NT dostarczyła transplantologia. Przeszczepienie nerki osobnikowi normotensyjnemu od szczura hipertensyjnego powoduje wzrost ciśnienia tętniczego krwi, natomiast przeszczep nerki osobnika normotensyjnego szczurowi z rozwiniętym NT przynosi skutek odwrotny³¹. Podobne zjawisko zaobserwowano u ludzi, gdzie przeszczep nerki pacjentowi z utrzymującym się NT powoduje remisję NT u biorcy³². Wykazano również, że przeszczep nerki od dawcy z NT powoduje częstszy rozwój NT u biorców w porównaniu z przeszczepami od normotensyjnych dawców³³. Choroby nerek stanowią częstą przyczynę NT. Wśród nich wyróżniamy: choroby mięsiste nerek (pierwotne i wtórne choroby kłębuszków nerkowych, choroby cewkowo-śródmięsiste, choroby wrodzone np. wielotorbielowatość), choroby naczyń nerek (zwężenie tętnicy nerkowej, zapalenie naczyń-wewnątrz nerkowych), nowotwory wydzielające reninę, zespoły pierwotnej retencji sodu (np. zespół Liddle'a, zespół Gordona)³⁴. Niemniej jednak NT spowodowane chorobami nerek stanowi najczęstszą przyczynę NT wtórnego, które stanowi około 10% ogółu chorych z NT. U pozostałych 90% chorych etiologia NT jest wieloczynnikowa i wciąż pozostaje niewyjaśniona¹⁶.

Zwiększona aktywność RAAS stanowi jeden z głównych mechanizmów prowadzących do rozwoju NT^{24,35}. Renina wydzielana jest przez komórki aparatu przykłębuszkowego, który utworzony jest w miejscu, gdzie stykają się ze sobą: tętniczka doprowadzająca, tętniczka odprowadzająca i komórki nabłonka cewki dalszej. Podstawowym bodźcem do wydzielania reniny jest zmniejszenie ciśnienia oraz ilość sodu w tętnicy doprowadzającej, a także stymulacja receptorów adrenergicznych β przez noradrenalinę uwalnianą z zakończenia nerwów współczulnych i adrenalinę. Renina nie wywiera bezpośredniego działania na naczynia krwionośne. Jej główne efekty fizjologiczne zależą od kaskady przemian angiotensynogenu, z którego powstaje m.in. Ang II^{24,36}. Ang II promuje skurcz tętniczek kłębuszkowych, nasila reabsorpcję sodu w cewce proksymalnej i dystalnej (wymiennik sodowo-

protonowy NHE3) oraz działa antydiuretycznie^{37,38}. Zwiększone stężenie Ang II prowadzi do skurczu naczyń wewnątrznerkowych, co skutkuje niedokrwieniem tkanki śródmiąższowej oraz powstawaniem nacieków makrofagów i limfocytów T wokół tych naczyń^{39,40}. Komórki zapalne wytwarzają Ang II oraz RFT prowadząc do lokalnego niedoboru NO³⁹. Szereg badań wskazuje na rolę NO w regulacji ciśnienia tętniczego krwi poprzez wpływ na napięcie naczyń krwionośnych nerek oraz hamowanie reabsorpcji sodu⁴¹. Ostatnim elementem układu RAAS jest aldosteron. Głównym miejscem syntezy aldosteronu jest warstwa kłębkowa kory nadnerczy. Czynniki pobudzające syntezę aldosteronu są Ang II, endotelina-1 (ET-1) oraz zwiększenie jonów potasowych w osoczu. Do czynników hamujących jego syntezę należą NO, dopamina oraz peptydy natriuretyczne. Główną rolą aldosteronu jest regulacja gospodarki wodno-elektrolitowej w nerkach²⁴.

U zdrowych ludzi podwyższenie ciśnienia tętniczego krwi powoduje zwiększenie wydalania sodu i wody przez nerki (natriureza ciśnieniowa), co prowadzi do zmniejszenia objętości płynów wewnątrzkomórkowych i normalizacji ciśnienia krwi⁴². Fizjologiczna sprawność mechanizmów natriurezy ciśnieniowej ulega zaburzeniu pod wpływem wielu czynników hemodynamicznych, neurohormonalnych i hormonalnych, w wyniku czego następuje podwyższenie ciśnienia tętniczego krwi³⁶. W modelach eksperymentalnych zaobserwowano, iż nadmierna podaż sodu nawet przy nieznacznym uszkodzeniu nerek skutkuje indukcją NT⁴³.

1.2.3. Naczynia krwionośne

Podstawowym mechanizmem hemodynamicznym odpowiedzialnym za stopniowy wzrost ciśnienia tętniczego krwi jest zwiększenie oporu obwodowego. NT powoduje wzrost naprężenia naczyń krwionośnych, na który ściany dużych tętnic reagują przerostem mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC) i przydanki, natomiast małe naczynia krwionośne podlegają eutroficznemu koncentrycznemu przemodelowaniu, które prowadzi do zmniejszenia ich średnicy^{24,44}.

Jedną z kluczowych substancji kontrolujących napięcie ściany naczyń jest tlenek azotu (NO) produkowany przez śródbłonkową syntazę tlenu azotu (eNOS). NO aktywuje cyklazę guanylanową w VSMC, powodując zwiększenie cGMP i aktywację zależnych

od niej kinaz białkowych prowadzących do rozkurczu naczyń krwionośnych^{24,45,46}. Przeciwną rolę do NO w naczyniach krwionośnych posiada m.in. ET-1. Wydzielana jest przez komórki śródbłonna i jest najsilniejszą ze znanych substancji kurczących naczynia krwionośne. Działa poprzez receptory ET_A znajdujące się na VSMC oraz ET_B na komórkach śródbłonna naczyniowego³⁶. Ponadto, aktywność ET-1 jest silnie powiązana z układem RAAS poprzez aktywację konwertazy angiotensyny I⁴⁷. Lokalna aktywacja RAAS w naczyniach krwionośnych odgrywa nadrzędną rolę w patogenezie NT. Angiotensyna II prowadzi do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi poprzez skurcz naczyń krwionośnych za pośrednictwem receptorów AT₁, obecnych w śródbłonku naczyniowym oraz VSMC^{24,25}. Ang II oraz aldosteron działając na naczynia krwionośne indukuje w warstwie środkowej naczyń proliferację i hipertrofię miocytów, a w warstwie środkowej i zewnętrznej produkcję kolagenu i fibronektyny przez miofibroblasty i fibroblasty, co prowadzi do zgrubienia i zwłóknienia ścian naczyń krwionośnych⁴⁸⁻⁵⁰.

Istotną rolę w patogenezie NT odgrywa stres oksydacyjny w naczyniach krwionośnych. W NT stwierdza się zwiększoną, zależną od Ang II, produkcję anionu nadadtlenkowego wytwarzanego przez oksydazę NADPH⁵¹. Oksydaza NADPH jest oksydazą flawinową katalizującą utlenianie tlenu cząsteczkowego do anionu nadadtlenkowego. Wyróżnia się 7 homologów oksydazy NADPH (NOX1 - 5 oraz Duox1 i Duox2)^{52,53}. Komórki śródbłonna naczyniowego wykazują ekspresję NOX 1, 2, 5, natomiast VSMC NOX 1, 4, 5⁵⁴. Ekspresja podjednostek oksydazy NADPH wzrasta w NT⁵⁵, a usunięcie NOX1⁵⁶, NOX2^{57,58} lub p47phox^{59,60} prowadzi do redukcji ciśnienia tętniczego krwi oraz zmniejszenia naczyniowego stresu oksydacyjnego. Natomiast odwrotny skutek przynosi usunięcie NOX4⁶¹. RFT mogą stymulować proliferację, migrację oraz apoptozę komórek naczyń krwionośnych, a także promować powstawanie stanu zapalnego w naczyniach krwionośnych⁶².

Spowodowany stresem oksydacyjnym spadek biodostępności NO wydaje się mieć szczególne znaczenie w rozwoju NT. Zmniejszoną produkcję NO zaobserwowano w aortach szczurów z NT⁶³. Natomiast Tschudi i wsp. stwierdzili prawidłowe wydzielanie NO i jego zwiększoną degradację pod wpływem anionorodnika nadadtlenkowego w naczyniach krezkowych szczurów z NT⁶⁴. Wykazano, że w stanach niedoboru L-argininy oraz tetrahydrobiopteryny, również eNOS staje się źródłem anionorodnika nadadtlenkowego^{24,65}. Zmniejszenie wytwarzania NO prowadzi do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i związanej z nią upośledzenia rozkurczu naczyń krwionośnych⁴⁵. W wielu badaniach wykazano, że dysfunkcja śródbłonna

jest niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych²⁴. Oprócz niekorzystnego działania stresu oksydacyjnego, dysfunkcja śródbłonna naczyniowego u chorych na NT powiązana jest z upośledzeniem metabolizmu NO spowodowanego wzrostem endogennego inhibitora syntazy tlenu azotu ADMA (ang. *asymmetric dimethylarginine*)⁶⁶. Zmniejszona biodostępność NO prowadzi do zwiększenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1, CD40) zwiększając przyleganie leukocytów do ściany naczyń krwionośnych rozpoczynając tym samym reakcję zapalną⁶⁷.

1.3. Rola układu odpornościowego w patogenezie nadciśnienia tętniczego

Koncepcja dotycząca roli układu odpornościowego w patogenezie NT została opisana ponad 50 lat temu. Wówczas Grollman i White wykazali, że leki immunosupresyjne obniżają ciśnienie tętnicze krwi u szczurów z częściowym zawałem nerki⁶⁸. Transfer komórek wyizolowanych z węzłów chłonnych⁶⁹ lub śledziony⁷⁰ pochodzących od szczurów z NT do szczurów normotensyjnych wpływa na wzrost ciśnienia tętniczego u biorców. Transfer grasicy od szczura normotensyjnego (Wistar) do szczura SHR (ang. *spontaneously hypertensive rat*), który spontanicznie rozwija NT wraz z wiekiem, opóźnia rozwój NT⁷¹. Podanie ekstraktu z grasicy lub hormonu tymozyny obniża ciśnienie tętnicze krwi u dorosłych szczurów SHR⁷². Również zastosowanie leku immunosupresyjnego, zmniejszającego poziom limfocytów T i B, normalizuje ciśnienie krwi u szczurów SHR. Spadkowi ciśnienia tętniczego krwi towarzyszy redukcja stresu oksydacyjnego oraz regres w infiltracji nerek przez komórki zapalne⁷³.

1.3.1. Rola limfocytów w patogenezie nadciśnienia tętniczego

Bezpośrednich dowodów na udział limfocytów T w patogenezie NT dostarczyły prace z wykorzystaniem myszy genetycznie modyfikowanych wykazujących dysfunkcję układu odpornościowego. Guzik i wsp. wykazali, że myszy RAG-1^{-/-}, pozbawione limfocytów T i B, nie wykształcają NT w odpowiedzi na ciągłą infuzję Ang II lub octanu dezoksykortykosteronu (DOCA-salt, ang. *desoxycorticosterone acetate*). Ponadto transfer limfocytów T, a nie B, przywracał wzrost ciśnienia tętniczego krwi

u tych myszy⁷⁴. Podobne zjawisko, dotyczące roli limfocytów T w rozwoju NT, zaobserwowane zostało przez inne zespoły z wykorzystaniem myszy *scid*⁷⁵ oraz szczurów RAG-1-/-⁷⁶.

Interesujących wyników wskazujących na rolę limfocytów T w patogenezie NT dostarczają prace dotyczące roli *lnk* znajdującego się na powierzchni komórek hematopoetycznych. Badania GWAS (ang. *genome-wide association studies*) wykazały, że mutacja genu kodującego *lnk* (ang. *lymphocyte adaptor protein*) jest powiązana z występowaniem chorób układu sercowo-naczyniowego, włączając NT⁷⁷. Białko LNK pełni rolę „hamulca” w proliferacji i sygnalingu za pośrednictwem cytokin u leukocytów. Utrata genu *lnk* nie powoduje zmian ciśnienia krwi u myszy kontrolnych natomiast infuzja Ang II (490 ng/kg/min) powoduje wzrost ciśnienia tętniczego krwi o 35 mmHg w porównaniu z myszami WT (myszy szczepu dzikiego, ang. *wild-type*) po infuzji Ang II. Na uwagę zasługuje fakt, że dawka 140ng/kg/min, która nie prowadzi do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi u myszy WT, powoduje indukcję ciśnienia tętniczego krwi do poziomu 180 mmHg u myszy *Lnk*-/-⁷⁸.

Angiotensyna II odgrywa kluczową rolę w rozwoju NT. Działa ona za pośrednictwem receptorów (AT₁ i AT₂), które zidentyfikowano na powierzchni limfocytów T. Transfer limfocytów T pozbawionych receptora AT₁ do myszy RAG-1-/- nie skutkuje wzrostem ciśnienia tętniczego krwi⁴⁹. Infuzja Ang II *in vivo* zwiększa ekspresję markerów powierzchniowych (CD69, CD44^{Hi} oraz CCR5) na krążących efektorowych limfocytach T, które następnie infiltrują nerki oraz okołonaczyniową tkankę tłuszczową (pvAT)⁷⁴. Stymulacja limfocytów T Ang II *in vitro* w obecności przeciwciał anti-CD3 nasila proliferację oraz zwiększa ekspresję markerów wczesnej (CD69) i późnej aktywacji (CD25) jak również receptora CCR5⁷⁹.

Badania ostatnich lat dostarczają szeregu dowodów na rolę limfocytów T w zmianach patologicznych naczyń krwionośnych takich jak: hipertrofia, zwłóknienie ściany naczyń krwionośnych oraz dysfunkcja śródbłoka naczyniowego spowodowanego zaburzeniem wydzielania NO lub/i zwiększonym stresem oksydacyjnym w naczyniach krwionośnych. Upośledzony rozkurcz naczyń krwionośnych w odpowiedzi na acetylocholinę obserwowany jest w wielu zwierzęcych modelach NT^{50,58,74,80}. Myszy pozbawione limfocytów T chronione są przed upośledzeniem funkcji śródbłoka naczyniowego, stresem oksydacyjnym oraz zwłóknieniem naczyń krwionośnych w NT zależnym od soli DOCA lub Ang II^{49,74}. Natomiast myszy *Lnk*-/-, charakteryzujące się zwiększoną aktywacją limfocytów T,

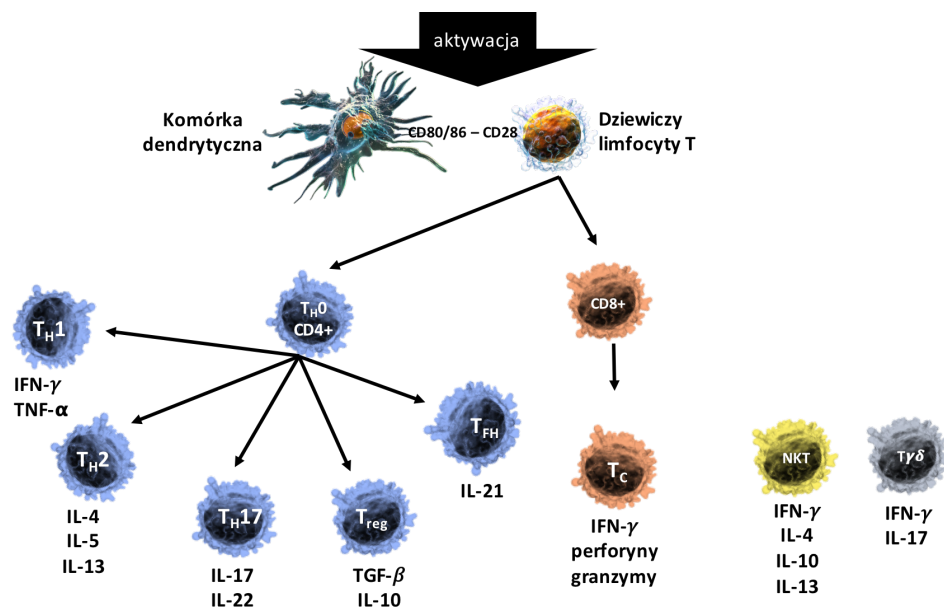
wykazują zwiększone upośledzenie rozkurczu naczyń krwionośnych oraz nasiloną produkcję anionorodnika ponadtlenkowego w porównaniu z myszami WT po infuzji Ang II⁷⁸. Wykazano również rolę limfocytów T w NT indukowanym stresem. Chroniczny stres podwyższa ciśnienie tętnicze krwi oraz skutkuje zwiększoną aktywacją krążących limfocytów T u myszy. Myszy RAG-1^{-/-} chronione są przed wzrostem ciśnienia tętniczego krwi wywołanego stresem, a transfer limfocytów T znosi ten efekt⁸¹. Szczególnym rodzajem NT jest tzw. stan przedzucawkowy (ang. *preeclampsia*) występujący u kobiet w ciąży. Rola limfocytów T w tym patologicznym stanie jest dobrze udokumentowana⁸². Transfer limfocytów T od ciężarnych szczurów z NT podnosi ciśnienie tętnicze krwi szczurom normotensyjnym. Natomiast zastosowanie losartanu, antagonisty receptora AT₁, chroni te zwierzęta przed indukcją NT⁸³.

Drugą grupę limfocytów stanowią limfocyty B, które odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi typu humoralnego poprzez rozpoznawanie i przetwarzanie antygenów oraz produkcję przeciwciał⁸⁴.

Jak wykazały badania z wykorzystaniem myszy RAG-1^{-/-}, limfocyty B nie były kluczowe do indukcji NT zależnego od Ang II⁷⁴. Jednak do zainicjowania aktywacji limfocytów B konieczny jest udział pomocniczych limfocytów T, których myszy RAG-1^{-/-} nie posiadają. Ang II zwiększa liczbę zaktywowanych limfocytów B w osoczu oraz organach limfatycznych⁸⁵. Pierwotne oraz ciążowe NT powiązane jest ze zwiększoną ilością przeciwciał IgG, IgA oraz IgM w serum pacjentów⁸⁴ oraz zwierząt^{85,86} z NT. Podawanie przeciwciał AT₁-AA, wyizolowanych od ludzi, powoduje wzrost ciśnienia tętniczego u myszy⁸⁷. Genetyczne (BAFF-R^{-/-}) lub farmakologiczne (anty-CD20) usunięcie limfocytów B skutkuje spadkiem ciśnienia tętniczego krwi około 15mmHg w porównaniu z myszami posiadającymi funkcjonalne limfocyty B w NT zależnym od Ang II. Natomiast, repopulacja limfocytów B przywraca ciśnienie tętnicze krwi do poziomu obserwowanego u myszy C57BL6⁸⁵. Transfer pomocniczych limfocytów T pochodzących od zwierzęcia z nadciśnieniem ciążowym do zwierzęcia normotensyjnego skutkuje wzrostem ciśnienia tętniczego krwi oraz produkcją przeciwciał AT₁-AA przez limfocyty B, natomiast blokada receptora AT₁ znosi ten efekt⁸³.

1.3.1.1. Rola subpopulacji limfocytów T w patogenezie nadciśnienia tętniczego

Podstawą klasyfikacji limfocytów T jest występowanie na ich powierzchni receptorów TCR, antygenów MHC oraz receptorów różnicowania CD (ang. *cluster differentiation*). Na tej podstawie wyodrębniono limfocyty pomocnicze (CD4+) rozpoznające MHC klasy II oraz cytotoksyczne (CD8+) rozpoznające MHC klasy I. W zależności od budowy receptora TCR wyróżnia się limfocyty $T\alpha\beta$ oraz $T\gamma\delta$. Natomiast ze względu na wydzielane przez nie substancje i pełnione funkcje wśród limfocytów T wyodrębniono: limfocyty cytotoksyczne (T_C), limfocyty pomocnicze (T_H) oraz limfocyty regulatorowe (T_{reg}) (Ryc. 2)^{88,89}.



Ryc. 2. Klasyfikacja subpopulacji limfocytów T.

Limfocyty cytotoksyczne charakteryzują się występowaniem receptorów CD3 oraz CD8. Wydzielając perforyny, granzymy oraz IFN- γ wykazują zdolność cytotoksyczności i zabijania patogenów⁸⁸. Myszy pozbawione limfocytów CD8+ (CD8-/-)⁹⁰ lub charakteryzujące się upośledzeniem funkcji tej subpopulacji poprzez usunięcie transkrypcyjnego regulatora Id2 (ang. *inhibitor of DNA binding 2*) chronione są przed indukcją NT⁹¹. Podobnie transfer limfocytów CD8+, a nie CD4+CD25-, indukują NT u myszy RAG-1-/- w odpowiedzi na Ang II⁹⁰.

W ustroju występuje grupa limfocytów cytotoksycznych, których receptory antygenowe mają ograniczoną różnorodność, brak specyficznej lokalizacji oraz nie wykazują ekspansji klonalnej w odpowiedzi na napotkany antygen. Limfocyty tej klasy określane są mianem limfocytów odpowiedzi nieswoistej i należą do nich limfocyty $T\gamma\delta$ oraz NKT⁹². Limfocyty $T\gamma\delta$ stanowią heterogenną subpopulację limfocytów T. Większość jest podwójnie negatywna (CD4-CD8-)⁹². Limfocyty $T\gamma\delta$ uczestniczą w odpowiedzi przeciwzakaźnej i odpowiedzi przeciwnowotworowej. Mogą zabijać inne komórki, a także uczestniczyć w regulacji odpowiedzi immunologicznej przez wydzielanie cytokin (np. IFN- γ , IL-17). Znaczna część limfocytów $T\gamma\delta$ przejawia zdolność do spontanicznej cytotoksyczności, niepodlegającej restrykcji MHC^{93,94}. Ponadto limfocyty $T\gamma\delta$ wykazują zdolność do prezentacji antygenów, podobnie jak komórki dendrytyczne⁹⁵. Brak limfocytów $T\gamma\delta$ chroni myszy przed indukcją NT, dysfunkcją śródbłonka naczyniowego oraz przebudową naczyń krwionośnych w modelu NT zależnego od Ang II⁹⁶.

Limfocyty NKT to subpopulacja limfocytów $T\alpha\beta$, posiadających na swojej powierzchni marker NK1.1, który jest typowy dla komórek NK. Większość limfocytów NKT jest podwójnie negatywna (CD4-CD8-). Komórki te produkują cytokiny przeciwzapalne IL-4, IL-10 oraz IL-13, jak również prozapalny IFN- γ ⁹². Kirabo i wsp. wykazali, że limfocyty NKT nie odgrywają roli w indukcji NT zależnego od Ang II⁹⁷.

Wśród limfocytów T pomocniczych wyróżnia się limfocyty naiwne T_H0 , które po zetknięciu z antygenem przekształcają się w limfocyty efektorowe T_H1 , T_H2 , T_H17 oraz T_{FH} . T_H1 uczestniczą w odpowiedzi typu komórkowego wydzielając IFN- γ oraz TNF- α . Limfocyty T_H2 produkując IL-4, -5, -13 warunkują odpowiedź typu humoralnego. Limfocyty T_H17 charakteryzują się produkcją IL-17 oraz IL-22. Natomiast w tkankach limfatycznych znajdują się limfocyty T_{FH} (*T follicular helper*) wydzielające IL-21, których funkcja wiąże się z aktywacją limfocytów B^{89,98-100}. Efektorowe subpopulacje T_H1 , T_H2 , T_H17 oraz T_H2 odpowiadają za aktywację, podczas gdy T_{reg} hamują odpowiedź komórek układu odpornościowego⁸⁹. Nadciśnienie tętnicze promuje polaryzację limfocytów T w kierunku T_H1 natomiast zmniejsza polaryzację w kierunku limfocytów T_H2 ¹⁰¹. Genetyczne usunięcie genów odpowiedzialnych za produkcję cytokin przez limfocyty T_H1 (IFN- γ , TNF- α) chroni zwierzęta przed indukcją NT oraz/lub końcowemu uszkodzeniu narządów spowodowanych działaniem Ang II^{102,103}.

Limfocyty T_H17 posiadają receptory błonowe CD3 i CD4 oraz receptor jądrowy ROR γ t (ang. *retinoid-related orphan receptor*), którego brak hamuje wytwarzanie IL-17⁹⁴. Limfocyty T_H17, różnicujących się z naiwnych limfocytów CD4⁺ pod wpływem IL-23 poprzedzonej działaniem IL-6 oraz TGF- β 1. Ponadto ważną rolę w aktywacji tych komórek odgrywa czynnik transkrypcyjny STAT3^{89,104-106}. Limfocyty T_H17 odgrywają nadrzędną rolę w odporności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej. Wydzielając IL-17 aktywują monocyty, komórki nabłonkowe i fibroblasty do wytwarzania chemokin i cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α), które działają chemotaktycznie na komórki układu odpornościowego¹⁰⁷. Zaobserwowano zwiększoną aktywację oraz wzrost liczby limfocytów T_H17 w NT zależnym od Ang II oraz soli DOCA^{105,108}. Również zwiększone spożycie soli (NaCl), które stanowi czynnik ryzyka NT¹⁰⁹, prowadzi do zwiększenia ich liczby u ludzi oraz zwierząt eksperymentalnych poprzez aktywację szlaku p38/MAPK¹¹⁰. Regulatorowe limfocyty T (T_{reg}) charakteryzują się występowaniem ekspresji markerów powierzchniowych CD4⁺CD25⁺ oraz wewnątrzkomórkowego czynnika transkrypcyjnego Foxp3¹⁰⁶. Stanowią one około 5-10% krążących limfocytów CD4⁺. W zależności od ich funkcji i miejsca pochodzenia dzieli się je na naturalne (nT_{reg}) powstające w grasicy oraz indukowalne (iT_{reg}) powstające z dziewiczych limfocytów T na obwodzie⁸⁹. Komórki T_{reg} hamują proliferację limfocytów efektorowych oraz wydzielanie przez nie cytokin prozapalnych. Ich główną funkcją jest kontrolowanie i hamowanie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej^{89,111}. Schiffrin jako pierwszy wskazał na protekcyjną rolę T_{reg} u szczurów z genetycznie uwarunkowanym NT. Wykorzystując szczury konsomiczne wykazał, że transfer chromosomu 2 (zawierającego geny prozapalne) od szczura normotensyjnego (Brown Norway) do szczura hipertensyjnego (Dalh salt-sensitive) redukuje ciśnienie tętnicze krwi zwiększając poziom limfocytów T z ekspresją Foxp3¹¹². Angiotensyna II wywiera bezpośredni wpływ na spadek limfocytów regulatorowych. Hodowla T_{reg} z Ang II w warunkach *in vitro* zwiększa apoptozę tych komórek. Natomiast zastosowanie antagonisty receptora AT₁ znosi ten efekt¹¹³. Również w toku rozwoju eksperymentalnego NT zależnego od Ang II dochodzi do spadku poziomu T_{reg}¹¹³. Zaobserwowano, że wzrostowi ciśnienia tętniczego krwi o 43 mmHg, po infuzji Ang II, towarzyszył 43% spadek komórek Foxp3 w nerkach¹¹⁴. Redukcję ekspresji Foxp3 zaobserwowano również w szczurzym modelu NT wyindukowanego solą DOCA¹⁰⁵. Transfer T_{reg} do myszy z NT nie tylko obniża ciśnienie tętnicze krwi^{114,115} ale również redukuje sztywność naczyń krwionośnych,

zmniejsza produkcję anionorodnika ponadtlenkowego, a także hamuje infiltrację nerek przez komórki zapalne^{113,114}.

I.3.2. Rola komórek dendrytycznych w patogenezie nadciśnienia tętniczego

Wyróżnia się dwa typy komórek dendrytycznych (DC): klasyczne DC, odpowiedzialne za prezentację antygenów limfocytom T oraz plazmocytoidalne DC, będące głównym producentem interferonów typu I⁸⁹. DC wydzielają szereg interleukin (IL-1, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18), chemokin (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5) oraz cytokin (TGF- β , IFN- α , IFN- γ , TNF), które mogą modulować funkcję i chemotaksję komórek układu odpornościowego¹¹⁶. Komórki dendrytyczne przetwarzają i prezentują antygeny naiwnym limfocytom T za pośrednictwem cząsteczek współstymulujących CD80 oraz CD86 (B7-1 oraz B7-2). Cząsteczki te stanowią ligand dla CD28 i homologicznej z nią CTLA-4 pojawiającej się po aktywacji limfocytów T¹¹⁷. Nadciśnienie tętnicze zwiększa ekspresję ligandów B7 na powierzchni DC, co prowadzi do zwiększonej aktywacji limfocytów T¹¹⁸. Wykazano, że DC uzyskane od myszy z NT promują proliferację i polaryzację limfocytów T w kierunku T_H1 w warunkach *in vitro*⁹⁷. Zastosowanie przeciwciała anti-CTLA-4-Ig bądź genetyczne usunięcie B7 zapobiega aktywacji limfocytów T, a także chroni zwierzęta eksperymentalne przed wykształceniem NT zależnego od soli-DOCA oraz Ang II. Również podawanie przeciwciała anti-CTLA-4-Ig zwierzętom z wyindukowanym NT powoduje istotny spadek poziomu ciśnienia tętniczego krwi. Blokada interakcji B7-CD28 skutkuje zmniejszonym naciekiem leukocytów, w szczególności limfocytów T do tkanek okołonaczyniowych w porównaniu do myszy kontrolnych¹¹⁸. Pod wpływem działania RFT, których wzmożoną produkcję obserwuje się w NT, może dochodzić do formowania tzw. neantygenów, które następnie prezentowane są przez DC limfocytom T^{23,97,119}. Również, Ang II zwiększa produkcję anionorodnika ponadtlenkowego przez DC *in vivo* oraz *in vitro* w sposób zależny od NOX2⁹⁷.

1.3.3. Rola monocytów/makrofagów w patogenezie nadciśnienia tętniczego

Monocyty reprezentują 3-8% leukocytów krwi obwodowej. Odgrywają one kluczową rolę w odporności immunologicznej, stanach zapalnych oraz przebudowie tkanek¹²⁰. Monocyty charakteryzują się wysoką „plastycznością” i po przedostaniu się do tkanek różnicują się w makrofagi^{120,121} oraz DC¹²².

Makrofagi zalicza się do komórek fagocytujących, które rezydują w tkankach limfatycznych i nielimatycznych. Ich fundamentalną rolą jest utrzymanie homeostazy w tkankach poprzez usuwanie fragmentów martwych komórek lub bakterii jak również aktywny udział w regeneracji tkanek i procesach zapalnych^{89,123}.

Wykazano, że w toku rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego dochodzi do zwiększonej akumulacji monocytów oraz makrofagów w krążeniu obwodowym oraz narządach takich jak aorta czy nerki. Ich rola została dobrze poznana w miażdżycy i obecnie uznaje się je za kluczowy element w każdym stadium tej choroby^{124,125}.

Ostatnie lata badań wskazują na rolę układu wrodzonego w patogenezie NT. Nadciśnienie tętnicze zależne od Ang II powoduje akumulację monocytów Ly6C^{hi}, natomiast podanie liposomów zawierających kłodronat, działający cytotoksycznie na monocyty, prowadzi do spadku ciśnienia tętniczego krwi o około 20 mmHg w porównaniu do myszy otrzymujących liposomy kontrolne¹²¹. Podobne wyniki uzyskał Wenzel i wsp. dokonując ablacji monocytów LysM⁺¹²⁶. Usunięcie monocytów z krwioobiegu, oprócz spadku ciśnienia tętniczego krwi, przeciwdziałało szkodliwym działaniom Ang II na naczynia krwionośne takie jak; dysfunkcja śródbłonna naczyniowego, stres oksydacyjny oraz przebudowa naczyń krwionośnych^{121,126}. Ponowny transfer monocytów przywracał nadciśnieniowy fenotyp u myszy¹²⁶.

Makrofagi mogą rezydować w wielu tkankach i narządach uwalniając szereg chemokin, czynników wzrostu, a także być źródłem RFT^{124,125}. Ponadto makrofagi, podobnie jak DC, mają zdolność do prezentacji antygenów limfocytom T przez co mogą stymulować je do produkcji cytokin prozapalnych¹²⁷. Wykazano, że w toku rozwoju NT dochodzi do zwiększonej akumulacji makrofagów w nerkach oraz tkankach okołonaczyniowych. Myszy z deficytem naczyniowych makrofagów spowodowanych mutacją genu *mCSF* nie są zdolne do wykształcenia NT zależnego od Ang II oraz soli DOCA¹²⁸. Ze względu na ich funkcję makrofagi dzielą się na subpopulacje M1 oraz M2. Makrofagom M1 przypisuje się funkcję prozapalną, natomiast M2 mediuje odpowiedź przeciwzapalną. Makrofagi M1 produkują IL-12 oraz IL-23,

które są kluczowe dla polaryzacji limfocytów T_H1 oraz T_H17. Tymczasem, subpopulacja M2 wykazuje produkcję IL-10 i uczestniczy w odpowiedzi typu T_H2¹²⁹. W NT Moore i wsp. powiązali zwiększoną liczbę makrofagów M2 ze wzmożoną produkcją kolagenu oraz spadkiem elastyny w naczyniach krwionośnych myszy z NT¹²¹.

1.3.4. Rola komórek NK w patogenezie nadciśnienia tętniczego

Komórki NK pochodzą z wspólnej komórki progenitorowej limfocytów, a ich główną funkcją jest naturalna cytotoksyczność poprzez zabijanie komórek nowotworowych bądź zainfekowanych przez wirusy¹¹⁷.

U ludzi stanowią około 15% wszystkich leukocytów i definiowane są na podstawie ekspresji CD56 oraz braku receptora dla CD3¹³⁰. U myszy fenotypuje się je na podstawie unikalnego markera NK1.1, podczas gdy szurze komórki NK posiadają wysoką ekspresję CD161 przy jednoczesnym braku markera CD3^{131,132}. Poza limfocytami T, uważa się je za główne źródło IFN- γ . Ponadto produkują również IL-1 β , TNF, granzym B oraz perforinę¹³¹⁻¹³³.

Redukcja liczby komórek NK opisana została u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca oraz ostrym zespołem wieńcowym¹³¹. Natomiast zwiększoną ich liczbę zaobserwowano w blaszce miażdżycowej u ludzi i zwierząt^{130,134}, a ich usunięcie znacząco redukowało rozwój miażdżycy w modelach eksperymentalnych¹³⁰. Pomimo iż rola komórek NK w miażdżycy staje się oczywista ich udział w patogenezie NT nie jest do końca wyjaśniony. Zwiększona liczbę komórek NK w krwi obwodowej oraz łożysku opisano u ciężarnych szczurów SHRSP w porównaniu z ciężarnymi szczurami WKY¹³². Zahamowanie prawidłowej funkcji komórek NK, przy użyciu przeciwciała monoklonalnego NK1.1 osłabia dysfunkcję śródbłonna naczyniowego, spowodowaną infuzją Ang II¹²⁷, która jest jedną z przyczyn powstawania NT.

1.3.5. Rola neutrofilii patogenezie nadciśnienia tętniczego

Neutrofile stanowią około 90% krążących granulocytów, a ich główną rolą jest ochrona organizmu przeciwko zakażeniom bakteryjnym. Neutrofile stanowią źródło anionorodnika ponadtlenkowego (w trakcie wybuchu tlenowego), mogąc wpływać na spadek biodostępności NO w naczyniach krwionośnych¹¹⁷.

Morton i wsp. usuwając krążące neutrofile u myszy (podając przeciwciała RB6-8C5) zauważył spadek ciśnienia tętniczego krwi o 16 mmHg w porównaniu do myszy kontrolnych. Aorty myszy, którym podawano RB6-8C5 wykazały zahamowanie skurczu w odpowiedzi na fenylefrynę w porównaniu do aort myszy kontrolnych¹³⁵. Na potencjalną rolę neutrofilów w regulacji ciśnienia krwi może stanowić również przykład dziedzicznej neutropeni u Jemeńczyków, której towarzyszy niewielki, aczkolwiek istotny 2-3 mmHg spadek ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi¹³⁵. Z drugiej strony, farmakologiczna neutropenia nie chroni zwierząt przed NT wywołanym Ang II¹³⁶.

1.3.6. Dowody kliniczne na udział układu odpornościowego w patogenezie nadciśnienia tętniczego

Pomimo iż wyniki z badań eksperymentalnych wskazują na kluczową rolę komórek układu odpornościowego w patogenezie NT nadal niewiele wiadomo jakie to ma dokładne przełożenie kliniczne. Niemniej jednak badania z wykorzystaniem humanizowanych myszy, które posiadają ludzki układ odpornościowy, wydają się potwierdzać rolę komórek układu odpornościowego w patogenezie NT. Humanizowane myszy pod wpływem działania Ang II wykształcają NT oraz wykazują zwiększoną aktywację limfocytów T, które infiltrują nerki oraz pvAT tych zwierząt. Ponadto, podobnie jak u ludzi z NT, myszy te charakteryzowały się wzrostem limfocytów T pamięci (CD3+CD45RO+) pod wpływem działania Ang II¹³⁷. Zwiększoną liczbę leukocytów, a także korelację ich liczby z wysokością skurczowego ciśnienia tętniczego krwi wykazano w badaniach NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*)¹³⁸. Pacjenci zarażeni wirusem HIV charakteryzują się zmniejszoną częstotliwością wystąpienia wysokiego ciśnienia tętniczego¹³⁹. Podobnie przyjmowanie leków wywierających działanie cytotoksyczne na limfocyty i prowadzi do spadku ciśnienia tętniczego krwi u pacjentów z łagodnym NT³. Podwyższone ciśnienie tętnicze krwi towarzyszy pacjentom po infuzji zaktywowanych limfocytów T¹⁴⁰. W ostatnich latach u pacjentów z NT zidentyfikowano wzrost liczby cytotoksycznych limfocytów T CD57+ nieposiadających markera CD28 (CD8+CD57+CD28^{null}), który jest niezbędny do pełnej aktywacji limfocytarnej. CD28^{null} oraz CD57+ uważa się za markery starzenia się limfocytów T. Starzejące się limfocyty wykazują zwiększoną cytotoksyczność oraz produkcję cytokin

prozapalnych¹⁴¹. Cytokiny takie jak; TNF, IFN- γ , IL-6 oraz IL-17 wzrastają u ludzi z NT i niejednokrotnie służą jako marker chorób sercowo-naczyniowych^{137,142-146}.

Wprowadzenie nowoczesnych narzędzi diagnostycznych z dziedziny biologii molekularnej przyczyniło się do wyjaśnienia genetycznych mechanizmów NT. Wykryto liczne polimorfizmy genów kandydatów NT kodujących np. angiotensynogen, enzymy konwertujące angiotensynę, receptory dla angiotensyny czy też receptory adrenergiczne²⁴. Badania GWAS (ang. *genome-wide association studies*) wykazały związek pomiędzy NT a polimorfizmami genów powiązanych z funkcjonowaniem limfocytów T: HLA-DQB1 kodującego MHC klasy II, SH2B3 kodującego LNK oraz CD247 kodującego łańcuch zeta TCR¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Badania molekularne wskazały również na powiązanie NT z polimorfizmami cytokin takich jak; TNF, IL-6 oraz IL-10, które są produkowane przez komórki układu odpornościowego¹⁵⁰⁻¹⁵².

1.4. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa

Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa (pvAT) zlokalizowana jest na zewnątrz przydanki i otacza wszystkie naczynia krwionośne, za wyjątkiem naczyń mózgowych¹⁵³. U gryzoni pvAT otaczający aortę piersiową skomponowany jest głównie z brunatnej tkanki tłuszczowej, tłuszcz otaczający aortę brzuszną stanowi mieszaninę białej i brunatnej tkanki tłuszczowej, natomiast naczynia krezkowe otoczone są typową białą tkanką tłuszczową¹⁵⁴. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa u ludzi pod względem histologicznym bardziej przypomina białą tkankę tłuszczową. Niemniej jednak w porównaniu do typowej białej tkanki tłuszczowej wykazuje istotne różnice pod względem profilu ekspresji genów jak i białek. Co więcej, profil ten jest bardziej zbliżony do brunatnej tkanki tłuszczowej¹⁵³. Charakterystyczny kolor tkanki tłuszczowej uwarunkowany jest od liczby mitochondriów. Brunatnej tkance tłuszczowej przypisuje się rolę termoregulacyjną, natomiast białą uważa się za rezerwuar energetyczny. Oba rodzaje tkanki tłuszczowej znajdują się pod kontrolą współczulnego układu nerwowego, przy czym tkanka brunatna jest tkanką bardziej unerwioną. Różnice w budowie histologicznej i profilu metabolicznym oraz pochodzenie z różnych komórek prekursorowych powiązane jest ze zróżnicowanymi właściwościami

immunologiczno-zapalnymi białej i brunatnej tkanki tłuszczowej^{155,156}.
 Porównanie rodzajów tkanki tłuszczowej zestawiono w tabeli nr 2.

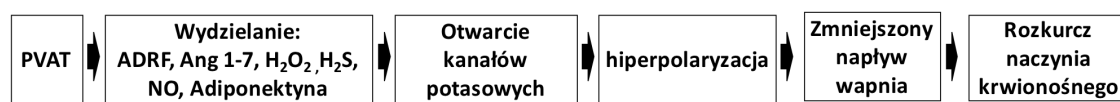
Tabela 2. Zestawienie typów tkanki tłuszczowej.

	WAT	BAT	PVAT	Literatura
Lokalizacja	Podskórna, trzewna	Okołonerkowa, międzyłopatkowa, okolice karku	Otacza naczynia krwionośne	¹⁵⁴
Morfologia	Duże adipocyty	Małe adipocyty	Małe adipocyty	^{157,158}
Krople tłuszczu	Pojedyncze, duże	Wiele, małe	Wiele, małe	^{153,154,157}
Pochodzenie (prekursor)	Pdgfr- α	Myf5+	SM22 α +	^{154,156}
Główna funkcja	Gromadzenie energii	Produkcja ciepła	Utrzymanie homeostazy naczyń krwionośnych, produkcja ciepła	^{153,156}
Aktywność metaboliczna	+	+++		^{159,160}
Mitochondria/UCP-1	+/+ (na granicy detekcji)	+++/>+++	++(+)	¹⁵⁷
Geny specyficzne dla tkanki	PPAR γ , PLIN1, HOXC8, TCF21, TLE3, C/EBP α , Rb, RIP140, APOL7C, DAPL1, NANT, SNCG, STAP1, GRAP2, MEST	ZIC1, LHX8, EVA1, PDK4, EPSTI1, PRDM16, CIDEA, ELOVL3, SCL27A2, COX7A1, CPT1B, KNG2m ACOT11, DIO2, BMP7	Podobny do BAT	^{156,157,161}

Przez wiele lat tkanka tłuszczowa otaczająca naczynia krwionośne postrzegana była wyłącznie jako rezerwuuar energetyczny, przypisywano jej rolę izolatora ciepłego bądź uważano, że pełni rolę wyłącznie podporową dla naczyń krwionośnych. Obecnie w świetle najnowszych badań postrzegana jest jako endokryny organ uwalniający do krążenia szereg substancji o charakterze regulującym jak i zapalnym¹⁵⁹.

1.4.1. Rola tkanki tłuszczowej w regulacji napięcia naczyń krwionośnych

Naczynie krwionośne pozbawione pvAT charakteryzuje się większym skurczem w porównaniu do naczynia otoczonego pvAT w odpowiedzi na noradrenalinę, fenylefrynę, serotoninę oraz Ang II¹⁵⁹. Nadsącz (ang. *conditioned media*) uzyskany z pvAT wykazuje właściwości naczynio-rozkurczowe¹⁵⁹. Verlohren i wsp. wykazali pozytywną korelację pomiędzy ilością pvAT a rozkurczem naczyń krwionośnych¹⁶². Przeciwskurczowa rola pvAT przypisywana jest między innymi, wciąż niezidentyfikowanemu, tłuszczopochodnemu czynnikowi rozkurczowemu ADRF (ang. *adipocyte-derived relaxing factor*). Funkcję ADRF mogą pełnić Ang 1-7, H₂O₂, siarkowodór (H₂S), kwas palmitynowy, prostacyklina oraz adiponektyna¹⁶³. Substancje te działają hamująco na skurcz naczyń krwionośnych poprzez wydzielanie NO przez komórki śródbłonna naczyniowego lub/i za pośrednictwem kanałów potasowych zlokalizowanych w VSMC¹⁶⁴ (Ryc. 3). Wykazano również ekspresję eNOS, jak i zdolność do wydzielania NO przez PVAT^{164,165}.



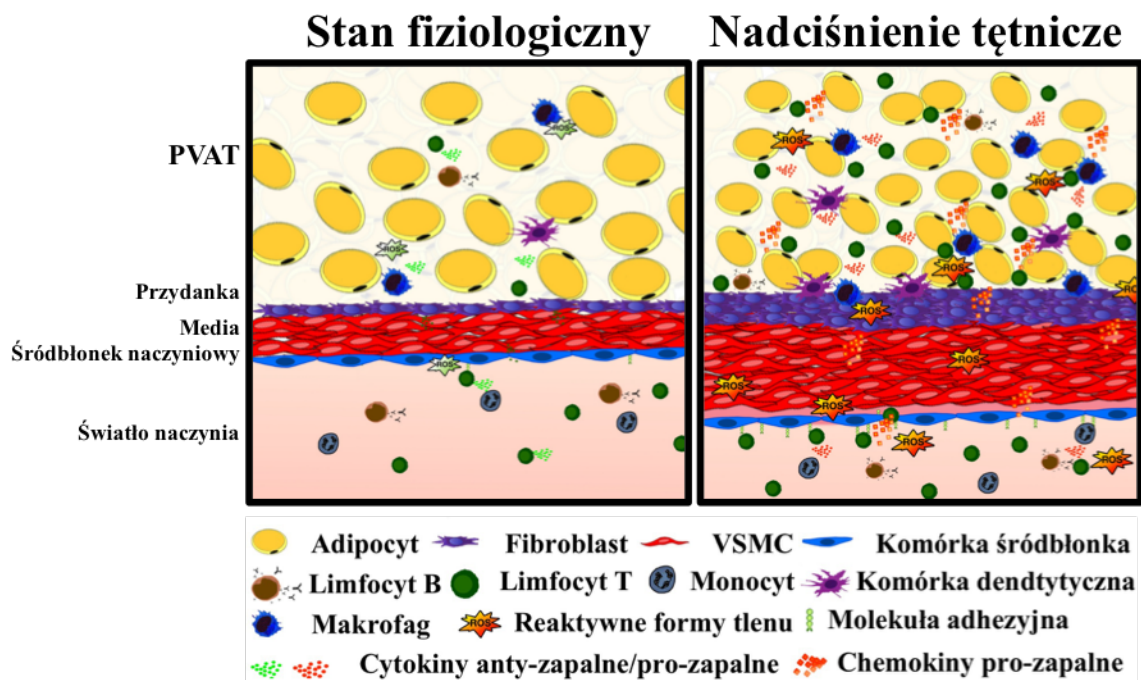
Ryc. 3. Schemat reprezentujący efekt okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej na mięśniówkę gładką naczyń krwionośnych.

1.4.2. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa jako rezerwuar komórek zapalnych

Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa poza adipocytami, które stanowią jej większość, zawiera także komórki śródbłonna naczyniowego, VSMC, fibroblasty oraz liczne komórki układu odpornościowego¹⁶⁶. W toku rozwoju NT dochodzi do wzrostu liczby komórek infiltrujących pvAT (Ryc. 4). Ostatnie lata badań wskazują na zwiększoną infiltrację pvAT przez limfocyty T^{74,167}, monocyty/makrofagi⁷⁸ oraz DC¹¹⁸. Myszy pozbawione limfocytów T lub monocytów/makrofagów wykazują zmniejszony stan zapalny w odpowiedzi na czynniki pro-nadciśnieniowe^{74,126,168}, natomiast utrata genu *lnk* znacząco nasila okołonaczyniowy stan zapalny oraz akumulację leukocytów w pvAT⁷⁸. Withers i wsp. wykazali, że naczynia krwionośne, z i bez pvAT, pochodzące od myszy kontrolnych oraz pozbawionych makrofagów (CD11b-DTR) charakteryzują się takim samym skurczem w odpowiedzi na noradrenalinę. Natomiast inkubacja tych

naczyń z aldosteronem powoduje utratę przeciwskurczowej funkcji pvAT u myszy WT, a nie u CD11b-DTR¹⁶⁸. Hodowla DC, wyizolowanych z pvAT, z naiwnymi limfocytami T *in vitro* promuje różnicowanie T w kierunku prozapalnym¹⁶⁹. Okołonaczyniowy stan zapalny jest znacząco upośledzony u myszy pozbawionych zdolności do syntezy cytokin prozapalnych (np. IL-17^{-/-} oraz IL-6^{-/-}) po infuzji Ang II¹⁰⁸.

Okołonaczyniowy stan zapalny nasila neowaskularyzację (tworzenie się nowych naczyń krwionośnych) naczyń odżywczych (vaso vasorum), co prowadzi do zwiększonej dystrybucji substancji wydzielanych przez adipocyty jak również komórki rezydujące w PVAT¹⁷⁰. Leukocyty za sprawą wydzielanych cytokin mogą oddziaływać lokalnie na inne komórki lub znajdujące się w pobliżu całe narządy, natomiast przedostając się do krwioobiegu działać ogólnoustrojowo.



Ryc. 4. Graficzne porównanie okolonaczyniowej tkanki tłuszczowej w stanie fizjologicznym oraz NT.

1.4.3. Rola okolonaczyniowej tkanki tłuszczowej w rozwoju dysfunkcji śródbłonka naczyniowego i patogenezie nadciśnienia tętniczego

Jak wspomniano wcześniej pvAT w warunkach fizjologicznych wykazuje właściwości regulujące prawidłowy stan napięcia naczyń krwionośnych. Niemniej jednak w stanach patologicznych wykazuje właściwości prozapalne i wydziela

szereg substancji o charakterze naczynioskurczowym. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa posiada prawie wszystkie komponenty RAAS, za wyjątkiem reniny³⁵, jak również wykazuje ekspresję angiotensynogenu¹⁵⁵ co może świadczyć o roli tej tkanki w lokalnej produkcji Ang II, promującej skurcz naczyń krwionośnych¹⁷¹. Wykazano powiązanie zwiększonej aktywacji RAAS w pvAT z chorobami układu sercowo-naczyniowego¹⁷². Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa posiada również wszystkie elementy molekularne wymagane do produkcji RFT, wliczając w to oksydazy NADPH, eNOS oraz liczne mitochondria¹⁵⁹. Wykazano, że naczynie zawierające pvAT produkuje więcej anionorodnika ponadtlenkowego, niż naczynie pozbawione tej tkanki¹⁷³. Zwiększona produkcja RFT w pvAT otaczających naczynia kręgowo prowadzi do zwiększonego skurczu naczyń krwionośnych, a także upośledzenia rozkurczu w odpowiedzi na acetylocholinę¹⁷⁴. Redukcja przeciwskurczowego działania pvAT w NT jest powiązana ze zmniejszoną ilością substancji o charakterze rozkurczowym lub upośledzeniem działania kanałów potasowych¹⁷⁵. Ponadto w stanach patologicznych pvAT może produkować substancje promujące skurcz naczyń krwionośnych takich jak noradrenalina, prostaglandyna, prostacyklina czy tomboksan^{163,176}. Otyłość, będąca jednym z czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, powiązana jest ze zwiększoną ilością pvAT oraz występowaniem dysfunkcji naczyń oporowych¹⁷⁷, spowodowanych zwiększonym wydzielaniem mediatorów procesu zapalnego (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1) przez pvAT²⁴. Pacjenci poddani chirurgicznemu zabiegowi bariatrycznemu wykazują istotną poprawę funkcji rozkurczowej naczyń krwionośnych oraz redukcję ciśnienia tętniczego krwi po 6 miesiącach od zabiegu. Utracie masy ciała towarzyszy redukcja okołonaczyniowego stanu zapalnego oraz zwiększenie poziomu NO i adiponektyny w pvAT¹⁷⁸. Podobnie otyłe myszy wykazują spadek L-argininy, ale nie tetrahydrobiopteryny, w pvAT co skutkuje redukcją biodostępności NO, zwiększoną produkcją RFT oraz szeregiem mediatorów prozapalnych co prowadzi do upośledzenia rozkurczu naczyń krwionośnych posiadających pvAT w badaniach *ex vivo*¹⁶⁵.

1.4.4. Rola okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w procesach patofizjologicznych naczyń krwionośnych

Badania kliniczne wykazały powiązanie pvAT z zwapnieniem aorty brzusznej oraz naczyń wieńcowych serca. Kobiety z SLE (ang. *systemic lupus erythematosus*) posiadające większą depozycję okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej zalegającej na odcinku aorty piersiowej charakteryzowały się większym zwapnieniem naczyń niż kobiety zdrowe¹⁶³. Sztynnienie naczyń krwionośnych powiązane jest ze zwiększoną akumulacją kolagenu, cytokin prozapalnych oraz zwiększoną produkcją RFT w pvAT. Badania Framingham Heart Study¹⁷⁹ oraz badania eksperymentalne na myszach *ob/ob*¹⁶³ wykazały związek pomiędzy sztywnieniem naczyń krwionośnych a zwiększoną depozycją tkanki tłuszczowej otaczającej naczynia krwionośne.

Badania na modelach zwierzęcych wskazują również na rolę lokalnego stanu zapalnego oraz nacieku leukocytów w pvAT w formowaniu tętniaków aorty brzusznej (AAA, ang. *abdominal aortic aneurysm*), stanu patofizjologicznego naczyń krwionośnych będącego powikłaniem NT¹⁸⁰. Podawanie Ang II, promuje rekrutację komórek zapalnych do przydanki oraz pvAT otaczającej aortę zwiększając podatność na formację AAA¹⁸⁰. Kolejnym dowodem na udział komórek układu odpornościowego w patogenezie AAA jest usunięcie TLR-4 lub MyD88 w leukocytach, która zmniejsza liczbę AAA u poddanych działaniu Ang II¹⁸¹. Również zmniejszenie ekspresji cytokin prozapalnych wydzielanych przez pvAT chroni myszy przed rozwojem tętniaków aorty¹⁸².

1.5. Cytokiny, chemokiny i adipokiny w regulacji ciśnienia tętniczego krwi i funkcjonowania naczyń krwionośnych

1.5.1. Cytokiny w patogenezie nadciśnienie tętniczego

Cytokiny stanowią grupę białek, syntetyzowanych i wydzielanych przez wiele rodzajów komórek, których funkcją jest przenoszenie sygnałów pomiędzy limfocytami, fagocytami oraz innymi komórkami organizmu. Cząsteczki te mogą działać autokrynnie lub parakrynnie pełniąc rolę mediatorów w procesach biologicznych. Cytokiny działają

za pośrednictwem interakcji ze swoistym receptorem na błonie komórkowej powodując aktywację szlaków sygnałowych (aktywacja lub/i fosforylacja kinaz) prowadzących do produkcji aktywnych czynników transkrypcyjnych indukujących odpowiedź na poziomie ekspresji genów. W oparciu na funkcje cytokiny podzielono na: interleukiny, interferony, czynniki martwicy nowotworów, chemokiny, czynniki wzrostowe oraz czynniki stymulujące rozwój kolonii¹¹⁷.

1.5.1.1. Interleukina 17

Interleukina 17 (IL-17) produkowana jest głównie przez limfocyty T_H17, a także w mniejszym stopniu przez limfocyty T_C, T γ / δ , niektóre limfocyty B oraz komórki NK¹⁸³. Rodzina IL-17 obejmuje grupę 6 ligandów (sklasyfikowanych od A do F)¹⁰⁴. IL-17A oraz IL-17F wykazują największą homologię oraz działanie mediujące odpowiedź prozapalną¹⁰⁴. IL-17A jest ligandem dla receptorów IL17RA i IL17RC zlokalizowanych na komórkach nabytego oraz wrodzonego układu odpornościowego, a także na innych niemieloidalnych komórkach takich jak: komórki śródbłonna, fibroblasty i mięśnie gładkie¹⁰⁴. Jej zwiększona produkcja obserwowana jest w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego takich jak NT, stan przedzucawkowy, miażdżyca i zawał mięśnia sercowego^{108,184-186}. IL-17A wzrasta w osoczu pacjentów z NT, a także w osoczu, PBMC, śledzionie, nerkach i sercu zwierząt z wykształconym NT¹⁰⁵. Podawanie rekombinowanej IL-17A myszom *in vivo* prowadzi do zwiększenia ciśnienia tętniczego krwi¹⁴⁶. Natomiast myszy IL-17^{-/-} nie wykształcają typowego NT w odpowiedzi na Ang II¹⁶⁷. Podobnie podawanie przeciwciała skierowanego przeciwko IL-17 obniża ciśnienie tętnicze krwi u szczurów z NT zależnym od soli DOCA¹⁰⁵.

W badaniach *in vivo* oraz *in vitro* wykazano bezpośredni wpływ IL-17A na funkcję śródbłonna naczyniowego oraz zaburzenie stanu redox naczyń krwionośnych. Myszy, którym podawano rekombinowaną IL-17A wykształcają dysfunkcję śródbłonna naczyniowego¹⁴⁶, z kolei myszy pozbawione genu kodującego IL-17 chronione są przed uszkodzeniem naczyń oraz stresem oksydacyjnym spowodowanym działaniem Ang II¹⁶⁷. Nguyen i wsp., wykazali bezpośredni wpływ IL-17A na spadek produkcji NO przez eNOS za sprawą fosforylacji Thr495¹⁴⁶, która hamuje produkcję NO¹⁸⁷.

Nadciśnieniu tętniczemu towarzyszy zwiększona akumulacja/produkcja kolagenu powodując zmniejszenie elastyczności naczyń krwionośnych, co skutkuje większym

obciążeniem serca oraz wpływa na wzrost skurczowego ciśnienia krwi (efekt Windkessela). Wykazano, że blokada lub usunięcie IL-17A zapobiega nadmiernej depozycji kolagenu chroniąc przed powikłaniami NT takimi jak zwłóknienie naczyń i hipertrofia serca^{49,105}. Ochronna funkcja usunięcia IL-17A u myszy z NT koreluje ze zmniejszonym okołonaczyniowym stenem zapalnym. Myszy te charakteryzują się zmniejszoną akumulacją leukocytów oraz limfocytów T w pvAT w porównaniu do normotensyjnych myszy WT¹⁶⁷.

1.5.1.2. Interferon gamma

Interferon gama (IFN- γ) produkowany jest przez pobudzone limfocyty T i komórki NK, a także nabłonki i fibroblasty. Działa jako pozytywny sygnał sprzężenia zwrotnego w szeregu reakcji immunologicznych¹¹⁷. IFN- γ odgrywa kluczową rolę zarówno w aktywacji monocytów i makrofagów, jak i w polaryzacji tych komórek w kierunku fenotypu zapalnego¹³¹.

Wykazano, że IFN- γ może wpływać na aktywację układu RAAS poprzez zwiększenie produkcji angiotensynogenu w nerkach¹⁸⁸ oraz regulować wchłanianie zwrotne sodu przez transportery NHE3¹⁰³. Oba wspomniane procesy odgrywają ważną rolę w rozwoju NT²⁴.

Eksperymentalne NT powiązane jest ze zwiększoną produkcją IFN- γ przez zaktywowane limfocyty T⁷⁸ oraz komórki NK¹²⁷. Infuzja Ang II myszom pozbawionych genu odpowiedzialnego za produkcję IFN- γ skutkuje wykształceniem niższego o 20 mmHg ciśnienia tętniczego krwi w porównaniu z myszami WT⁷⁸. Z drugiej jednak strony genetyczne usunięcie receptora IFN- γ nie wpływa na zmianę ciśnienia tętniczego krwi w analogicznych eksperymentach¹⁸⁹. Saleh i wsp. wykorzystując myszy LNK-/- zaobserwował zwiększoną produkcję IFN- γ przez limfocyty CD8 w NT zależnym Ang II. Zwiększona produkcja IFN- γ powiązana była z pogorszeniem funkcji śródbłonna naczyniowego oraz zwiększonym stresem oksydacyjnym w naczyniach krwionośnych^{78,190}.

I.5.1.3. TNF

Czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF) produkowany jest przez wiele typów komórek takich jak limfocyty T, makrofagi, komórki śródbłonka, fibroblasty, neurony, a także adipocyty¹⁹¹. Działa poprzez receptory TNFR1 oraz TNFR2 odgrywając ważną rolę w procesach prozapalnych. W badaniach *in vivo*, a także *in vitro* wykazano, że TNF zwiększa ekspresję cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonka oraz VSMC¹⁹². Ponadto indukuje produkcję szeregu chemokin o charakterze prozapalnym takich jak: CCL5, CCL7, CCL8, CXCL9¹⁹³. TNF poprzez aktywację transkrypcji NF-κB wzmacnia działanie genów zaangażowanych w procesach zapalnych. Stymulując oksydazę NADPH (NOX1, NOX2 i NOX4) zwiększa poziom anionorodnika ponadtlenkowego przyczyniając się do wykształcenia dysfunkcji śródbłonka naczyniowego. Stymulacja komórek śródbłonka za pośrednictwem TNF *in vitro* powoduje spadek ekspresji eNOS, poprzez destabilizację jego mRNA¹⁹⁴. Ponadto działając łącznie z IL-17 indukuje ekspresję innych cytokin prozapalnych¹⁹³. Angiotensyna II wywiera bezpośredni wpływ na produkcję TNF przez komórki układu odpornościowego oraz adipocyty¹⁹⁵. Pacjenci przyjmujący inhibitory AT₁ charakteryzują się niższym poziomem tej cytokiny w krwioobiegu¹⁴⁵. W toku rozwoju NT zależnego od Ang II dochodzi do zwiększonej produkcji TNF przez limfocyty T⁷⁴. Myszy pozbawione genu kodującego TNF nie wykształcają NT, natomiast podanie tym myszom rekombinowanego TNF przywraca nadciśnieniową odpowiedź na Ang II¹⁹⁵. Badania z wykorzystaniem entareceptu, antagonisty TNF wykazały redukcję ciśnienia tętniczego krwi oraz stresu oksydacyjnego w modelach NT zależnego od Ang II⁷⁴. Ponadto zastosowanie entareceptu poprawia funkcję śródbłonka naczyniowego i obniża ciśnienie tętnicze krwi u ciężarnych szczurów z NT¹³².

I.5.1.4. Interleukina 6

Interleukina 6 (IL-6) produkowana jest w szczególności przez monocyty, makrofagi i limfocyty T, a także okołonaczyniowe adipocyty, fibroblasty oraz VSMC^{106,196}. IL-6 wpływa stymulująco na proliferację limfocytów T, jak również bierze udział w powstawaniu limfocytów T_H17¹⁰⁶, a jej produkcja jest nasilana pod wpływem

działania IL-17¹⁴⁶. Wysoki poziom IL-6 koreluje ze zwiększonym ciśnieniem tętniczym krwi u ludzi¹⁹⁶. Stosowanie antagonistów receptora AT₁ redukuje jej poziom w surowicy u pacjentów z NT¹⁴⁵. Wzrost IL-6 obserwowany jest także w wielu modelach zwierzęcych NT^{186,197,198}. Angiotensyna II stymuluje produkcję IL-6 przez VSMC prowadząc do zwiększonej produkcji cytokin, chemokin i cząsteczek adhezyjnych¹⁹⁹. IL-6 indukuje ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), który stymuluje do wzrostu i migracji VSMC²⁰⁰. Natomiast zwiększając ekspresję receptorów AT₁ w naczyniach krwionośnych nasila działanie Ang II na zwiększony stan napięcia naczyń krwionośnych oraz okołonaczyniowy stan zapalny²⁰¹. Myszy pozbawione genu kodującego IL-6 chronione są przed rozwojem NT wywołanego działaniem Ang II^{196,202} lub indukowanym stresem¹⁴⁴. IL-6, w eksperymentach *ex vivo*, wywołuje upośledzenie rozkurczu naczyń krwionośnych²⁰¹.

1.5.1.5. Interleukina 10

Interleukina 10 (IL-10) produkowana jest głównie przez pobudzone limfocyty T_{H2}, a także limfocyty B, makrofagi i keratynocyty⁸⁸. Hamuje produkcję cytokin wydzielanych przez limfocyty T_{H1} (IFN- γ , IL-2) oraz monocyty i makrofagi (IL-1, IL6, IL-8, IL-12, TNF), a także reaktywnych związków tlenowych i tlenku azotu. Ponadto hamuje ekspresję cząsteczek MHC klasy II na monocytach, zmniejszając zdolność tych komórek do prezentacji antygenów^{88,117}.

Redukcja IL-10 powiązana jest ze zwiększoną aktywacją makrofagów oraz zwiększeniem ekspresji ICAM-1 i VCAM-1 na ich powierzchni¹¹³. Eskalacja tych markerów obserwowana jest w NT i powoduje zwiększoną migrację leukocytów do tkanek otaczających naczynia krwionośne. Naczynia krwionośne pochodzące od myszy pozbawionych genu dla IL-10 inkubowane z Ang II wykazywały 50% pogorszenie rozkurczu w porównaniu z naczyniami krwionośnymi od myszy WT²⁰³. Usunięcie genu dla IL-10 skutkuje dodatkowo zwiększeniem produkcji TNF oraz IL-6^{203,204}. IL-10 wydzielana przez limfocyty T_{reg} redukuje stres oksydacyjny zależny oksydazy NADPH, jak również zwiększa aktywność/fosforylację eNOS polepszając funkcję śródbłonna w naczyniach oporowych²⁰⁵. Transfer limfocytów T_{reg} lub podawanie rekombinowanej IL-10 myszom z wyindukowanym NT redukuje ciśnienie tętnicze krwi

oraz poprawia funkcję śródbłonka naczyniowego. Wspomniany efekt nie jest obserwowany po transferze T_{reg} pochodzących od myszy pozbawionych genu kodującego IL-10²⁰⁵.

1.5.1.6. Interleukina 33

Interleukina 33 (IL-33) pełni funkcję tradycyjnej cytokiny oraz wewnątrzkomórkowego czynnika jądrowego. IL-33 wiążąc się z receptorem ST2 bierze udział w aktywacji komórek układu odpornościowego. Kompleks IL-33-ST2 odpowiada za indukcję odpowiedzi immunologicznej typu T_H2, niemniej jednak badania dostarczają dowodów na udział tej cytokiny w odpowiedzi typu T_H1²⁰⁶. Plejotropowe działanie IL-33 zależy od typu komórek oraz charakteru cytokin w jakim komórka się znajduje. Stymuluje ona limfocyty T do produkcji IL-4, IL-5, IL-13, wzmacnia polaryzację aktywowanych makrofagów M2, dojrzewanie DC oraz produkcję IFN- γ przez limfocyty CD8+ (T_C) w sposób zależny od receptora TCR oraz ST2^{206,207}. Zidentyfikowano również wydzielniczą postać rozpuszczalną receptora ST2 (sST2), który wychwytuje IL-33, hamując jej aktywność biologiczną. Ekspresja sST2 indukowana jest przez cytokiny prozapalne. Przy braku czynników stymulujących o charakterze zapalnym IL-33 podlega ekspresji wyłącznie w jądrze komórkowym, gdzie pełni rolę regulatora ekspresji genów²⁰⁸.

Ekspresję IL-33 oraz jej receptorów wykazano w mysich aortach oraz ludzkich pierwotnych liniach komórek śródbłonka naczyniowego oraz VSMC²⁰⁹. Również komórki układu odpornościowego, takie jak makrofagi i DC wydzielają IL-33, po stymulacji cytokinami o charakterze prozapalnym²⁰⁷. Stymulacja komórek śródbłonka naczyniowego IL-33 indukuje wzrost cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonka, co prowadzi do zwiększonej adhezji leukocytów do ściany naczyń krwionośnych oraz produkcji MCP-1, która nasila chemotaksję komórek układu odpornościowego²¹⁰. Stymulowane komórki śródbłonka naczyniowego wydzielają sST2, która bierze udział w procesie przebudowy i włóknienia naczyń krwionośnych. Inkubacja VSMC z sST2 zwiększa ekspresję mRNA oraz białka kolagenu typu 1, fibronektyny oraz innych prozwłóknieniowych czynników takich jak TGF- β oraz CTGF (ang., *connective tissue growth factor*)²¹¹.

Wykazano ekspresję IL-33 w tkance tłuszczowej. Hipoksja oraz stymulacja adipocytów TNF- α prowadzi do zwiększonej ekspresji mRNA tej cytokiny²¹². Stymulacja mysich adipocytów IL-33 indukuje wydzielanie IL-5, IL-13, IL-10²¹³ oraz napływ limfocytów T_H2²¹³. W ostatnich latach zidentyfikowano szczególną populację komórek rezydujących w tkance tłuszczowej posiadających receptory ST2 (FLAC, ang. *fat-associated lymphoid cluster*). Komórki FLAC, stymulowane IL-33, produkują cytokiny typu T_H2, a ich rola ciągle nie została wyjaśniona²¹⁴.

1.5.2. Chemokiny

Chemokiny reprezentują grupę białek o małej masie cząsteczkowej wahającej się od 7 do 12 kDa. W oparciu o pozycję cysteiny podzielono je na 4 grupy: C, CC, CXC oraz CX3C²¹⁵. Produkowane są przez wiele typów komórek, a ich aktywność związana jest pobudzeniem specyficznego dla nich receptora błonowego. Receptory te odgrywają kluczową rolę w rekrutacji komórek immunologicznych do źródeł zapalnych, zgodnie z gradientem stężeń czynników chemotaktycznych. Chemokiny odgrywają bardzo ważną rolę w wielu procesach zapalnych oraz odpowiedzi immunologicznej²¹⁶, jak również w rozwoju dysfunkcji śródbłonka naczyniowego oraz szeregu chorób układu sercowo-naczyniowego²¹⁷.

1.5.2.1. RANTES

RANTES (czynnik regulowany przez aktywację; ekspresje i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T, ang. *Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*; CCL5, ang. *chemokine (C-C motif) ligand 5*) należy do grupy beta chemokin C-C, w których dwie pierwsze cysteiny sąsiadują ze sobą. CCL5 wydzielana jest przez limfocyty T, makrofagi, płytki krwi, komórki śródbłonka, mięśniówkę gładką oraz okołonaczyniową tkankę tłuszczową^{160,218}. RANTES jest chemokiną o szerokim znaczeniu klinicznym. Opisano jego rolę w chorobach takich jak: ADIS, chorobach nowotworowych, astmie, chorobach autoimmunologicznych, cukrzycy oraz kłębuszkowym zapaleniu nerek²¹⁹. Ostatnie lata badań wskazują na ważny udział

RANTES w chorobach układu serowo-naczyniowego. Wykazano korelację poziomu RANTES z występowaniem ostrych zespołów wieńcowych²²⁰. Poziom RANTES w osoczu jest wyższy u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca w porównaniu do grupy kontrolnej²²¹.

RANTES odgrywa kluczową rolę w rekrutacji leukocytów do źródeł zapalnych lub miejsc infekcji^{222,223} za pośrednictwem receptorów CCR1, CCR2 i CCR5²¹⁸. Zwiększoną ekspresję RANTES wykazano w blaszce miażdżycowej oraz w rezydujących w niej monocytach/makrofagach²²³. Genetyczne pozbawienie *ccr5* u myszy ApoE^{-/-} redukuje powstawanie zmian miażdżycowych powodowanych dietą oraz na późniejszych etapach choroby stabilizuje blaszkę miażdżycową, a także redukuje infiltrację komórek zapalnych typu T_H1 i zwiększa ekspresję IL-10. W przeciwieństwie do usunięcia *ccr5*, usunięcie genu kodującego *ccr1* powodowało nasilenie formowania się blaszki miażdżycowej oraz zwiększało rekrutację limfocytów T²²⁴. Podobnie, usunięcie *ccr5*, a nie *ccr1*, prowadziło do redukcji formowania neointymy po mechanicznym uszkodzeniu naczyń krwionośnych (wire-injury) u myszy ApoE^{-/-}²²⁵. Również zastosowanie inhibitora [⁴⁷AANA⁴⁷] -RANTES lub peptydowego antagonisty RANTES (Met-RANTES) hamuje powstawanie oraz stabilizuje blaszkę miażdżycową oraz redukuje rekrutację leukocytów w kierunku zmian miażdżycowych²²⁶. W eksperymentalnym modelu NT zależnego od Ang II dochodzi do wzrostu mRNA dla RANTES w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej⁷⁴. Jednak pomimo dobrze udokumentowanej roli RANTES w miażdżycy, jej rola w NT ciągle nie została jeszcze dobrze poznana.

1.5.2.2. Chemokiny CXCL9, CXCL10 oraz CXCL11

Chemokiny CXCL9 (MIG, *monokine induced by IFN-γ*), CXCL10 (IP-10, *IFN-γ-inducible protein of 10 kDa*) oraz CXCL11 (I-TAC, *IFN inducible T-cell α-chemoattractant*) należą do grupy chemokin prozapalnych indukowanych za pośrednictwem IFN-γ. Ich wspólną cechą jest interakcja z receptorem CXCR3, jak również silne właściwości chemotaktyczne wywierane na komórki układu immunologicznego²²⁷. Podwyższony poziom CXCL9, CXCL10 oraz CXCL11 obserwuje się w serum pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi takich jak: NT^{141,228,229}, choroba wieńcowa²³⁰. Ponadto zwiększoną ich ekspresję zaobserwowano

w ludzkiej blaszce miażdżycowej^{230,231}. MIG wykazuje odwrotną korelację z liczbą dodatkowych naczyń wieńcowych w chorobie niedokrwiennej serca²³⁰. Natomiast badania immunohistologiczne wykazały wzrost I-TAC w kanalikach proksymalnych i dystalnych nerek u pacjentów z NT¹⁴¹. CXCL10 (IP-10) produkowana jest przez limfocyty T, komórki NK, monocyty, DC, a także komórki śródbłonna naczyniowego oraz fibroblasty²³². Aktywacja szlaku CXCL10/CXCR3 powoduje nasiloną chemotaksję, fagocytozę, degranulację komórkową oraz wybuch tlenowy komórek układu odpornościowego, jak również migrację i proliferację komórek śródbłonna naczyniowego oraz VSMC²³³. Genetyczny lub farmakologiczny niedobór receptora CXCR3 hamuje rozwój miażdżycy, redukuje migrację limfocytów T oraz zwiększa poziom molekuł przeciwzapalnych u myszy Apoe^{-/-}^{234,235}. Dobrian i wsp. wykazali spadek ekspresji CXCL10 w pvAT myszy STAT4^{-/-}Apoe^{-/-}, które chronione były przed wykształceniem miażdżycy oraz okołonaczyniowego stanu zapalnego²³⁶. Zwiększoną ekspresję białka CXCL9 oraz CXCL10 obserwowano w badaniach immunohistochemicznych ludzkich tętniaków aorty, co powiązane było ze zwiększoną rekrutacją komórek zapalnych CXCR3⁺²³⁷. Doświadczenia eksperymentalne przeprowadzone na myszach z genetycznym usunięciem receptora CXCR3 wykazały jego ochronną rolę przed rozwojem tętniaków aorty piersiowej indukowanych chlorkiem wapnia²³⁸. Niemniej jednak podobnego efektu nie zaobserwowano w przypadku formowania się tętniaków aorty brzusznej²³⁹. Wzrost CXCL10 zaobserwowano u ludzi z otyłością oraz myszy karmionych paszą wysokotłuszczową²⁴⁰. Rola MIG, IP-10 oraz I-TAC w pvAT myszy z NT zależnym od Ang II nie został jeszcze opisana.

1.5.2.3. MCP-1

MCP-1 (ang., *monocyte chemo-attractant protein-1*, CCL2) zalicza się do chemokin typu C-C, która jest produkowana konstytutywnie lub pod wpływem działania RTF, cytokin oraz czynników wzrostu. Produkowana jest przez komórki układu odpornościowego, a także przez komórki naczyń krwionośnych. Indukcja ekspresji MCP-1 zachodzi pod wpływem czynników hemodynamicznych oraz hormonów takich jak Ang II czy ET-1²¹⁷. Wzrost chemokiny CCL2 obserwowany jest w chorobach układu sercowo-naczyniowego zarówno w badaniach klinicznych jak i badaniach

eksperymentalnych. Rola CCL2 w miażdżycy została bardzo dobrze poznana i obecnie uznaje się ją za głównego mediatora w procesie rekrutacji makrofagów w przebiegu aterosklerozy^{215,241}. Podwyższony poziom MCP-1 obserwowany jest u pacjentów z NT i dysfunkcją śródbłonna naczyniowego²⁴², a terapia hipotensyjna redukuje jego poziom²¹⁷. Biologiczne działanie MCP-1 jest następstwem pobudzania receptorów błonowych CCR2. Receptory dla MCP-1 zlokalizowane są na krążących komórkach układu odpornościowego oraz VSMC²⁴³. Aktywacja CCR2, również za pośrednictwem Ang II, stymuluje proliferację VSMC²⁴⁴ oraz migrację leukocytów w kierunku miejsc zapalnych. Blokada interakcji CCL2-CCR2 wykazuje szereg właściwości przeciwzapalnych²⁴⁵, a także powoduje redukcję ciśnienia tętniczego krwi w badaniach eksperymentalnych²⁴⁶. Podobnie, zastosowanie blokerów receptora AT₁ redukuje poziom MCP-1²⁴⁷. Badania immunohistologiczne dostarczyły dowodów na wydzielanie tej chemokiny przez pvAT²¹⁶. Wykazano, że komórki tłuszczowe wyizolowane z pvAT produkują około 10-40 razy więcej MCP-1 w porównaniu z komórkami uzyskanymi z tkanki tłuszczowej wisceralnej¹⁵⁸. CCL2 wydzielane z pvAT bierze udział w formowaniu nointymy²⁴⁸, a także przyczynia się do zwiększonej rekrutacji monocytów/makrofagów w różnych stanach patologicznych naczyń krwionośnych²⁴⁶.

1.5.3. Adipokiny

Adipokiny stanowią grupę białek wydzielanych niemal głównie przez komórki tłuszczowe. Podobnie jak cytokiny mogą działać lokalnie bądź po przedostaniu się do krwioobiegu wywierać wpływ na regulację fizjologiczną oraz patofizjologiczną wszystkich ukrwionych narządów. Adipokiny biorą udział w regulacji szeregu procesów zapalnych oraz funkcjonowaniu naczyń krwionośnych²⁴⁹.

1.5.3.1. Adiponektyna

Adiponektyna (Acrp30, AdipoQ, APN) jest białkowym hormonem składającym się z 247 aminokwasów. Stanowi około 0,01% białek osocza u ludzi, a jej stężenie spada w wielu stanach patologicznych takich jak otyłość, udar oraz choroby sercowo naczyniowe²⁵⁰. Pacjenci z pierwotnym NT charakteryzują się redukcją poziomu

adiponektyny w osoczu w porównaniu z pacjentami normotensyjnymi. Niskie stężenie adiponektyny stanowi niezależny czynnik ryzyka NT²⁵¹. Adiponektyna ma właściwości przeciwmiażdżycowe poprzez zmniejszanie zależnej od TNF adhezji monocytów do komórek śródbłonka naczyniowego, a także zmniejszaniu aktywacji samego śródbłonka naczyniowego²⁵². Wykazano także wpływ adiponektyny na funkcjonowanie naczyń krwionośnych. Gollasch i wsp. udokumentował, że adiponektyna redukuje skurcz naczyń wywołanych serotoniną^{160,253}. Adiponektyna mediuje rozkurcz naczyń krwionośnych poprzez aktywację kanałów potasowych²⁵³ oraz zwiększoną aktywację eNOS zależną aktywacji szlaku AMPK²⁵⁰. Indukuje także fosforylację eNOS w miejscu Ser¹¹⁷⁷ oraz interakcję z białkiem HSP90 – wymaganego do maksymalnej aktywacji eNOS²⁵⁰. Ponadto, działa antyapoptotycznie na komórki śródbłonka naczyniowego oraz hamuje proliferację VSMC^{250,254}. Poziom adiponektyny w osoczu wykazuje odwrotną korelację z IMT tętnic szyjnych²⁵⁵. W otyłości biodostępność adiponektyny koreluje z spadkiem naczyniorozkurczowego działania pvAT u ludzi²⁵⁶. Badania *in vivo* na zwierzętach wykazały protekcyjną rolę adiponektyny w progresji okołonaczyniowego stanu zapalnego. Zwiększenie poziomu tego hormonu skutkuje spadkiem ekspresji ACE oraz markerów dla makrofagów (CD68), a także limfocytów (CD4) w pvAT. Spadkowi temu towarzyszy również redukcja ekspresji TNF oraz MCP-1 w pvAT, jak również G-CSF, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-17, IP-10, MCP-1 i TNF w osoczu²⁵⁵.

1.5.3.2. Rezystyna

Rezystyna jest hormonem specyficznym dla tkanki tłuszczowej wywierającym działanie naczynioskurczowe poprzez wpływ na komórki śródbłonka naczyniowego. Wpływa na wzrost ET-1, hamowanie aktywności eNOS oraz zwiększanie ekspresji cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonka naczyniowego^{257,258}. Udokumentowano również jej wpływ na proliferację VSMC w wyniku aktywacji ścieżki ERK 1/2 oraz Akt²⁵⁹. Rezystyna uczestniczy w wielu procesach zapalnych, a także sama indukowalna jest pod wpływem cytokin prozapalnych takich jak IL-1, IL-6 oraz TNF²⁶⁰.

I.5.3.3. Chemeryna

Chemeryna jest białkiem o wielkości 14kDa wydzielanym przez komórki tkanki tłuszczowej i komórki układu odpornościowego. Poziom chemeryny wzrasta w chorobach o podłożu zapalnym, a jej poziom pozytywnie koreluje z TNF- α , IL-6 oraz CRP²⁴⁹. Chemeryna stymuluje chemotaksję makrofagów, komórek NK i DC^{261,262}. Chemeryna wywiera również istotny wpływ na indukując proliferacji i apoptozę ludzkich VSMC²⁴⁹. Ponadto zwiększa produkcję RFT, fosforylację Akt (Ser473) oraz ERK w naczyniach krwionośnych, co przekłada się na zwiększone ciśnienie tętnicze krwi w eksperymentach *in vivo*²⁶³. Udokumentowano jej bezpośredni wpływ na mediacje²⁶⁴ oraz nasilenie skurczu naczyń krwionośnych w odpowiedzi na fenylefrynę, ET-1²⁶⁵ i noradrenalinę²⁶³. Ostatnie lata badań dostarczają rozbieżnych wyników dotyczących roli chemeryny na funkcjonowanie śródbłonna naczyniowego. Inkubacja naczyń z chemeryną hamuje produkcję NO, a zwiększa generację RFT²⁶⁶. Z drugiej strony badania Zaho i Wanga wykazują, że stymulacja komórek śródbłonna chemeryną prowadzi do zwiększenia produkcji NO, natomiast zastosowanie przeciwciała blokującego receptor dla chemeryny (ChemR23) znosi ten efekt²⁶².

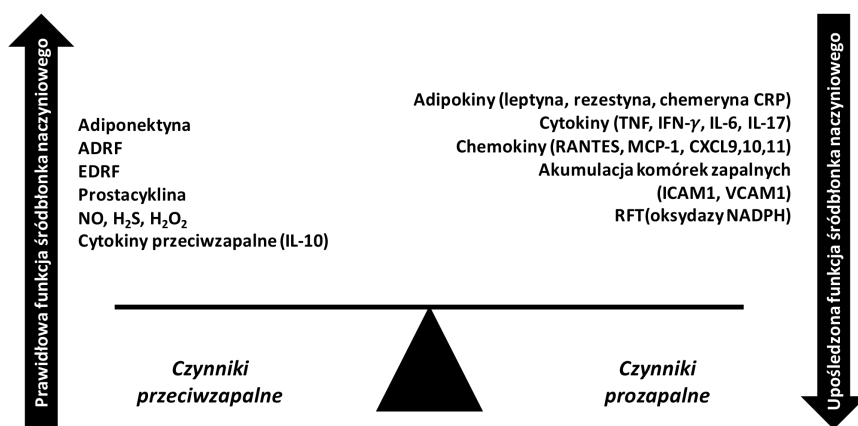
I.5.3.4. Białko C-reaktywne

Białko C-reaktywne (CRP, ang., *C Reactive Protein*) należy do białek ostrej fazy. Syntetyzowane jest głównie w wątrobie i tkance tłuszczowej, a jego ekspresja może być regulowana przez szereg cytokin prozapalnych²⁶⁷. Poziom CRP jest skorelowany ze zwiększonym ryzykiem chorób układu sercowo-naczyniowego, włączając w to NT²⁶⁸. Wykazano, że niewielki poziom CRP (9 μ g/mL) jest wystarczający do zaburzenia ciśnienia tętniczego krwi u zwierząt eksperymentalnych²⁶⁹. Zarówno dane kliniczne, jak i badania eksperymentalne, wykazują wpływ podwyższonego stężenia CPR na upośledzenie rozkurczu naczyń krwionośnych^{270,271}. CRP obniża ekspresję mRNA eNOS²⁷², zmniejsza fosforylację w miejscu Ser1177 a zwiększa fosforylację w miejscu Thr495, co skutkuje zmniejszoną aktywnością eNOS i spadkiem biodostępności NO²⁷³. CRP zwiększa również ekspresję ICAM-1, VCAM-1 oraz E-selektyny na komórkach śródbłonna²⁷², które odgrywają ważną rolę w rekrutacji komórek zapalnych.

Wykazano, że CRP zwiększa produkcję RFT zwiększając ekspresję podjednostki oksydazy NAPDH p22^{phox}, a także eskaluje ekspresję receptorów AT₁ na VSMC²⁶⁷.

1.6. Podsumowanie

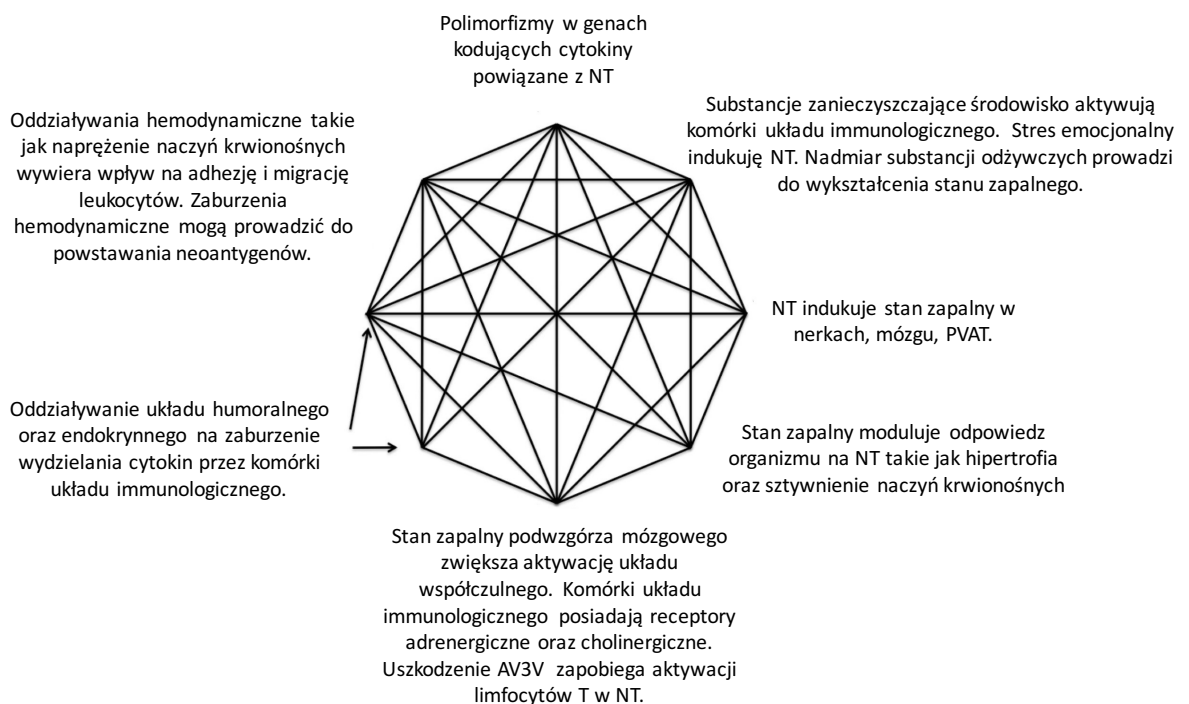
Mechanizm powstawania NT wciąż pozostaje niewyjaśniony wskazuje się na istotną rolę OUN, nerek, naczyń krwionośnych oraz przewlekłego stanu zapalnego w patogenezie tego schorzenia. Ponadto leukocyty migrując do miejsc zapalnych, włączając w to pvAT, aktywnie uczestniczą w modulowaniu stanu zalanego. Wiele aktywnych biologicznie białek wydzielanych jest również przez pvAT (cytokiny, chemokiny, adipokiny), która znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń krwionośnych. Dodatkowo, leukocyty, pvAT oraz naczynia krwionośne produkują RFT, które pełnią rolę mediatorów w wielu procesach komórkowych. Zaburzenie pomiędzy czynnikami prozapalnymi oraz przeciwzapalnymi w pvAT prowadzi do upośledzenia funkcji śródbłoka naczyniowego, co jest charakterystyczną cechą NT i innych chorób układu sercowo-naczyniowego (Ryc 5).



Ryc. 5. Zestawienie czynników przeciwzapalnych oraz prozapalnych wpływających na funkcjonowanie śródbłoka naczyniowego.

Zgodnie z mozaikową teorią Page'a (Ryc. 1) NT jest chorobą wieloczynnikową, i w świetle najnowszych badań należy ją poszerzyć o rolę komórek układu odpornościowego oraz okołonaczyniowego stanu zapalnego w rozwoju tej choroby. Profesor Harrison z Uniwersytetu w Vanderbilt zbierając dotychczasowe odkrycia naukowe poszerzył teorie Page'a o kontekst immunologiczno-zapalny (Ryc. 6). W aspektach genetycznych wskazał na rolę licznych polimorfizmów cytokin

prozapalnych (IL-6, TNF- α), które są przyczynowo-skutkowo związane z NT. Za czynnik środowiskowy można uznać stres, zanieczyszczenia oraz dietę bogatą w składniki odżywcze, które aktywują komórki układu odpornościowego. Hipertrofia i sztywnienie naczyń krwionośnych są mediowane stanem zapalnym oraz cytokinami wydzielanymi przez leukocyty co wpisuje się w czynnik anatomiczny i adaptacyjny. Podłoże pod czynnik związany rolą układu nerwowego w patogenezie NT stanowią pracę łączące aktywację limfocytów T oraz okołonaczyniowego i ogólnoustrojowego stanu zapalnego modulowanego poprzez aktywację centralnego układu nerwowego. Wydzielanie Ang II, aldosteronu, leptyny i katecholamin wpływa na funkcję naczyń krwionośnych i komórek układu odpornościowego co doskonale uzupełnia czynnik humoralny oraz endokrynnny. Natomiast zaburzenia hemodynamiki naczyń krwionośnych wpływa na produkcję chemokin oraz reguluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych, zarówno na komórkach naczyń jak i leukocytach, promując migrację komórek układu odpornościowego do miejsc zapalnych takich jak np. pVAT⁵.



Ryc. 6. Mozaikowa teoria Page'a z uwzględnieniem roli układu odpornościowego oraz stanu zapalnego w patogenezie nadciśnienia tętniczego.

Liczne prace wskazują na istotną rolę układu odpornościowego w NT. Jednak problem ten nie został jak dotąd zbadany w sposób systematyczny. Opisano rolę limfocytów T efektorowych, produkujących IL-17, IFN- γ oraz TNF,

limfocytów B, makrofagów i komórek dendrytycznych w tym procesie, jednak ich wzajemne interakcje i zmiany w toku rozwoju NT ciągle pozostają niejasne. Jako że odnotowano, iż okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa odgrywa szczególną rolę w patogenezie NT, konieczne jest obecnie scharakteryzowanie okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej jako rezerwuaru komórek zapalnych i cytokin/chemokin, które mogą modulować rozwój NT. Szczegółowe poznanie mechanizmu mediacji stanu zapalnego może zapoczątkować nowe podejście do terapii NT.

II. CEL PRACY

Celem pracy było scharakteryzowanie okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w modelach doświadczalnych nadciśnienia tętniczego, ze szczególnym uwzględnieniem naciekających ją komórek układu odpornościowego oraz ekspresji genów i białek mogących odgrywać rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Ponadto, celem było również poznanie mechanizmu rekrutacji komórek układu odpornościowego do okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej.

Celami szczegółowymi pracy były:

1. Ocena zmian profilu cytokin i chemokin w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej w nadciśnieniu tętniczym zależnym od Ang II;
2. Charakterystyka leukocytów naciekających okołonaczyniową tkankę tłuszczową w spontanicznym oraz zależnym od Ang II nadciśnieniu tętniczym;
3. Ocena chemotaktycznych właściwości limfocytów T w kierunku okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej oraz chemokiny RANTES w nadciśnieniu zależnym od Ang II;
4. Zbadanie roli chemokiny RANTES w regulacji okołonaczyniowego stanu zapalnego, funkcji śródbłonna naczyniowego oraz ciśnienia tętniczego krwi w nadciśnieniu zależnym od Ang II;

Część wyników opisanych w niniejszej rozprawie opublikowano w FASEB J. 2016;30(5):1987-99. Wszystkie doświadczenia, których wyniki zawarte są w niniejszej rozprawie zostały wykonane osobiście przez autora doktoratu

III. MATERIAŁ I METODY

III.1. Model badawczy

Wszystkie opisane w niniejszej pracy procedury z wykorzystaniem zwierząt uzyskały pozytywną opinię i akceptację lokalnej Komisji Etycznej (53/2012, 50/2013, 254/2015). Dodatkowo wykonawca posiadał indywidualną zgodę oraz doświadczenie w pracy z wyżej wymienionymi modelami zwierzęcymi.

III.1.1. Mysi model nadciśnienia tętniczego zależnego od angiotensyny II

W badaniach eksperymentalnych wykorzystywane były osobniki męskie myszy szczepu C57BL/6J (określane jako WT) (Charles River, USA) oraz myszy z usuniętym genem kodującym RANTES (RANTES^{-/-}) powstałe na bazie myszy C57BL/6J (Charles River, USA). Zwierzęta przetrzymywane były w zwierzętarni Katedry Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego (Uniwersytet Jagielloński) z nieograniczonym dostępem do paszy i wody.

Nadciśnienie tętnicze wywoływane było poprzez podskórne wszycie minipomp osmotycznych (Alzet) dozujących Angiotensynę II-[Val-5] (Sigma-Aldrich) w ilości 490ng/kg/min przez okres dwóch tygodni. Grupę kontrolną stanowiły myszy z wszczepioną minipompą osmotyczną uwalniającą bufor (0,15 M NaCl, 0,01 M CH₃COOH). W trakcie zabiegu zwierzętom poddawano dootrzewnowo roztwór ketaminy z ksylazyna w ilości 100 mg/kg ketaminy oraz 10 mg/kg ksylazyny w objętości 100 μ l.

Mysi model nadciśnienia tętniczego charakteryzuje się występowaniem podwyższonego ciśnienia tętniczego krwi sięgającego nawet 200 mmHg. Powiązany jest również z hipertrofią i zwłóknieniem serca oraz naczyń krwionośnych, a także aktywowaniem szlaków zaangażowanych w występowanie stresu oksydacyjnego w sercu oraz naczyniach krwionośnych. Wykorzystany model jest szeroko opisany w literaturze i najczęściej wykorzystywany do badań dotyczących nadciśnienia tętniczego u myszy^{74,78,108,121,127,190}.

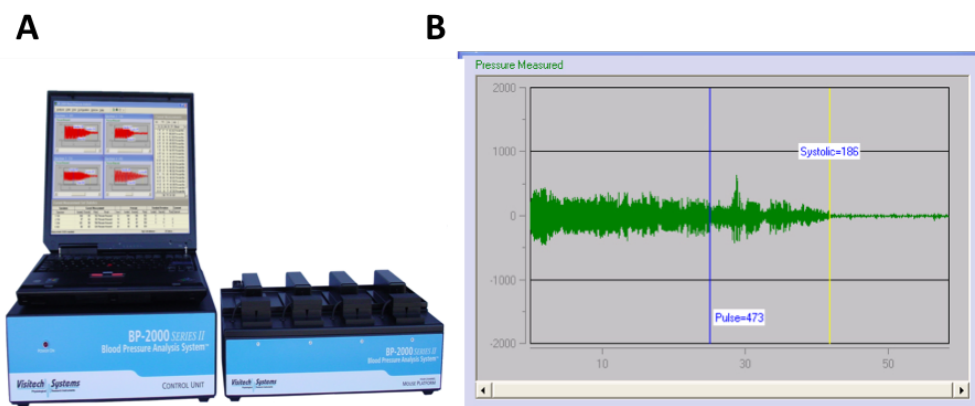
III.1.2. Model spontanicznego nadciśnienia tętniczego u szczurów

W badaniu zostały wykorzystane dwunastomiesięczne szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie tętnicze (SHR, *Spontaneously hypertensive rats*) oraz dwunastomiesięczne normotensyjne szczury kontrolne (WKY, *Wistar-Kyoto*) zakupione w Charles River Laboratories (Niemcy). Zwierzęta przetrzymywane były w zwierzętarni o wysokim standardzie sanitarno-higienicznym z nieograniczonym dostępem do paszy i wody (SPF, *Specific Pathogen Free*) na Wydziale Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Szczury SHR są najczęściej wykorzystywanym i najbardziej zbliżonym modelem do ludzkiego pierwotnego nadciśnienia tętniczego. Szczury te charakteryzują się wysokim skurczowym ciśnieniem tętniczym sięgającym lub przekraczającym 200 mmHg, dysfunkcją śródbłoka naczyniowego oraz zwiększonym stresem oksydacyjnym w naczyniach krwionośnych^{274,275}. Zaletą wykorzystanego modelu jest fakt, że podobnie jak u ludzi występują u nich trzy okresy rozwoju nadciśnienia tętniczego; stan przed ciśnieniowy, faza rozwoju i trwałego nadciśnienia tętniczego. Ponadto, model ten pod wieloma względami przypomina pierwotne NT u ludzi i jest uważany za najbardziej zbliżony model eksperymentalny. Jako kontrole użyto szczury WKY (Wistar-Kyoto) z których, poprzez chów wsobny został wyprowadzony szczep SHR²⁷⁶.

III.2. Pomiary ciśnienia tętniczego krwi

Ciśnienie krwi mierzone było metodą nieinwazyjną poprzez założenie mankieta na ogon zwierzęcia (*tail cuff*) przy użyciu aparatury pomiarowej BP2000 (Visitech Systems Inc.) (Ryc. 7). Pomiarów dokonywano codziennie o tej samej porze przez okres dwóch tygodni poprzedzający zabieg wszycia minipomp osmotycznych u myszy, co pozwoliło na adaptację zwierząt do warunków pomiaru. Po wszyciu minipomp osmotycznych pomiary były kontynuowane przez kolejne dwa tygodnie. U szczurów pomiar wyglądał w analogiczny sposób, z pominięciem etapu wszycia minipomp osmotycznych.



Ryc. 7. A- aparatura pomiarowa, B- przykładowy zapis z pomiaru ciśnienia tętniczego krwi u myszy

III.3. Eutanazja i pobieranie tkanek/narządów

Zwierzęta po wcześniejszym podaniu dootrzewnowo antykoagulantu (heparyna 200 U) poddane zostały eutanazji (inhalacja CO₂, stężenie w komorze >70%). W kolejnym kroku pobrana została krew z prawej komory serca zwierząt, a następnie wykonana została perfuzja zimnym PBS-em (Phosphate-Buffered Saline) poprzez wkłucie do lewej komory serca. Celem perfuzji było pozbycie się krwi z tkanek i narządów. Ostatnim krokiem było pobranie tkanek tłuszczowych oraz narządów niezbędnych do przeprowadzenia eksperymentów. Tkanki przez cały okres izolacji przebywały na lodzie (4°C).

III.4. Izolacja komórek

III.4.1. Izolacja PBMC

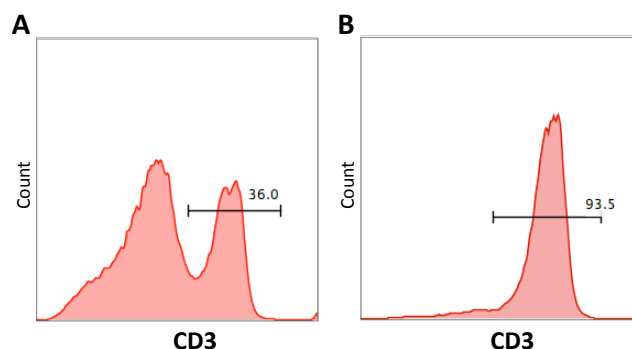
Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) otrzymywano z pełnej krwi obwodowej metodą wirowania (30 minut, 400G, 20°C) w gradiencie gęstości z wykorzystaniem medium do rozdziału leukocytów LSM (*Leukocyte Separation Medium*; PAA Laboratories). Liczbę komórek zliczano pod mikroskopem świetlnym przy użyciu komór Fuchs-Rosenthala oraz płynu Türka (100 ml 3% kwas octowy zawierający 1 ml 1% fioletu goryczki) barwiącego jądra krwinek białych.

III.4.2. Izolacja frakcji naczyniowo-stromalnej tkanek

Pobrane tkanki (pvAT i vAT) poddane zostały trawieniu enzymatycznemu przy użyciu kolagenazy 1s (450 U/ml), kolagenazy XI (125 U/ml) oraz hialuronidazy (60 U/ml) (Sigma-Aldrich). Proces trawienia przeprowadzano w PBS Ca⁺ Mg⁺ (Lonza) zawierającym 20μM HEPES (Sigma-Aldrich) przez 20 min w 37°C w inkubatorze komórkowym. Strawione tkanki przetarto przez 70μm sitko (Falcon, BD Bioscience) celem uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek frakcji naczyniowo-stromalnej VSF (*vascular stromal fraction cells*). Następnie komórki zostały przepłukane PBS-em zawierającym 1% FBS. Liczbę komórek zliczano pod mikroskopem świetlnym przy użyciu komór Fuchs-Rosenthala oraz płynu Türka (100 ml 3% kwas octowy zawierający 1 ml 1% fioletu goryczki) barwiącego jądra krwinek białych.

III.4.3. Izolacja subpopulacji limfocytów T

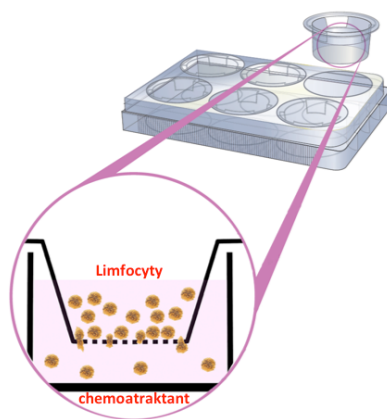
Limfocyty T (CD3⁺), pochodzące z PBMC oraz wytrawione z badanych tkanek tłuszczowych, pozyskiwane były na drodze negatywnej selekcji magnetycznej poprzez usunięcie komórek CD11b, CD11c, CD19, CD45R(B220), CD59b(DX5), CD105, MHC-klasy II oraz Ter-119 sprzężonych z magnetycznymi kuleczkami (Pan T Cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec) przy użyciu kolumn (MACS® Separation Columns) oraz magnetycznego separatora Vario MASC® (Miltenyi Biotec). Uzyskane powyższą metodą komórki wykorzystane w eksperymentach chemotaksji miały średnią czystość 94.4±1.8% (Ryc. 8).



Ryc. 8. Liczba komórek CD3⁺ przed (A) i po (B) sortowaniu na drodze negatywnej selekcji magnetycznej.

III.5. Chemotaksja limfocytów T

Migracja limfocytów w kierunku określonego chemoatraktantu zbadana została w komorach Boydena (Ryc. 9) na płytkach Transwell z rozmiarem porów 5µm (Costar).



Ryc. 9. Komora Boydena.

W eksperymentach wykorzystywano jednojądrzaste komórki krwi (PBMC) oraz limfocyty T z tkanek tłuszczowych pozyskane na drodze negatywnej selekcji magnetycznej.

Limfocyty zawieszono w medium RPMI 1640 (Gibco®) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej (Gibco®), w ilości 2×10^5 , umieszczano w górnym insertie komory Boydena w objętości 100 µl. W dolnej komorze znajdowało się 600 µl medium zawierającego rekombinowane białko RANTES (10 ng) (R&D Systems) lub 600 µl rozcieńczonego 50x supernatatu pochodzącego z hodowli tłuszczu. Płytkę była następnie inkubowana przez 2 godziny w inkubatorze komórkowym (37°C, 5% CO₂), po czasie inkubacji delikatnie usuwano górne inserty, a następnie zbierano komórki z dolnej komory i znakowano przeciwciałami monoklonalnymi (4°C, 20 minut) CD3, CD4, CD8 (BD Bioscience) i zawieszono w 200 µl PBS z 1% FBS.

Migracja szacowana była przy użyciu cytometru przepływowego FASC Canto II (Becton Dickinson) i wyrażona jako procent komórek, które przemieściły się do dolnej komory, w stosunku do komórek nałożonych na górny insert.

III.5.1. Wytwarzanie nadsączy z okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej

Pobrane tkanki tłuszczowe (pvAT i vAT) ważono, a następnie umieszczano w medium RPMI 1640 (Gibco) zawierającym 10% FBS (Gibco). Ilość medium normalizowano w stosunku do masy tłuszczu. Tłuszcz został poszatkowany a następnie umieszczony w inkubatorze (37°C, 5% CO₂). Po upływie 18 godzin medium wraz z tłuszczem przepuszczano przez filtr o porach 0,22 µm w celu uzyskania klarownego supernatantu, który służył jako chemoatraktant w przeprowadzonych eksperymentach.

III.5.2. Neutralizacja chemokiny RANTES

Chemoatraktant pochodzący z tkanki tłuszczowej myszy Ang II i Sham traktowany był przeciwciałem monoklonalnym wiążącym RANTES w stężeniu 0,5µg/ml (klon 53405, R&D Systems) przez okres 30 min w temperaturze 4°C. Kontrole w eksperymencie stanowiły chemoatraktanty bez dodatku przeciwciał, pozyskane w ten sam sposób i tym samym czasie.

III.6. Analiza cytometryczna leukocytów

Komórki zostały wyznakowane przeciwciałami monoklonalnymi zestawionymi w tabeli nr. 3. Wyznakowane przeciwciałami komórki poddane zostały analizie przy użyciu cytometrii przepływowej przy użyciu aparatu FACS CantoII lub FACS Verse (Becton Dickinson). Dane uzyskane z oznaczeń cytometrycznych analizowano przy pomocy programów; FASCSuite, FACSDiva (Becton Dickinson) oraz FlowJo (TreeStar, Inc).

Tabela 3. Wykaz przeciwciał wykorzystanych w badaniach cytometrii przepływowej.

Przeciwciała anty-mysie			
Marker	Klon	Fluorochrom	Firma
CCR1	643854	PE	R&D
CCR3	83101	PE	R&D
CCR5	7A4	PE	eBioscience
CCR6	140706	PE	R&D
CD11b	M1/70	APC	BD
CD11c	HL3	PE	BD
CD19	1D3	APC	BD
CD25	7D4	PE	BD
CD3	145-2C11	APC	BD
CD4	GK1.5	APCH7	BD
CD44	IM7	FITC	BD
CD45	30-F11	FITC	BD
CD45	30-F11	V500	BD
CD62L	MEL-14	PerCP	BD
CD69	H1.2F3	PE-CY7	BD
CD8a	53-6.7	PerCP	BD
FOXP3	FJK-16s	FITC	eBioscience
I-Ab	AF6-120.1	FITC	BD
IFN- γ	B27	FITC	BD
IL-17	N49-653	PE	BD
NK1.1	PK136	APC	BD
Przeciwciała anty-szczurze			
Marker	Klon	Fluorochrom	Firma
CD103	OC-62	FITC	BioLegend
CD161	10/87	PE	BD
CD25	OX-39	PE	eBioscience
CD3	1F4	APC	BD
CD3	1F4	PB	Serotec
CD4	W3/25	APC-CY7	BioLegend
CD4	OX-35	PE-CY7	BD
CD45	OX-1	PerCP	BioLegend
CD45RA	OX-33	FITC	BD
CD8a	OX-8	PerCP	BD
ED2	HIS-36	PE	BD
FOXP3	FJK/16s	FITC	eBioscience
IL-17	eBio17B7	PE	eBioscience
MHCII	OX-6	PerCP	BD

III.6.1. Badanie receptorów zewnątrz komórkowych

Pozyskane komórki (opisane w rozdziale III.4) znakowano przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko unikalnym receptorom powierzchniowym na komórkach układu odpornościowego. Komórki, zawieszono w PBS z 1% FBS, barwione były przeciwciałami monoklonalnymi przez okres 20 minut w 4°C w ciemności. Po tym czasie komórki zostały wypłukane z nadmiaru przeciwciał, które nie związały się z komórkami, a następnie komórki wirowano w prędkości 400g,

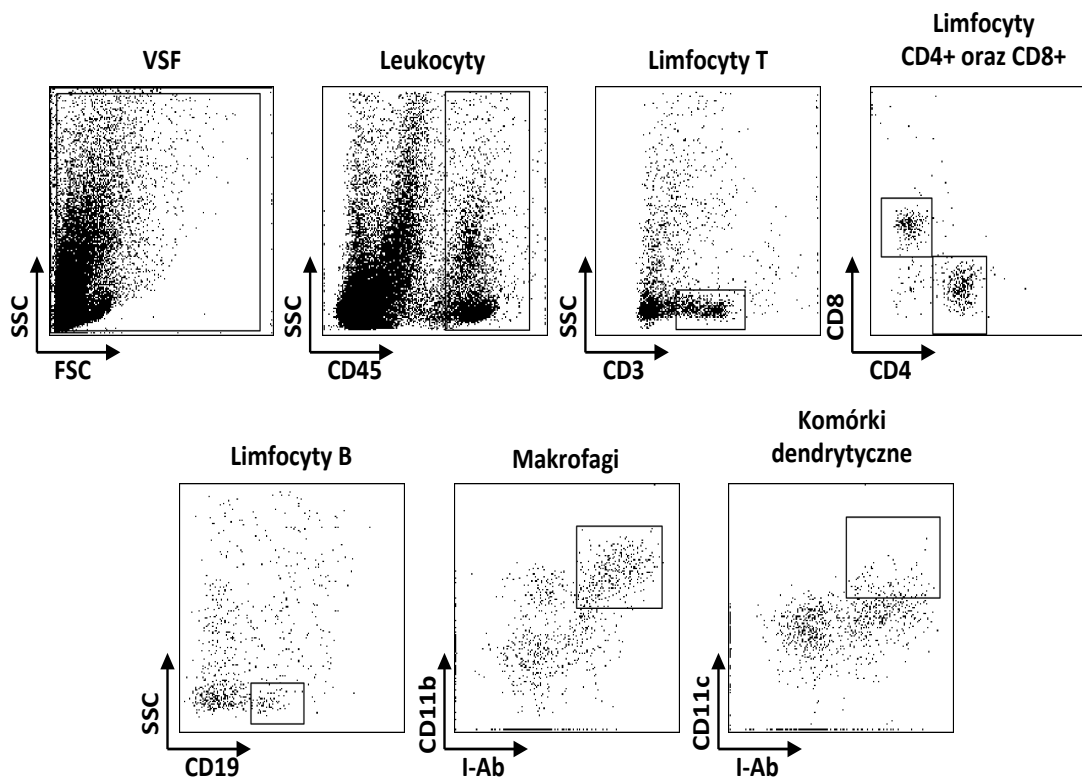
przez okres 6 minut w 4°C. Następnie komórki zawieszano w 200 ul PBS z 1%FBS i poddawano analizie cytometrycznej. W trakcie akwizycji próbki chronione były przed dostępem światła.

III.6.2. Badanie cytokin oraz receptorów wewnątrz komórkowych

W celu określenia profilu produkowanych cytokin, wyizolowane komórki umieszczono w medium komórkowym RPMI z 10% FBS (Gibco), a następnie stymulowano przez okres 4 godzin przy użyciu odczynnika *Leucocyte Activation Cocktail* (BD) w cieplarni (37°C, 5% CO₂). Następnie komórki wyznakowano przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko zewnątrzkomórkowym markerom takim jak: CD3, CD4, CD8 (BD Bioscience) przez okres 20 minut w 4°C w ciemności. W kolejnym etapie następowała permabilizacja ściany komórkowej przy użyciu *Fixation/Permabilization working solution* (eBioscience) przez 30 minut w 4°C w ciemności. Ostatnim etapem było barwienie wewnątrzkomórkowych cytokin IL-17 oraz IFN- γ w buforze utrzymującym permabilizację ściany komórkowej *Permabilization Buffer 1x* (eBioscience) przez okres 30 minut w 4°C w ciemności. Wybarwione komórki przepłukano dwukrotnie buforem utrzymującym permabilizację, następnie poddano analizie cytometrycznej. W analogiczny sposób, pomijając etap czterogodzinnej stymulacji, zdeterminowano poziom wewnątrzkomórkowego białka FoxP3.

III.6.3. Cytometryczna analiza komórek układu odpornościowego

Analizę otrzymanych wyników przeprowadzano na podstawie odpowiedniej strategii bramkowania komórek przy użyciu fluorescencyjnie wyznakowanych przeciwciał skierowanym przeciwko odpowiednim markerom komórkowym. Analizę rozpoczęto od założenia bramki dyskryminującej drobne fragmenty oraz konglomeraty komórkowe na cytogramie przedstawiającym uzyskane komórki (VSF) w oparciu o ich wielkość (FSC, forward scatter) oraz ziarnistość (SSC, side scatter). Następnie na podstawie bramki CD45 wyodrębniono poszczególne populacje leukocytów wyizolowanych z tkanek, na podstawie ich specyficznych markerów. Strategię bramkowania przedstawiono na Ryc. 10.



Ryc. 10. Strategia bramkowania wyników uzyskanych z cytometrii przepływowej.

III.7. Ocena funkcji śródbłonna naczyniowego

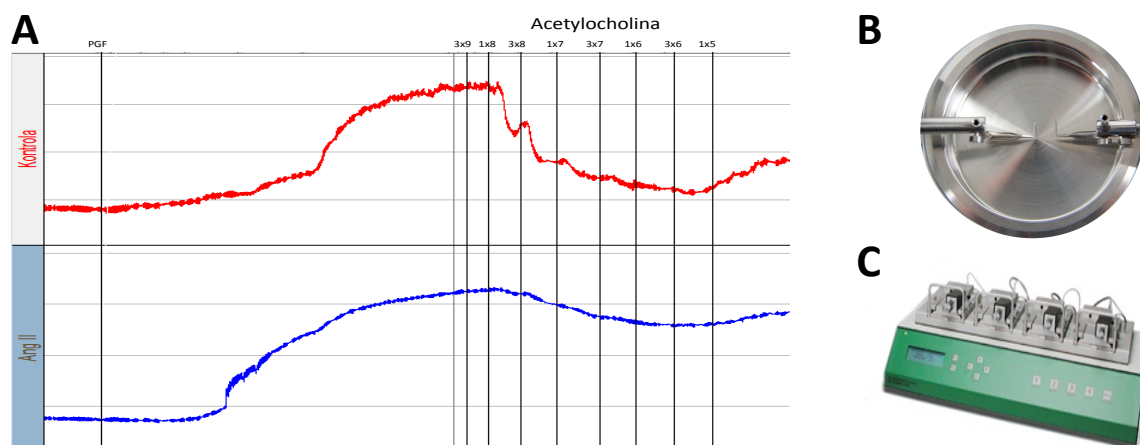
Wyizolowana aorta została oczyszczona z otaczających ją tkanek tłuszczowych przy użyciu narzędzi mikrochirurgicznych i do czasu rozpoczęcia eksperymentu umieszczona była w zimnym roztworze Krebs-Hepes (99 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 1.2 mM MgSO₄; 1mM KH₂PO₄; 1.9 mM CaCl₂; 25 mM NaHCO₃; 11.1 mM Glucose and 20 mM HEPES). Następnie aortę pocięto na 3 mm krążki i zawieszono pomiędzy dwoma metalowymi hakami (Ryc. 11 B) w łaźni wodnej MultiMyograph 610M (Danish Myolab) (Ryc. 11 C) zawierającej 5ml roztworu PSS (118.99 mmol/l NaCl, 4.69 mmol/l KCl, 1.17 mmol/l MgSO₄·7H₂O, 1,18 mmol/l KH₂PO₄, 2,5 mmol/l CaCl₂·2H₂O, 25 mmol/l NaHCO₃, 11.1 mmol/l glucose, 0.03 mmol/l EDTA) o temperaturze 37°C, natlenowanym 95%O₂-5%CO₂.

Przez okres 60 minut normalizowano naczynia do wartości 15 mN. Znormalizowane naczynia dwukrotnie przykurczano 120mM KCl, następnie przykurczono prostaglandyną F_{2α} (PGF_{2α}, Sigma-Aldrich). Przykurczone krążki aorty traktowane były wzrastającymi dawkami acetylocholiny (10⁻⁹-10⁻⁵ M, Sigma-Aldrich), mediatora wywołującego rozkurcz naczynia poprzez uwalnianie NO ze

śródbłonna naczyniowego. W celu zbadania niezależnego od śródbłonna rozkurczu wcześniej przykurczone naczynia poddawane były działaniu wzrastających dawek nitroprusydku sodu (SNP, 10^{-9} - 10^{-5} M, Sigma-Aldrich) po wcześniejszej inhibicji syntazy tlenku azotu (eNOS) przy użyciu 100 μ mol L-NAME (*N*_o-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, Sigma-Aldrich).

Funkcję śródbłonna naczyniowego rejestrowano i analizowano przy użyciu programu *AcqKnowledge 3.7.2* (BIOPAC Systems, Inc). Przykładowy zapis przedstawiono na Ryc. 11A. Dane dotyczące rozkurczu naczyń krwionośnych zostały wyrażone jako wartość procentowa rozkurczu naczynia w stosunku do jego skurczu.

Metoda ta jest uznana w pomiarach funkcji śródbłonna w wyizolowanych naczyniach krwionośnych i jest bardzo czułym wykładnikiem dostępności biologicznej tlenku azotu w naczyniu.



Ryc. 11. A – przykładowy zapis pomiaru funkcji śródbłonna naczyniowego u myszy kontrolnej oraz myszy z NT, B – łaźnia narządowa, C – miograf 610M.

III.8. Badanie ekspresji genów

Materiał natychmiast po pobraniu został umieszczony w roztworze RNAlater (Ambion) w celu uniknięcia degradacji RNA. Tkanki zostały zhomogenizowane w Qiazolu (Qiagen) przy użyciu mechanicznego homogenizatora TissueLyser LT (Qiagen) przez 15 minut, a następnie RNA zostało wyizolowane przy pomocy RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) zgodnie z zaleceniami producenta. Ilość uzyskanego RNA oznaczono fluorymetrycznie przy użyciu RiboGreen®RNA Assay Kit (Invitrogen)

i aparatu Synergy H4 (Biotek). Uzyskane i znormalizowane RNA zostało przepisane na cDNA przy użyciu kitu High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen) stosując się do zaleceń producenta.

Ekspresja genów *ccl2*, *ccl3*, *ccl4*, *ccl5* została zbadana przy użyciu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy DNA w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR) z wykorzystaniem sond znakowanych fluorescencyjnie (TaqMan®) przy użyciu aparatu 7900HT (Applied Biosystem). Gen S18 został użyty jako kontrola endogenna. Każda próbka oznaczona została w duplikacie. Wyniki zostały wyrażone jako wartość względna ilości mRNA (RQ, *relative quantity*) obliczane jako znormalizowane $2^{-\Delta Ct}$ gdzie ΔCt to różnica między Ct genu badanego i genu konstytutywnego.

III.9. Badanie profilu cytokin wytwarzanych przez okołonaczyniową tkankę tłuszczową

Tkankę okołonaczyniową zamrożono w ciekłym azocie bezpośrednio po pobraniu. Homogenizacji tkanek dokonano w PBS zawierającym enzymów proteolitycznych (aprotynina 10µg/mL, leupeptyna 10µg/mL, pepstatyna 10µg/mL) (Sigma-Aldrich) z wykorzystaniem homogenizatora Precellys®24. Uzyskane homogenaty zostały zwirowane (10000g 15min 4°C) celem usunięcia resztek komórkowych. Stężenie białka zostało oznaczone metodą Bradforda wykorzystującej fakt wiązania białka przez błękit kumazyny (Coomassie Brilliant Blue). Pomiaru dokonano przy $\lambda=595\text{nm}$ po związaniu barwnika z białkiem (15 min).

Uzyskany w powyższy sposób roztwór białka przechowywano w temperaturze -80°C. Profilowania 111 białek dokonano z wykorzystaniem Proteome Profiler™ Array Mouse XL Cytokine Array Kit (numer katalogowy ARY028) (R&D System) zgodnie ze specyfikacją/procedurą zalecaną przed producenta. Do oznaczenia wykorzystano 200 ng białka. Odczytu membran dokonano na czytniku Azure Biosystems c300 z wykorzystaniem chemiluminescencji. Czas ekspozycji membrany wynosił 60 sekund i został wcześniej zoptymalizowany w badaniach wstępnych.

Analizy uzyskanych membran dokonano przy użyciu programu HLIImage++ (Western Vision Software, USA).

III.10. Statystyczna analiza danych

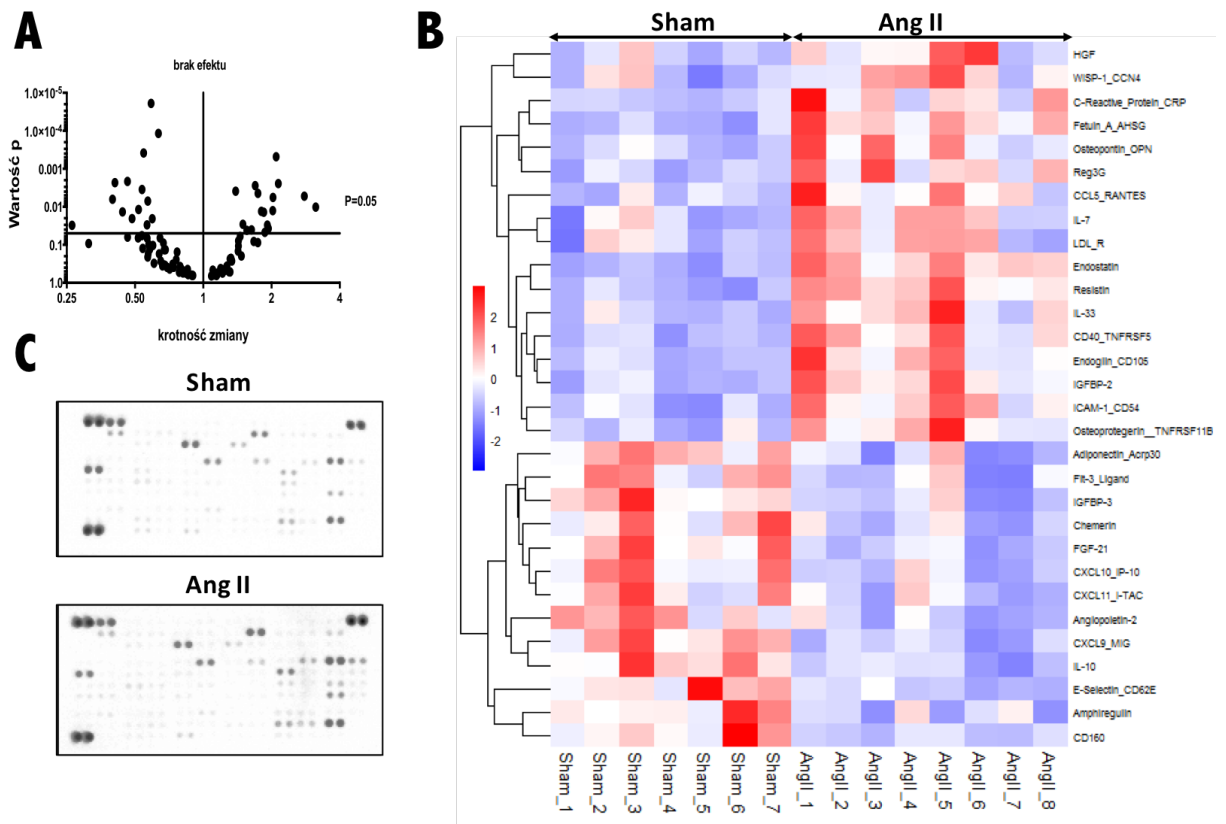
Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programów; SPSS Statistics wersja. 24.0 (IBM), GraphPad Prism 6c oraz R wersja 3.3.2. Analizę statystyczną wykonano za pomocą dwustronnego testu t-studenta dla próbek niesparowanych porównując 2 grupy badawcze. Dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla porównania 4 badanych grup. Analizy wariancji ANOVA dla powtarzalnych pomiarów, w których próbki były skorelowane ze sobą. Przyjęto wartość $p < 0.05$ jako istotną statystycznie.

Dane na wykresach zostały wyrażone jako wartość średnia \pm SEM (błąd standardowy). Wykresy sporządzono w programie GraphPad Prism 6c oraz R z wykorzystaniem rozszerzenia „pheatmap”.

IV. WYNIKI

IV.1. Ocena profilu cytokin/chemokin w okolonaczyniowej tkance tłuszczowej w nadciśnieniu tętniczym indukowanym angiotensyną II

Spośród 111 przebadanych na membranach cytokin/białek ekspresja 30 z nich była istotnie statystycznie zmieniona ($p < 0.05$) w pvAT pod wpływem NT wywołanego działaniem Ang II (Ryc. 12).



Ryc. 12. Ekspresja białek/cytokin w pvAT zmienionych pod wpływem działania Ang II. Wykres wulkaniczny wszystkich badanych białek (A), heatmap ze znamienne zmienionymi białkami (kolory odpowiadają wartości ekspresji, po standaryzacji Z, normalizowanej dla każdego białka osobno) (B), przykład membran (C) ($n=7-8$).

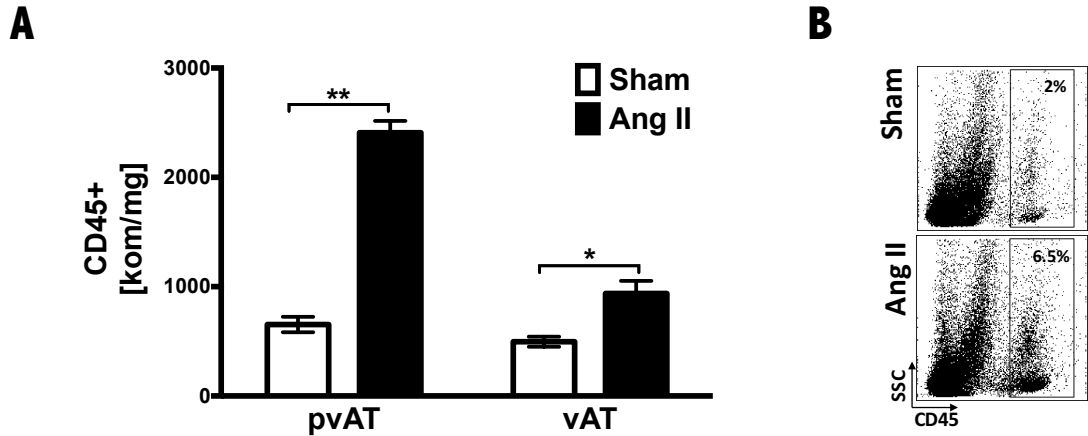
PVAT pochodzący od myszy z wszczepioną pompą uwalniającą Ang II wykazywał indukcję 17 białek oraz represję 13 białek w stosunku do myszy kontrolnych. Dokładne wyniki zostały zestawione w tabeli 4.

Tabela 4. Wykaz istotnie statystycznie ($p < 0.05$) zmienionych białek w pvAT pod wpływem infuzji Ang II ($n=7-8$).

Białko	Krotność zmiany (Ang II/sham)	Wartość p
C-Reactive Protein/CRP	3,8	0,0245
Reg3G	2,5	0,0073
IGFBP-2	2,5	0,0029
Osteoprotegerin/TNFRSF11B	2,3	0,0133
CD40/TNFRSF5	2,2	0,0030
Osteopontin OPN	2,1	0,0214
IL-33	1,9	0,0120
WISP-1/CCN4	1,9	0,0543
ICAM-1/CD54	1,9	0,0033
Fetuin A/AHSG	1,8	0,0006
HGF	1,8	0,0430
CCL5/RANTES	1,8	0,0288
Endoglin/CD105	1,8	0,0091
Endostatin	1,7	0,0001
IL-7	1,7	0,0195
LDL R	1,6	0,0442
Resistin	1,6	0,0002
Adiponectin/Acrp30	0,7	0,0035
Amphiregulin	0,7	0,0230
IL-10	0,6	0,0044
IGFBP-3	0,6	0,0066
Flt-3 Ligand	0,6	0,0150
Chemerin	0,5	0,0217
CXCL11/I-TAC	0,5	0,0408
Angiopoietin-2	0,5	0,0053
CXCL10/IP-10	0,5	0,0207
CXCL9/MIG	0,5	0,0018
FGF-21	0,5	0,0075
E-Selectin/CD62E	0,4	0,0153
CD160	0,3	0,0284

IV.2. Charakterystyka leukocytów infiltrujących okołonaczyniową oraz wisceralną tkankę tłuszczową w nadciśnieniu zależnym od angiotensyny II

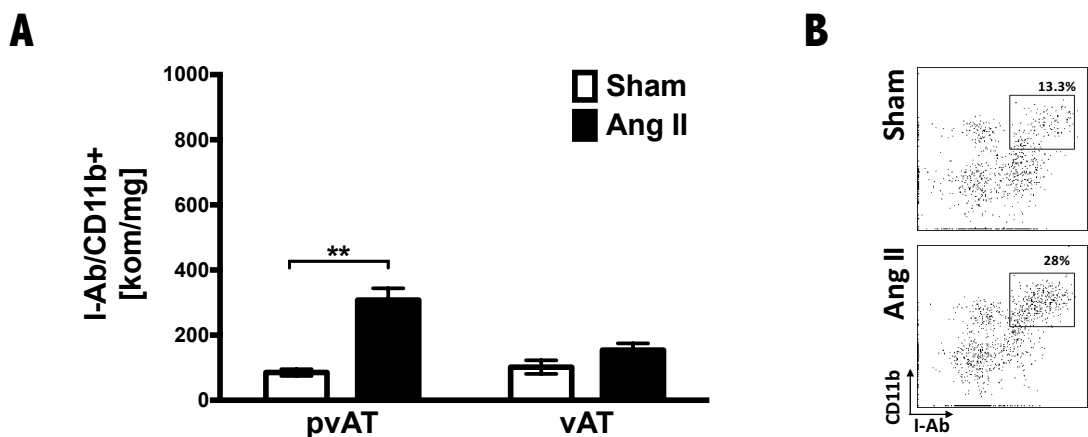
W toku rozwoju nadciśnienia zależnego od Ang II dochodzi do zwiększonej infiltracji pvAT oraz w mniejszym stopniu vAT przez leukocyty (CD45+). Angiotensyna II indukuje ponad 3,5-krotny wzrost komórek CD45+ w pvAT w porównaniu do myszy kontrolnych ($2407,8 \pm 108,7$ kom/mg vs. $654 \pm 70,4$ kom/mg, $p < 0,01$). Istotny wzrost leukocytów zaobserwowano również w vAT ($938,2 \pm 115,6$ kom/mg vs. $496,9 \pm 46,5$ kom/mg, $p < 0,05$). Niemniej, efekt Ang II był znamienne statystycznie wyższy w pvAT niż vAT ($p_{int} < 0.001$) (Ryc. 13).



Ryc. 13. Naciek leukocytny w pvAT i vAT (A). Przykładowy obraz cytometrii przepływowej komórek pochodzących z pvAT (B) (*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $p_{int} < 0,001$, $n=5$).

IV.2.1. Makrofagi

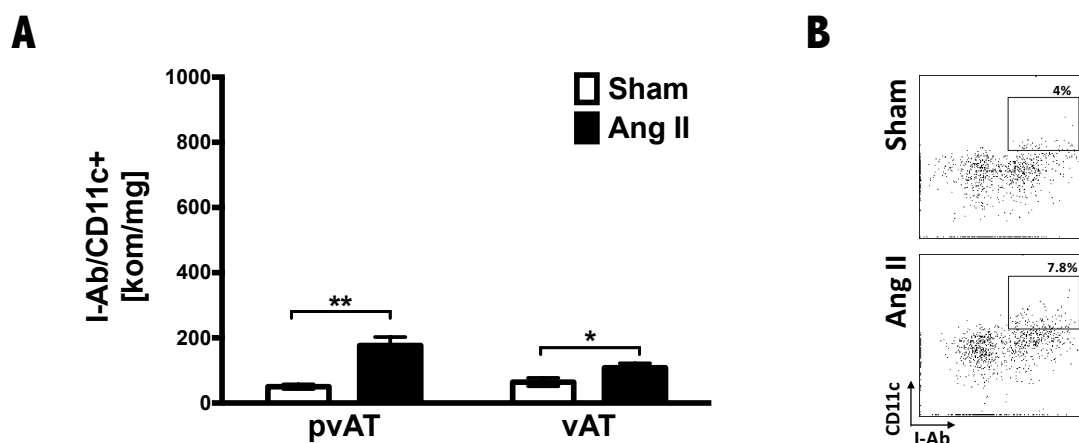
Wśród leukocytów rezydujących w pvAT wykazano znamiennej statystycznie wzrost makrofagów, definiowanych jako komórki I-Ab+CD11b+, u myszy z NT w porównaniu do kontroli ($307,6 \pm 36$ kom/mg vs. $85,1 \pm 10,4$ kom/mg, $p < 0,01$). Nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic w liczbie makrofagów infiltrujących vAT pomiędzy 2 grupami myszy, co skutkowało istotnie większym efektem Ang II w pvAT w porównaniu do vAT ($p_{int} < 0,001$) (Ryc. 14).



Ryc. 14. Makrofagi naciekające pvAT i vAT (A). Przykładowy obraz cytometrii przepływowej wytrawionych makrofagów z pvAT (B) (**- $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $p_{int} < 0,001$, $n=6$).

IV.2.2. Komórki dendrytyczne

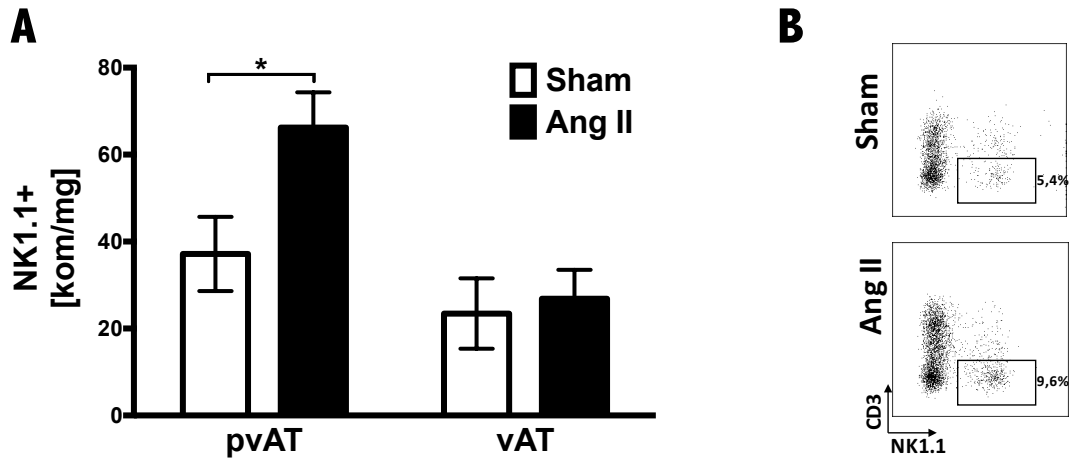
Infuzja Ang II powoduje zwiększoną akumulację DC (I-Ab+CD11c+) w pvAT (176±25 kom/mg vs. 50±7 kom/mg, Sham vs. Ang II, $p<0,01$). Również w vAT zaobserwowano istotny wzrost akumulacji DC (108±13 kom/mg vs. 64±12 kom/mg, $p<0,05$), jednak efekt Ang II był znamienne statystycznie wyższy w pvAT niż vAT ($p_{int}<0,05$) (Ryc. 15).



Ryc. 15. Komórki dendrytyczne naciekające pvAT i vAT (A). Przykładowy obraz wytrawionych makrofagów z okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej (B) (*- $p<0,05$, **- $p<0,01$ Sham vs. Ang II, $p_{int}<0,05$, $n=6$).

IV.2.3. Komórki NK

Nadciśnienie tętnicze zależne od Ang II powiązane jest z istotnym statystycznie wzrostem akumulacji komórek NK w pvAT, fenotypowanych na podstawie markera NK1.1+CD3- (37±8 vs. 66±8 kom/mg, $p<0,05$). Nie wykazano różnic w liczbie komórek infiltrujących vAT myszy kontrolnych oraz myszy z rozwiniętym NT (23±8 vs. 27±6 kom/mg) (Ryc. 16).

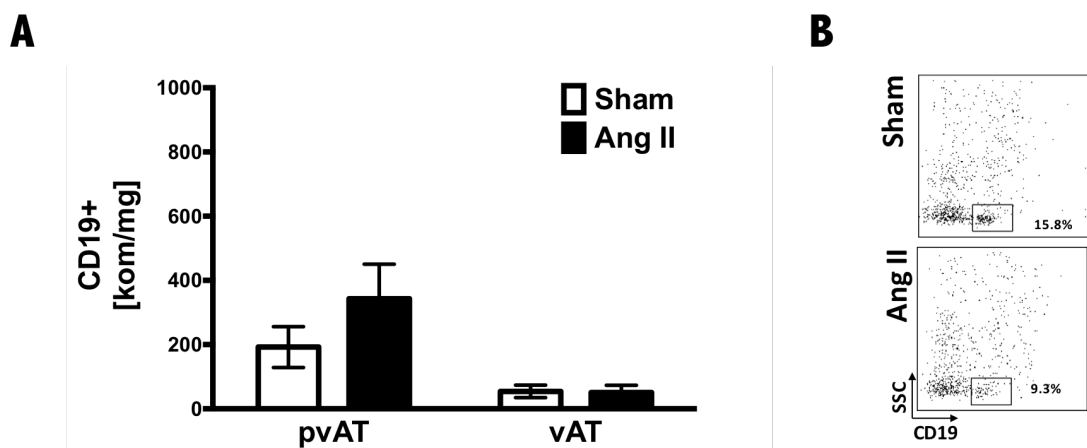


Ryc. 16. Komórki NK pvAT i vAT (A). Przykładowy obraz wytrawionych komórek NK z pvAT (B) (*- $p < 0,05$ Sham vs. Ang II, $n = 4-6$).

IV.2.4. Limfocyty

IV.2.4.1. Limfocyty B

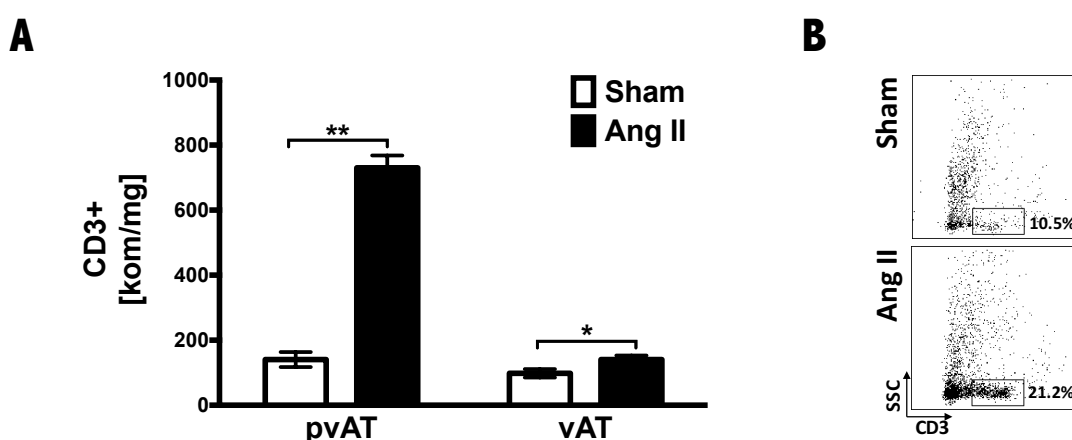
W toku rozwoju NT zależnego od Ang II nie dochodzi do znamiennego statystycznie wzrostu limfocytów B w pvAT oraz vAT (Ryc. 17).



Ryc. 17. Limfocyty B naciekające pvAT i vAT (A). Przykładowy obraz wytrawionych limfocytów B z pvAT (B) ($n = 6$).

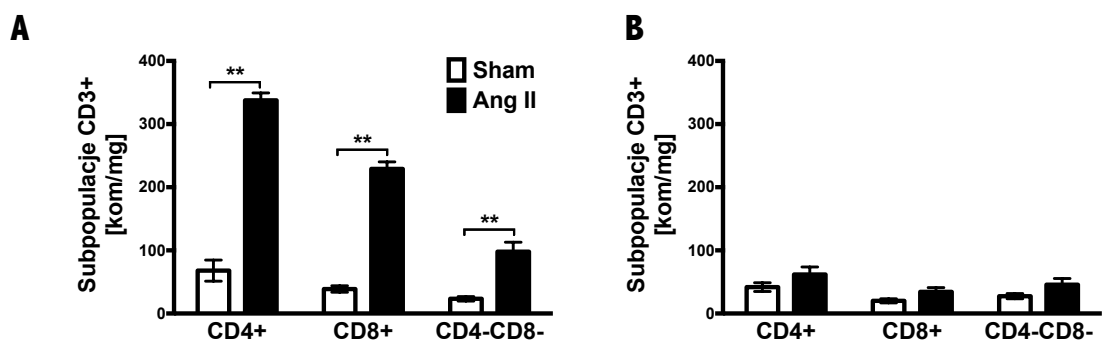
IV.2.4.2. Limfocyty T

Wśród naciekających leukocytów wykazano znamienne statystycznie, ponad 5-krotny, wzrost liczby limfocytów T (CD3+) spowodowany 14-dniową infuzją Ang II w porównaniu do myszy kontrolnych (730 ± 38 kom/mg vs. 140 ± 23 kom/mg tkanki, $p < 0,01$). Ang II spowodowała wzrost (1,4x) całkowitej liczby limfocytów T w tkance wisceralnej (140 ± 12 kom/mg vs. 98 ± 13 , $p < 0,05$). Pomimo tego, efekt Ang II był znamienne statystycznie wyższy pvAT w porównaniu do vAT ($p_{\text{int}} < 0,0001$) (Ryc. 18).



Ryc. 18. Naciek limfocytarny w pvAT i vAT (A). Przykładowy obraz cytometrii przepływowej wytrawionych komórek, pochodzących z pvAT (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $p_{\text{int}} < 0,0001$, $n = 5$).

W toku rozwoju nadciśnienia zależnego od Ang II dochodzi do zwiększenia liczby podstawowych subpopulacji limfocytów T rezydujących w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej w porównaniu do myszy kontrolnych. Zaobserwowano około 6-krotny wzrost komórek CD8+ (229 ± 11 kom/mg vs. 39 ± 5 kom/mg, $p < 0,01$), 5-krotny wzrost komórek CD4+ (337 ± 11 kom/mg vs. 68 ± 16 kom/mg, $p < 0,01$) oraz ponad 4-krotny wzrost komórek CD4-CD8- (97 ± 14 kom/mg vs. 23 ± 3 kom/mg, $p < 0,01$) (Ryc. 19A). Nie zaobserwowano istotnych zmian w liczbie limfocytów CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8- w tkance wisceralnej (Ryc. 19B).



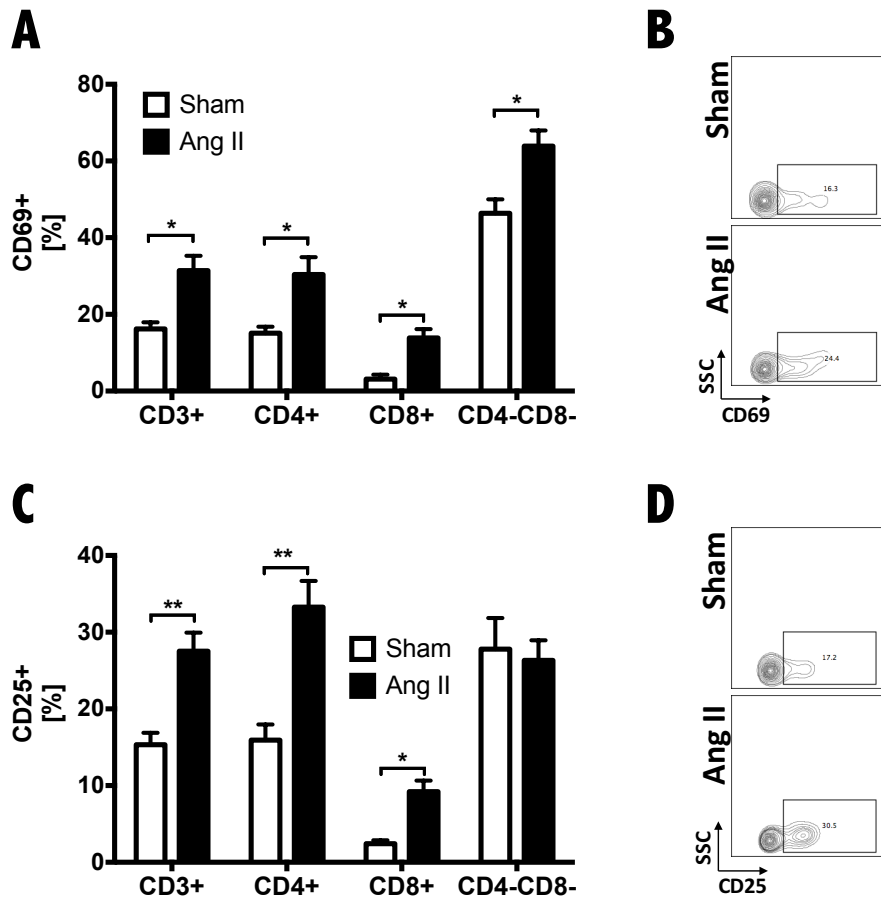
Ryc. 19. Naciek subpopulacji limfocytów T w pvAT (A) i vAT (B) (** $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $n = 5$).

IV.2.4.2.1. Ekspresja markerów aktywacji na powierzchni limfocytów T

Limfocyty T rezydujące w pvAT zostały poddane analizie pod względem receptora CD69+, będącego markerem wczesnej aktywacji. Średnia wartość procentowa limfocytów T posiadających marker CD69 wzrasta 2-krotnie po 14-dniowej infuzji Ang II ($16,2 \pm 2$ vs. $31,4 \pm 4$ %, $p < 0,05$) (Ryc. 20A i 20B). Wszystkie subpopulacje limfocytów T, rezydujące w pvAT, charakteryzowały się zwiększeniem ekspresji markera CD69 na swojej powierzchni u myszy z NT w stosunku do myszy kontrolnych. Największy stopień indukcji markera wczesnej aktywacji w stosunku do kontroli (ponad 4x) wykazywały limfocyty CD8+ ($3,2 \pm 1$ vs. $13,8 \pm 2$ %, $p < 0,05$), natomiast 2-krotną indukcję zaobserwowano na limfocytach CD4+ ($30,4 \pm 4$ vs. $15,1 \pm 2$ %, $p < 0,05$). Największym odsetkiem komórek CD69+ charakteryzowały się limfocyty CD4-CD8-, które dodatkowo istotnie wzrastały w toku rozwoju NT zależnego od Ang II ($46,3 \pm 4$ vs. $63,8 \pm 4$ %, $p < 0,05$) (Ryc. 20A).

Przeanalizowano również ekspresję receptora dla interleukiny 2 (IL-2), uważanego za późny marker aktywacji limfocytów T. Indukcja NT powiązana była ze wzrostem odsetka markera CD25 na limfocytach rezydujących w pvAT ($15,3 \pm 2$ vs. $27,5 \pm 3$ %, $p < 0,01$) (Ryc. 20C i 20D). Wśród subpopulacji limfocytów T największym odsetkiem komórek posiadających marker CD25+ charakteryzowały się limfocyty CD4+, wyizolowane od myszy poddanych działaniu Ang II w porównaniu z limfocytami CD4+ uzyskanymi z pvAT myszy kontrolnych ($33,3 \pm 3$ vs. 16 ± 2 %, $p < 0,01$). Infuzja Ang II skutkowała również ponad 3,5-krotną aktywacją limfocytów CD8+

w stosunku do myszy kontrolnych ($9,2 \pm 2$ vs. $2,4 \pm 0,5$, $p < 0,05$). Wysokim odsetkiem markera CD25 charakteryzowały się limfocyty CD4-CD8- u myszy kontrolnych, niemniej jednak infuzja Ang II nie wpływała na ich liczbę ($27,8 \pm 4$ vs. $26,3 \pm 3\%$) (Ryc. 20C).

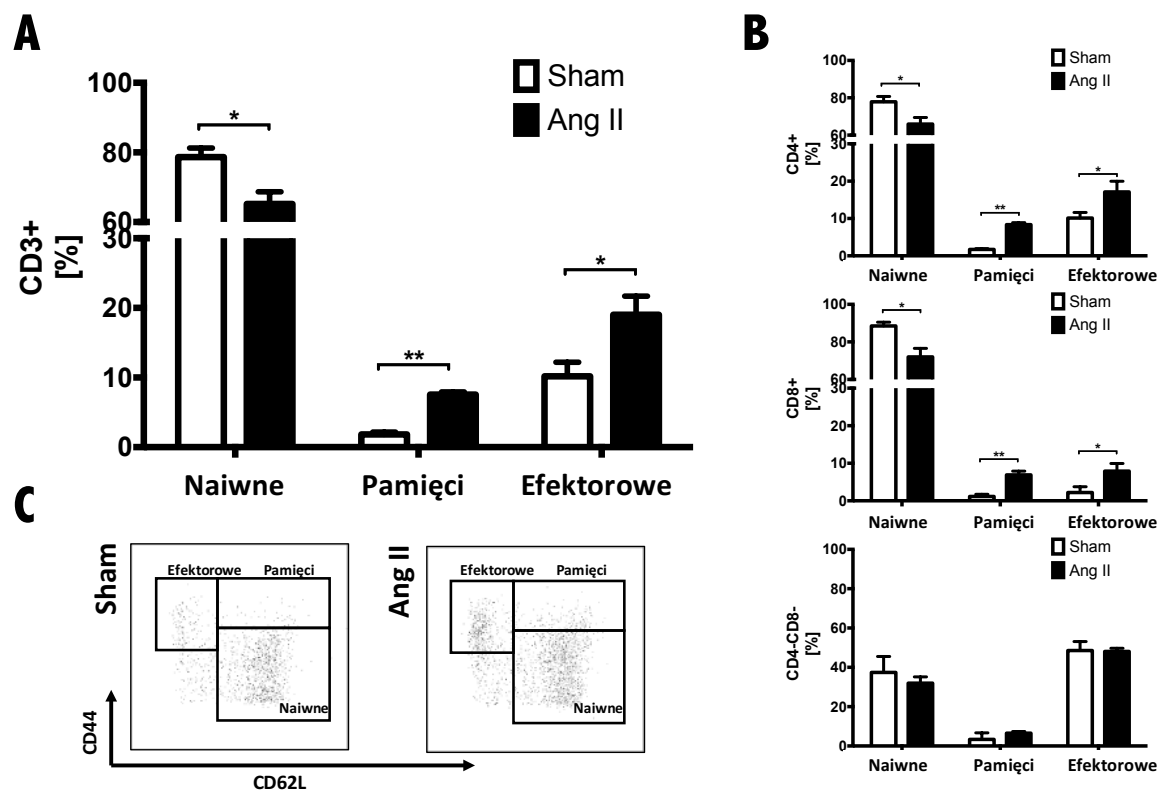


Ryc. 20. Odsetek limfocytów T, rezydujących w pvAT, posiadających markery wczesnej (A) oraz późnej (C) aktywacji. Przykład analizy cytometrycznej limfocytów T naciekających pvAT na podstawie markera CD69+(B) oraz CD25(D) (*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $n = 3-5$).

IV.2.4.2.2. Limfocyty naiwne, pamięci i efektorowe

Wyizolowane z tłuszczu okołoaortalnego komórki CD3+ przeanalizowano pod kątem markerów CD44+ oraz CD62L+ na podstawie których wyodrębniono subpopulacje limfocytów naiwnych (CD62L+CD44-), pamięci (CD62L+CD44+)

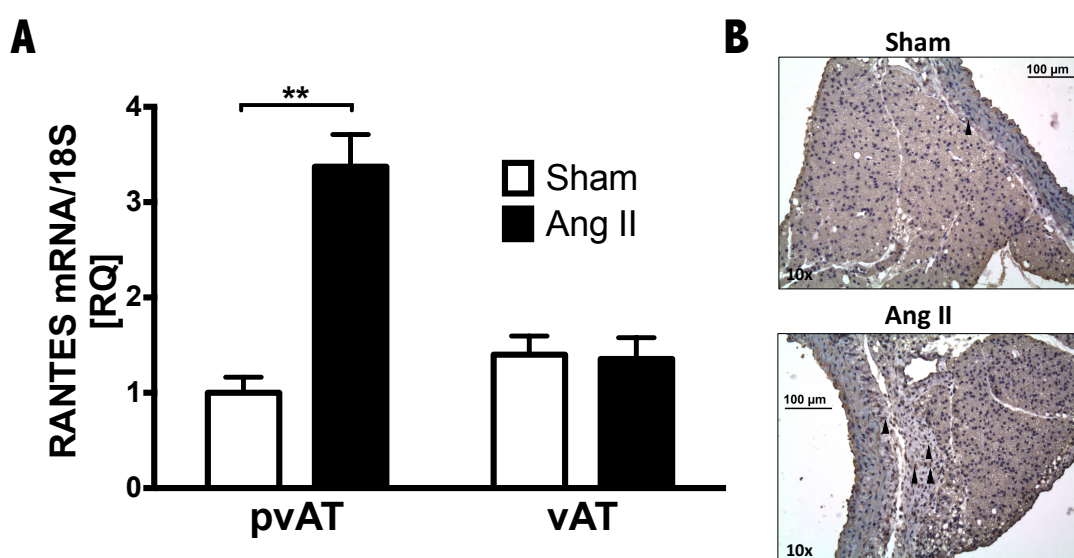
oraz efektorowe (CD62L-CD44+). Naciśnienie tętnicze powiązane było ze spadkiem naiwnych limfocytów T ($65,2 \pm 3,5$ vs. $78,6 \pm 2,6$ %, $p < 0,05$), wzrostem limfocytów T pamięci ($7,5 \pm 0,4$ vs. $1,8 \pm 0,3$ %, $p < 0,01$) oraz efektorowych ($19 \pm 2,6$ vs. $10,2 \pm 2$ %, $p < 0,05$) w porównaniu do myszy kontrolnych (Ryc. 21A i 21C). Analogiczny spadek limfocytów naiwnych oraz wzrost limfocytów pamięci i efektorowych wykazano w subpopulacjach limfocytów CD4+ (naiwne: 66 ± 4 vs. 78 ± 3 %, $p < 0,05$; pamięci: $8 \pm 0,05$ vs. $1,7 \pm 0,2$ %, $p < 0,01$; efektorowe: 17 ± 3 vs. 10 ± 2 %, $p < 0,05$) oraz limfocytach CD8+ (naiwne: 72 ± 4 vs. 88 ± 2 %, $p < 0,05$; pamięci: 7 ± 1 vs. $1,1 \pm 0,6$ %, $p < 0,01$; efektorowe: 8 ± 2 vs. $2,2 \pm 1,5$ %, $p < 0,05$). Największym odsetkiem limfocytów efektorowych charakteryzowała się subpopulacja CD4-CD8-, które stanowiły 48 ± 4 % u myszy kontrolnych oraz 48 ± 2 % u myszy z NT zależnym od Ang II. Nie wykazano również istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów naiwnych oraz pamięci na limfocytach CD4-CD8- pomiędzy badanymi grupami (Ryc. 21 B).



Ryc. 21. Odsetek limfocytów naiwnych, pamięci oraz efektorowych na komórkach CD3+ (A) oraz ich subpopulacjach (B) rezydujących w pvAT. Przykład analizy cytometrycznej limfocytów T naciekających pvAT podstawie markera CD44+ oraz CD62L+ (C) (*- $P < 0,05$, **- $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $n = 3-5$).

IV.2.5. Poziom ekspresji RANTES w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej

W toku rozwoju NT zależnego od Ang II dochodzi do zwiększonej ekspresji mRNA (Ryc. 22A) oraz białka (Ryc. 22B) RANTES w pvAT. Wykazano ponad 3-krotną indukcję mRNA RANTES u myszy z NT w stosunku do myszy kontrolnych ($3,3 \pm 0,3$ vs. $1 \pm 0,2$, $p < 0,01$). Nie zaobserwowano wzrostu chemokiny RANTES w vAT u myszy z NT zależnym od Ang II (Ryc. 22A), co skutkowało istotnie większym efektem działania Ang II w pvAT, w porównaniu do vAT ($p_{int} < 0,001$).

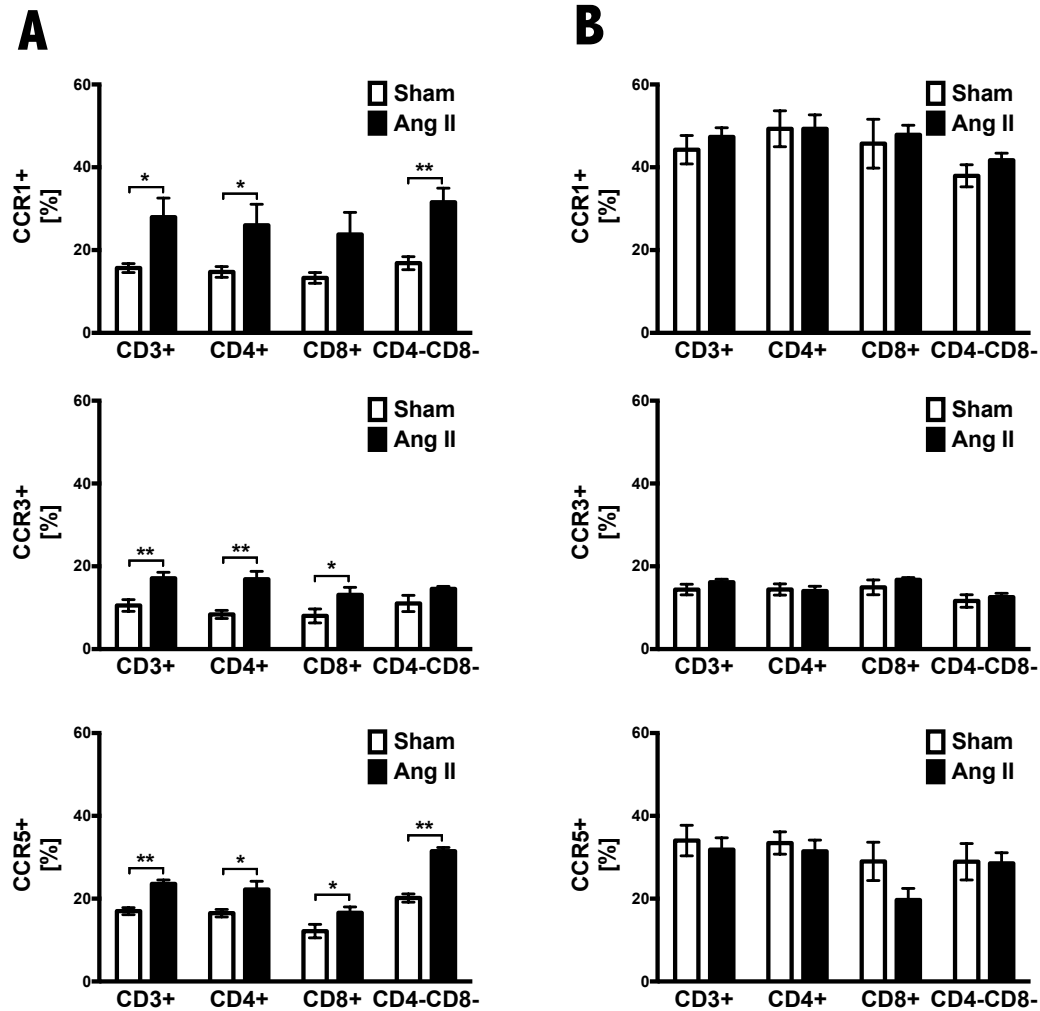


Ryc. 22. Ekspresja mRNA chemokiny RANTES w pvAT oraz wisceralnym. Wizualizacja chemokiny RANTES metodą immunohistochemii w pvAT (B) (**- $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $n = 5$ /grupę, $p_{int} < 0,001$). Zdjęcia wykorzystane dzięki uprzejmości dr A. Sagan (University of Glasgow).

IV.2.6. Ekspresja receptorów dla chemokiny RANTES na powierzchni limfocytów T

Angiotensyna II statystycznie znacząco zwiększa procent komórek z ekspresją receptorów dla chemokiny RANTES na powierzchni limfocytów T w pvAT: CCR1 ($27,9 \pm 4,6\%$ vs. $15,7 \pm 1\%$, $p < 0,05$), CCR3 ($17,1 \pm 1,4\%$ vs. $10,5 \pm 1,4\%$, $p < 0,01$), CCR5 ($23,6 \pm 0,9\%$ vs. $17 \pm 0,9\%$, $p < 0,01$) (Ryc. 23A). Ekspresja wszystkich receptorów dla chemokiny RANTES zwiększa się również na subpopulacji limfocytów CD4,

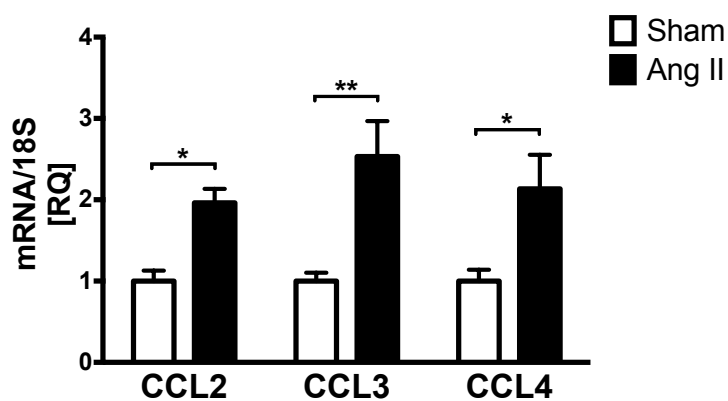
natomiast limfocyty CD8 charakteryzowały się zwiększeniem odsetka receptorów CCR3 oraz CCR5. Nie zaobserwowano powyższych zmian w limfocytach infiltrujących vAT (Ryc. 23B).



Ryc. 23. Ekspresja receptorów dla chemokiny RANTES na powierzchni limfocytów T rezydujących w pvAT (A) oraz vAT (B) ($n=5$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ Sham vs. Ang II).

IV.2.7. Ekspresja innych chemokin będących ligandami dla receptorów CCR1, CCR3 i CCR5

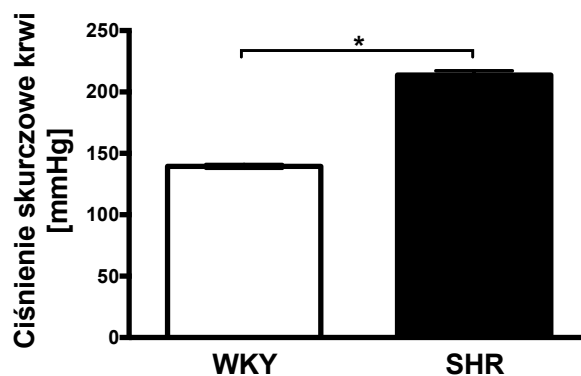
Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa pochodząca od myszy z wyindukowanym nadciśnieniem tętniczym charakteryzowała się zwiększoną ekspresją mRNA dla chemokin będących ligandami receptorów CCR1, CCR3 oraz CCR5. Największy stopień indukcji w stosunku do kontroli wykazywał CCL3 ($2,5\pm 0,4$ vs. $1\pm 0,1$, $p<0,01$), następnie CCL4 ($2,1\pm 0,4$ vs. $1\pm 0,2$, $p<0,05$) oraz CCL2 ($1,9\pm 0,2$ vs. $1\pm 0,1$, $p<0,05$) (Ryc. 24).



Ryc. 24. Ekspresja mRNA chemokin prozapalnych w pvAT (*- $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $n = 4-5$).

IV.3. Charakterystyka okołonaczyniowego stanu zapalnego w spontanicznym nadciśnieniu tętniczym u szczurów

Szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie tętnicze (SHR) charakteryzowały się wyższym ciśnieniem tętniczym krwi o ponad 74 mmHg w porównaniu do szczurów normotensyjnych (WKY, $213,8 \pm 3,4$ vs. $139,4 \pm 1,6$ mmHg, $p < 0,01$) (Ryc. 25).

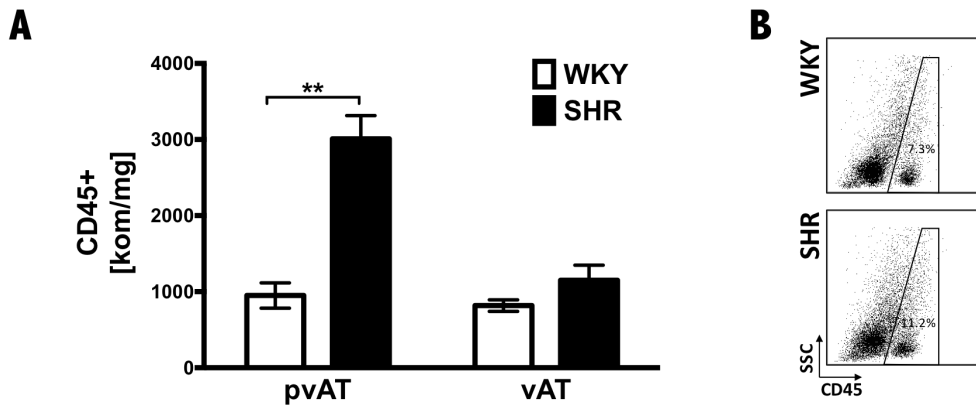


Ryc. 25. Ciśnienie tętnicze krwi u szczurów SHR i WKY (*- $p < 0,01$, $n = 7$).

IV.3.1. Infiltracja okołonaczyniowej oraz wisceralnej tkanki tłuszczowej przez leukocyty

Spontaniczne NT korelowało ze zwiększoną, istotną statystycznie, akumulacją leukocytów (CD45+) w pvAT w porównaniu ze szczurami, które nie wykształcają nadciśnienie tętniczego (3008 ± 306 vs. 950 ± 166 kom/mg, $p < 0,01$). Nie stwierdzono

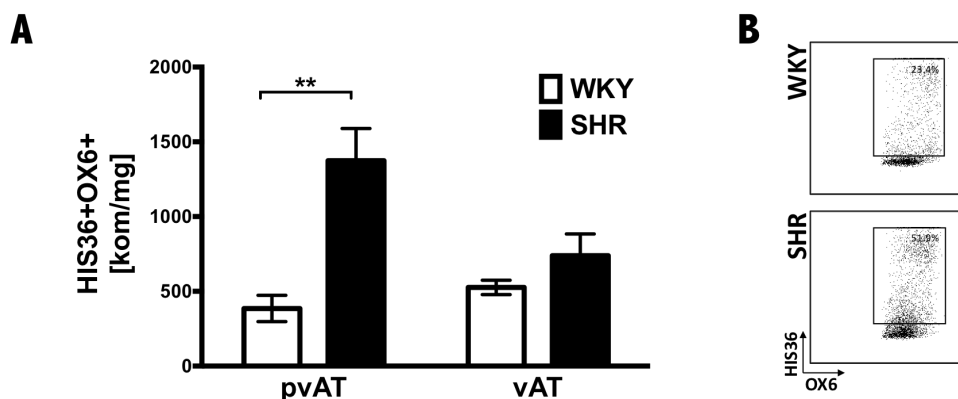
istotnych różnic w liczbie leukocytów naciekających wisceralną tkankę tłuszczową (Ryc. 26), co skutkowało większym efektem NT w pvAT w porównaniu do vAT ($p_{int}<0,0001$).



Ryc. 26. Naciek leukocytarny w pvAT i vAT (A). Przykładowy obraz cytometrii przepływowej komórek CD45+ pochodzących z pvAT (**- $p<0,01$ WKY vs. SHR, $p_{int}<0,0001$, $n=7$).

IV.3.1.1. Makrofagi

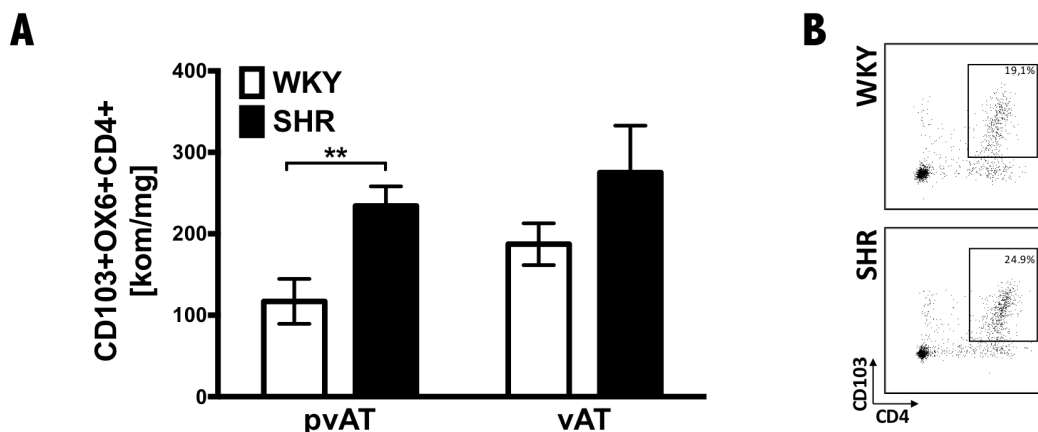
Liczba makrofagów (HIS36+OX6+) przyrasta 3,5-krotnie w pvAT szczurów SHR w porównaniu do szczurów WKY (1374 ± 215 vs. 385 ± 87 kom/mg, $p<0,01$). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w liczbie makrofagów rezydujących w vAT (Ryc. 27), co skutkowało znamienne statystycznie większym efektem NT w pvAT w porównaniu do vAT ($p_{int}<0,05$).



Ryc. 27. Naciek makrofagów w pvAT i vAT (A) oraz przykładowy obraz cytometrii przepływowej komórek pochodzących z pvAT (B) (**- $p<0,01$ WKY vs. SHR, $p_{int}<0,05$, $n=7$).

IV.3.1.2. Komórki dendrytyczne

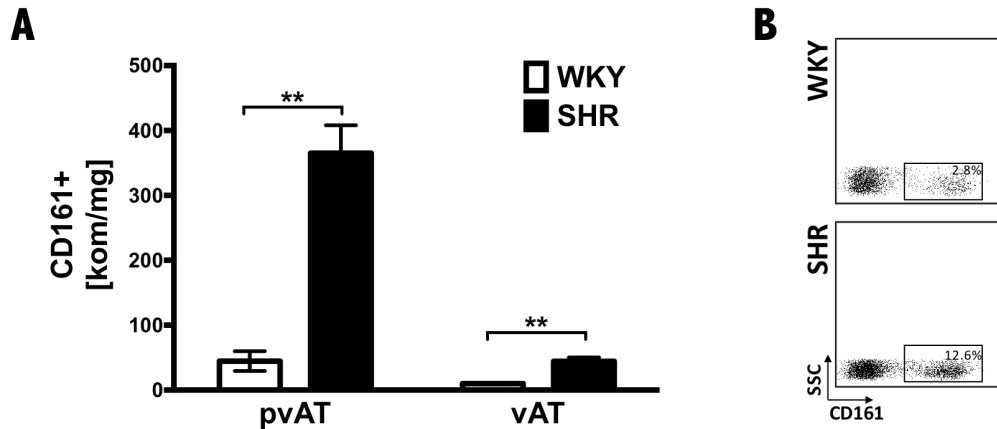
Wśród leukocytów, naciekających pvAT, wykazano znamiennej statystycznie wzrost DC (CD103+OX6+CD4+) u szczurów ze spontanicznym NT w porównaniu do szczurów normotensyjnych (234±24 vs. 117±27 kom/mg, $p<0,01$). Nie wykazano znamienych statystycznie różnic i liczbie DC w pvAT (Ryc. 28).



Ryc. 28. Naciek komórek dendrytycznych w pvAT i vAT (A) oraz przykładowy obraz cytometrii przepływowej komórek pochodzących z pvAT (B) (** - $p<0,01$ WKY vs. SHR, $n=7$).

IV.3.1.3. Komórki NK

Spontaniczne NT powiązane było z ponad 8-krotnym, znamienym statystycznie, wzrostem liczby komórek NK (CD161+) w pvAT (365±42 vs. 44±15, kom/mg, $p<0,01$) oraz 4-krotnym, istotnym statystycznie, wzrostem ich liczby w vAT (44±9 vs. 9±1 kom/mg, $p<0,01$) w stosunku do szczurów kontrolnych (Ryc. 29). Niemniej jednak liczba komórek NK infiltrujących pvAT była kilkakrotnie wyższa niż miało to miejsce w vAT, co skutkowało istotnie większym efektem NT w pvAT porównując do vAT ($p_{int}<0,0001$).

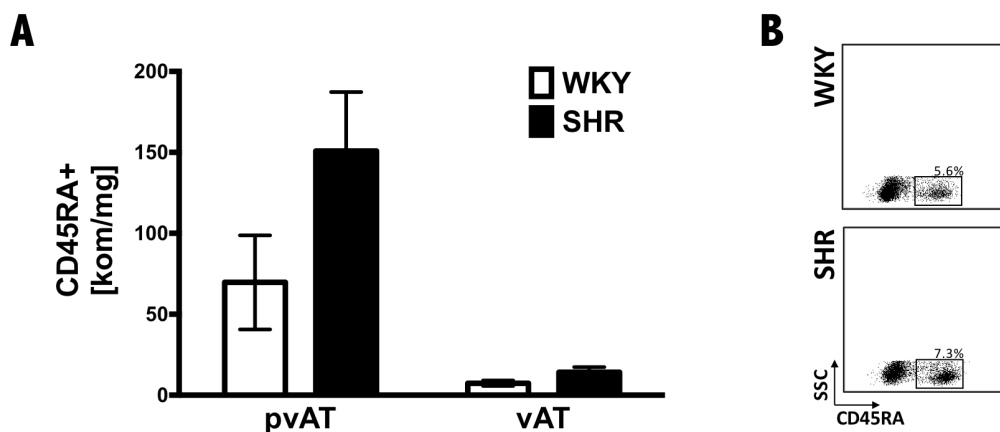


Ryc. 29. Naciek komórek NK w pvAT i vAT (A) oraz przykładowy obraz cytometrii przepływowej komórek pochodzących z pvAT (B), (** - $p < 0,01$ WKY vs. SHR, $p_{int} < 0,0001$, $n=7$).

IV.3.1.4. Limfocyty

IV.3.1.4.1. Limfocyty B

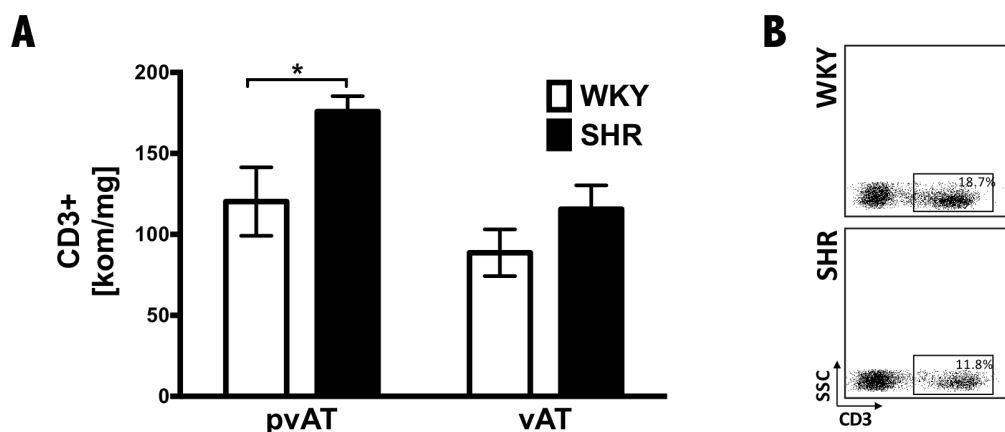
Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pod względem liczby limfocytów B, fenotypowanych jako CD45RA, infiltrujących okołonaczyniową oraz wisceralną tkankę tłuszczową u szczurów SHR i WKY (Ryc. 30).



Ryc. 30. Naciek limfocytów B w pvAT i vAT (A) oraz przykładowy obraz cytometrii przepływowej komórek pochodzących z pvAT (B) ($n=7$).

IV.3.1.4.2. *Limfocyty T*

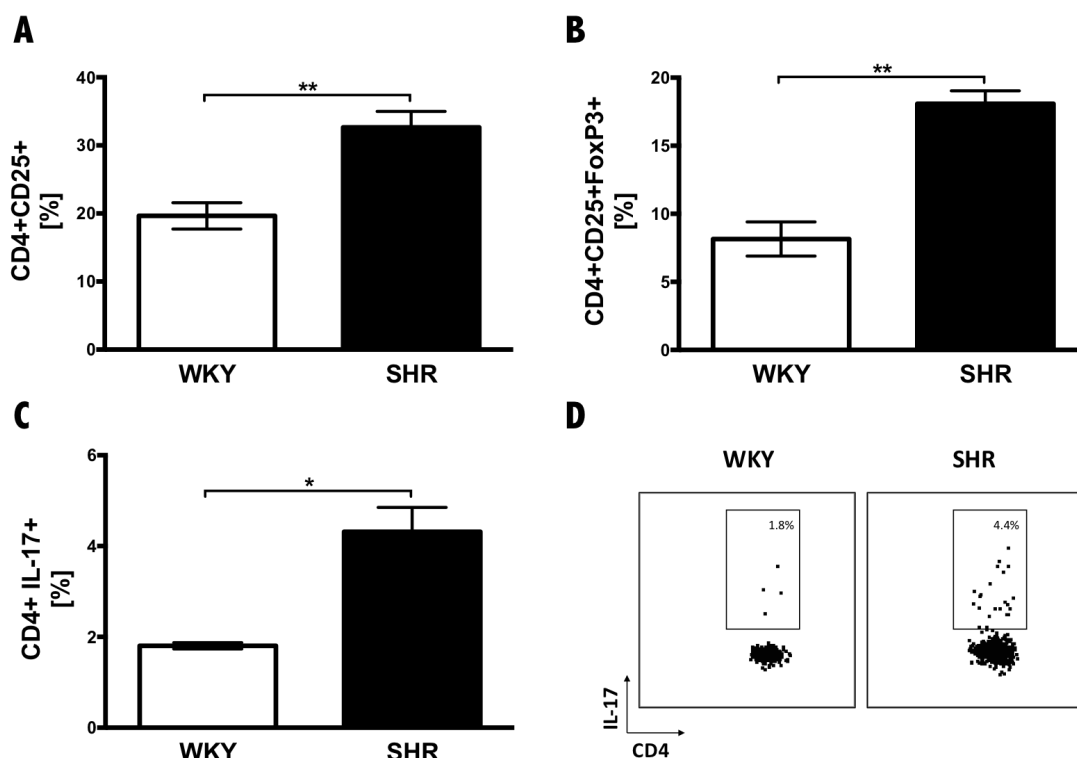
Szczury spontanicznie rozwijające NT cechowały się zwiększoną liczbą limfocytów T rezydujących w pvAT w porównaniu do szczurów normotensyjnych (175 ± 9 vs. 120 ± 21 kom/mg, $p < 0,05$). Analogicznego efektu nie wykazano analizując pvAT (Ryc. 31).



Ryc. 31. Naciek limfocytów T w pvAT i vAT (A) oraz przykładowy obraz cytometrii przepływowej komórek pochodzących z pvAT (B) ($n=7$).

IV.3.1.4.2.1. *Limfocyty T_{reg} oraz T_{H17}*

Wśród limfocytów T, naciekających pvAT szczurów SHR, zaobserwowano zwiększony odsetek limfocytów CD4+ zawierających marker CD25 (32 ± 2 vs. 19 ± 2 %, $p < 0,01$) (Ryc. 32A). Ponadto pvAT szczurów SHR infiltrowana była w większym stopniu przez limfocyty T regulatorowe (CD4+CD25+FoxP3+) w porównaniu ze szczurami WKY (18 ± 1 vs. 8 ± 1 %, $p < 0,01$) (Ryc. 32B). Odnotowano również ponad 2-krotny wzrost limfocytów T_{H17} u szczurów SHR w porównaniu do szczurów WKY ($4,3 \pm 0,5$ vs. $1,8 \pm 0,06$ %, $p < 0,05$) (Ryc. 32C i 32D).

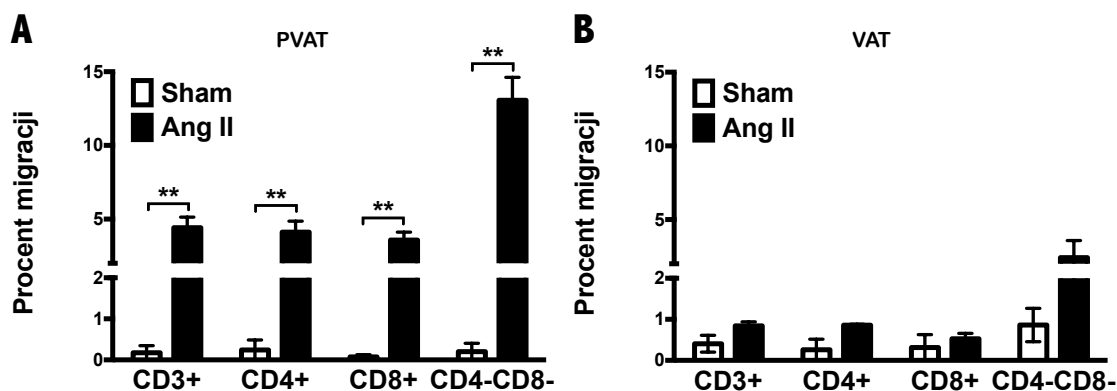


Ryc. 32. Naciek limfocytów T CD4+CD25+ (A), limfocytów regulatorowych Treg (B) oraz limfocytów T_H17 (C) w pvAT. Przykładowy obraz cytometrii przepływownej przedstawiający produkcję IL-17 (D) (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ WKY vs. SHR, $n=6$).

IV.4. Chemotaktyczne właściwości limfocytów T

IV.4.1. Chemotaksja limfocytów T w kierunku okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej

W toku przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że limfocyty T charakteryzują się zwiększonym potencjałem chemotaktycznym w kierunku supernatantu z pvAT pochodzącej od myszy z wyindukowanym NT ($4,41 \pm 0,72\%$ vs. $0,17 \pm 0,17\%$, $p < 0,01$) (Ryc. 33B). Nie zaobserwowano istotnych różnic w migracji limfocytów T w kierunku nadsączy pozyskanych z hodowli vAT ($0,84 \pm 0,1\%$ vs. $0,3 \pm 0,26\%$) (Ryc. 33B). Ponadto, pvAT myszy Ang II wykazuje większy potencjał chemotaktyczny na limfocyty T w porównaniu z vAT (Ryc. 33A).

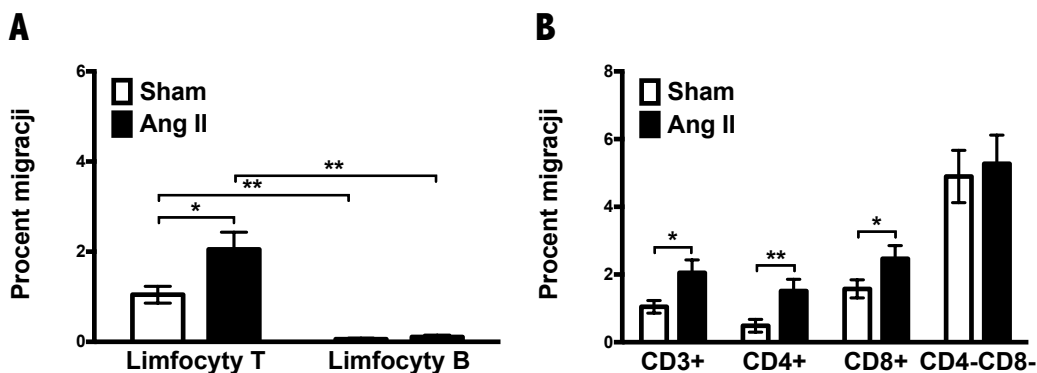


Ryc. 33. Migracja limfocytów T w pvAT (A) i vat (B) tkanki tłuszczowej ($n=3$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ Sham pvAT vs. Ang II pvAT).

Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa pochodząca od myszy z wyindukowanym nadciśnieniem tętniczym istotnie zwiększała chemotaksję limfocytów CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8- ($p<0,01$). Największą migrację w kierunku tłuszczu okołoaortalnego wykazywały limfocyty o fenotypie CD3+CD4-CD8-, pochodzące od myszy poddanych działaniu Ang II. Charakteryzowały się one ponad 3-krotnie zwiększoną aktywnością chemotaktyczną w porównaniu z limfocytami o fenotypie CD4+ ($13,06\pm1,5$ vs. $4,11\pm0,7$ %) oraz CD8+ ($13,06\pm1,5$ vs. $3,58\pm0,5$ %) (Ryc. 33B). Nie wykazano powyższych prawidłowości w odniesieniu do nadsączy uzyskanych z tkanek wisceralnych myszy kontrolnych i nadciśnieniowych (Ryc. 33B).

IV.4.2. Chemotaktyczne właściwości limfocytów krwi obwodowej w kierunku chemokiny RANTES

W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że Ang II dwukrotnie zwiększa potencjał chemotaktyczny limfocytów T krwi obwodowej, pochodzących od myszy poddawanych działaniu Ang II w porównaniu z myszami kontrolnymi w kierunku chemokiny RANTES (10ng/mL) ($2,05\pm0,38\%$ vs. $1,04\pm0,22\%$, $p<0,05$) (Ryc. 34A). Ponadto chemokina RANTES istotnie statystycznie nasila migrację limfocytów T, nie zwiększając chemotaksji limfocytów B ($2,05\pm0,18$ vs. $0,1\pm0,04$ oraz Sham $1,04\pm0,18$ vs. $0,06\pm0,02$) (Ryc. 34A).

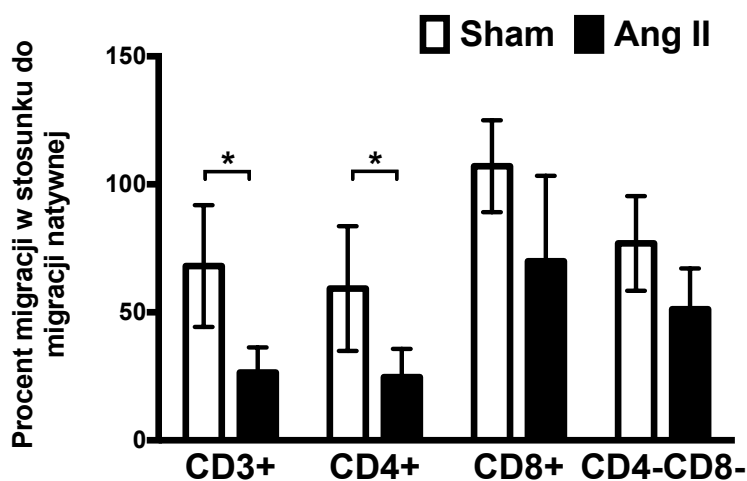


Ryc. 34. Migracja limfocytów T i B (A) oraz subpopulacji limfocytów T (B) w kierunku chemokiny RANTES (10ng/mL) (n=11, * p<0,05, ** p<0,01).

Największą migrację w obu badanych grupach wykazywały limfocyty T o fenotypie CD4-CD8- w porównaniu z limfocytami CD4+ i CD8+. Angiotensyna II powoduje znamieny wzrost migracji komórek CD4+ ($1,51 \pm 0,35\%$ vs. $0,48 \pm 0,19\%$, $p < 0,01$) oraz CD8+ ($2,47 \pm 0,39\%$ vs. $1,57 \pm 0,27\%$, $p < 0,05$) w kierunku chemokiny RANTES (Ryc. 34B).

IV.4.2.1. Wpływ blokady RANTES na chemotaksję limfocytów T w kierunku okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej

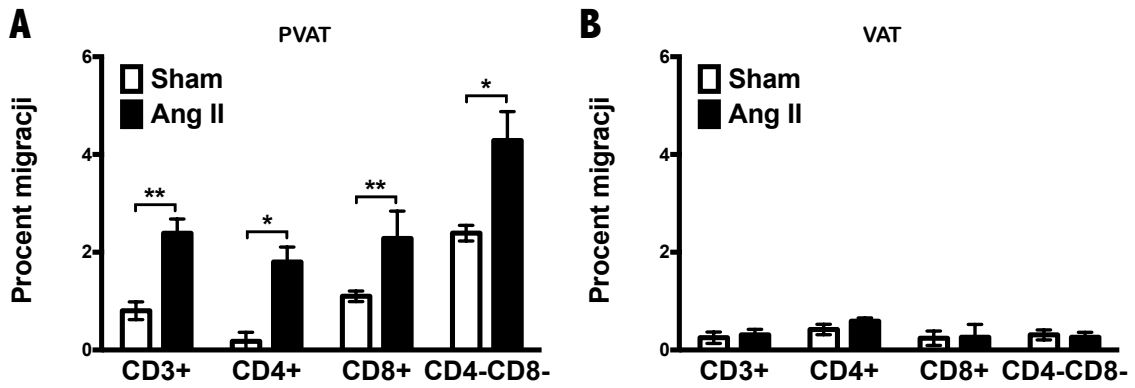
Zastosowanie przeciwciała wiążącego RANTES (0,5µg/ml) obniża chemotaktyczne właściwości limfocytów T w kierunku supernatantu uzyskanego z pvAT w stosunku do migracji natywnej (bez przeciwciała anty-RANTES). Inhibicja migracji limfocytów T jest istotnie niższa w supernatantach myszy Ang II w porównaniu do myszy kontrolnych ($26 \pm 9\%$ vs. $68 \pm 23\%$, $p < 0,05$ test t jednostronny) (Ryc. 35). Anty-RANTES istotnie obniżyło proces chemotaksji limfocytów CD4+ w kierunku nadsącza uzyskanego z pvAT myszy Ang II w porównaniu do nadsącza myszy kontrolnej ($24 \pm 11\%$ vs. $59 \pm 24\%$, $p < 0,05$). Nie zaobserwowano istotnych zmian w limfocytach CD8+ oraz CD4-CD8-, niemniej te ostatnie wykazywały trend spadkowy (Ryc. 35).



Ryc. 35. Migracja limfocytów T w kierunku supernatantu z przeciwciałem wiążącym RANTES (*- $p < 0,05$, $n = 4$).

IV.4.3. Chemotaksja limfocytów T rezydujących w okołonaczyniowej i wisceralnej tkance tłuszczowej

Limfocyty T rezydujące w pvAT, pozyskane na drodze trawienia enzymatycznego, pochodzące od myszy z NT wykazują prawie 3-krotny wzrost potencjału migracyjnego w kierunku RANTES (10ng/mL) w porównaniu z limfocytami pozyskanymi od myszy kontrolnych ($2,4 \pm 0,3\%$ vs. $0,8 \pm 0,2\%$, $p < 0,01$) (Ryc. 36A). Subpopulacje limfocytów CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8- wyizolowanych z tłuszczu myszy Ang II migrowały bardziej efektywnie w porównaniu z limfocytami wyizolowanymi od myszy kontrolnych. Wykazano 10-krotny wzrost migracji limfocytów CD4+ ($p < 0,05$) oraz 2-krotny wzrost migracji limfocytów CD8+ ($p < 0,01$) i CD4-CD8- ($p < 0,05$), rezydujących w tłuszczu myszy nadciśnieniowych w porównaniu z limfocytami myszy kontrolnych, w kierunku chemokiny RANTES (Ryc. 36A). Migracja limfocytów T infiltrujących vAT była na minimalnym poziomie w obu badanych grupach (Ryc. 36B).

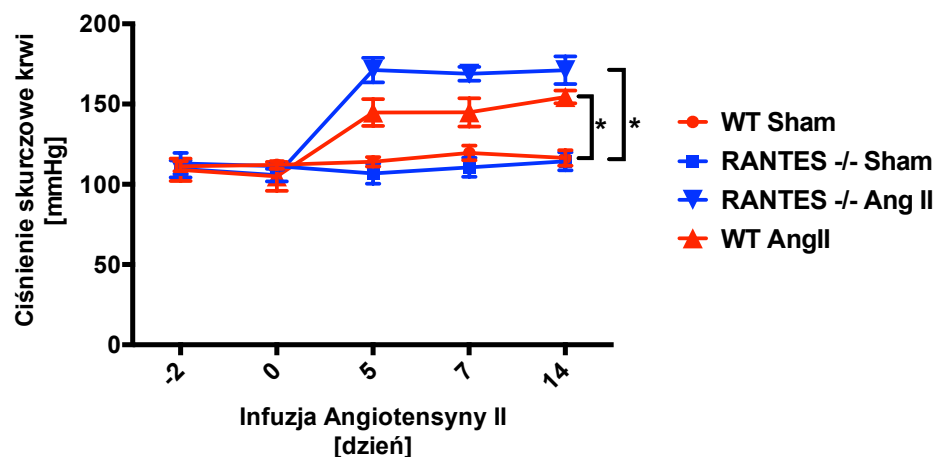


Ryc. 36. Migracja limfocytów T wyizolowanych z pvAT (A) oraz vAT (B) w kierunku chemokiny RANTES (10ng/mL) (n=4, * p<0,05, ** p<0,01).

IV.5. Rola chemokiny RANTES w regulacji ciśnienia tętniczego krwi i funkcji naczyń krwionośnych

IV.5.1. Wpływ RANTES na rozwój nadciśnienia tętniczego krwi

Infuzja Ang II powoduje wzrost ciśnienia tętniczego krwi u myszy WT oraz RANTES -/-. Po 14 dniach infuzji Ang II ciśnienie skurczowe krwi wynosiło średnio 155±4 mmHg i było wyższe o około 40 mmHg wyższe w stosunku do myszy kontrolnych (p<0,01). Myszy z usuniętym genem dla RANTES po 14 dniowej infuzji Ang II wykazały ciśnienie tętnicze krwi wyższe o około 54 mmHg w stosunku do kontrolnych myszy RANTES -/- (p<0,01). Angiotensyna II spowodowała większy wzrost średniego ciśnienia skurczowego krwi u myszy RANTES-/- w porównaniu do myszy WT (171±8 vs. 155±4 mmHg), aczkolwiek wzrost ten nie był istotnie statystyczny (ANOVA dla powtarzalnych pomiarów). Nie wykazano różnic w ciśnieniu tętniczym krwi u myszy kontrolnych (Ryc. 37).

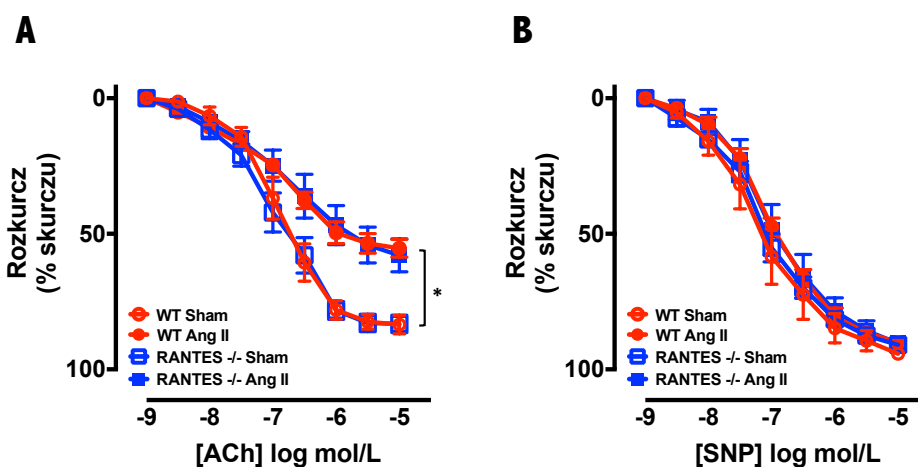


Ryc. 37. Ciśnienie tętnicze krwi (* - $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $n = 6$).

IV.5.2. Wpływ RANTES na czynność naczyń krwionośnych

IV.5.2.1. Naczynia oporowe (krezkowe)

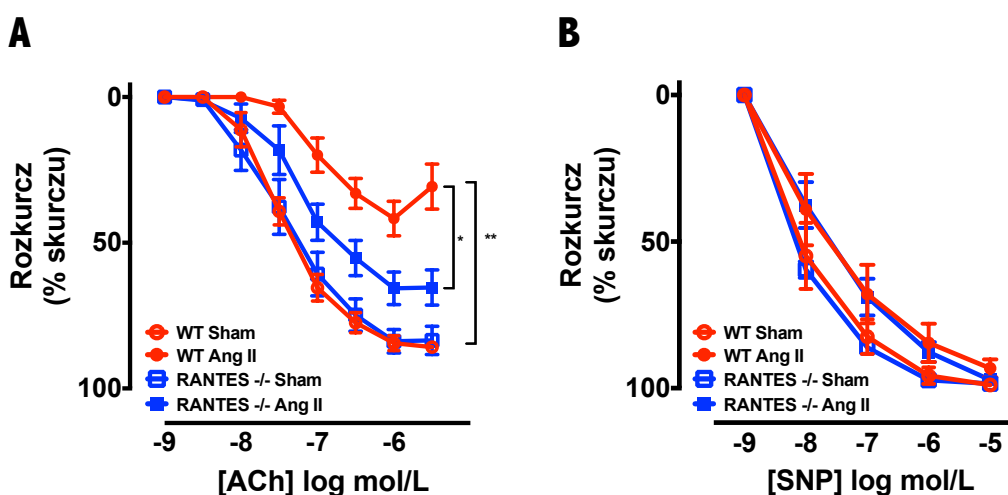
W toku rozwoju NT zależnego od Ang II dochodzi do upośledzenia funkcji śródbłonna naczyń krezkowych u myszy WT oraz myszy z delacją RANTES ($p < 0,01$). Nie zaobserwowano wpływu braku genu kodującego chemokinę RANTES na funkcjonowanie naczyń krezkowych w grupach kontrolnych (Ryc. 38A). Niezależny od śródbłonna rozkurcz naczyń krezkowych na wzrastające dawki nitroprusydku sodu (SNP) nie wykazał istotnych statystycznie różnic w żadnej z badanych grup (Ryc. 38B).



Ryc. 38. Rozkurcz naczyń krezkowych zależna od wzrastających dawek acetylocholiny (A) oraz nitroprusydku sodu (B) ($n = 5-6$).

IV.5.2.2. Aorta

Angiotensyna II prowadzi do upośledzonej funkcji śródbłonna naczyniowego aorty w porównaniu z myszami kontrolnymi (WT vs. WT Ang II, $p < 0,01$). Myszy pozbawione genu dla RANTES wykazały istotnie mniejszą dysfunkcję śródbłonna naczyniowego po podaniu Ang II, w porównaniu z myszami C57BL6, które również poddawane były infuzji Ang II ($p < 0,05$) (Ryc. 39A). Usunięcie genu kodującego RANTES nie wpływa na prawidłowe funkcjonowanie śródbłonna naczyniowego u myszy kontrolnych. Niezależny od śródbłonna rozkurcz naczyń dużych naczyń krwionośnych na nitroprusydek sodu (SNP) nie różnił się pomiędzy grupami (Ryc. 39B).



Ryc. 39. Rozkurcz krążków aorty zależna od wzrastających dawek acetylocholin (A) oraz nitroprusydku sodu (B) (* - $p < 0,01$, WT Sham vs. WT AngII, ** - $p < 0,05$ WT Ang II vs. RANTES-/- AngII, $n = 5-6$).

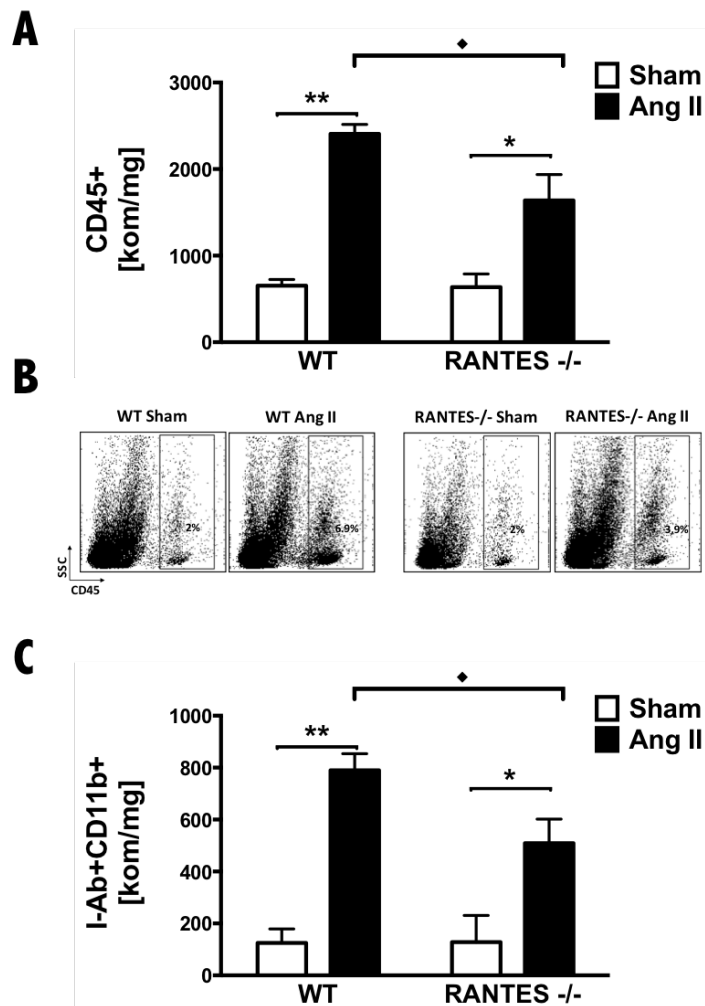
IV.6. Rola chemokiny RANTES w indukcji okołonaczyniowego stanu zapalnego

IV.6.1. Wpływ chemokiny RANTES na infiltrację leukocytów do okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej

Nadciśnienie tętnicze zależne od Ang II powiązane jest z ponad 3,5-krotną infiltracją pVAT przez komórki CD45⁺ u myszy WT ($p < 0,01$). Myszy pozbawione

genu kodującego chemokinę RANTES charakteryzowały się ponad 2,5-krotnym zwiększeniem liczby komórek na mg tkanki po infuzji Ang II w stosunku do myszy kontrolnych (636 ± 152 vs. 1637 ± 398 kom/mg, $p < 0,05$). Niemniej, efekt działania Ang II na akumulację leukocytów był znamienne statystycznie wyższy w pvAT myszy WT niż pvAT myszy RANTES^{-/-} ($p_{int} < 0,05$). Nie zaobserwowano znamienych różnic w liczbie komórek naciekających pvAT myszy kontrolnych (Ryc. 40A).

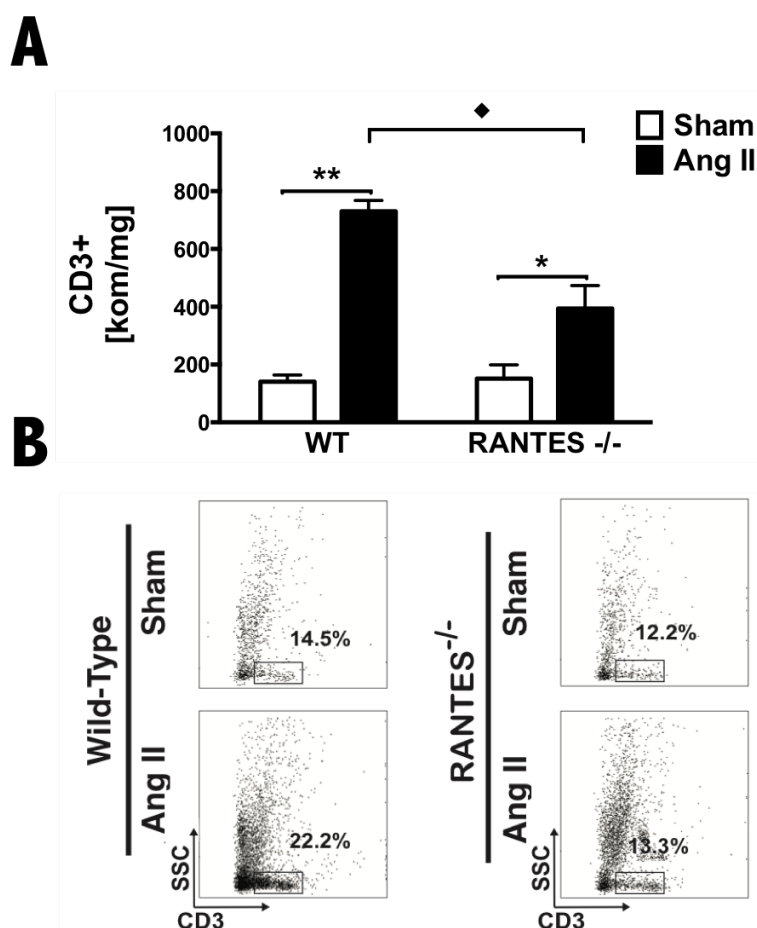
Angiotensyna II istotnie zwiększa akumulację makrofagów (I-Ab+CD11b+) w pvAT u myszy WT (125 ± 54 vs. 790 ± 64 kom/mg, $p < 0,01$) oraz myszy RANTES^{-/-} (128 ± 103 vs. 509 ± 93 kom/mg, $p < 0,05$). Ponadto efekt Ang II na akumulację makrofagów był znamienne statystycznie wyższy w pvAT myszy WT niż w pvAT myszy RANTES^{-/-} ($p_{int} < 0,05$). Usunięcie genu kodującego RANTES nie miało znamienego statystycznie wpływu na poziom makrofagów w grupach kontrolnych (Ryc. 40C).



Ryc. 40. Naciek leukocytów (A) oraz makrofagów (C) w pvAT. Przykładowy obraz komórek pvAT z cytometrii przepływowej komórek CD45+ (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ Sham vs. Ang II, $p_{int} < 0,05$, $n = 5$).

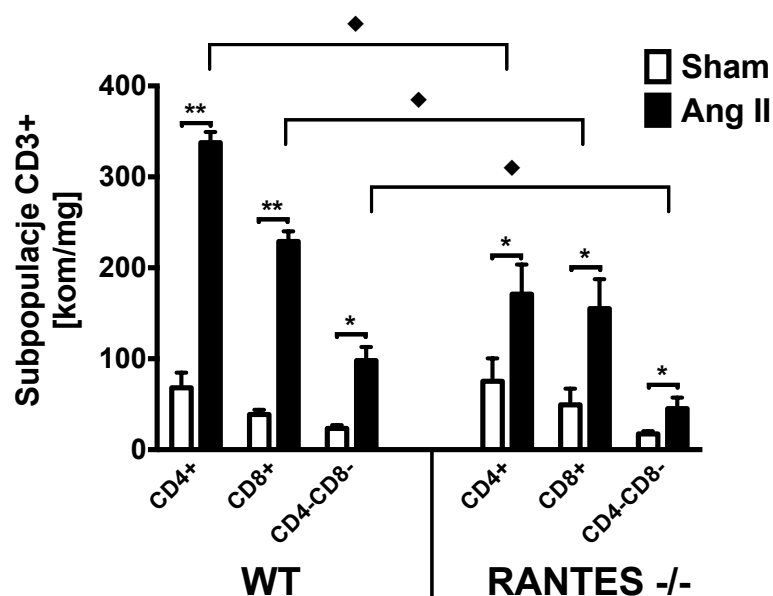
IV.6.2. Wpływ usunięcia RANTES na infiltrację limfocytów T do okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej

Myszy WT wykazały ponad 5-krotny przyrost liczby limfocytów T infiltrujących pvAT po 14 dniowej infuzji Ang II ($p < 0.01$). Liczba komórek CD3+ na mg tkanki okołaortalnej wzrastała również u myszy pozbawionych genu *ccl5* po indukcji NT w stosunku do myszy normotensyjnych (151 ± 47 vs. 393 ± 80 kom/mg, $p < 0,05$). Pomimo to liczba limfocytów T u myszy pozbawionych RANTES była prawie 2-krotnie niższa w stosunku do myszy WT poddanych działaniu Ang II (393 ± 80 vs. 730 ± 38 kom/mg, $p < 0,01$). Nie zaobserwowano różnic w liczbie komórek infiltrujących pvAT myszy kontrolnych WT oraz RANTES-/- (140 ± 23 vs. 151 ± 47 kom/mg) (Ryc. 41). Efekt Ang II był znamienne statystycznie wyższy w pvAT myszy WT w porównaniu do pvAT myszy RANTES-/- ($p_{int} < 0.01$).



Ryc. 41. Naciek limfocytarny w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej(A). Przykładowy obraz limfocytów T z cytometrii przepływowej(B) (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ Sham vs. Ang, \blacklozenge - $p < 0,01$ WT vs. RANTES -/-, $n = 5$).

Zaobserwowano istotny statystycznie spadek subpopulacji limfocytów T u nadciśnieniowych myszy genetycznie zmodyfikowanych w stosunku do nadciśnieniowych myszy WT. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa pochodząca od myszy RANTES^{-/-} z wykształconym NT charakteryzowała się spadkiem limfocytów; CD4⁺ (171±32 vs. 337±11 kom/mg, p<0,01), CD8⁺ (155±32 vs. 229±11 kom/mg, p<0,01) oraz CD4-CD8- (45±12 vs. 98±15 kom/mg, p<0,01) w porównaniu limfocytów rezydujących w pvAT myszy WT podanych infuzji Ang II (Ryc. 42). Infiltracja pvAT u myszy normotensyjnych nie różniła się pomiędzy badanymi grupami. Średnia liczba komórek CD4⁺, CD8⁺ oraz CD4-CD8- na mg tkanki wynosiła odpowiednio 68±16, 39±5 oraz 23±4 u myszy WT, natomiast u myszy pozbawionych RANTES; 75±25, 49±17 oraz 17±3 (Ryc. 42).

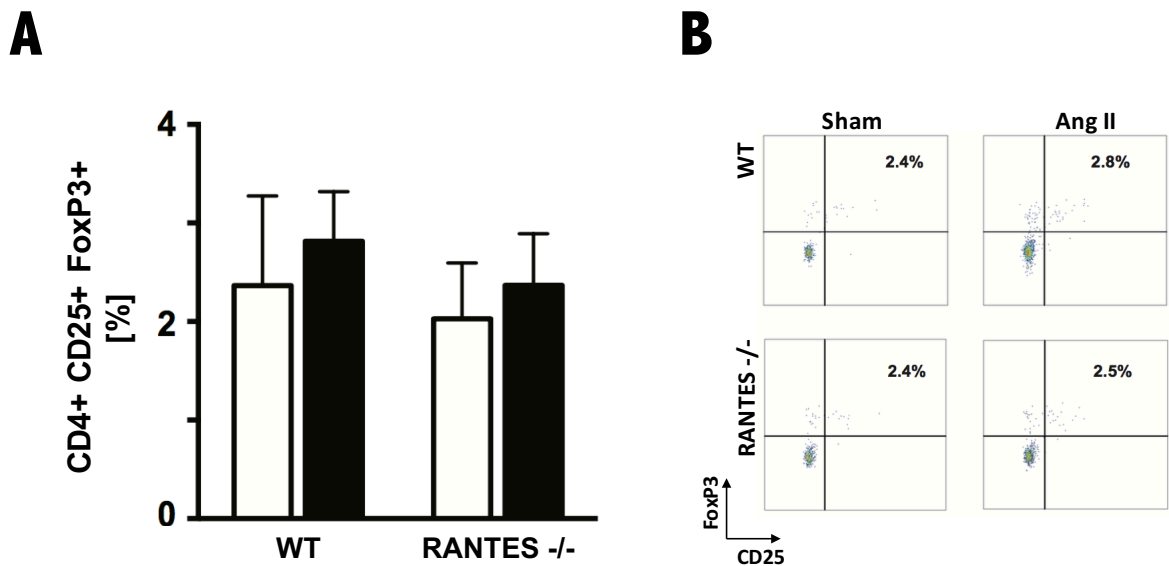


Ryc. 42. Naciek subpopulacji limfocytów T w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej (* -p<0,05, ** - p<0,01 Sham vs. Ang, ♦ - p<0,01 WT vs. RANTES^{-/-}, n=5).

IV.6.2.1. Infiltracja okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej przez komórki regulatorowe

Infuzja Ang II nie wpłynęła na infiltrację limfocytów regulatorowych (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) do pvAT. Odsetek komórek regulatorowych u myszy kontrolnej WT wyniósł 2,36±0,92%, natomiast po indukcji NT zależnego od Ang II 2,85±0,50%. Usunięcie genu *ccl5* nie przyczyniło się do zmiany poziomu limfocytów

CD4+CD25+FoxP3+ w pvAT myszy kontrolnych ($2,04 \pm 0,57\%$) oraz z wyindukowanym NT zależnym od Ang II ($2,41 \pm 0,51$) (Ryc. 43).



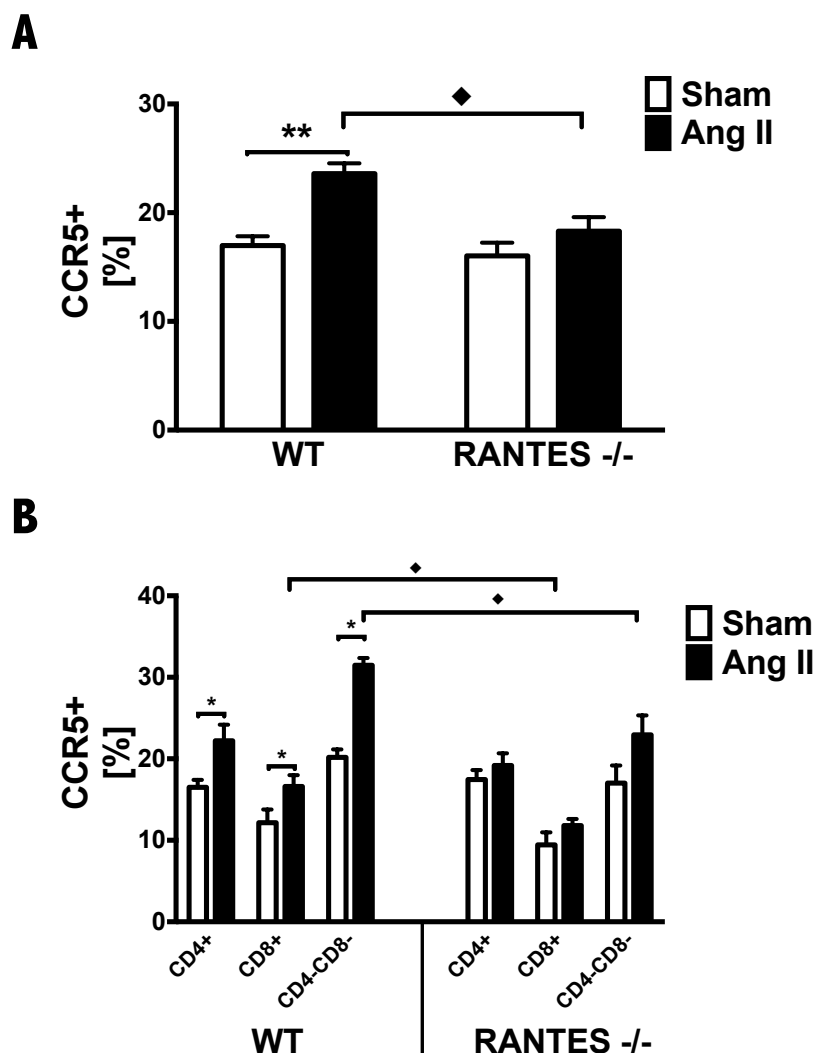
Ryc. 43. Naciek limfocytów T regulatorowych w pvAT (A). Przykładowy obraz cytometrii przepływowej obrazującej komórki Treg w pvAT (B) (n=6).

IV.6.2.2. Ekspresja markera CCR5 na powierzchni limfocytów T rezydujących w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej

W toku rozwoju NT u myszy WT dochodzi do zwiększonej infiltracji pvAT przez limfocyty T posiadających marker CCR5, dla którego RANTES jest ligandem ($p < 0,01$). Infuzja Ang II myszom RANTES^{-/-} nie wpływała na zwiększoną migrację limfocytów CD3+CCR5+ w kierunku pvAT *in vivo* (16 ± 1 vs. 18 ± 1 %). Ponadto, efekt Ang II na akumulację limfocytów CCR5+ był znamienne statystycznie wyższy w pvAT myszy WT w porównaniu do pvAT myszy RANTES^{-/-} ($p_{\text{int}} < 0,05$). Nie zaobserwowano różnic w odsetku limfocytów T, posiadających receptor CCR5, u normotensyjnych myszy WT oraz RANTES^{-/-} (17 ± 1 vs. 16 ± 1 %) (Ryc. 44A).

Zwiększony odsetek limfocytów posiadających receptor dla chemokiny RANTES zaobserwowany został na wszystkich subpopulacjach limfocytów T u myszy szczepu dzikiego po 14-dniowej infuzji Ang II ($p < 0,05$). Usunięcie RANTES zahamowało rekrutację komórek CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8- do pvAT po infuzji Ang II. Zaobserwowano istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów CD8+CCR5+

(23 ± 2 vs. 31 ± 1 %, $p < 0,05$) a także limfocytów CD4-CD8-CCR5+ (11 ± 1 vs. 17 ± 1 %, $p < 0,05$) u myszy RANTES-/- Ang II w porównaniu do myszy WT Ang II. Analiza subpopulacji limfocytów T pod względem odsetka komórek z receptorem CCR5 nie wykazała różnic pomiędzy grupami myszy kontrolnymi (Ryc. 44B).



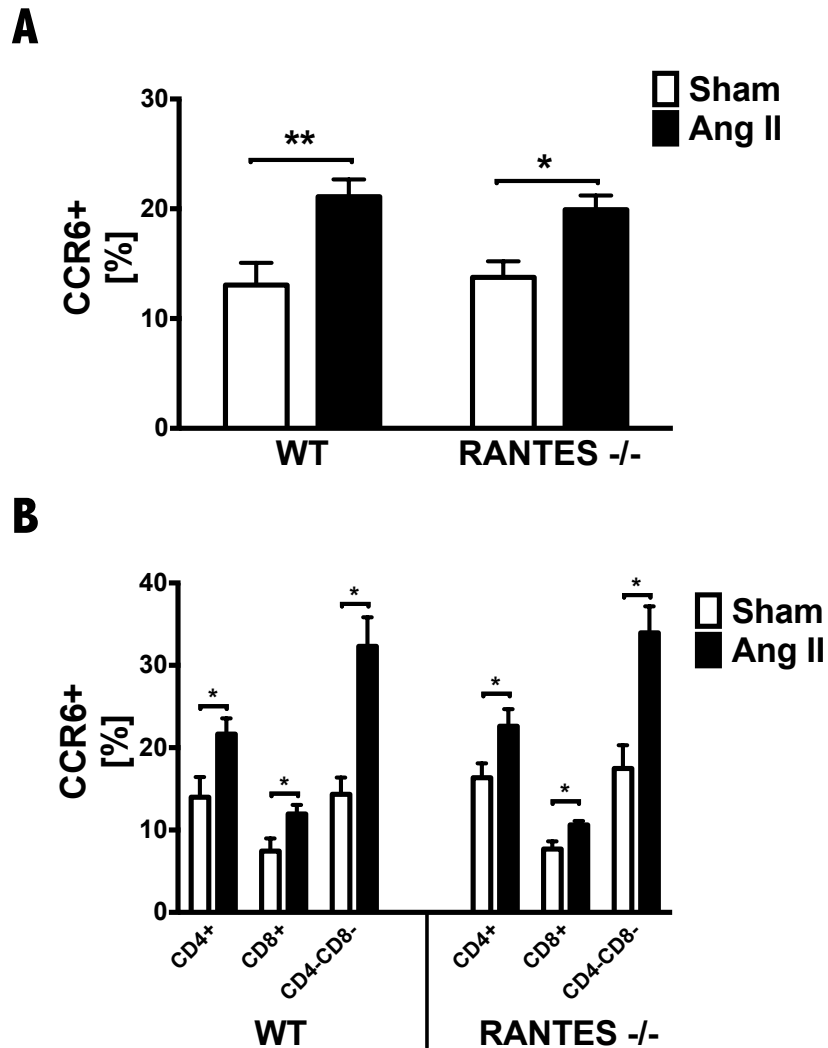
Ryc. 44. Ekspresja receptora (CCR5) dla chemokiny RANTES na powierzchni limfocytów T (A) oraz ich subpopulacji CD4+, CD8+CD4-CD8- (B) rezydujących w pvAT (*- $p < 0,05$ Sham vs. Ang II, \blacklozenge - $p < 0,05$, $p_{int} < 0,05$ $n=5$).

IV.6.2.3. Ekspresja markera CCR6 na powierzchni limfocytów T rezydujących w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej

Limfocyty T uzyskane w wyniku trawienia enzymatycznego przeanalizowano pod kątem ekspresji markera CCR6. Wykazano, że w toku rozwoju NT wywołanego

14-dniową infuzją Ang II dochodzi do wzrostu odsetka komórek z markerem CCR6 infiltrujących pvAT myszy WT (13 ± 2 vs. 21 ± 1 %, $p<0,01$).

Podobny wzrost zaobserwowano u myszy pozbawionych RANTES^{-/-} po infuzji Ang II (14 ± 1 vs. 20 ± 1 %, $p<0,05$). Natomiast, nie wykazano różnic w odsetku limfocytów T CCR6⁺ pomiędzy grupami traktowanymi Ang II oraz pomiędzy grupami kontrolnymi (Ryc. 45A).



Ryc. 45. Ekspresja receptora CCR6 na powierzchni limfocytów T (A) oraz ich subpopulacji CD4⁺, CD8⁺CD4⁻CD8⁻ (B) rezydujących w tkance okołaortalnej (*- $p<0,05$ Sham vs. $n=5$).

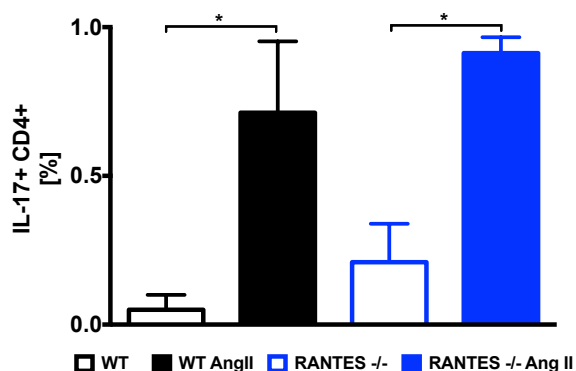
Indukcja nadciśnienia tętniczego powiązana była ze wzrostem ekspresji CCR6 na wszystkich subpopulacjach limfocytów T w porównaniu z myszami kontrolnymi. Największą indukcją charakteryzowały się limfocyty CD4⁻CD8⁻.

(14 ± 2 vs. 32 ± 3 %, $p < 0,05$), następnie limfocyty CD4+ (14 ± 2 vs. 22 ± 2 %, $p < 0,05$) oraz limfocyty CD8+ (7 ± 1 vs. 12 ± 1 %, $p < 0,05$). Podobny efekt infuzji Ang II na akumulację subpopulacji limfocytów T w pvAT zaobserwowano u myszy pozbawionych genu *ccl5*: CD4-CD8- (17 ± 3 vs. 34 ± 3 %, $p < 0,05$), CD4+ (16 ± 2 vs. 22 ± 2 %, $p < 0,05$), CD8+ (8 ± 1 vs. 11 ± 1 %, $p < 0,05$). Nie wykazano różnic w odsetku komórek CCR6+ na subpopulacjach limfocytów T pomiędzy grupami normotensyjnymi WT oraz RANTES-/- (Ryc. 45B).

IV.7. Wpływ usunięcia RANTES na produkcję cytokin prozapalnych przez limfocyty T infiltrujące okołonaczyniową tkankę tłuszczową

IV.7.1. Produkcja interleukiny 17

Indukcja NT powiązana była ze zwiększoną akumulacją subpopulacji limfocytów CD4+IL-17+ w pvAT. Wykazano ponad 14-krotnie indukcję odsetka komórek wydzielających IL-17 u myszy poddanych działaniu Ang II w stosunku do myszy kontrolnych ($p < 0,05$). Usunięcie genu kodującego RANTES nie wpłynęło w żaden sposób na akumulację limfocytów TH17 w pvAT, gdzie również zaobserwowano istotny statystycznie wzrost tej subpopulacji pod wpływem infuzji Ang II ($0,21 \pm 0,12$ vs. $0,91 \pm 0,05$ %, $p < 0,05$) (Ryc. 46).

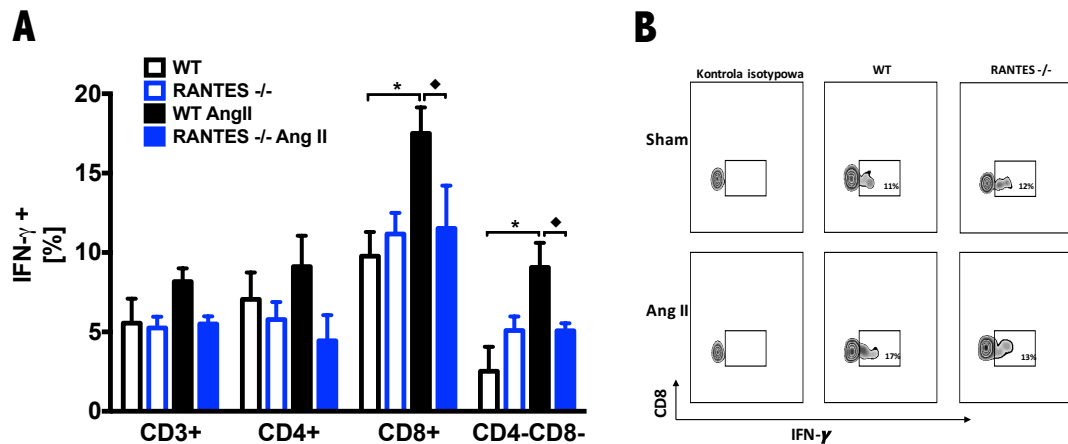


Ryc. 46. Infiltracja pvAT przez limfocyty produkujące IL-17 (* - $p < 0,05$, $n = 5$).

IV.7.2. Produkcja interferonu gamma

Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa pochodząca od myszy WT poddanych działaniu Ang II charakteryzowała się zwiększoną akumulacją limfocytów

CD8⁺ (18 ± 2 vs. 10 ± 2 , $p<0,01$) oraz CD4-CD8⁻ (9 ± 1 vs. 3 ± 1 , $p<0,01$) produkujących IFN- γ w porównaniu z limfocytami myszy kontrolnych. Usunięcie chemokiny RANTES zahamowało rekrutację komórek produkujących IFN- γ do pvAT *in vivo* spowodowanego 14 dniową infuzją Ang II. Zaobserwowano istotny spadek limfocytów CD8⁺ (11 ± 3 vs. 18 ± 2 %, $p<0,01$) oraz CD4-CD8⁻ (5 ± 1 vs. 9 ± 1 %, $p<0,01$) u myszy RANTES^{-/-} w stosunku do myszy WT z rozwiniętym NT zależnym od Ang II (Ryc. 47).



Ryc. 47. Infiltracja pvAT przez limfocyty produkujące interferon gama (A). Przykładowy obraz cytometrii przepływowej obrazujący produkcję interferonu gamma przez limfocyty CD8⁺(B) (* - $p<0,01$, $\blacklozenge p<0,01$ $n=5$).

V. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. NT zależne od Ang II powiązane jest ze zwiększoną produkcją/wydzielaniem substancji o charakterze prozapalnych (np. RANTES, CRP, rezestyna) oraz spadkiem produkcji mediatorów przeciwzapalnych (np. adiponektyna, IL-10) przez pvAT, które prowadzą do zwiększonego stanu zapalnego wokół naczyń krwionośnych.
2. Okołonaczyniowy stan zapalny w spontanicznym oraz zależnym od Ang II NT charakteryzuje się zwiększeniem liczby makrofagów, DC, komórek NK, limfocytów T, natomiast wpływa na poziom limfocytów B w pvAT;
 - Największy wzrost w spontanicznym NT wykazywały komórki NK, natomiast w NT zależnym od Ang II limfocyty T;
 - Limfocyty T infiltrujące pvAT charakteryzowały się zwiększoną ekspresją markerów aktywacji CD44, CD69, CD25 po infuzji Ang II;
 - NT powiązane było ze zwieszoną produkcją IL-17 przez limfocyty T CD4+, oraz IFN- γ produkowanego przez limfocyty T CD8+ oraz CD4-CD8- rezydujące w pvAT;
 - pvAT w spontanicznym NT wykazywał zwiększoną liczbę limfocytów regulatorowych (CD4+CD25+FoxP3+);
3. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa myszy z rozwiniętym NT wykazują zwiększoną ekspresję RANTES oraz nasila migrację limfocytów T;
 - RANTES nasila migrację limfocytów T, a nie B;
 - Infuzja Ang II zwiększa ekspresję receptorów dla chemokiny RANTES (CCR1, CCR3 oraz CCR5) na powierzchni limfocytów T rezydujących w pvAT;
 - Neutralizacja RANTES hamuje migrację limfocytów T w kierunku pvAT;
4. Myszy pozbawione genu *ccl5*, kodującego RANTES, chronione są przed indukcją okołonaczyniowego stanu zapalnego oraz upośledzeniem funkcji śródbłonna

naczyniowego, a nie wzrostem ciśnienia tętniczego krwi wywołanego działaniem Ang II;

- Usunięcie RANTES prowadzi do zmniejszonej akumulacji makrofagów oraz limfocytów T w pvAT;
- Usunięcie genu kodującego RANTES zmniejsza stopień infiltracji pvAT przez limfocyty T CCR5+, natomiast nie ma wpływu na akumulację limfocytów T CCR6+;
- Usunięcie *ccl5* zmniejsza produkcję IFN- γ natomiast nie ma wpływu na produkcję IL-17 przez limfocyty T rezydujące w pvAT;

VI. DYSKUSJA

W prezentowanej pracy zaobserwowano znacząco zwiększony naciek komórek zapalnych w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej, a nie wisceralnej, w zależnym od Ang II jak i w spontanicznym NT. Następnie zaproponowano mechanizm rekrutacji limfocytów T do okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej. Opisano również rolę chemokiny RANTES w regulacji okołonaczyniowego stanu zapalnego i funkcjonowaniu śródbłonna naczyniowego w NT zależnym od Ang II.

VI.1. Charakterystyka stanu zapalnego okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w nadciśnieniu zależnym od angiotensyny II.

Procesy zapalne odgrywają kluczową rolę w chorobach układu krążenia, w tym NT^{142,277,278}. W osoczu krwi ludzi chorych na NT obserwuje się wzrost szeregu mediatorów zapalnych takich jak: CRP, IL-6, IL-17, TNF, MCP-1, CXCL9, CXCL10, CXCL11 czy chemeryna^{141,186,196,228,229,249,268}. Wyniki ostatnich lat badań wskazują pvAT jako miejsce wytwarzania chemokin, cytokin oraz czynników wzrostowych kluczowych w rozwoju dysfunkcji śródbłonna naczyniowego oraz indukcji NT¹⁶⁶.

W toku przeprowadzonych eksperymentów, mających na celu scharakteryzowanie białek wytwarzanych przez pvAT w NT zależnym od Ang II, zaobserwowano znamiennej statystycznie indukcję wielu związanych z patogenezą zapalenia cząsteczek. W tym CRP, RegG, IGFBP-2, TNFRSF11B, THFRSF5, OPN, IL-33, CCN4, ICAM-1, fetuiny A, HGF, RANTES, CD105, endostatyny, IL-7, LDLR, rezestyny oraz represję adiponektyny, AREG, IL-10, IGFBP-3, chemeryny, CXCL9, CXCL10, CXCL11, FGF 21, CD62E oraz CD160 w stosunku do pvAT myszy kontrolnych. Niemniej jednak, o ile CRP czy adiponektyna należą do typowych białek produkowanych przez komórki tłuszczowe to np. IL-33, IL-10, IL-7 czy RANTES produkowane są również przez komórki układu odpornościowego, których obecność stwierdzono w nerkach oraz naczyniach krwionośnych, czyli organach kluczowych w rozwoju NT^{74,78,118,121,167}. Rola komórek układu odpornościowego w patogenezie NT została dobrze udokumentowana^{74,78,118,121,167}. Genetyczne usunięcie lub farmakologiczne zahamowanie aktywacji monocytów, makrofagów, DC, limfocytów T

oraz w mniejszym stopniu limfocytów B, chroni zwierzęta przed wzrostem ciężkiego NT⁷⁴. Podobnego efektu nie zaobserwowano w przypadku usunięcia komórek NK i NKT^{97,131}. Natomiast usunięcie genu *lnk* skutkuje dodatkowym wzrostem ciśnienia tętniczego krwi⁷⁸.

W toku przeprowadzonych badań wykazano znamiennego wzrost liczby leukocytów infiltrujących pvAT w NT wywołanym działaniem Ang II. Zaobserwowany został istotny wzrost makrofagów, DC oraz komórek NK w pvAT u myszy z wykształconym NT w porównaniu do myszy kontrolnych. Niemniej jednak największym stopniem indukcji w NT charakteryzowały się limfocyty T. Nie wykazano natomiast różnic w liczbie limfocytów B pomiędzy grupami. Co ciekawe, leukocyty infiltrowały pvAT w większym stopniu niż vAT. Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje innych zespołów badawczych dotyczące zwiększonej liczby komórek układu odpornościowego w pvAT. W szczególności dotyczy to liczby limfocytów T oraz makrofagów^{74,118,167}.

Brak zwiększonej akumulacji limfocytów B w pvAT myszy z NT również został niedawno opisany⁸⁵. Natomiast, odmienny wynik uzyskali Moore i wsp., wskazując na brak wzrostu komórek NK w pvAT zwierząt po 14-dniowej infuzji Ang II¹²¹. Podczas gdy, Wenzel i wsp., wykazali indukcję ich liczby po 7 dniach stosując wyższą niż w prezentowanej rozprawie dawkę Ang II¹²⁶, co może wskazywać również na ich rolę w początkowych stadiach rozwoju NT. Pomimo iż rola DC w NT została dobrze poznana, a ich wzrost opisano w śledzionie i węzłach chłonnych zwierząt z NT^{97,118}, nie scharakteryzowano dotychczas wzrostu ich akumulacji w pvAT w NT zależnym od Ang II.

W związku z faktem, że limfocyty T infiltrowały pvAT w największym stopniu oraz pochodzącymi z literatury danymi dotyczącymi ich roli oraz wzmożonej aktywacji przez DC^{74,118} w NT postanowiono scharakteryzować tę subpopulację leukocytów bardziej szczegółowo. Limfocyty dziewicze u myszy charakteryzują się niską ekspresją markera CD44 (CD44^{low}) oraz wysoką ekspresją markerów CD62L/CCR7, które zatrzymują limfocyt w tkance limfoidalnej, gdzie dochodzi do aktywacji przez DC²⁷⁹. Aktywacja limfocytu prowadzi do proliferacji oraz różnicowania w kierunku komórek efektorowych wykazujących zwiększoną ekspresję markerów CD44 oraz CD25 a także spadkiem CD62L umożliwiając migrację komórek efektorowych do innych tkanek organizmu²⁷⁹. Większość komórek efektorowych żyje krótko, natomiast pozostałe różnicują się w długożyjące spoczynkowe komórki pamięci, które podzielono na 3 typy

w zależności od ich zdolności migracyjnych: limfocyty T pamięci centralne posiadające receptor mediujący migracje do tkanek limfatycznych (CD62L/CCR7); limfocyty T pamięci efektorowe, które nie posiadają CD62L/CCR7 i napływają do miejsc gdzie toczy się stan zapalny; limfocyty T pamięci rezydujące, które migrują do specyficznych tkanek i rezydują w nich nie powracając ponownie na obwód²⁸⁰.

W niniejszej pracy po raz pierwszy scharakteryzowano limfocyty naiwne, pamięci oraz efektorowe rezydujące w pvAT w NT zależnym od Ang II na podstawie ekspresji receptorów CD44 i CD26L. Myszy z wyindukowanym NT charakteryzowały się spadkiem limfocytów T naiwnych oraz wzrostem limfocytów T efektorowych oraz limfocytów T pamięci w pvAT w porównaniu z myszami kontrolnymi. Podobny rozkład powyższych populacji zauważono na limfocytach CD4+ oraz CD8+. Podczas gdy limfocyty podwójnie negatywne (CD4-CD8-) charakteryzowały się największym odsetkiem komórek efektorowych, niemniej jednak ich liczba nie różniła się pomiędzy badanymi grupami.

Aktywacja limfocytów T wyzwała *de novo* ekspresję pewnych cząsteczek powierzchniowych, a także wzmacnia ekspresję innych. Cząsteczka CD69, marker wczesnej aktywacji, pojawia się na limfocycie T po aktywacji przez komórki prezentujące antygen. CD69 tworząc kompleks z S1P1 powoduje retencje komórki w drugorzędowych organach limfatycznych²⁸¹, gdzie pobudzone limfocyty T ulegają proliferacji i różnicowaniu w komórki efektorowe⁸⁸. Zaktywowane limfocyty T wykazują ekspresję markera CD25 (marker późnej aktywacji), który jest receptorem dla IL-2²⁸². Interakcja IL-2-CD25 powoduje wzrost i aktywację limfocytów T^{117,282}. Ponadto, Ang II zwiększa ekspresję CD25 oraz CD69 na krążących limfocytach T w badaniach *in vivo* oraz *in vitro*^{74,79}.

W toku przeprowadzonych badań po raz pierwszy wykazano, że NT zależne od Ang II, zwiększa dwukrotnie odsetek limfocytów T z ekspresją markera CD69 w pvAT. Wzrost ten był również charakterystyczny dla subpopulacji limfocytów T CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8-. Zwiększona aktywacja limfocytów T w pvAT myszy z grupy Ang II charakteryzowała się zwiększoną liczbą limfocytów T posiadających receptor dla IL-2 (CD25) w stosunku do komórek wyizolowanych z pvAT myszy kontrolnych. Co więcej wzrost ten wykazano również na subpopulacjach limfocytów CD4+ oraz CD8+. Zwiększona liczba komórek z markerem CD69 może wskazywać na prezentację antygeny przez komórki DC lub makrofagi w pvAT. Potwierdza to również fakt, iż brak stymulacji antygenowej skutkuje zahamowaniem fazy

proliferacyjnej spowodowanej spadkiem liczby receptorów dla IL-2¹¹⁷, który nie jest obserwowany w pvAT mszy z NT. IL-33 oraz IFN nasilają ekspresję markera CD69²⁸³, natomiast IL-7 zwiększa proliferację i polaryzację limfocytów T^{93,229}. Co ciekawe, niniejsze badania wykazały wzrost tych cytokin w pvAT myszy poddanych 14-dniowej infuzji Ang II.

VI.2. Charakterystyka stanu zapalnego okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w spontanicznym nadciśnieniu tętniczym u szczurów.

Ze względu na duże podobieństwo wielu cech fenotypowych NT szczurów SHR i nadciśnienia pierwotnego u ludzi szczury SHR stanowią szczególnie zbliżony do ludzkiego model NT¹⁶. Wykazano, że usunięcie grasicy u szczurów SHR skutkuje obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi⁷¹ co wskazuje na rolę komórek układu odpornościowego w patogenezie spontanicznego NT. Szczury SHR charakteryzują się występowaniem wysokiego ciśnienia tętniczego krwi, zwiększonym stresem oksydacyjnym oraz dysfunkcją naczyń krwionośnych. Redukcja potencjału rozkurczowego naczyń powiązana jest ze spadkiem substancji rozkurczających naczyń krwionośne wydzielanych przez komórki śródbłonna naczyniowego, a także PVAT^{45,160}. Proces ten może być modulowany przez komórki układu odpornościowego^{23,183,284}. W związku z powyższym oraz brakiem prac opisujących komponentę immunologiczną w okołonaczyniowym stanie zapalnym u szczurów SHR przy użyciu cytometrii przepływowej scharakteryzowano komórki układu odpornościowego rezydujące w pvAT.

Wykazano ponad 3 krotnie większą liczbę leukocytów (CD45+) infiltrujących pvAT szczurów ze spontanicznym NT (SHR) w stosunku do szczurów normotensyjnych (WKY). Dominującą subpopulacją leukocytów rezydujących w pvAT były makrofagi, których liczba dodatkowo drastycznie wzrastała w spontanicznym NT. Niemniej jednak największy wzrost w stosunku do szczurów WKY wykazano w liczbie komórek NK. Zaobserwowano również istotny wzrost DC oraz limfocytów T w pvAT szczurów SHR. Ponadto limfocyty T charakteryzowały się zwiększoną ekspresją markera CD25, świadczącego o wzmożonej aktywacji tych komórek. Nie wykazano natomiast istotnych zmian w liczbie limfocytów B pomiędzy grupami. Co ważniejsze zwiększona liczba leukocytów była obserwowana wyłącznie w pvAT, która była infiltrowana

w większym stopniu niż vAT, co może potwierdzać unikalną rolę tej tkanki w patogenezie spontanicznego NT. Niemniej jednak na uwagę zasługuje fakt, że spontaniczne NT charakteryzowało się największą indukcją komórek NK, podczas gdy w NT zależnym od Ang II to limfocyty T infiltrowały pvAT w największym stopniu.

VI.3. Rola RANTES w mechanizmie migracji limfocytów w kierunku okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej.

W toku przebiegu stanu zapalnego dochodzi do wzmożonej migracji komórek układu odpornościowego do tkanek docelowych na zasadzie chemotaksji. Chemotaksja regulowana jest przez cząsteczki adhezyjne, migracyjne zdolności leukocytów oraz obecności czynników chemotaktycznych¹¹⁷. W niniejszej pracy wykazano, że stan zapalny w pvAT powiązany był z indukcją szeregu mediatorów zapalnych wpływających na chemotaksję bezpośrednio (np. RANTES) lub pośrednio poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonna naczyniowego (np. IL-33, CRP, rezestyna)^{210,257,272}, które odgrywają kluczową rolę w migracji komórek do miejsc zapalnych. W związku z powyższym oraz faktem zwiększonej liczby limfocytów T w pvAT myszy z wykształconym NT przeprowadzono eksperyment mający na celu wykazanie chemotaktycznych właściwości pvAT na migrację limfocytów T. W toku przeprowadzonych doświadczeń dowiedziono po raz pierwszy, że nadsącz z pvAT wyizolowany od myszy w wykształconym NT cechuje się zwiększonym potencjałem chemotaktycznym limfocytów T w stosunku do pvAT myszy kontrolnych. Natomiast tkanka wisceralna charakteryzowała się niewielkim potencjałem chemotaktycznym, a migracja limfocytów T nie różniła się pomiędzy grupami. Doświadczenie to może pośrednio tłumaczyć obserwowaną w NT zwiększoną akumulację limfocytów w pvAT, a nie vAT, pod wpływem działania nieokreślonego czynnika promującego ich chemotaksję. Już 10 lat temu wykazano, że w NT zależnym od Ang II dochodzi do wzrostu ekspresji mRNA dla RANTES w pvAT⁷⁴. RANTES odgrywa kluczową rolę w rekrutacji leukocytów do źródeł zapalnych^{222,223,285} za pośrednictwem receptorów CCR1, CCR2 oraz CCR5²¹⁸. Ang II zwiększa ekspresję receptorów CCR5 na krążących limfocytach T w badaniach *in vivo* oraz *in vitro*^{74,118}, a wpływ blokady tego receptora hamuje rekrutację

limfocytów T i progresje miażdżycy u myszy²²⁴. Może to świadczyć o potencjalnej roli chemokiny RANTES i jej receptorów w rekrutacji limfocytów T do pvAT w NT. Przy użyciu trzech różnych metod badawczych wykazano indukcję chemokiny RANTES w pvAT myszy poddanej działaniu Ang II. Następnie w niniejszej pracy po raz pierwszy zostało opisane, że infuzja Ang II zwiększa 2-krotnie chemotaksję limfocytów T w kierunku chemokiny RANTES, natomiast nie ma wpływu na chemotaksję limfocytów B, których potencjał migracyjny był znikomy. Jest to spójne z wynikami wskazującymi na zwiększoną akumulację limfocytów T, a nie B, w pvAT myszy z wykształconym NT zależnym od Ang II^{74,85,118}. Również limfocyty T wyizolowane z pvAT myszy z NT wykazywały zwiększoną migrację w kierunku chemokiny RANTES. Szczegółowa analiza limfocytów T, rezydujących pvAT, wykazała zwiększoną ekspresję receptorów CCR1, CCR3 oraz CCR5 po wpływie działania Ang II *in vivo*, co wyjaśnia ich nasiloną migrację w kierunku ich ligandu jakim jest RANTES.

Celem potwierdzenia kluczowej roli RANTES w procesie chemotaksji limfocytów T w kierunku nadsącza uzyskanego w pvAT wykonano eksperymenty mające na celu usunięcie RANTES ze środowiska przy użyciu przeciwciał anty-RANTES. Co ciekawe, neutralizacja RANTES powodowała spadek migracji limfocytów T w pvAT myszy z NT oraz myszy kontrolnych. Niemniej jednak spadek był znacznie większy w pvAT myszy poddanej działaniu Ang II wskazując na ważną rolę tej chemokiny w rekrutacji limfocytów T do pvAT w NT. Na uwagę zasługuje fakt, że blokada RANTES nie blokowała chemotaksji całkowicie co świadczy o udziale innych chemokin w regulacji okołonaczyniowego stanu zapalnego. Ponadto receptory dla RANTES mogą łączyć się również z innymi chemokinami. Ligandami dla CCR1 są CCL3 oraz CCL5, CCR3 łączy się z CCL5, natomiast CCR5 wykazuje powinowactwo do CCL3, CCL4 oraz CCL5²²³. Jak wykazano w niniejszej pracy, również CCL2, CCL3 oraz CCL4 są indukowane w pvAT pod wpływem infuzji Ang II *in vivo*.

VI.4. Rola RANTES w regulacji ciśnienia tętniczego krwi, okołonaczyniowego stanu zapalnego oraz funkcji naczyń krwionośnych.

W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że genetyczne usunięcie genu *ccl5*, kodującego RANTES, wykazuje właściwości ochronne w modulacji okołonaczyniowego stanu zapalnego oraz funkcji śródbłonna naczyniowego dużych naczyń krwionośnych,

niezależnie od wzrostu ciśnienia tętniczego krwi, w NT zależnym od Ang II. Wykazałem, że usunięcie RANTES nie wpływa na poziom ciśnienia tętniczego krwi zarówno u myszy kontrolnych jak i po 14 dniowej infuzji Ang II. Brak różnic w ciśnieniu tętniczym krwi u tego szczepu myszy został niedawno potwierdzony przez Rudemillera i wsp. w 28-dniowym modelu NT zależnego od Ang II²⁸⁶. Odmianą rolę RANTES w regulacji ciśnienia tętniczego krwi opisano u szczurów SHR. Spadek ekspresji RANTES zaobserwowano w jądrze pasma samotnego (NTS) u szczurów SHR w porównaniu ze szczurami WKY²⁸⁷. Mikroiniekcja RANTES do tego regionu mózgu lub 3-tygniowe podskórne nastrzykiwanie rekombinowanym białkiem RANTES powoduje spadek ciśnienia tętniczego krwi u szczurów SHR^{287,288}. Pomimo przeciwstawnych wyników uzyskanych z badań nad szczurami SHR, należy pamiętać, że spontaniczne NT ma podłoże wieloczynnikowe a jego etiologia ciągle pozostaje nie wyjaśniona.

Jak wspomiano wcześniej NT powiązane jest z występowaniem okołonaczyniowego stanu zapalnego. W niniejszej pracy wykazano, że w toku rozwoju NT dochodzi do zwiększonej infiltracji pvAT przez liczne komórki układu odpornościowego, które uwalniają szereg cytokin prozapalnych takich jak np. IFN- γ czy IL-17^{78,127,167}. Prozapalne działanie tych cytokin prowadzi do zmian patofizjologicznych naczyń takich jak dysfunkcja śródbłonna naczyniowego^{49,78}.

Nowatorskim elementem pracy było wykazanie, że myszy pozbawione genu kodującego RANTES chronione są przed dysfunkcją śródbłonna naczyniowego aorty, a także okołonaczyniowym stanem zapalnym, który jest obserwowany u myszy WT pod wpływem działania Ang II. Obserwowany efekt powiązany był ze spadkiem okołonaczyniowego stanu zapalnego przejawiającego się w zmniejszonej akumulacji makrofagów oraz limfocytów T. Brak chemokiny RANTES skutkowało zahamowaniem rekrutacji limfocytów CD3+ wraz z subpopulacjami CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8- charakteryzującymi się ekspresją receptora CCR5 na powierzchni błony komórkowej. Obecność markera CCR5 jest cechą charakterystyczną limfocytów T_H1²⁸⁹, które produkują IFN- γ ^{289,290}.

Wykazano, że infuzja Ang II nasilała infiltrację pvAT przez limfocyty T CD8+ oraz CD4-CD8- produkujące IFN- γ u myszy WT. Produkcja IFN- γ przez te subpopulacje limfocytów T została potwierdzona w literaturze⁷⁸. Odkrywczym elementem było wykazanie, że usunięcie chemokiny RANTES zapobiegało akumulacji/migracji

komórek CD3+CD8+ oraz CD3+ CD4-CD8 produkujących IFN- γ w pvAT pod wpływem działania Ang II *in vivo* skutkując spadkiem tej prozapalnej cytokiny w pvAT. Brak indukcji IFN- γ w pvAT pod wpływem działania Ang II u myszy RANTES-/- został również potwierdzony w dalszych badaniach przez nasz zespół badawczy przy użyciu qPCR. Redukcja migracji komórek CCR5+ oraz spadek produkcji IFN- γ chronił myszy RANTES-/- przed szkodliwym działaniem Ang II na funkcjonowanie śródbłonka naczyniowego w aorcie. Protekcyjną rolę usunięcia *tbx21*, genu odpowiedzialnego za produkcję IFN- γ , na funkcję śródbłonka naczyniowego opisano w literaturze¹²⁷. Wykazano również, że zwiększona produkcja IFN- γ prowadzi do upośledzenia rozkurczu naczyń krwionośnych pod wpływem działania Ang II *in vivo*⁷⁸. Natomiast nasz zespół jako pierwszy wykazał szkodliwy wpływ IFN- γ na śródbłonek naczyniowy w eksperymentach *ex vivo*. CCR5 odgrywa również istotną rolę w migracji limfocytów regulatorowych (T_{reg})²⁹¹, których protekcyjna rola na funkcjonowanie śródbłonka naczyniowego oraz redukcje ciśnienia tętniczego krwi w NT została szeroko opisana w literaturze¹¹²⁻¹¹⁵. Pomimo znaczącej poprawy funkcji śródbłonka naczyniowego u myszy RANTES-/- z wykształconym NT nie zaobserwowano różnic w liczbie limfocytów regulatorowych infiltrujących pvAT. Różnice te nie były również widoczne zarówno u kontrolnych i poddanych działaniu Ang II myszy WT. Z drugiej jednak strony zauważono, że w spontanicznym NT dochodzi do wzrostu komórek T_{reg} w pvAT. Uzyskane wyniki nie są spójne z obserwacjami innych zespołów badawczych wykazujących na spadek T_{reg} w NT^{113,114}. Niemniej, cytowane wcześniej prace opisują redukcję T_{reg} w mysich naczyniach wieńcowych, które nie posiadają pvAT, nerkach i śledzionie. Nie opisano jak dotąd ich liczby w pvAT zwierząt z NT.

Pomimo znaczącej redukcji limfocytów T i makrofagów efekt Ang II był taki sam u myszy RANTES-/- jak i myszy WT. Świadczy to o tym, że dysfunkcja śródbłonka naczyniowego wywołana działaniem Ang II nie jest jedynie konsekwencją zwiększonego ciśnienia krwi. Tak więc utrzymanie podwyższonego ciśnienia tętniczego krwi może być powiązane z mechanizmem niezależnym od RANTES. NT jest chorobą kompleksową a w jej patogenezie rolę mogą odgrywać OUN oraz nerki¹⁸³. W następstwie tego poprawa funkcji śródbłonka naczyniowego dużych naczyń krwionośnych nie jest wystarczająca do redukcji ciśnienia tętniczego krwi. Ponadto funkcję regulacyjną ciśnienia tętniczego krwi przypisuje się naczyniom

oporowym. Również inne komórki układu odpornościowego odgrywają rolę w indukcji bądź utrzymaniu wysokiego ciśnienia tętniczego krwi. Należy zaznaczyć, że usunięcie chemokiny RANTES nie chroniło przed całkowitym zahamowaniem rekrutacji komórek zapalnych. Spowodowane jest to faktem działania innych chemokin lub cytokin prozapalnych promujących chemotaksję leukocytów do miejsc zapalnych.

Ostatnie lata badań wskazują na ważną rolę komórek T_H17 , produkujących IL-17, w regulacji funkcji naczyń krwionośnych oraz indukcji NT^{104,146,167,292}. Podawanie zwierzętom rekombinowanej IL-17 indukuje wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz wykształcenie dysfunkcji śródbłonna naczyniowego¹⁴⁶. Natomiast genetyczne wyłączenie genu kodującego IL-17 chroni zwierzęta przed indukcją ciężkiego NT, a także przed wykształceniem dysfunkcji śródbłonna naczyniowego oraz okołonaczyniowego stanu zapalnego w odpowiedzi na Ang II^{105,108,167}. Chemotaksja limfocytów T_H17 do miejsc zapalnych odbywa się na zasadzie interakcji receptora CCR6, znajdującego się na powierzchni tych komórek, z ligandem CCL20^{293,294}. Źródłem CCL20 mogą być komórki tłuszczowe, a także same limfocyty T_H17 ²⁹⁴⁻²⁹⁶. Ekspresja CCL20 indukowana jest pod wpływem TNF- α oraz IFN- γ , a hamowana przez IL-10²⁹⁷. Chemotaksja komórek T_H17 jest zhamowana u myszy CCR6^{-/-}, natomiast brak tego receptora nie ma wpływu na komórki produkujące IFN- γ ²⁹⁸. W toku przeprowadzonych eksperymentów wykazano zwiększony odsetek limfocytów T z markerem CCR6 w pvAT myszy WT po infuzji Ang II. Co więcej, akumulacja limfocytów CCR6⁺ była niezmieniona u myszy RANTES^{-/-} z NT. Podobnie jak usunięcie genu kodującego RANTES nie chroniło myszy przed infiltracją pvAT przez limfocyty T produkujące IL-17. Brak spadku ciśnienia tętniczego krwi, dysfunkcję naczyń krezkowych oraz delikatne upośledzenie funkcji śródbłonna naczyniowego w aorcie może być spowodowany utrzymywaniem się na wysokim poziomie IL-17, która wpływa na spadek produkcji NO poprzez fosforylację eNOS¹⁴⁶. Zwiększoną liczbę komórek T_H17 , produkujących IL-17, zaobserwowano również w pvAT szczurów SHR, co może sugerować na rolę tej cytokiny w patogenezie spontanicznego NT.

VI.5. *Słabe strony badania*

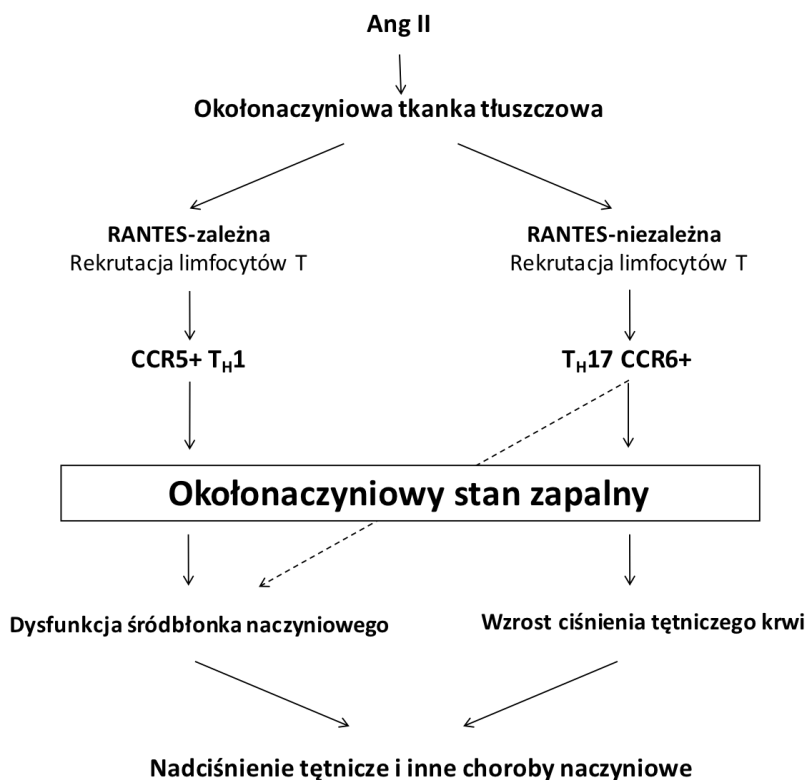
Słabą stroną badań jest brak wykorzystania myszy ze specyficznym usunięciem RANTES dla poszczególnych tkanek, ponieważ rola RANTES może być inna w adipocytach, VSMC czy komórkach śródbłonna naczyniowego.

W obecnej rozprawie nie dokonano pomiaru stresu oksydacyjnego w naczyniach krwionośnych, który odgrywa ważną rolę w NT i może być regulowany przez RANTES. Ponadto zbadanie wpływu usunięcia RANTES na profil wytwarzanych przez pvAT chemokin, cytokin oraz czynników wzrostu pomógłby w lepszym poznaniu roli RANTES w regulacji okołonaczyniowego stanu zapalnego.

VII. PODSUMOWANIE

Wyniki niniejszych obserwacji potwierdzają ważną rolę okołonaczyniowego stanu zapalnego w spontanicznym i zależnym od Ang II nadciśnieniem tętniczym. Ponadto wskazują na ważną rolę komórek układu odpornościowego oraz chemokiny RANTES w modulacji okołonaczyniowego stanu zapalnego oraz funkcji śródbłonna naczyniowego.

Podsumowując otrzymane wyniki proponuje dwa mechanizmy rekrutacji limfocytów T w kierunku pVAT: zależny oraz niezależny od RANTES. Mechanizm zależny od RANTES promuje rekrutację limfocytów T CCR5+ produkujących INF- γ prowadząc do wykształcenia dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. Natomiast ścieżka niezależna od RANTES promuje chemotaksję limfocytów T CCR6+ produkujących IL-17, która powoduje wzrost ciśnienia tętniczego krwi a także upośledza funkcję śródbłonna naczyniowego. Farmakologiczna interwencja mająca na celu zahamowanie rekrutacji limfocytów T do tkanek otaczających naczynia krwionośne może zapobiegać upośledzeniu funkcji śródbłonna naczyniowego będącego komplikacją nadciśnienia tętniczego.



Ryc. 48. Proponowany mechanizm rekrutacji limfocytów T do okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w nadciśnieniu zależnym od angiotensyny II.

VIII. WNIOSKI

1. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa w NT, zarówno zależnym od Ang II jest miejscem rozwoju stanu zapalnego charakteryzującego się zwiększoną produkcją cytokin i chemokin prozapalnych oraz redukcją mediatorów przeciwzapalnych.
2. Okołonaczyniowy stan zapalny w NT charakteryzuje się zwiększonym naciekiem leukocytami, a w szczególności limfocytami T, makrofagami, komórkami dendrytycznymi oraz komórkami NK. W spontanicznym NT u szczurów szczególnie silny wzrost obserwowano w odniesieniu do komórek NK.
3. Okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa u myszy z rozwiniętym NT wykazuje zwiększoną ekspresję RANTES oraz nasila migrację limfocytów T.
4. Chemokina RANTES odgrywa kluczową rolę w infiltracji okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej przez limfocyty T i makrofagi w NT zależnym od Ang II, a jej usunięcie zapobiega temu procesowi, jednocześnie chroniąc przed rozwojem dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w mechanizmie niezależnym od zmian ciśnienie tętniczego krwi.

IX. STRESZCZENIE

Nadciśnienie tętnicze (NT) jest stanem patologicznym wywierającym znaczący wpływ na zdrowie publiczne. NT jest jednym z głównych czynników ryzyka chorób układu krążenia, w tym zawału i niewydolności serca, udarów oraz chorób nerek, zajmując pierwsze miejsce pod względem ryzyka zgonów na świecie. Pomimo postępów w leczeniu i diagnostyce etiologia NT ciągle pozostaje nieznana. Istotną rolę w NT odgrywają ośrodkowy układ nerwowy, nerki oraz naczynia krwionośne. Niemniej jednak ostatnie lata wskazują na kluczową rolę przewlekłego stanu zapalnego oraz komórek układu odpornościowego w patogenezie tej choroby. W toku rozwoju NT dochodzi do zwiększonej infiltracji okołonaczyniowej tłuszczowej (pvAT) przez limfocyty i makrofagi. Komórki te produkując szereg cytokin prozapalnych, które modulują funkcjonowanie pvAT prowadząc do wykształcenia okołonaczyniowego stanu zapalnego. Ponadto, pvAT w warunkach patofizjologicznych wydziela szereg czynników prozapalnych oraz reaktywnych form tlenu i wspólnie z leukocytami może wywierać wpływ na regulację napięcia i przebudowę naczyń krwionośnych, a także modulować rozwój NT. Dokładna rola komórek zapalnych w pvAT jak również mechanizm ich rekrutacji do tej tkanki w NT ciągle pozostaje niewyjaśniony.

Celem pracy było scharakteryzowanie pvAT ze szczególnym uwzględnieniem naciekających ją komórek układu odpornościowego oraz ekspresji genów i białek mogących odgrywać ważną rolę w patogenezie NT. Ponadto, celem było również poznanie mechanizmu rekrutacji komórek układu odpornościowego do pvAT.

Powyższy cel został osiągnięty poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

1. Określenia stopnia zmian profilu cytokin i chemokin w pvAT w NT zależnym od Ang II;
2. Charakterystyka leukocytów naciekających pvAT w spontanicznym oraz zależnym od angiotensyny II (Ang II) NT;
3. Oceny chemotaktycznych właściwości limfocytów T w kierunku pvAT oraz chemokiny RANTES w NT zależnym od Ang II;
4. Zbadanie roli chemokiny RANTES w regulacji okołonaczyniowego stanu zapalnego, funkcji śródbłonna naczyniowego oraz ciśnienia tętniczego krwi w NT od Ang II;

W badaniu wykorzystano 3 miesięczne myszy: C57BL/6 (WT, *wild-type*), myszy z usuniętym genem dla chemokiny RANTES (RANTES^{-/-}) oraz 12 miesięczne szczury ze spontanicznym NT (SHR) dla których kontrolę stanowiły szczury WKY. NT u myszy wywoływane było 14-dniową infuzją Ang II (490ng/kg/min). Ocena profilu białek wytwarzanych przez pvAT oznaczona została metodą immunodetekcji (dot-plot). Komórki krwi oraz pozyskane na drodze trawienia enzymatycznego analizowano metodą cytometrii przepływowej. Chemotaksja limfocytów T badana była w komorach Boydena. Ekspresję genów zbadano metodą qPCR. Do oceny funkcji śródbłonna naczyniowego wykorzystano metodę *organ-bath*. Dane analizowano z wykorzystaniem test t-studenta oraz analizy wariancji ANOVA. Dane wyważone zostały jako wartość średnia±błąd standardowy.

Wyniki: Spośród 111 przebadanych w pvAT myszy białek, ekspresja 30 była znamienne statystycznie zmieniona w pvAT ($p < 0,05$) pod wpływem działania Ang II *in vivo*. Wykazano indukcję 17 białek; CRP, RegG, IGFBP-2, TNFRSF11B, THFRSF5, OPN, IL-33, CCN4, ICAM-1, fetuiny A, HGF, RANTES, CD105, endostatyny, IL-7, LDLR, rezestyny oraz represję 13 białek; adiponektyny, AREG, IL-10, IGFBP-3, chemeryny, CXCL9, CXCL10, CXCL11, FGF 21, CD62E oraz CD160 w pvAT myszy z NT w porównaniu do kontroli.

Infuzja Ang II indukuje ponad 3,5-krotny wzrost liczby komórek CD45⁺ na mg tkanki w pvAT w porównaniu do myszy kontrolnych ($2407,8 \pm 108,7$ vs. $654 \pm 70,4$, $p < 0,01$). Wśród leukocytów infiltrujących pvAT zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczby makrofagów (307 ± 36 vs. 85 ± 10 , $p < 0,01$), komórek dendrytycznych (176 ± 25 vs. 50 ± 7 , $p < 0,01$), komórek NK (37 ± 8 vs. 66 ± 8 , $p < 0,05$), a także limfocytów T (730 ± 38 vs. 140 ± 23 , $p < 0,01$) i ich subpopulacji CD8⁺ (229 ± 11 vs. 39 ± 5 , $p < 0,01$), CD4⁺ (337 ± 11 vs. 68 ± 16 , $p < 0,01$) oraz CD4-CD8⁻ (97 ± 14 vs. 23 ± 3 , $p < 0,01$) na mg tkanki u myszy z wykształconym NT w porównaniu do myszy kontrolnych. Natomiast nie wykazano różnic w liczbie limfocytów B. Ponadto działanie Ang II było znamienne statystycznie wyższe na akumulację leukocytów ($p_{\text{int}} < 0,001$), makrofagów ($p_{\text{int}} < 0,001$), komórek dendrytycznych ($p_{\text{int}} < 0,05$) oraz limfocytów T ($p_{\text{int}} < 0,001$) w pvAT w porównaniu do w tkanki wisceralnej (vAT).

W toku rozwoju NT zależnego od Ang II dochodzi do zwiększonej infiltracji pvAT przez zaktywowane limfocyty T posiadające marker CD69 ($16,2 \pm 2$ vs. $31,4 \pm 4$ %, $p < 0,05$) oraz CD25 ($15,3 \pm 2$ vs. $27,5 \pm 3$ %, $p < 0,01$). Wszystkie subpopulacje limfocytów T, rezydujące w pvAT, charakteryzowały się znamienym statystycznie

($p < 0,05$) zwiększeniem ekspresji markera CD69, natomiast znamiennej wzrost ekspresji markera CD25 wykazano na subpopulacji CD4+ ($p < 0,01$) oraz CD8+ ($p < 0,05$) u myszy z NT w stosunku do myszy kontrolnych. Zaobserwowano spadek odsetka naiwnych limfocytów T (78 ± 2 vs. $65 \pm 3\%$, $p < 0,05$) oraz wzrost odsetka limfocytów T pamięci ($1,8 \pm 0,3$ vs. $7,5 \pm 0,4\%$, $p < 0,01$) oraz limfocytów T efektorowych (10 ± 2 vs. $19 \pm 3\%$, $p < 0,05$) rezydujących w pvAT myszy z wyindukowanym NT w porównaniu do myszy kontrolnych. Analogiczny spadek limfocytów naiwnych oraz wzrost limfocytów pamięci i efektorowych wykazano w subpopulacjach limfocytów CD4+ (naiwne: 66 ± 4 vs. $78 \pm 3\%$, $p < 0,05$; pamięci: $8 \pm 0,1$ vs. $1,7 \pm 0,2\%$, $p < 0,01$; efektorowe: 17 ± 3 vs. $10 \pm 2\%$, $p < 0,05$) oraz limfocytach CD8+ (naiwne: 72 ± 4 vs. $88 \pm 2\%$, $p < 0,05$; pamięci: 7 ± 1 vs. $1,1 \pm 0,6\%$, $p < 0,01$; efektorowe: 8 ± 2 vs. $2,2 \pm 1,5\%$, $p < 0,05$). Największym odsetkiem limfocytów efektorowych charakteryzowała się subpopulacja CD4-CD8-, które stanowiły $48 \pm 4\%$ u myszy kontrolnych oraz $48 \pm 2\%$ u myszy z NT zależnym od Ang II.

Szczury SHR charakteryzowały się zwiększoną liczbą komórek CD45+ na mg tkanki w pvAT w porównaniu ze szczurami WKY (3008 ± 306 vs. 950 ± 166 , $p < 0,01$). Wśród leukocytów wykazano znamiennej wzrost makrofagów (1374 ± 215 vs. 385 ± 87 , $p < 0,01$), komórek dendrytycznych (234 ± 24 vs. 117 ± 27 , $p < 0,01$), komórek NK (365 ± 42 vs. 44 ± 15 , $p < 0,01$) oraz limfocytów T (175 ± 9 vs. 120 ± 21 , $p < 0,05$) w pvAT SHR w porównaniu do WKY. Ponadto działanie NT było znamiennej statystycznie wyższe na akumulację leukocytów ($p_{int} < 0,001$), makrofagów ($p_{int} < 0,05$), oraz komórek NK ($p_{int} < 0,001$) w pvAT w porównaniu do vAT.

Wśród limfocytów T, naciekających pvAT szczurów SHR, zaobserwowano zwiększony odsetek subpopulacji CD4+CD25+ (32 ± 2 vs. $19 \pm 2\%$), CD4+CD25+FoxP3+ (18 ± 1 vs. $8 \pm 1\%$, $p < 0,01$) oraz limfocytów T_H17 ($4,3 \pm 0,5$ vs. $1,8 \pm 0,1\%$, $p < 0,05$) w porównaniu do WKY.

W toku rozwoju NT zależnego od Ang II dochodzi do zwiększonej ekspresji mRNA dla RANTES w pvAT ($p < 0,01$) oraz receptorów dla RANTES na powierzchni limfocytów T rezydujących w pvAT; CCR1 ($27,9 \pm 4,6$ vs. $15,7 \pm 1\%$, $p < 0,05$), CCR3 ($17,1 \pm 1,4$ vs. $10,5 \pm 1,4\%$, $p < 0,01$), CCR5 ($23,6 \pm 0,9$ vs. $17 \pm 0,9\%$, $p < 0,01$). Ponadto, zaobserwowano znamiennej wzrost ($p < 0,05$) CCL2, CCL3 i CCL4 (ligandów CCR1, CCR3, CCR5) w pvAT myszy z NT.

Limfocyty T wykazały zwiększoną migrację w kierunku supernatantu pozyskanego z pvAT myszy z NT w porównaniu do supernatantu myszy kontrolnych ($4,4 \pm 0,7$ vs. $0,2 \pm 0,2\%$, $p < 0,01$). Obserwowany wzrost wykazywały również limfocyty

CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8- ($p < 0,01$). Działanie Ang II indukowało wzrost migracji limfocytów T ($2,1 \pm 0,4$ vs. $1,1 \pm 0,2\%$, $p < 0,05$), a nie B, w kierunku RANTES ($p < 0,05$). Wzrost ten towarzyszył również subpopulacji CD4+ ($p < 0,01$) i CD8+ ($p < 0,05$). Również, wyizolowane z pvAT myszy z NT, limfocyty T wykazywały znamienne większy potencjał migracyjny w kierunku RANTES niż limfocyty pozyskane od myszy kontrolnych ($2,4 \pm 0,3$ vs. $0,8 \pm 0,2\%$, $p < 0,01$). Zastosowanie przeciwciała wiążącego RANTES zmniejsza chemotaksję limfocytów T w kierunku supernatantu z pvAT. Inhibicja migracji limfocytów T jest istotnie niższa w supernatantach myszy Ang II w porównaniu do myszy kontrolnych (26 ± 9 vs. $68 \pm 23\%$, $p < 0,05$).

Infuzja Ang II spowodowała wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz dysfunkcję śródbłonna naczyń krezkowych u myszy WT oraz RANTES -/- ($p < 0,01$). Usunięcie genu kodującego RANTES chroniło myszy przed dysfunkcją śródbłonna naczyniowego w aorcie obserwowanej u myszy WT po infuzji Ang II ($p < 0,05$). Myszy pozbawione RANTES charakteryzowały się ponad 2,5-krotnym zwiększeniem liczby leukocytów (636 ± 152 vs. 1637 ± 398 , $p < 0,05$), makrofagów (128 ± 103 vs. 509 ± 93 , $p < 0,05$) oraz limfocytów T (151 ± 47 vs. 393 ± 80 , $p < 0,05$) na mg tkanki po infuzji Ang II w stosunku do myszy kontrolnych. Niemniej, efekt działania Ang II na akumulację leukocytów, makrofagów i limfocytów T (wraz z subpopulacjami CD4+, CD8+, CD4-CD8-) był znamienne statystycznie wyższy w pvAT myszy WT niż pvAT myszy RANTES-/-, odpowiednio $2407,8 \pm 108,7$ vs 1637 ± 398 ($p_{\text{int}} < 0,05$), 510 ± 93 vs. 790 ± 64 ($p_{\text{int}} < 0,05$) oraz vs. 730 ± 38 vs. 393 ± 80 ($p_{\text{int}} < 0,01$).

W toku rozwoju NT u myszy WT dochodzi do zwiększonej infiltracji pvAT przez limfocyty T posiadających marker CCR5 ($p < 0,01$) oraz CCR6 ($p < 0,01$). Natomiast usunięcie genu kodującego RANTES chroniło przed akumulacją limfocytów T z ekspresją CCR5+, a nie CCR6+ w pvAT.

Indukcja NT powiązana była ze znamienne zwiększoną akumulacją limfocytów T_H17 ($0,1 \pm 0,1$ vs. $0,7 \pm 0,2\%$, $p < 0,05$) produkujących IL-17, a także limfocytów T CD8+ ($9,7 \pm 1,5$ vs. $17,5 \pm 1,6\%$, $p < 0,05$) i CD4-CD8- ($2,5 \pm 1,5$ vs. $9 \pm 1,5\%$, $p < 0,05$) produkujących IFN- γ ($p < 0,01$) u myszy WT. Zaobserwowano istotny spadek limfocytów CD8+ (11 ± 3 vs. $18 \pm 2\%$, $p < 0,01$) oraz CD4-CD8- (5 ± 1 vs. $9 \pm 1\%$, $p < 0,01$), a nie T_H17 , u myszy RANTES-/- w stosunku do myszy WT z rozwiniętym NT zależnym od Ang II.

Wnioski: Okołonaczyniowy stan zapalny powiązany jest ze zwiększoną produkcją cytokin/chemokin prozapalnych oraz zwiększonym naciekiem komórek układu odpornościowego. NT zależne od Ang II zwiększa ekspresję RANTES,

która odgrywa kluczową rolę w rekrutacji limfocytów T, a jej usunięcie zapobiega indukcji okołonaczyniowego stanu zapalnego, jednocześnie chroniąc przed rozwojem dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w mechanizmie niezależnym od ciśnienia tętniczego krwi.

IX.1. Summary

Abstract

Hypertension (HT) is a common disorder with a substantial impact on public health because of associated complications such as stroke, heart failure, kidney diseases, and it is a major source of morbidity and mortality. Despite the progress in research and diagnostics the aetiology of HT still remains unclear. An important role in HT is played by the central nervous system, kidneys and blood vessels. However, recent studies have suggested a crucial role of inflammation and immune cells in the pathogenesis of this complex disease. During the progression of HT immune cells such as T cells and macrophages accumulate in the perivascular adipose tissue (pvAT). Immune cells releasing proinflammatory factors affect pvAT function leading to development of perivascular inflammation. Furthermore, pvAT in pathological conditions release various inflammatory factors such as cytokines, chemokines, growth factors and reactive oxygen species and acting together with immune cells may affect vascular function and vascular remodelling leading to increased blood pressure. The exact role and function of the inflammatory cells residing in pvAT, as well as the mechanism of their recruitment into this tissue compartment in HT still remains unclear.

The aim of the study was to characterise the perivascular adipose tissue with a particular emphasis on infiltrating immune cells as well genes and proteins in pvAT which may play an important role in the pathogenesis of HT. Another objective was to investigate the mechanism of recruiting immune cells toward pvAT in HT.

The aims have been achieved through the following specific objectives:

1. Determination of the expression of cytokines and chemokines released by pvAT in Ang II-induced HT;
2. Characterisation of leukocytes infiltrating pvAT in spontaneous and Ang II-induced HT;

3. Assessment of chemotactic properties of T cells toward pvAT and chemokine RANTES in Ang II-induced HT;
4. Determination of the specific role of RANTES in regulation of perivascular inflammation, vascular function and blood pressure regulation

3-month-old C57BL/6, RANTES^{-/-} and 12-month-old spontaneously hypertensive rats (SHR) with their normotensive control (WKY) were used. Mice were treated with angiotensin II (AngII, 490ng/kg/min) or control buffer for 14 days. The expression of cytokines/chemokines and gene expression in pvAT were both determined by a membrane-based sandwich immunoassay and qPCR, respectively. The number and phenotype of immune cells infiltrating pvAT (after enzymatic digestions) were analysed using flow cytometry. The chemotaxis of T cells towards pvAT or RANTES was studied in Boyden chambers. The vascular function was assessed using organ-bath method. Statistical analysis was performed using ANOVA or t-test. Data are expressed as a mean±SEM

Results:

Out of 111 mouse pvAT proteins studied, 30 were significantly changed in pvAT ($p < 0.05$) upon Ang II infusion. Among them 17; CRP, RegG, IGFBP-2, TNFRSF11B, THFRSF5, OPN, IL-33, CCN4, ICAM-1, fetuin A, HGF, RANTES, CD105, endostatin IL-7, LDLR, resistin were upregulated and 13; adiponectin, AREG, IL-10, IGFBP-3, chemerin, CXCL9, CXCL10, CXCL11, FGF 21, CD62E, CD160 were downregulated in the pvAT of Ang II-treated animals in comparison to sham.

Ang II infusion caused 3.5-fold induction of pvAT leukocytes in comparison to sham. This increase was evident for macrophages (307 ± 36 vs. 85 ± 10 , $p < 0.01$), dendritic cells (176 ± 25 vs. 50 ± 7 , $p < 0.01$), NK cells (37 ± 8 vs. 66 ± 8 , $p < 0.05$) as well as T cells (730 ± 38 vs. 140 ± 23 , $p < 0.01$), with their subsets CD8⁺ (229 ± 11 vs. 39 ± 5 , $p < 0.01$), CD4⁺ (337 ± 11 vs. 68 ± 16 , $p < 0.01$) and CD4⁻CD8⁻ (97 ± 14 vs. 23 ± 3 , $p < 0.01$). Moreover, impact of Ang II was significantly more prominent in accumulation of leukocytes ($p_{\text{int}} < 0.001$), macrophages ($p_{\text{int}} < 0.001$), dendritic cells ($p_{\text{int}} < 0.05$) and T cells ($p_{\text{int}} < 0.001$) in pvAT in comparison to visceral fat (vAT).

HT was associated with an increased number of activated T cells with CD69 (16 ± 2 vs. 31 ± 4 %, $p < 0.05$) and CD25 (15 ± 2 vs. 27 ± 3 %, $p < 0.01$) marker residing in pvAT. A significantly increased expression of CD69 marker was also observed on CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁻CD8⁻ subsets, whereas CD25 only on CD4 and CD8 subsets in comparison to normotensive animals. Furthermore, Ang II-induced HT was associated

with a decline of naïve T cells (78 ± 3 vs. $65\pm 4\%$, $p<0.05$) and an elevation of memory T cells (1.8 ± 0.3 vs. $7.5\pm 0.4\%$, $p<0.01$) and effector T cells (10 ± 2 vs. $19\pm 3\%$, $p<0.05$) residing in pvAT as compared to sham. This trend was observed in CD4 and CD8 T cell subsets.

The total number of leucocytes infiltrating pvAT in 12-month-old rats was significantly higher than in WKY (3008 ± 306 vs. 950 ± 166 , $p<0.01$). Virtually, all studied subsets such as macrophages (1374 ± 215 vs. 385 ± 87 , $p<0.01$), dendritic cells (234 ± 24 vs. 117 ± 27 , $p<0.01$), NK (365 ± 42 vs. 44 ± 15 , $p<0.01$) cells and T cells (175 ± 9 vs. 120 ± 21 , $p<0.05$) were increased in SHR rats in comparison to WKY. Moreover, spontaneous HT was associated with a significantly higher effect on accumulation of leukocytes ($p_{\text{int}}<0.001$), macrophages ($p_{\text{int}}<0.05$) and NK cells ($p_{\text{int}}<0.001$) in pvAT than in vAT.

Perivascular adipose tissue harvested from SHR rats showed higher number of CD4+CD25+ (32 ± 2 vs. $19\pm 2\%$), CD4+CD25+FoxP3+ (18 ± 1 vs. $8\pm 1\%$, $p<0.01$) and T_H17 ($4,3\pm 0,5$ vs. $1,8\pm 0,1$ %, $p<0.05$) T cell in comparison to pvAT harvested from WKY.

The 14-day infusion of Ang II was associated with a significant increase of RANTES mRNA ($p<0.01$). Ang II markedly increased the total content of T cells in pvAT expressing receptors for RANTES: CCR1 ($28\pm 5\%$ vs. $16\pm 1\%$), CCR3 ($17\pm 1\%$ vs. $10\pm 1\%$), CCR5 ($24\pm 1\%$ vs. $17\pm 1\%$), while having no effect in vAT. The expression of other ligands (CCL2, CCL3 and CCL4) for CCR1, CCR3 and CCR5 was also significantly increased.

T cells showed increased chemotaxis towards pvAT obtained from AngII infused mice when compared to sham animals ($4.4\pm 0.7\%$ vs. $0.2\pm 0.2\%$, $p<0.01$). Moreover, RANTES recruited T cells, but not B cells, from blood. Ang II infusion doubly increased chemotaxis of blood derived T cells towards RANTES ($p<0.01$). However, the most prominent chemotaxis potential was observed in pvAT isolated T cells from AngII treated mice ($2.4\pm 0.3\%$ vs. $0.8\pm 0.2\%$ in sham, $p<0.01$). Preincubation of conditioned media with anti-RANTES antibody significantly reduced T-cell chemotaxis toward the pvAT from Ang II- infused animals.

Ang II infusion caused a development of severe hypertension in RANTES^{-/-} and endothelial dysfunction of mesenteric arteries. A similar effect was observed in WT animals.

Ang II-dependent HT in RANTES^{-/-} was associated with increased number of leukocytes (636 ± 152 vs. 1637 ± 398 , $p<0.05$), macrophages (128 ± 103 vs. 509 ± 93 ,

$p < 0.05$) and T cells (151 ± 47 vs. 393 ± 80 , $p < 0.05$) in pVAT as compared to sham animals; however, the effect of Ang II was significantly higher in the pvAT of WT animals in comparison to the pvAT of RANTES^{-/-} animals 2407 ± 108 vs 1637 ± 398 ($p_{int} < 0.05$), 510 ± 93 vs. 790 ± 64 ($p_{int} < 0.05$) as well as 730 ± 38 vs. 393 ± 80 ($p_{int} < 0.01$), respectively.

Ang II infusion markedly increased the number of T cells possessing CCR5 and CCR6 markers in the pvAT of WT animals. However, deletion the gene encoding RANTES protect against the accumulation of T cells possessing CCR5 + but not CCR6+ in pvAT.

Ang II-dependent HT was associated with an increased number of T_H17 (0.05 ± 0.05 vs. 0.72 ± 0.24 , $p < 0.05$) and T cell subset; CD8⁺ (9.7 ± 1.5 vs. 17.5 ± 1.6 , $p < 0.05$) and CD4-CD8⁻ (2.5 ± 1.5 vs. 9 ± 1.5 , $p < 0.05$) which produce IFN- γ in the pvAT of WT animals, while RANTES^{-/-} mice were protected against the infiltration of IFN- γ producing T cells (CD8⁺; 11 ± 3 vs. $18 \pm 2\%$, $p < 0.01$ and CD4-CD8⁻; 5 ± 1 vs. $9 \pm 1\%$, $p < 0.01$ in comparison to WT), but not T_H17, upon Ang II infusion.

Conclusions:

Perivascular inflammation is associated with an increased production of proinflammatory cytokines/chemokines as well as an increased accumulation of immune cells. Ang II infusion increase the expression of chemokine RANTES which play a crucial role in the recruitment of T cells, and its deletion protects against perivascular inflammation and vascular dysfunction regardless of blood pressure.

X. SPIS SKRÓTÓW

AAA	tętniak aorty brzusznej
ADFR	tłuszczopochodny czynnik rozkurczowy naczyń krwionośnych
ADMA	asymetryczna dimetyloarginina
ADRF	tłuszczopochodny czynnik rozkurczowy
AMPK	kinaza aktywowana 5'AMP
Ang II	angiotensyna II
Ang.	język angielski
AREG	amfiregulina
AT ₁	receptor angiotensyny typu 1
CCL	ligand C-C chemokin
CCR	receptor C-C chemokin
CD	kompleks różnicowania
cGMP	rozpuszczalna cyklaza guanylanowa
CRP	białko C-reaktywne
CTGF	czynnik wzrostu tkanki łącznej
CTLA-4	antygen 4-cytotoksycznego limfocytu T
CXCL	chemokina indukowalna prozapalna
DC	komórka dendrytyczna
DOCA	octanu dezoksykortykosteronu
eNOS	śródbłonkowa syntaza tlenku azotu
ET-1	endotelina 1
FGF 21	czynnik wzrostu fibroblastów 21
FLAC	komórki rezydujące w tkance tłuszczowej (FLAC, ang. <i>fat-associated lymphoid cluster</i>)
Foxp3	czynnik transkrypcyjny limfocytów regulatorowych
GWAS	badania asocjacyjne całego genomu (ang. <i>genome-wide association studies</i>)
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
HGF	czynnik wzrostu hepatocytów
ICAM-1	międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna typu I
IFN	interferon
IGFBP-3	insulinopodobny czynnik wzrostowy 3
IL	interleukina
LDLR	receptor lipoproteiny niskiej gęstości
Lnk	regulator cytokinowy (ang. <i>lymphocyte adaptor protein</i>)
MCP-1	chemotaktyczne białko makrofagów 1β (CCL2)
Met-RANTES	antagonista RANTES
NADPH	zredukowana forma fosforanu dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego
NK	naturalne komórki cytotoksyczne
NO	tlenek azotu
NT	nadciśnienie tętnicze
NTS	jądra pasma samotnego
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBMC	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

pvAT	okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa
PVN	neurony jądra przykomorowego
RAAS	układ renina-angiotensyna-aldosteron
RAG-1	gen aktywujące rekombinaze 1
RANTES	<i>CCL5, ang. Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
RFT	reaktywne formy tlenu
ROR γ t	receptor jądrowy gamma limfocytów T _H 17
RVLM	przedwspółczulne interneurony dogłowego brzuszno-bocznego obszaru rdzenia przedłużonego
Sham	mysz kontrolna
SHR	szczur spontanicznie rozwijający nadciśnienie tętnicze
STAT3	przebieżnik sygnału I aktywator transkrypcji 3
TCR	receptor limfocyta T
TGF	transformujący czynnik wzrostu
T _h	Limfocyty T pomocnicze
TNF	czynnik martwicy nowotworu
T _{reg}	limfocyty regulatorowe
vAT	tkanka wisceralna
VCAM-1	cząsteczka adhezji komórkowej naczyń I
Vs.	kontra
VSMC	komórki mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia
WKY	szczur normotensyjny szczepu Wistar
WT, myszy	myszy szczepu dzikiego (ang. <i>wild-type</i>)

XI. SPIS RYCIN

RYC. 1. MOZAIKOWA TEORIA PAGE'A.....	9
RYC. 2. KLASYFIKACJA SUBPOPULACJI LIMFOCYTÓW T.....	19
RYC. 3. SCHEMAT REPREZENTUJĄCY EFEKT OKOŁONACZYNIOWEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ NA MIĘŚNIÓWKĘ GŁADKĄ NACZYŃ KRWIONOŚNYCH.	28
RYC. 4. GRAFICZNE PORÓWNANIE OKOŁONACZYNIOWEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ W STANIE FIZJOLOGICZNYM ORAZ NT.	29
RYC. 5. ZESTAWIENIE CZYNNIKÓW PRZECIWPALNYCH ORAZ PROZAPALNYCH WPŁYWAJĄCYCH NA FUNKCJONOWANIE ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO.	43
RYC. 6. MOZAIKOWA TEORIA PAGE'A Z UWZGLĘDNIENIEM ROLI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO ORAZ STANU ZAPLANEGO W PATOGENEZIE NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO.	44
RYC. 7. A- APARATURA POMIAROWA, B- PRZYKŁADOWY ZAPIS Z POMIARU CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI U MYSZY	49
RYC. 8. LICZBA KOMÓREK CD3+ PRZED (A) I PO (B) SORTOWANIU NA DRODZE NEGATYWNEJ SELEKCJI MAGNETYCZNEJ.	50
RYC. 9. KOMORA BOYDENA.	51
RYC. 10. STRATEGIA BRAMKOWANIA WYNIKÓW UZYSKANYCH Z CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ.	55
RYC. 11. A – PRZYKŁADOWY ZAPIS POMIARU FUNKCJI ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO U MYSZY KONTROLNEJ ORAZ MYSZY Z NT, B – ŁĄŻNIA NARZĄDOWA, C – MIOGRAF 610M.....	56
RYC. 12. EKSPRESJA BIAŁEK/CYTOKIN W PVAT ZMIENIONYCH POD WPŁYWEM DZIAŁANIA ANG II. WYKRES WULKANICZNY WSZYSTKICH BADANYCH BIAŁEK (A), HEATMAP ZE ZNAMIENNIE ZMIENIONYMI BIAŁKAMI (KOLORY ODPOWIADAJĄ WARTOŚCI EKSPRESJI, PO STANDARYZACJI Z, NORMALIZOWANEJ DLA KAŻDEGO BIAŁKA OSOBNO) (B), PRZYKŁAD MEMBRAN (C) (N=7-8).	59
RYC. 13. NACIEK LEUKOCYTARNY W PVAT I VAT (A). PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ KOMÓREK POCHODZĄCYCH Z PVAT (B) (*-p<0,05, **-p<0,01 SHAM VS. ANG II, P _{INT} <0,001, N=5).	61
RYC. 14. MAKROFAGI NACIEKAJĄCE PVAT I VAT (A). PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ WYTRAWIONYCH MAKROFAGÓW Z PVAT (B) (**-p<0,01 SHAM VS. ANG II, P _{INT} <0,001, N=6).....	61
RYC. 15. KOMÓRKI DENDRYTYCZNE NACIEKAJĄCE PVAT I VAT (A). PRZYKŁADOWY OBRAZ WYTRAWIONYCH MAKROFAGÓW Z OKOŁONACZYNIOWEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ (B) (*- p<0,05, **- p<0,01 SHAM VS. ANG II, P _{INT} <0,05, N=6).....	62
RYC. 16. KOMÓRKI NK PVAT I VAT (A). PRZYKŁADOWY OBRAZ WYTRAWIONYCH KOMÓREK NK Z PVAT (B) (*-p<0,05 SHAM VS. ANG II, N=4-6).....	63
RYC. 17. LIMFOCYTY B NACIEKAJĄCE PVAT I VAT (A). PRZYKŁADOWY OBRAZ WYTRAWIONYCH LIMFOCYTÓW B Z PVAT (B) (N=6).....	63
RYC. 18. NACIEK LIMFOCYTARNY W PVAT I VAT (A). PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ WYTRAWIONYCH KOMÓREK, POUCHODZĄCYCH Z PVAT (* p<0,05, ** p<0,01 SHAM VS. ANG II, P _{INT} <0,0001, N=5).....	64
RYC. 19. NACIEK SUBPOPULACJI LIMFOCYTÓW T W PVAT (A) I VAT (B) (** p<0,01 SHAM VS. ANG II, N=5).	65
RYC. 20. ODSETEK LIMFOCYTÓW T, REZYDUJĄCYCH W PVAT, POSIADAJĄCYCH MARKERY WZCZESNEJ (A) ORAZ PÓŻNEJ (C) AKTYWACJI. PRZYKŁAD ANALIZY CYTOMETRYCZNEJ LIMFOCYTÓW T NACIEKAJĄCYCH PVAT NA PODSTAWIE MARKERA CD69+(B) ORAZ CD25(D)(*-p<0,05, **-p<0,01 SHAM VS. ANG II, N=3-5).	66

RYC. 21. ODSETEK LIMFOCYTÓW NAIWNYCH, PAMIĘCI ORAZ EFEKTOROWYCH NA KOMÓRKACH CD3+ (A) ORAZ ICH SUBPOPULACJACH (B) REZYDUJĄCYCH W PVAT. PRZYKŁAD ANALIZY CYTOMETRYCZNEJ LIMFOCYTÓW T NACIEKAJĄCYCH PVAT PODSTAWIE MARKERA CD44+ ORAZ CD62L+ (C) (*-P<0,05, **-P<0,01 SHAM VS. ANG II, N=3-5).	67
RYC. 22. EKSPRESJA MRNA CHEMOKINY RANTES W PVAT ORAZ WISCERALNYM. WIZUALIZACJA CHEMOKINY RANTES METODĄ IMMUNOHISTOCHEMII W PVAT (B) (**- P<0,01 SHAM VS. ANG II, N=5/GRUPE, P _{INT} <0,001). ZDJĘCIA WYKORZYSTANE DZIĘKI UPREJMOŚCI DR A. SAGAN (UNIVERSITY OF GLASGOW).	68
RYC. 23. EKSPRESJA RECEPTORÓW DLA CHEMOKINY RANTES NA POWIERZCHNI LIMFOCYTÓW T REZYDUJĄCYCH W PVAT (A) ORAZ VAT (B) (N=5, * P<0,05, ** P<0,01 SHAM VS. ANG II).	69
RYC. 24. EKSPRESJA MRNA CHEMOKIN PROZAPALNYCH W PVAT (*-P<0,05, ** - P<0,01 SHAM VS. ANG II, N=4-5).	70
RYC. 25. CIŚNIENIE TĘTNICZE KRWI U SZCZURÓW SHR I WKY (*-P<0,01, N=7).	70
RYC. 26. NACIEK LEUKOCYTARNY W PVAT I VAT(A). PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ KOMÓREK CD45+ POCHODZĄCYCH Z PVAT (**-P<0,01 WKY VS. SHR, P _{INT} <0,0001, N=7).	71
RYC. 27. NACIEK MAKROFAGÓW W PVAT I VAT (A) ORAZ PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ KOMÓREK POCHODZĄCYCH Z PVAT (B) (**-P<0,01 WKY VS. SHR, P _{INT} <0,05, N=7).	71
RYC. 28. NACIEK KOMÓREK DENDRYTYCZNYCH W PVAT I VAT (A) ORAZ PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ KOMÓREK POCHODZĄCYCH Z PVAT (B) (**-P<0,01 WKY VS. SHR, N=7).	72
RYC. 29. NACIEK KOMÓREK NK W PVAT I VAT (A) ORAZ PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ KOMÓREK POCHODZĄCYCH Z PVAT (B), (**-P<0,01 WKY VS. SHR, P _{INT} <0,0001, N=7).	73
RYC. 30. NACIEK LIMFOCYTÓW B W PVAT I VAT (A) ORAZ PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ KOMÓREK POCHODZĄCYCH Z PVAT (B) (N=7).	73
RYC. 31. NACIEK LIMFOCYTÓW T W PVAT I VAT (A) ORAZ PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ KOMÓREK POCHODZĄCYCH Z PVAT (B) (N=7).	74
RYC. 32. NACIEK LIMFOCYTÓW T CD4+CD25+ (A), LIMFOCYTÓW REGULATOROWYCH TREG (B) ORAZ LIMFOCYTÓW T _H 17 (C) W PVAT. PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ PRZESTAWIAJĄCY PRODUKCJĘ IL-17 (D) (* - P<0,05, ** -P<0,01 WKY VS. SHR, N=6).	75
RYC. 33. MIGRACJA LIMFOCYTÓW T W PVAT (A) I VAT (B) TKANKI TŁUSZCZOWEJ (N=3, * P<0,05, ** P<0,01 SHAM PVAT VS. ANG II PVAT).	76
RYC. 34. MIGRACJA LIMFOCYTÓW T I B (A) ORAZ SUBPOPULACJI LIMFOCYTÓW T (B) W KIERUNKU CHEMOKINY RANTES (10NG/ML) (N=11, * P<0,05, ** P<0,01).	77
RYC. 35. MIGRACJA LIMFOCYTÓW T W KIERUNKU SUPERNATANTU Z PRZECIWCIAŁEM WIĄŻĄCYM RANTES (*- P<0,05, N=4).	78
RYC. 36. MIGRACJA LIMFOCYTÓW T WYIŻLOWANYCH Z PVAT (A) ORAZ VAT (B) W KIERUNKU CHEMOKINY RANTES (10NG/ML) (N=4, * P<0,05, ** P<0,01).	79
RYC. 37. CIŚNIENIE TĘTNICZE KRWI (* - P<0,01 SHAM VS. ANG II, N=6).	80
RYC. 38. ROZKURCZ NACZYŃ KREZKOWYCH ZALEŻNA OD WZRASTAJĄCYCH DAWEK ACETYLOCHOLINY (A) ORAZ NITROPRUSYDKU SODU (B) (N=5-6).	80
RYC. 39. ROZKURCZ KRAŻKÓW AORTY ZALEŻNA OD WZRASTAJĄCYCH DAWEK ACETYLOCHOLINY (A) ORAZ NITROPRUSYDKU SODU (B) (* - P<0,01, WT SHAM VS. WT ANGI, ** - P<0,05 WT ANGI VS. RANTES-/- ANGI, N=5-6).	81

RYC. 40. NACIEK LEUKOCYTÓW (A) ORAZ MAKROFAGÓW (C) W PVAT. PRZYKŁADOWY OBRAZ KOMÓREK PVAT Z CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ KOMÓREK CD45+ (* - P<0,05, ** - P<0,01 SHAM VS. ANG II, P _{INT} <0.05, N=5).	82
RYC. 41. NACIEK LIMFOCYTARNY W OKOŁONACZYNIOWEJ TKANCIE TŁUSZCZOWEJ(A). PRZYKŁADOWY OBRAZ LIMFOCYTÓW T Z CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ(B) (* -P<0,05, ** - P<0,01 SHAM VS. ANG, ♦ - P<0,01 WT VS. RANTES -/-, N=5).	83
RYC. 42. NACIEK SUBPOPULACJI LIMFOCYTÓW T W OKOŁONACZYNIOWEJ TKANCIE TŁUSZCZOWEJ (* -P<0,05, ** - P<0,01 SHAM VS. ANG, ♦ - P<0,01 WT VS. RANTES -/-, N=5).	84
RYC. 43. NACIEK LIMFOCYTÓW T REGULATOROWYCH W PVAT (A). PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ OBRAZUJĄCEJ KOMÓRKI TREG W PVAT (B) (N=6).	85
RYC. 44. EKSPRESJA RECEPTORA (CCR5) DLA CHEMOKINY RANTES NA POWIERZCHNI LIMFOCYTÓW T (A) ORAZ ICH SUBPOPULACJI CD4+, CD8+CD4-CD8- (B) REZYDUJĄCYCH W PVAT (*- P<0,05 SHAM VS. ANG II, ♦ - P<0,05, P _{INT} <0,05 N=5).....	86
RYC. 45. EKSPRESJA RECEPTORA CCR6 NA POWIERZCHNI LIMFOCYTÓW T (A) ORAZ ICH SUBPOPULACJI CD4+, CD8+CD4-CD8- (B) REZYDUJĄCYCH W TŁUSZCZU OKOŁOAORTALNYM (*- P<0,05 SHAM VS. N=5).....	87
RYC. 46. INFILTRACJA PVAT PRZEZ LIMFOCYTY PRODUKUJĄCE IL-17 (* - P<0,05, N=5).	88
RYC. 47. INFILTRACJA PVAT PRZEZ LIMFOCYTY PRODUKUJĄCE INTERFERON GAMA (A). PRZYKŁADOWY OBRAZ CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ OBRAZUJĄCY PRODUKCJĘ INTERFERONU GAMMA PRZEZ LIMFOCYTY CD8+(B) (* - P<0,01, ♦P<0,01 N=5).....	89
RYC. 48. PROPONOWANY MECHANIZM REKRUTACJI LIMFOCYTÓW T DO OKOŁONACZYNIOWEJ TKANKI TŁUSZCZOWEJ W NADCIŚNIENIU ZALEŻNYM OD ANGIOTENSYNY II.....	102

XII. SPIS TABEL

TABELA 1. KLASYFIKACJA NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO ²	8
TABELA 2. ZESTAWIENIE TYPÓW TKANKI TŁUSZCZOWEJ.	27
TABELA 3. WYKAZ PRZECIWCIAŁ WYKORZYSTANYCH W BADANIACH CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ.	53
TABELA 4. WYKAZ ISTOTNIE STATYSTYCZNIE (P<0.05) ZMIENIONYCH BIAŁEK W PVAT POD WPŁYWEM INFUZJI ANG II (N=7-8).	60

XIII. LITERATURA

1. MOZAFFARIAN, D., *ET AL.* HEART DISEASE AND STROKE STATISTICS--2015 UPDATE: A REPORT FROM THE AMERICAN HEART ASSOCIATION. *CIRCULATION* **131**, e29-322 (2015).
2. MANCIA, G., *ET AL.* 2013 ESH/ESC GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF ARTERIAL HYPERTENSION: THE TASK FORCE FOR THE MANAGEMENT OF ARTERIAL HYPERTENSION OF THE EUROPEAN SOCIETY OF HYPERTENSION (ESH) AND OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY (ESC). *JOURNAL OF HYPERTENSION* **31**, 1281-1357 (2013).
3. SOLAK, Y., *ET AL.* HYPERTENSION AS AN AUTOIMMUNE AND INFLAMMATORY DISEASE. *HYPERTENS RES* (2016).
4. JANUSZEWCZ, W. & GRODZICKI, T. STARE I NOWE ELEMENTY MOZAIKI PAGE'A W PATOGENEZIE NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO. *ARTERIAL HYPERTENSION* **7**, 191-195 (2003).
5. HARRISON, D.G. THE MOSAIC THEORY REVISITED: COMMON MOLECULAR MECHANISMS COORDINATING DIVERSE ORGAN AND CELLULAR EVENTS IN HYPERTENSION. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF HYPERTENSION : JASH* **7**, 68-74 (2013).
6. KEARNEY, P.M., *ET AL.* GLOBAL BURDEN OF HYPERTENSION: ANALYSIS OF WORLDWIDE DATA. *THE LANCET* **365**, 217-223 (2005).
7. JAKI JEST STAN ZDROWIA POLAKÓW WEDŁUG NATPOL 2011?
8. ZDROJEWSKI, T., *ET AL.* ARTERIAL HYPERTENSION IN POLAND IN 2002. *JOURNAL OF HUMAN HYPERTENSION* **18**, 557-562 (2004).
9. CHOBANIAN, A.V., *ET AL.* THE SEVENTH REPORT OF THE JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE: THE JNC 7 REPORT. *JAMA* **289**, 2560-2572 (2003).
10. LI, C., ENGSTROM, G., HEDBLAD, B., BERGLUND, G. & JANZON, L. BLOOD PRESSURE CONTROL AND RISK OF STROKE: A POPULATION-BASED PROSPECTIVE COHORT STUDY. *STROKE; A JOURNAL OF CEREBRAL CIRCULATION* **36**, 725-730 (2005).
11. MAINOUS, A.G., 3RD, EVERETT, C.J., LISZKA, H., KING, D.E. & EGAN, B.M. PREHYPERTENSION AND MORTALITY IN A NATIONALLY REPRESENTATIVE COHORT. *THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY* **94**, 1496-1500 (2004).
12. CZARNECKA, D. & BIŁO, G. PACJENT Z CIŚNIENIEM WYSOKIM PRAWIDŁOWYM - CZY WYMAGA LECZENIA? *CHOROBY SERCA I NACZYŃ Tom 2*, 187-189 (2005).
13. LEWINGTON, S., CLARKE, R., QIZILBASH, N., PETO, R. & COLLINS, R. AGE-SPECIFIC RELEVANCE OF USUAL BLOOD PRESSURE TO VASCULAR MORTALITY: A META-ANALYSIS OF INDIVIDUAL DATA FOR ONE MILLION ADULTS IN 61 PROSPECTIVE STUDIES. *LANCET* **360**, 1903-1913 (2002).
14. HEIDENREICH, P.A., *ET AL.* FORECASTING THE FUTURE OF CARDIOVASCULAR DISEASE IN THE UNITED STATES: A POLICY STATEMENT FROM THE AMERICAN HEART ASSOCIATION. *CIRCULATION* **123**, 933-944 (2011).
15. SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, E. UDZIAŁ OŚRODKOWEGO UKŁĄDU NERWOWEGO W REGULACJI UKŁĄDU KRAŻENIA. STRUKTURY MÓZGU REGULUJĄCE CIŚNIENIE TĘTNICZE. IN *NADCIŚNIENIE TĘTNICZE* (EDS. JANUSZEWCZ, A., JANUSZEWCZ, W., SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, E. & SZNAJDERMAN, M.) 91-100 (MEDYCINA PRAKTYCZNA, KRAKÓW, 2007).
16. KAPLAN, N.M. *NADCIŚNIENIE TĘTNICZE - ASPEKTY KLINICZNE* (WYDAWNICTWO CZELEJ SP. Z O.O. , LUBLIN, 2006).
17. DAMPNEY, R.A., POLSON, J.W., POTTS, P.D., HIROOKA, Y. & HORIUCHI, J. FUNCTIONAL ORGANIZATION OF BRAIN PATHWAYS SUBSERVING THE BARORECEPTOR REFLEX: STUDIES IN CONSCIOUS ANIMALS USING IMMEDIATE EARLY GENE EXPRESSION. *CELL MOL NEUROBIOL* **23**, 597-616 (2003).
18. JANUSZEWCZ, W., SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, E., JANUSZEWCZ, A. & PREJBISZ, A. NEUROGENNE ASPEKTY NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO. *NADCIŚNIENIE TĘTNICZE* **12**, 1-11 (2008).
19. TRZEBSKI, A. ODRUCHOWA REGULACJA KRAŻENIA KRWI W NADCIŚNIENIU TĘTNICZYM. IN *NADCIŚNIENIE TĘTNICZE* (ED. JANUSZEWCZ A., J.W., SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA E., SZNAJDERMAN M.) (MEDYCINA PRAKTYCZNA, KRAKÓW, 2007).
20. MARVAR, P.J., *ET AL.* CENTRAL AND PERIPHERAL MECHANISMS OF T-LYMPHOCYTE ACTIVATION AND VASCULAR INFLAMMATION PRODUCED BY ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION. *CIRCULATION RESEARCH* **107**, 263-270 (2010).
21. LOB, H.E., SCHULTZ, D., MARVAR, P.J., DAVISSON, R.L. & HARRISON, D.G. ROLE OF THE NADPH OXIDASES IN THE SUBFORNICAL ORGAN IN ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION. *HYPERTENSION* **61**, 382-387 (2013).

22. LOB, H.E., *ET AL.* INDUCTION OF HYPERTENSION AND PERIPHERAL INFLAMMATION BY REDUCTION OF EXTRACELLULAR SUPEROXIDE DISMUTASE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *HYPERTENSION* **55**, 277-283, 276P FOLLOWING 283 (2010).
23. HARRISON, D.G., VINH, A., LOB, H. & MADHUR, M.S. ROLE OF THE ADAPTIVE IMMUNE SYSTEM IN HYPERTENSION. *CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY* **10**, 203-207 (2010).
24. WIĘCEK, A., *ET AL.* *HIPERTENSJOLOGIA. PATOGENEZA, DIAGNOSTYKA I LECZENIE NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO.*, (MEDYCYNĄ PRAKTYCZNA KRAKÓW, 2015).
25. MIDDEKE, M. *NADCIŚNIENIE TĘTNICZE*, (WYDAWNICTWO CZELEJ SP. Z O.O LUBLIN, 2006).
26. KRUM, H., *ET AL.* CATHETER-BASED RENAL SYMPATHETIC DENERVATION FOR RESISTANT HYPERTENSION: A MULTICENTRE SAFETY AND PROOF-OF-PRINCIPLE COHORT STUDY. *LANCET* **373**, 1275-1281 (2009).
27. FERRARA, L.A., *ET AL.* ADRENERGIC NERVOUS SYSTEM AND LEFT VENTRICULAR MASS IN PRIMARY HYPERTENSION. *EUROPEAN HEART JOURNAL* **10**, 1036-1040 (1989).
28. KACZYŃSKA, A. & GACIONG, Z. STRES PSYCHICZNY A NADCIŚNIENIE TĘTNICZE. *CHOROBY SERCA I NACZYŃ* **1**, 73-79 (2004).
29. HAMER, M., BOUTCHER, Y. & BOUTCHER, S.H. CARDIOVASCULAR AND RENAL RESPONSES TO MENTAL CHALLENGE IN HIGHLY AND MODERATELY ACTIVE MALES WITH A FAMILY HISTORY OF HYPERTENSION. *JOURNAL OF HUMAN HYPERTENSION* **16**, 319-326 (2002).
30. SCHMIEDER, R.E., *ET AL.* GLOMERULAR HYPERFILTRATION DURING SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM ACTIVATION IN EARLY ESSENTIAL HYPERTENSION. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY : JASN* **8**, 893-900 (1997).
31. DAHL, L.K. & HEINE, M. PRIMARY ROLE OF RENAL HOMOGRAFTS IN SETTING CHRONIC BLOOD PRESSURE LEVELS IN RATS. *CIRCULATION RESEARCH* **36**, 692-696 (1975).
32. CURTIS, J.J., *ET AL.* REMISSION OF ESSENTIAL HYPERTENSION AFTER RENAL TRANSPLANTATION. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* **309**, 1009-1015 (1983).
33. GUIDI, E., *ET AL.* HYPERTENSION MAY BE TRANSPLANTED WITH THE KIDNEY IN HUMANS: A LONG-TERM HISTORICAL PROSPECTIVE FOLLOW-UP OF RECIPIENTS GRAFTED WITH KIDNEYS COMING FROM DONORS WITH OR WITHOUT HYPERTENSION IN THEIR FAMILIES. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY : JASN* **7**, 1131-1138 (1996).
34. WOJTUSIK, S. & SULOWICZ, W. [THE ROLE OF KIDNEY IN PATHOGENESIS OF ARTERIAL HYPERTENSION]. *PRZEGLĄD LEKARSKI* **69**, 680-686 (2012).
35. NGUYEN DINH CAT, A. & TOUYZ, R.M. A NEW LOOK AT THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM--FOCUSING ON THE VASCULAR SYSTEM. *PEPTIDES* **32**, 2141-2150 (2011).
36. WYSZYŃSKA, T. & LITWIN, M. *NADCIŚNIENIE TĘTNICZE U DZIECI I MŁODZIEŻY*, (WYDAWNICTWO LEKARSKI PZWL, WARSZAWA, 2002).
37. COFFMAN, T.M. THE INEXTRICABLE ROLE OF THE KIDNEY IN HYPERTENSION. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **124**, 2341-2347 (2014).
38. WADEI, H.M. & TEXTOR, S.C. THE ROLE OF THE KIDNEY IN REGULATING ARTERIAL BLOOD PRESSURE. *NAT REV NEPHROL* **8**, 602-609 (2012).
39. JOHNSON, R.J., FEIG, D.I., NAKAGAWA, T., SANCHEZ-LOZADA, L.G. & RODRIGUEZ-ITURBE, B. PATHOGENESIS OF ESSENTIAL HYPERTENSION: HISTORICAL PARADIGMS AND MODERN INSIGHTS. *JOURNAL OF HYPERTENSION* **26**, 381-391 (2008).
40. WU, J., *ET AL.* IMMUNE ACTIVATION CAUSED BY VASCULAR OXIDATION PROMOTES FIBROSIS AND HYPERTENSION. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **126**, 50-67 (2016).
41. NUYT, A.M. & ALEXANDER, B.T. DEVELOPMENTAL PROGRAMMING AND HYPERTENSION. *CURRENT OPINION IN NEPHROLOGY AND HYPERTENSION* **18**, 144-152 (2009).
42. GUYTON, A.C. BLOOD PRESSURE CONTROL--SPECIAL ROLE OF THE KIDNEYS AND BODY FLUIDS. *SCIENCE* **252**, 1813-1816 (1991).
43. JOHNSON, R.J., HERRERA-ACOSTA, J., SCHREINER, G.F. & RODRIGUEZ-ITURBE, B. SUBTLE ACQUIRED RENAL INJURY AS A MECHANISM OF SALT-SENSITIVE HYPERTENSION. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* **346**, 913-923 (2002).
44. MULVANY, M.J., *ET AL.* VASCULAR REMODELING. *HYPERTENSION* **28**, 505-506 (1996).
45. GUZIK, T.J. & HARRISON, D.G. VASCULAR NADPH OXIDASES AS DRUG TARGETS FOR NOVEL ANTIOXIDANT STRATEGIES. *DRUG DISCOVERY TODAY* **11**, 524-533 (2006).
46. MICHEL, T. & VANHOUTTE, P.M. CELLULAR SIGNALING AND NO PRODUCTION. *PFLUGERS ARCHIV : EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* **459**, 807-816 (2010).
47. KOHAN, D.E. ENDOTHELIN, HYPERTENSION AND CHRONIC KIDNEY DISEASE: NEW INSIGHTS. *CURRENT OPINION IN NEPHROLOGY AND HYPERTENSION* **19**, 134-139 (2010).

48. LEWARTOWSKI, B. BUDOWA I FUNKCJA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH W NADCIŚNIENIU TĘTNICZYM. IN *NADCIŚNIENIE TĘTNICZE* (EDS. JANUSZEWICZ, A., JANUSZEWICZ, W., SZCZEPAŃSKA-SADOWSKA, E. & SZNAJDERMAN, M.) (MEDYCINA PRAKTYCZNA, KRAKÓW, 2007).
49. WU, J., *ET AL.* INFLAMMATION AND MECHANICAL STRETCH PROMOTE AORTIC STIFFENING IN HYPERTENSION THROUGH ACTIVATION OF p38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE. *CIRCULATION RESEARCH* **114**, 616-625 (2014).
50. MONTEZANO, A.C., NGUYEN DINH CAT, A., RIOS, F.J. & TOUYZ, R.M. ANGIOTENSIN II AND VASCULAR INJURY. *CURRENT HYPERTENSION REPORTS* **16**, 431 (2014).
51. HIROOKA, Y., *ET AL.* VITAMIN C IMPROVES ATTENUATED ANGIOTENSIN II-INDUCED ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASODILATION IN HUMAN FOREARM VESSELS. *HYPERTENS RES* **26**, 953-959 (2003).
52. TOUYZ, R.M., BRIONES, A.M., SEDEEK, M., BURGER, D. & MONTEZANO, A.C. NOX ISOFORMS AND REACTIVE OXYGEN SPECIES IN VASCULAR HEALTH. *MOLECULAR INTERVENTIONS* **11**, 27-35 (2011).
53. KONIOR, A., SCHRAMM, A., CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M. & GUZIK, T.J. NADPH OXIDASES IN VASCULAR PATHOLOGY. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING* **20**, 2794-2814 (2014).
54. DRUMMOND, G.R. & SOBEY, C.G. ENDOTHELIAL NADPH OXIDASES: WHICH NOX TO TARGET IN VASCULAR DISEASE? *TRENDS ENDOCRINOL METAB* **25**, 452-463 (2014).
55. WIND, S., *ET AL.* OXIDATIVE STRESS AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN AORTAS OF AGED SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS BY NOX1/2 IS REVERSED BY NADPH OXIDASE INHIBITION. *HYPERTENSION* **56**, 490-497 (2010).
56. MATSUNO, K., *ET AL.* NOX1 IS INVOLVED IN ANGIOTENSIN II-MEDIATED HYPERTENSION: A STUDY IN NOX1-DEFICIENT MICE. *CIRCULATION* **112**, 2677-2685 (2005).
57. WANG, H.D., *ET AL.* ROLE OF NADPH OXIDASE IN THE VASCULAR HYPERTROPHIC AND OXIDATIVE STRESS RESPONSE TO ANGIOTENSIN II IN MICE. *CIRCULATION RESEARCH* **88**, 947-953 (2001).
58. LOOT, A.E., SCHREIBER, J.G., FISSLTHALER, B. & FLEMING, I. ANGIOTENSIN II IMPAIRS ENDOTHELIAL FUNCTION VIA TYROSINE PHOSPHORYLATION OF THE ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **206**, 2889-2896 (2009).
59. LANDMESSER, U., *ET AL.* ROLE OF p47PHOX IN VASCULAR OXIDATIVE STRESS AND HYPERTENSION CAUSED BY ANGIOTENSIN II. *HYPERTENSION* **40**, 511-515 (2002).
60. LANDMESSER, U., *ET AL.* OXIDATION OF TETRAHYDROBIOPTERIN LEADS TO UNCOUPLING OF ENDOTHELIAL CELL NITRIC OXIDE SYNTHASE IN HYPERTENSION. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **111**, 1201-1209 (2003).
61. SCHRODER, K., *ET AL.* NOX4 IS A PROTECTIVE REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATING VASCULAR NADPH OXIDASE. *CIRCULATION RESEARCH* **110**, 1217-1225 (2012).
62. SCHULZ, E., GORI, T. & MUNZEL, T. OXIDATIVE STRESS AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN HYPERTENSION. *HYPERTENS RES* **34**, 665-673 (2011).
63. GRUNFELD, S., *ET AL.* ROLE OF SUPEROXIDE IN THE DEPRESSED NITRIC OXIDE PRODUCTION BY THE ENDOTHELIUM OF GENETICALLY HYPERTENSIVE RATS. *HYPERTENSION* **26**, 854-857 (1995).
64. TSCHUDI, M.R., MESAROS, S., LUSCHER, T.F. & MALINSKI, T. DIRECT IN SITU MEASUREMENT OF NITRIC OXIDE IN MESENTERIC RESISTANCE ARTERIES. INCREASED DECOMPOSITION BY SUPEROXIDE IN HYPERTENSION. *HYPERTENSION* **27**, 32-35 (1996).
65. JIN, R.C. & LOSCALZO, J. VASCULAR NITRIC OXIDE: FORMATION AND FUNCTION. *JOURNAL OF BLOOD MEDICINE* **2010**, 147-162 (2010).
66. BOGER, R.H., *ET AL.* ASYMMETRIC DIMETHYLARGININE (ADMA): A NOVEL RISK FACTOR FOR ENDOTHELIAL DYSFUNCTION: ITS ROLE IN HYPERCHOLESTEROLEMIA. *CIRCULATION* **98**, 1842-1847 (1998).
67. SZMITKO, P.E., *ET AL.* NEW MARKERS OF INFLAMMATION AND ENDOTHELIAL CELL ACTIVATION: PART I. *CIRCULATION* **108**, 1917-1923 (2003).
68. WHITE, F.N. & GROLLMAN, A. AUTOIMMUNE FACTORS ASSOCIATED WITH INFRACTION OF KIDNEY. *NEPHRON* **204**, 93-102 (1964).
69. OKUDA, T. & GROLLMAN, A. PASSIVE TRANSFER OF AUTOIMMUNE INDUCED HYPERTENSION IN THE RAT BY LYMPH NODE CELLS. *TEXAS REPORTS ON BIOLOGY AND MEDICINE* **25**, 257-264 (1967).
70. OLSEN, F. TRANSFER OF ARTERIAL HYPERTENSION BY SPLENIC CELLS FROM DOCA-SALT HYPERTENSIVE AND RENAL HYPERTENSIVE RATS TO NORMOTENSIVE RECIPIENTS. *ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA SCANDINAVICA. SECTION C, IMMUNOLOGY* **88**, 1-5 (1980).
71. BA, D., TAKEICHI, N., KODAMA, T. & KOBAYASHI, H. RESTORATION OF T CELL DEPRESSION AND SUPPRESSION OF BLOOD PRESSURE IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS (SHR) BY THYMUS GRAFTS OR THYMUS EXTRACTS. *J IMMUNOL* **128**, 1211-1216 (1982).
72. VENTOLA, D.A. & STRAUSSER, H.R. EVALUATION OF T CELL SUBPOPULATION AND FUNCTION IN THYMOSIN TREATED SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS. *THYMUS* **6**, 129-141 (1984).

73. RODRIGUEZ-ITURBE, B., *ET AL.* REDUCTION OF RENAL IMMUNE CELL INFILTRATION RESULTS IN BLOOD PRESSURE CONTROL IN GENETICALLY HYPERTENSIVE RATS. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. RENAL PHYSIOLOGY* **282**, F191-201 (2002).
74. GUZIK, T.J., *ET AL.* ROLE OF THE T CELL IN THE GENESIS OF ANGIOTENSIN II INDUCED HYPERTENSION AND VASCULAR DYSFUNCTION. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **204**, 2449-2460 (2007).
75. CROWLEY, S.D., *ET AL.* LYMPHOCYTE RESPONSES EXACERBATE ANGIOTENSIN II-DEPENDENT HYPERTENSION. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY* **298**, R1089-1097 (2010).
76. MATTSON, D.L., *ET AL.* GENETIC MUTATION OF RECOMBINATION ACTIVATING GENE 1 IN DAHL SALT-SENSITIVE RATS ATTENUATES HYPERTENSION AND RENAL DAMAGE. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY* **304**, R407-414 (2013).
77. DEVALIERE, J. & CHARREAU, B. THE ADAPTOR LNK (SH2B3): AN EMERGING REGULATOR IN VASCULAR CELLS AND A LINK BETWEEN IMMUNE AND INFLAMMATORY SIGNALING. *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY* **82**, 1391-1402 (2011).
78. SALEH, M.A., *ET AL.* LYMPHOCYTE ADAPTOR PROTEIN LNK DEFICIENCY EXACERBATES HYPERTENSION AND END-ORGAN INFLAMMATION. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **125**, 1189-1202 (2015).
79. HOCH, N.E., *ET AL.* REGULATION OF T-CELL FUNCTION BY ENDOGENOUSLY PRODUCED ANGIOTENSIN II. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY* **296**, R208-216 (2009).
80. SALEH, M.A., NORLANDER, A.E. & MADHUR, M.S. INHIBITION OF INTERLEUKIN-17A, BUT NOT INTERLEUKIN-17F, SIGNALING LOWERS BLOOD PRESSURE, AND REDUCES END-ORGAN INFLAMMATION IN ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION. *JACC: BASIC TO TRANSLATIONAL SCIENCE* (2016).
81. MARVAR, P.J., *ET AL.* T LYMPHOCYTES AND VASCULAR INFLAMMATION CONTRIBUTE TO STRESS-DEPENDENT HYPERTENSION. *BIOL PSYCHIATRY* **71**, 774-782 (2012).
82. SAITO, S. TH17 CELLS AND REGULATORY T CELLS: NEW LIGHT ON PATHOPHYSIOLOGY OF PREECLAMPSIA. *IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY* **88**, 615-617 (2010).
83. NOVOTNY, S.R., *ET AL.* ACTIVATING AUTOANTIBODIES TO THE ANGIOTENSIN II TYPE I RECEPTOR PLAY AN IMPORTANT ROLE IN MEDIATING HYPERTENSION IN RESPONSE TO ADOPTIVE TRANSFER OF CD4+ T LYMPHOCYTES FROM PLACENTAL ISCHEMIC RATS. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY* **302**, R1197-1201 (2012).
84. CHAN, C.T., *ET AL.* ANTIBODIES IN THE PATHOGENESIS OF HYPERTENSION. *BIOMED RES INT* **2014**, 504045 (2014).
85. CHAN, C.T., *ET AL.* OBLIGATORY ROLE FOR B CELLS IN THE DEVELOPMENT OF ANGIOTENSIN II-DEPENDENT HYPERTENSION. *HYPERTENSION* **66**, 1023-1033 (2015).
86. CHEN, C.M. & SCHACHTER, D. ELEVATION OF PLASMA IMMUNOGLOBULIN A IN THE SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RAT. *HYPERTENSION* **21**, 731-738 (1993).
87. ZHOU, C.C., *ET AL.* AUTOANTIBODY-MEDIATED IL-6-DEPENDENT ENDOTHELIN-1 ELEVATION UNDERLIES PATHOGENESIS IN A MOUSE MODEL OF PREECLAMPSIA. *J IMMUNOL* **186**, 6024-6034 (2011).
88. GOŁĄB, J., LASEK, W. & STOKŁOSA, T. *IMMUNOLOGIA*, (WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN SA, WARSZAWA, 2010).
89. MURPHY, K. & WEAVER, C. *JANEWAY'S IMMUNOBIOLOGY, 9TH EDITION*, (2016).
90. TROTT, D.W., *ET AL.* OLIGOCLONAL CD8+ T CELLS PLAY A CRITICAL ROLE IN THE DEVELOPMENT OF HYPERTENSION. *HYPERTENSION* **64**, 1108-1115 (2014).
91. GRATZE, P., *ET AL.* NOVEL ROLE FOR INHIBITOR OF DIFFERENTIATION 2 IN THE GENESIS OF ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION. *CIRCULATION* **117**, 2645-2656 (2008).
92. PTAK, W., PTAK, M. & SZCZEPANIK, M. *PODSTAWY IMMUNOLOGII*, (WYDAWNICTWO LEKARSKIE PZWŁ, WARSZAWA, 2008).
93. GOŁĄB, J., JAKÓBISIAK, M., LASEK, W. & STOKŁOSA, T. *IMMUNOLOGIA*, (WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN SA, WARSZAWA, 2007).
94. AFZALI, B., LOMBARDI, G., LECHLER, R.I. & LORD, G.M. THE ROLE OF T HELPER 17 (TH17) AND REGULATORY T CELLS (TREG) IN HUMAN ORGAN TRANSPLANTATION AND AUTOIMMUNE DISEASE. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY* **148**, 32-46 (2007).
95. GODFREY, D.I., ULDRICH, A.P., MCCLUSKEY, J., ROSSJOHN, J. & MOODY, D.B. THE BURGEONING FAMILY OF UNCONVENTIONAL T CELLS. *NATURE IMMUNOLOGY* **16**, 1114-1123 (2015).

96. CAILLON, A., ONEEB REHMAN MIAN, M., BARHOUMI, T., PARADIS, P. & SCHIFFRIN, E.L. ABSTRACT P617: ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION AND VASCULAR INJURY IS MEDIATED BY GAMMA/DELTA T CELLS. *HYPERTENSION* **66**, AP617-AP617 (2015).
97. KIRABO, A., *ET AL.* DC ISOKETAL-MODIFIED PROTEINS ACTIVATE T CELLS AND PROMOTE HYPERTENSION. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **124**, 4642-4656 (2014).
98. NOELLE, R.J. & NOWAK, E.C. CELLULAR SOURCES AND IMMUNE FUNCTIONS OF INTERLEUKIN-9. *NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY* **10**, 683-687 (2010).
99. DEENICK, E.K., MA, C.S., BRINK, R. & TANGYE, S.G. REGULATION OF T FOLLICULAR HELPER CELL FORMATION AND FUNCTION BY ANTIGEN PRESENTING CELLS. *CURR OPIN IMMUNOL* **23**, 111-118 (2011).
100. TRIFARI, S. & SPITS, H. IL-22-PRODUCING CD4+ T CELLS: MIDDLE-MEN BETWEEN THE IMMUNE SYSTEM AND ITS ENVIRONMENT. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **40**, 2369-2371 (2010).
101. SHAO, J., *ET AL.* IMBALANCE OF T-CELL SUBSETS IN ANGIOTENSIN II-INFUSED HYPERTENSIVE RATS WITH KIDNEY INJURY. *HYPERTENSION* **42**, 31-38 (2003).
102. ZHANG, J., *ET AL.* TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA PRODUCED IN THE KIDNEY CONTRIBUTES TO ANGIOTENSIN II-DEPENDENT HYPERTENSION. *HYPERTENSION* **64**, 1275-1281 (2014).
103. KAMAT, N.V., *ET AL.* RENAL TRANSPORTER ACTIVATION DURING ANGIOTENSIN-II HYPERTENSION IS BLUNTED IN INTERFERON-GAMMA-/- AND INTERLEUKIN-17A-/- MICE. *HYPERTENSION* **65**, 569-576 (2015).
104. JIN, W. & DONG, C. IL-17 CYTOKINES IN IMMUNITY AND INFLAMMATION. *EMERG MICROBES INFECT* **2**, e60 (2013).
105. AMADOR, C.A., *ET AL.* SPIRONOLACTONE DECREASES DOCA-SALT-INDUCED ORGAN DAMAGE BY BLOCKING THE ACTIVATION OF T HELPER 17 AND THE DOWNREGULATION OF REGULATORY T LYMPHOCYTES. *HYPERTENSION* **63**, 797-803 (2014).
106. CHEN, S. & AGRAWAL, D.K. DYSREGULATION OF T CELL SUBSETS IN THE PATHOGENESIS OF HYPERTENSION. *CURRENT HYPERTENSION REPORTS* **17**, 8 (2015).
107. IWAKURA, Y., ISHIGAME, H., SAIJO, S. & NAKAE, S. FUNCTIONAL SPECIALIZATION OF INTERLEUKIN-17 FAMILY MEMBERS. *IMMUNITY* **34**, 149-162 (2011).
108. MADHUR, M.S., *ET AL.* ROLE OF INTERLEUKIN 17 IN INFLAMMATION, ATHEROSCLEROSIS, AND VASCULAR FUNCTION IN APOLIPOPROTEIN E-DEFICIENT MICE. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **31**, 1565-1572 (2011).
109. FOSS, J.D., KIRABO, A. & HARRISON, D.G. DO HIGH-SALT MICROENVIRONMENTS DRIVE HYPERTENSIVE INFLAMMATION? *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY* **312**, R1-R4 (2017).
110. KLEINWIEFELD, M., *ET AL.* SODIUM CHLORIDE DRIVES AUTOIMMUNE DISEASE BY THE INDUCTION OF PATHOGENIC TH17 CELLS. *NATURE* **496**, 518-522 (2013).
111. PALOMARES, O., *ET AL.* ROLE OF TREG IN IMMUNE REGULATION OF ALLERGIC DISEASES. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **40**, 1232-1240 (2010).
112. VIEL, E.C., LEMARIE, C.A., BENKIRANE, K., PARADIS, P. & SCHIFFRIN, E.L. IMMUNE REGULATION AND VASCULAR INFLAMMATION IN GENETIC HYPERTENSION. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY* **298**, H938-944 (2010).
113. MATROUGUI, K., *ET AL.* NATURAL REGULATORY T CELLS CONTROL CORONARY ARTERIOLAR ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN HYPERTENSIVE MICE. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* **178**, 434-441 (2011).
114. BARHOUMI, T., *ET AL.* T REGULATORY LYMPHOCYTES PREVENT ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION AND VASCULAR INJURY. *HYPERTENSION* **57**, 469-476 (2011).
115. KASAL, D.A. & SCHIFFRIN, E.L. ANGIOTENSIN II, ALDOSTERONE, AND ANTI-INFLAMMATORY LYMPHOCYTES: INTERPLAY AND THERAPEUTIC OPPORTUNITIES. *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTENSION* **2012**, 829786 (2012).
116. BANCHEREAU, J., *ET AL.* IMMUNOBIOLOGY OF DENDRITIC CELLS. *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY* **18**, 767-811 (2000).
117. ROITT, I., BROSTOFF, J. & MALE, D. *IMMUNOLOGIA*, (WYDAWNICTO LEKARSKIE PZWL, WARSZAWA, 2000).
118. VINH, A., *ET AL.* INHIBITION AND GENETIC ABLATION OF THE B7/CD28 T-CELL COSTIMULATION AXIS PREVENTS EXPERIMENTAL HYPERTENSION. *CIRCULATION* **122**, 2529-2537 (2010).
119. MCMASTER, W.G., KIRABO, A., MADHUR, M.S. & HARRISON, D.G. INFLAMMATION, IMMUNITY, AND HYPERTENSIVE END-ORGAN DAMAGE. *CIRCULATION RESEARCH* **116**, 1022-1033 (2015).
120. WEBER, C., *ET AL.* ROLE AND ANALYSIS OF MONOCYTE SUBSETS IN CARDIOVASCULAR DISEASE. JOINT CONSENSUS DOCUMENT OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY (ESC) WORKING

- GROUPS "ATHEROSCLEROSIS & VASCULAR BIOLOGY" AND "THROMBOSIS". *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS* **116**, 626-637 (2016).
121. MOORE, J.P., *ET AL.* M2 MACROPHAGE ACCUMULATION IN THE AORTIC WALL DURING ANGIOTENSIN II INFUSION IN MICE IS ASSOCIATED WITH FIBROSIS, ELASTIN LOSS, AND ELEVATED BLOOD PRESSURE. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY* **309**, H906-917 (2015).
 122. O'NEILL, D.W. & BHARDWAJ, N. DIFFERENTIATION OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES INTO DENDRITIC CELLS. *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY* **CHAPTER 22**, UNIT 22F.24 (2005).
 123. WYNN, T.A., CHAWLA, A. & POLLARD, J.W. MACROPHAGE BIOLOGY IN DEVELOPMENT, HOMEOSTASIS AND DISEASE. *NATURE* **496**, 445-455 (2013).
 124. SHIRAI, T., HILHORST, M., HARRISON, D.G., GORONZY, J.J. & WEYAND, C.M. MACROPHAGES IN VASCULAR INFLAMMATION--FROM ATHEROSCLEROSIS TO VASCULITIS. *AUTOIMMUNITY* **48**, 139-151 (2015).
 125. TABAS, I. & BORNFELDT, K.E. MACROPHAGE PHENOTYPE AND FUNCTION IN DIFFERENT STAGES OF ATHEROSCLEROSIS. *CIRCULATION RESEARCH* **118**, 653-667 (2016).
 126. WENZEL, P., *ET AL.* LYSOZYME M-POSITIVE MONOCYTES MEDIATE ANGIOTENSIN II-INDUCED ARTERIAL HYPERTENSION AND VASCULAR DYSFUNCTION. *CIRCULATION* **124**, 1370-1381 (2011).
 127. KOSSMANN, S., *ET AL.* ANGIOTENSIN II-INDUCED VASCULAR DYSFUNCTION DEPENDS ON INTERFERON-GAMMA-DRIVEN IMMUNE CELL RECRUITMENT AND MUTUAL ACTIVATION OF MONOCYTES AND NK-CELLS. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **33**, 1313-1319 (2013).
 128. DE CIUCEIS, C., *ET AL.* REDUCED VASCULAR REMODELING, ENDOTHELIAL DYSFUNCTION, AND OXIDATIVE STRESS IN RESISTANCE ARTERIES OF ANGIOTENSIN II-INFUSED MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR-DEFICIENT MICE: EVIDENCE FOR A ROLE IN INFLAMMATION IN ANGIOTENSIN-INDUCED VASCULAR INJURY. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **25**, 2106-2113 (2005).
 129. MURRAY, P.J. & WYNN, T.A. PROTECTIVE AND PATHOGENIC FUNCTIONS OF MACROPHAGE SUBSETS. *NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY* **11**, 723-737 (2011).
 130. WHITMAN, S.C., RATERI, D.L., SZILVASSY, S.J., YOKOYAMA, W. & DAUGHERTY, A. DEPLETION OF NATURAL KILLER CELL FUNCTION DECREASES ATHEROSCLEROSIS IN LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR NULL MICE. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **24**, 1049-1054 (2004).
 131. KNORR, M., MUNZEL, T. & WENZEL, P. INTERPLAY OF NK CELLS AND MONOCYTES IN VASCULAR INFLAMMATION AND MYOCARDIAL INFARCTION. *FRONTIERS IN PHYSIOLOGY* **5**, 295 (2014).
 132. SMALL, H.Y., *ET AL.* ROLE OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA AND NATURAL KILLER CELLS IN UTERINE ARTERY FUNCTION AND PREGNANCY OUTCOME IN THE STROKE-PRONE SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RAT. *HYPERTENSION* **68**, 1298-1307 (2016).
 133. SELATHURAI, A., *ET AL.* NATURAL KILLER (NK) CELLS AUGMENT ATHEROSCLEROSIS BY CYTOTOXIC-DEPENDENT MECHANISMS. *CARDIOVASCULAR RESEARCH* **102**, 128-137 (2014).
 134. BOBRYSHCHEV, Y.V. & LORD, R.S. IDENTIFICATION OF NATURAL KILLER CELLS IN HUMAN ATHEROSCLEROTIC PLAQUE. *ATHEROSCLEROSIS* **180**, 423-427 (2005).
 135. MORTON, J., *ET AL.* CIRCULATING NEUTROPHILS MAINTAIN PHYSIOLOGICAL BLOOD PRESSURE BY SUPPRESSING BACTERIA AND IFNGAMMA-DEPENDENT iNOS EXPRESSION IN THE VASCULATURE OF HEALTHY MICE. *BLOOD* **111**, 5187-5194 (2008).
 136. YILDIRIM, A., RUSSELL, J., YAN, L.S., SENCHENKOVA, E.Y. & GRANGER, D.N. LEUKOCYTE-DEPENDENT RESPONSES OF THE MICROVASCULATURE TO CHRONIC ANGIOTENSIN II EXPOSURE. *HYPERTENSION* **60**, 1503-1509 (2012).
 137. ITANI, H.A., *ET AL.* ACTIVATION OF HUMAN T CELLS IN HYPERTENSION: STUDIES OF HUMANIZED MICE AND HYPERTENSIVE HUMANS. *HYPERTENSION* **68**, 123-132 (2016).
 138. PARK, C.S., *ET AL.* ASSOCIATION BETWEEN THE JNC 7 CLASSIFICATION OF THE STAGES OF SYSTOLIC HYPERTENSION AND INFLAMMATORY CARDIOVASCULAR RISK FACTORS. *KOREAN CIRCULATION JOURNAL* **37**, 623 (2007).
 139. PALACIOS, R., *ET AL.* IMPACT OF HAART ON BLOOD PRESSURE IN HIV-INFECTED PATIENTS. A PROSPECTIVE STUDY IN A COHORT OF NAIVE PATIENTS. *HIV MEDICINE* **7(1)**, 10-15 (2006).
 140. BALSARI, A., *ET AL.* SYSTEMIC ADMINISTRATION OF AUTOLOGOUS, ALLOACTIVATED HELPER-ENRICHED LYMPHOCYTES TO PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA OF THE LUNG. A PHASE I STUDY. *CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY: CII* **21**, 148-155 (1986).
 141. YOUN, J.C., *ET AL.* IMMUNOSENESCENT CD8+ T CELLS AND C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 CHEMOKINES ARE INCREASED IN HUMAN HYPERTENSION. *HYPERTENSION* **62**, 126-133 (2013).
 142. CAILLON, A. & SCHIFFRIN, E.L. ROLE OF INFLAMMATION AND IMMUNITY IN HYPERTENSION: RECENT EPIDEMIOLOGICAL, LABORATORY, AND CLINICAL EVIDENCE. *CURRENT HYPERTENSION REPORTS* **18**, 21 (2016).

143. RIDKER, P.M., RIFAI, N., STAMPFER, M.J. & HENNEKENS, C.H. PLASMA CONCENTRATION OF INTERLEUKIN-6 AND THE RISK OF FUTURE MYOCARDIAL INFARCTION AMONG APPARENTLY HEALTHY MEN. *CIRCULATION* **101**, 1767-1772 (2000).
144. LEE, D.L., *ET AL.* HYPERTENSIVE RESPONSE TO ACUTE STRESS IS ATTENUATED IN INTERLEUKIN-6 KNOCKOUT MICE. *HYPERTENSION* **44**, 259-263 (2004).
145. MANABE, S., OKURA, T., WATANABE, S., FUKUOKA, T. & HIGAKI, J. EFFECTS OF ANGIOTENSIN II RECEPTOR BLOCKADE WITH VALSARTAN ON PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION. *JOURNAL OF CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY* **46**, 735-739 (2005).
146. NGUYEN, H., *ET AL.* INTERLEUKIN-17 CAUSES RHO-KINASE-MEDIATED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND HYPERTENSION. *CARDIOVASCULAR RESEARCH* **97**, 696-704 (2013).
147. TRAGANTE, V., *ET AL.* GENE-CENTRIC META-ANALYSIS IN 87,736 INDIVIDUALS OF EUROPEAN ANCESTRY IDENTIFIES MULTIPLE BLOOD-PRESSURE-RELATED LOCI. *AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS* **94**, 349-360 (2014).
148. NEWTON-CHEH, C., *ET AL.* GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY IDENTIFIES EIGHT LOCI ASSOCIATED WITH BLOOD PRESSURE. *NAT GENET* **41**, 666-676 (2009).
149. EHRET, G.B., O'CONNOR, A.A., WEDER, A., COOPER, R.S. & CHAKRAVARTI, A. FOLLOW-UP OF A MAJOR LINKAGE PEAK ON CHROMOSOME 1 REVEALS SUGGESTIVE QTLs ASSOCIATED WITH ESSENTIAL HYPERTENSION: GENNET STUDY. *EUR J HUM GENET* **17**, 1650-1657 (2009).
150. CHEUNG, B.M., *ET AL.* RELATIONSHIP OF PLASMA INTERLEUKIN-6 AND ITS GENETIC VARIANTS WITH HYPERTENSION IN HONG KONG CHINESE. *AMERICAN JOURNAL OF HYPERTENSION* **24**, 1331-1337 (2011).
151. LI, Y.Y. TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA G308ALPHA GENE POLYMORPHISM AND ESSENTIAL HYPERTENSION: A META-ANALYSIS INVOLVING 2244 PARTICIPANTS. *PLOS ONE* **7**, e35408 (2012).
152. TIMASHEVA, Y.R., NASIBULLIN, T.R., ZAKIROVA, A.N. & MUSTAFINA, O.E. ASSOCIATION OF INTERLEUKIN-6, INTERLEUKIN-12, AND INTERLEUKIN-10 GENE POLYMORPHISMS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION IN TATARS FROM RUSSIA. *BIOCHEM GENET* **46**, 64-74 (2008).
153. CHANG, L., *ET AL.* LOSS OF PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE ON PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-GAMMA DELETION IN SMOOTH MUSCLE CELLS IMPAIRS INTRAVASCULAR THERMOREGULATION AND ENHANCES ATHEROSCLEROSIS. *CIRCULATION* **126**, 1067-1078 (2012).
154. BROWN, N.K., *ET AL.* PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE IN VASCULAR FUNCTION AND DISEASE: A REVIEW OF CURRENT RESEARCH AND ANIMAL MODELS. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **34**, 1621-1630 (2014).
155. GALVEZ-PRieto, B., *ET AL.* COMPARATIVE EXPRESSION ANALYSIS OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM COMPONENTS BETWEEN WHITE AND BROWN PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE. *THE JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY* **197**, 55-64 (2008).
156. HARMS, M. & SEALE, P. BROWN AND BEIGE FAT: DEVELOPMENT, FUNCTION AND THERAPEUTIC POTENTIAL. *NATURE MEDICINE* **19**, 1252-1263 (2013).
157. CEDIKOVA, M., *ET AL.* MITOCHONDRIA IN WHITE, BROWN, AND BEIGE ADIPOCYTES. *STEM CELLS INTERNATIONAL* **2016**, 1-11 (2016).
158. CHATTERJEE, T.K., *ET AL.* PROINFLAMMATORY PHENOTYPE OF PERIVASCULAR ADIPOCYTES: INFLUENCE OF HIGH-FAT FEEDING. *CIRCULATION RESEARCH* **104**, 541-549 (2009).
159. SZASZ, T., BOMFIM, G.F. & WEBB, R.C. THE INFLUENCE OF PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE ON VASCULAR HOMEOSTASIS. *VASCULAR HEALTH AND RISK MANAGEMENT* **9**, 105-116 (2013).
160. SZASZ, T. & WEBB, R.C. PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE: MORE THAN JUST STRUCTURAL SUPPORT. *CLIN SCI (LOND)* **122**, 1-12 (2012).
161. FITZGIBBONS, T.P., *ET AL.* SIMILARITY OF MOUSE PERIVASCULAR AND BROWN ADIPOSE TISSUES AND THEIR RESISTANCE TO DIET-INDUCED INFLAMMATION. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY* **301**, H1425-H1437 (2011).
162. VERLOHREN, S., MULLER, D.N., LUFT, F.C. & DECHEND, R. IMMUNOLOGY IN HYPERTENSION, PREECLAMPSIA, AND TARGET-ORGAN DAMAGE. *HYPERTENSION* **54**, 439-443 (2009).
163. VILLACORTA, L. & CHANG, L. THE ROLE OF PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE IN VASOCONSTRICTION, ARTERIAL STIFFNESS, AND ANEURYSM. *HORM MOL BIOL CLIN INVESTIG* **21**, 137-147 (2015).
164. VICTORIO, J.A., FONTES, M.T., ROSSONI, L.V. & DAVEL, A.P. DIFFERENT ANTI-CONTRACTILE FUNCTION AND NITRIC OXIDE PRODUCTION OF THORACIC AND ABDOMINAL PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUES. *FRONTIERS IN PHYSIOLOGY* **7**, 295 (2016).
165. XIA, N., *ET AL.* UNCOUPLING OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE IN PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE OF DIET-INDUCED OBESE MICE. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **36**, 78-85 (2016).

166. NOSALSKI, R. & GUZIK, T.J. PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE INFLAMMATION IN VASCULAR DISEASE. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY* (2017).
167. MADHUR, M.S., *ET AL.* INTERLEUKIN 17 PROMOTES ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION AND VASCULAR DYSFUNCTION. *HYPERTENSION* **55**, 500-507 (2010).
168. WITHERS, S.B., *ET AL.* MACROPHAGE ACTIVATION IS RESPONSIBLE FOR LOSS OF ANTICONTRACTILE FUNCTION IN INFLAMED PERIVASCULAR FAT. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **31**, 908-913 (2011).
169. CHEN, Y., *ET AL.* ADIPOSE TISSUE DENDRITIC CELLS ENHANCES INFLAMMATION BY PROMPTING THE GENERATION OF TH17 CELLS. *PLOS ONE* **9**, e92450 (2014).
170. GOSSL, M., *ET AL.* PREVENTION OF VASA VASORUM NEOVASCULARIZATION ATTENUATES EARLY NEOINTIMA FORMATION IN EXPERIMENTAL HYPERCHOLESTEROLEMIA. *BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY* **104**, 695-706 (2009).
171. WANG, D., CHABRASHVILI, T., BORREGO, L., ASLAM, S. & UMANS, J.G. ANGIOTENSIN II INFUSION ALTERS VASCULAR FUNCTION IN MOUSE RESISTANCE VESSELS: ROLES OF O AND ENDOTHELIUM. *JOURNAL OF VASCULAR RESEARCH* **43**, 109-119 (2006).
172. KAWAHITO, H., *ET AL.* PERIAORTIC ADIPOSE TISSUE-SPECIFIC ACTIVATION OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM CONTRIBUTES TO ATHEROSCLEROSIS DEVELOPMENT IN UNINEPHRECTOMIZED APOE^{-/-} MICE. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY* **305**, H667-675 (2013).
173. GAO, Y.J., *ET AL.* PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE PROMOTES VASOCONSTRICTION: THE ROLE OF SUPEROXIDE ANION. *CARDIOVASCULAR RESEARCH* **71**, 363-373 (2006).
174. GIL-ORTEGA, M., *ET AL.* IMBALANCE BETWEEN PRO AND ANTI-OXIDANT MECHANISMS IN PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE AGGRAVATES LONG-TERM HIGH-FAT DIET-DERIVED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION. *PLOS ONE* **9**, e95312 (2014).
175. JEPPE, T.A., *ET AL.* DOWNREGULATION OF KV7.4 CHANNEL ACTIVITY IN PRIMARY AND SECONDARY HYPERTENSION. *CIRCULATION* **124**, 602-611 (2011).
176. AYALA-LOPEZ, N., *ET AL.* PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE CONTAINS FUNCTIONAL CATECHOLAMINES. *PHARMACOL RES PERSPECT* **2**, e00041 (2014).
177. ZABORSKA, K.E., WAREING, M. & AUSTIN, C. COMPARISONS BETWEEN PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE AND THE ENDOTHELIUM IN THEIR MODULATION OF VASCULAR TONE. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY* (2016).
178. AGHAMOHAMMADZADEH, R., *ET AL.* EFFECTS OF BARIATRIC SURGERY ON HUMAN SMALL ARTERY FUNCTION: EVIDENCE FOR REDUCTION IN PERIVASCULAR ADIPOCYTE INFLAMMATION, AND THE RESTORATION OF NORMAL ANTICONTRACTILE ACTIVITY DESPITE PERSISTENT OBESITY. *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY* **62**, 128-135 (2013).
179. BRITTON, K.A., *ET AL.* THORACIC PERIAORTIC AND VISCERAL ADIPOSE TISSUE AND THEIR CROSS-SECTIONAL ASSOCIATIONS WITH MEASURES OF VASCULAR FUNCTION. *OBESITY (SILVER SPRING)* **21**, 1496-1503 (2013).
180. POLICE, S.B., THATCHER, S.E., CHARNIGO, R., DAUGHERTY, A. & CASSIS, L.A. OBESITY PROMOTES INFLAMMATION IN PERIAORTIC ADIPOSE TISSUE AND ANGIOTENSIN II-INDUCED ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM FORMATION. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **29**, 1458-1464 (2009).
181. OWENS, A.P., 3RD, *ET AL.* MYD88 DEFICIENCY ATTENUATES ANGIOTENSIN II-INDUCED ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM FORMATION INDEPENDENT OF SIGNALING THROUGH TOLL-LIKE RECEPTORS 2 AND 4. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **31**, 2813-2819 (2011).
182. KUROBE, H., *ET AL.* PROTECTIVE EFFECTS OF SELECTIVE MINERALOCORTICOID RECEPTOR ANTAGONIST AGAINST AORTIC ANEURYSM PROGRESSION IN A NOVEL MURINE MODEL. *J SURG RES* **185**, 455-462 (2013).
183. SINGH, M.V., CHAPLEAU, M.W., HARWANI, S.C. & ABOUD, F.M. THE IMMUNE SYSTEM AND HYPERTENSION. *IMMUNOLOGIC RESEARCH* **59**, 243-253 (2014).
184. TIMMERS, L., *ET AL.* TOLL-LIKE RECEPTOR 4 MEDIATES MALADAPTIVE LEFT VENTRICULAR REMODELING AND IMPAIRS CARDIAC FUNCTION AFTER MYOCARDIAL INFARCTION. *CIRCULATION RESEARCH* **102**, 257-264 (2008).
185. BEHNAMFAR, N., ZIBAEENEZHAD, M.J., GOLMOGHADDAM, H. & DOROUDCHI, M. CD45RO+ MEMORY T-CELLS PRODUCE IL-17 IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS. *CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY (NOISY-LE-GRAND, FRANCE)* **61**, 17-23 (2015).
186. LAMARCA, B., BREWER, J. & WALLACE, K. IL-6-INDUCED PATHOPHYSIOLOGY DURING PRE-ECLAMPSIA: POTENTIAL THERAPEUTIC ROLE FOR MAGNESIUM SULFATE? *INT J INTERFERON CYTOKINE MEDIAT RES* **2011**, 59-64 (2011).

187. LIN, M.I., *ET AL.* PHOSPHORYLATION OF THREONINE 497 IN ENDOTHELIAL NITRIC-OXIDE SYNTHASE COORDINATES THE COUPLING OF L-ARGININE METABOLISM TO EFFICIENT NITRIC OXIDE PRODUCTION. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **278**, 44719-44726 (2003).
188. SATOU, R., *ET AL.* INTERFERON-GAMMA BIPHASICALLY REGULATES ANGIOTENSINOGEN EXPRESSION VIA A JAK-STAT PATHWAY AND SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALING 1 (SOCS1) IN RENAL PROXIMAL TUBULAR CELLS. *FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY* **26**, 1821-1830 (2012).
189. MARKO, L., *ET AL.* INTERFERON-GAMMA SIGNALING INHIBITION AMELIORATES ANGIOTENSIN II-INDUCED CARDIAC DAMAGE. *HYPERTENSION* **60**, 1430-1436 (2012).
190. MIKOLAJCZYK, T.P., *ET AL.* ROLE OF CHEMOKINE RANTES IN THE REGULATION OF PERIVASCULAR INFLAMMATION, T-CELL ACCUMULATION, AND VASCULAR DYSFUNCTION IN HYPERTENSION. *FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY* **30**, 1987-1999 (2016).
191. MENDIZABAL, Y., LLORENS, S. & NAVA, E. HYPERTENSION IN METABOLIC SYNDROME: VASCULAR PATHOPHYSIOLOGY. *INTERNATIONAL JOURNAL OF HYPERTENSION* **2013**, 230868 (2013).
192. ZHANG, F., *ET AL.* INHIBITION OF TNF-ALPHA INDUCED ICAM-1, VCAM-1 AND E-SELECTIN EXPRESSION BY SELENIUM. *ATHEROSCLEROSIS* **161**, 381-386 (2002).
193. HOT, A., LENIEF, V. & MIOSSEC, P. COMBINATION OF IL-17 AND TNFALPHA INDUCES A PRO-INFLAMMATORY, PRO-COAGULANT AND PRO-THROMBOTIC PHENOTYPE IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS. *ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES* **71**, 768-776 (2012).
194. NEUMANN, P., GERTZBERG, N. & JOHNSON, A. TNF-ALPHA INDUCES A DECREASE IN eNOS PROMOTER ACTIVITY. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY* **286**, L452-459 (2004).
195. SRIRAMULA, S., HAQUE, M., MAJID, D.S. & FRANCIS, J. INVOLVEMENT OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN ANGIOTENSIN II-MEDIATED EFFECTS ON SALT APPETITE, HYPERTENSION, AND CARDIAC HYPERTROPHY. *HYPERTENSION* **51**, 1345-1351 (2008).
196. LEE, D.L., *ET AL.* ANGIOTENSIN II HYPERTENSION IS ATTENUATED IN INTERLEUKIN-6 KNOCKOUT MICE. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY* **290**, H935-940 (2006).
197. BRANDS, M.W., *ET AL.* INTERLEUKIN 6 KNOCKOUT PREVENTS ANGIOTENSIN II HYPERTENSION: ROLE OF RENAL VASOCONSTRICTION AND JANUS KINASE 2/SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 3 ACTIVATION. *HYPERTENSION* **56**, 879-884 (2010).
198. LUTHER, J.M., *ET AL.* ANGIOTENSIN II INDUCES INTERLEUKIN-6 IN HUMANS THROUGH A MINERALOCORTICOID RECEPTOR-DEPENDENT MECHANISM. *HYPERTENSION* **48**, 1050-1057 (2006).
199. RUIZ-ORTEGA, M., *ET AL.* RENAL AND VASCULAR HYPERTENSION-INDUCED INFLAMMATION: ROLE OF ANGIOTENSIN II. *CURRENT OPINION IN NEPHROLOGY AND HYPERTENSION* **15**, 159-166 (2006).
200. COHEN, T., NAHARI, D., CEREM, L.W., NEUFELD, G. & LEVI, B.Z. INTERLEUKIN 6 INDUCES THE EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **271**, 736-741 (1996).
201. WASSMANN, S., *ET AL.* INTERLEUKIN-6 INDUCES OXIDATIVE STRESS AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION BY OVEREXPRESSION OF THE ANGIOTENSIN II TYPE 1 RECEPTOR. *CIRCULATION RESEARCH* **94**, 534-541 (2004).
202. ZHANG, W., *ET AL.* INTERLEUKIN 6 UNDERLIES ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION AND CHRONIC RENAL DAMAGE. *HYPERTENSION* **59**, 136-144 (2012).
203. DIDION, S.P., KINZENBAW, D.A., SCHRADER, L.I., CHU, Y. & FARACI, F.M. ENDOGENOUS INTERLEUKIN-10 INHIBITS ANGIOTENSIN II-INDUCED VASCULAR DYSFUNCTION. *HYPERTENSION* **54**, 619-624 (2009).
204. CHATTERJEE, P., *ET AL.* INTERLEUKIN 10 DEFICIENCY EXACERBATES TOLL-LIKE RECEPTOR 3-INDUCED PREECLAMPSIA-LIKE SYMPTOMS IN MICE. *HYPERTENSION* **58**, 489-496 (2011).
205. KASSAN, M., GALAN, M., PARTYKA, M., TREBAK, M. & MATROUGUI, K. INTERLEUKIN-10 RELEASED BY CD4(+)CD25(+) NATURAL REGULATORY T CELLS IMPROVES MICROVASCULAR ENDOTHELIAL FUNCTION THROUGH INHIBITION OF NADPH OXIDASE ACTIVITY IN HYPERTENSIVE MICE. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **31**, 2534-2542 (2011).
206. YANG, Q., *ET AL.* IL-33 SYNERGIZES WITH TCR AND IL-12 SIGNALING TO PROMOTE THE EFFECTOR FUNCTION OF CD8+ T CELLS. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **41**, 3351-3360 (2011).
207. MILOVANOVIC, M., *ET AL.* IL-33/ST2 AXIS IN INFLAMMATION AND IMMUNOPATHOLOGY. *IMMUNOLOGIC RESEARCH* **52**, 89-99 (2012).
208. CZYZEWSKA-BUCZYNSKA, A., ZUK, N., ROMANOWSKA-MICHERDA, K. & WITKIEWICZ, W. [BIOLOGICAL ROLE OF INTERLEUKIN 33 AND ITS IMPORTANCE IN PATHOPHYSIOLOGY OF

- CARDIOVASCULAR SYSTEM]. *POSTĘPY HIGIENY I MEDYCYNY DOSWIADCZALNEJ (ONLINE)* **68**, 834-841 (2014).
209. MILLER, A.M., *ET AL.* IL-33 REDUCES THE DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **205**, 339-346 (2008).
 210. DEMYANETS, S., *ET AL.* INTERLEUKIN-33 INDUCES EXPRESSION OF ADHESION MOLECULES AND INFLAMMATORY ACTIVATION IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS AND IN HUMAN ATHEROSCLEROTIC PLAQUES. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **31**, 2080-2089 (2011).
 211. MARTINEZ-MARTINEZ, E., *ET AL.* A ROLE FOR SOLUBLE ST2 IN VASCULAR REMODELING ASSOCIATED WITH OBESITY IN RATS. *PLOS ONE* **8**, e79176 (2013).
 212. WOOD, I.S., WANG, B. & TRAYHURN, P. IL-33, A RECENTLY IDENTIFIED INTERLEUKIN-1 GENE FAMILY MEMBER, IS EXPRESSED IN HUMAN ADIPOCYTES. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **384**, 105-109 (2009).
 213. MILLER, A.M., *ET AL.* INTERLEUKIN-33 INDUCES PROTECTIVE EFFECTS IN ADIPOSE TISSUE INFLAMMATION DURING OBESITY IN MICE. *CIRCULATION RESEARCH* **107**, 650-658 (2010).
 214. MORO, K., *ET AL.* INNATE PRODUCTION OF T(H)2 CYTOKINES BY ADIPOSE TISSUE-ASSOCIATED C-KIT(+)SCA-1(+) LYMPHOID CELLS. *NATURE* **463**, 540-544 (2010).
 215. VAN DER VORST, E.P., DORING, Y. & WEBER, C. CHEMOKINES. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **35**, e52-56 (2015).
 216. HENRICHOT, E., *ET AL.* PRODUCTION OF CHEMOKINES BY PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE: A ROLE IN THE PATHOGENESIS OF ATHEROSCLEROSIS? *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **25**, 2594-2599 (2005).
 217. MARTYNOWICZ, H., JANUS, A., NOWACKI, D. & MAZUR, G. THE ROLE OF CHEMOKINES IN HYPERTENSION. *ADVANCES IN CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE : OFFICIAL ORGAN WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY* **23**, 319-325 (2014).
 218. SURMI, B.K. & HASTY, A.H. THE ROLE OF CHEMOKINES IN RECRUITMENT OF IMMUNE CELLS TO THE ARTERY WALL AND ADIPOSE TISSUE. *VASCULAR PHARMACOLOGY* **52**, 27-36 (2010).
 219. KRENSKY, A.M. & AHN, Y.T. MECHANISMS OF DISEASE: REGULATION OF RANTES (CCL5) IN RENAL DISEASE. *NAT CLIN PRACT NEPHROL* **3**, 164-170 (2007).
 220. DE JAGER, S.C., *ET AL.* CHEMOKINES CCL3/MIP1ALPHA, CCL5/RANTES AND CCL18/PARC ARE INDEPENDENT RISK PREDICTORS OF SHORT-TERM MORTALITY IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROMES. *PLOS ONE* **7**, e45804 (2012).
 221. KOH, S.J., *ET AL.* ASSOCIATION OF SERUM RANTES CONCENTRATIONS WITH ESTABLISHED CARDIOVASCULAR RISK MARKERS IN MIDDLE-AGED SUBJECTS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY* **132**, 102-108 (2009).
 222. CRAWFORD, A., ANGELOSANTO, J.M., NADWODNY, K.L., BLACKBURN, S.D. & WHERRY, E.J. A ROLE FOR THE CHEMOKINE RANTES IN REGULATING CD8 T CELL RESPONSES DURING CHRONIC VIRAL INFECTION. *PLOS PATHOG* **7**, e1002098 (2011).
 223. MARQUES, R.E., GUABIRABA, R., RUSSO, R.C. & TEIXEIRA, M.M. TARGETING CCL5 IN INFLAMMATION. *EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS* **17**, 1439-1460 (2013).
 224. BRAUNERSREUTHER, V., *ET AL.* CCR5 BUT NOT CCR1 DEFICIENCY REDUCES DEVELOPMENT OF DIET-INDUCED ATHEROSCLEROSIS IN MICE. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **27**, 373-379 (2007).
 225. ZERNECKE, A., *ET AL.* DEFICIENCY IN CCR5 BUT NOT CCR1 PROTECTS AGAINST NEOINTIMA FORMATION IN ATHEROSCLEROSIS-PRONE MICE: INVOLVEMENT OF IL-10. *BLOOD* **107**, 4240-4243 (2006).
 226. BRAUNERSREUTHER, V., *ET AL.* A NOVEL RANTES ANTAGONIST PREVENTS PROGRESSION OF ESTABLISHED ATHEROSCLEROTIC LESIONS IN MICE. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **28**, 1090-1096 (2008).
 227. CZAJA, A.J. REVIEW ARTICLE: CHEMOKINES AS ORCHESTRATORS OF AUTOIMMUNE HEPATITIS AND POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS. *ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS* **40**, 261-279 (2014).
 228. ANTONELLI, A., *ET AL.* HIGH SERUM LEVELS OF CXC CHEMOKINE LIGAND 10 IN UNTREATED ESSENTIAL HYPERTENSION. *JOURNAL OF HUMAN HYPERTENSION* **22**, 579-581 (2008).
 229. STUMPF, C., *ET AL.* SERUM LEVELS OF THE TH1 CHEMOATTRACTANT INTERFERON-GAMMA-INDUCIBLE PROTEIN (IP) 10 ARE ELEVATED IN PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION. *HYPERTENS RES* **34**, 484-488 (2011).
 230. SAFA, A., *ET AL.* HIGHER CIRCULATING LEVELS OF CHEMOKINES CXCL10, CCL20 AND CCL22 IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE. *CYTOKINE* **83**, 147-157 (2016).
 231. MACH, F., *ET AL.* DIFFERENTIAL EXPRESSION OF THREE T LYMPHOCYTE-ACTIVATING CXC CHEMOKINES BY HUMAN ATHEROMA-ASSOCIATED CELLS. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **104**, 1041-1050 (1999).

232. BONDAR, C., *ET AL.* ROLE OF CXCR3/CXCL10 AXIS IN IMMUNE CELL RECRUITMENT INTO THE SMALL INTESTINE IN CELIAC DISEASE. *PLOS ONE* **9**, e89068 (2014).
233. VAN DEN BORNE, P., QUAX, P.H.A., HOEFER, I.E. & PASTERKAMP, G. THE MULTIFACETED FUNCTIONS OF CXCL10 IN CARDIOVASCULAR DISEASE. *BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL* **2014**, 1-11 (2014).
234. VAN WANROOIJ, E.J., *ET AL.* CXCR3 ANTAGONIST NBI-74330 ATTENUATES ATHEROSCLEROTIC PLAQUE FORMATION IN LDL RECEPTOR-DEFICIENT MICE. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **28**, 251-257 (2008).
235. VEILLARD, N.R., *ET AL.* DIFFERENTIAL INFLUENCE OF CHEMOKINE RECEPTORS CCR2 AND CXCR3 IN DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS IN VIVO. *CIRCULATION* **112**, 870-878 (2005).
236. DOBRIAN, A.D., *ET AL.* STAT4 CONTRIBUTES TO ADIPOSE TISSUE INFLAMMATION AND ATHEROSCLEROSIS. *THE JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY* **227**, 13-24 (2015).
237. TANG, P.C., *ET AL.* TRANSMURAL INFLAMMATION BY INTERFERON-GAMMA-PRODUCING T CELLS CORRELATES WITH OUTWARD VASCULAR REMODELING AND INTIMAL EXPANSION OF ASCENDING THORACIC AORTIC ANEURYSMS. *FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY* **19**, 1528-1530 (2005).
238. GALLO, A., *ET AL.* CIRCULATING INTERFERON- γ -INDUCIBLE CYS-X-CYS CHEMOKINE RECEPTOR 3 LIGANDS ARE ELEVATED IN HUMANS WITH AORTIC ANEURYSMS AND CYS-X-CYS CHEMOKINE RECEPTOR 3 IS NECESSARY FOR ANEURYSM FORMATION IN MICE. *THE JOURNAL OF THORACIC AND CARDIOVASCULAR SURGERY* **143**, 704-710 (2012).
239. MACTAGGART, J.N., XIONG, W., KNISPEN, R. & BAXTER, B.T. DELETION OF CCR2 BUT NOT CCR5 OR CXCR3 INHIBITS AORTIC ANEURYSM FORMATION. *SURGERY* **142**, 284-288 (2007).
240. DEIULIIS, J.A., *ET AL.* CXCR3 MODULATES OBESITY-INDUCED VISCERAL ADIPOSE INFLAMMATION AND SYSTEMIC INSULIN RESISTANCE. *OBESITY (SILVER SPRING)* **22**, 1264-1274 (2014).
241. CHARO, I.F. & TAUBMAN, M.B. CHEMOKINES IN THE PATHOGENESIS OF VASCULAR DISEASE. *CIRCULATION RESEARCH* **95**, 858-866 (2004).
242. DE LA SIERRA, A. & LARROUSSE, M. ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IS ASSOCIATED WITH INCREASED LEVELS OF BIOMARKERS IN ESSENTIAL HYPERTENSION. *JOURNAL OF HUMAN HYPERTENSION* **24**, 373-379 (2010).
243. DESHMANE, S.L., KREMLEV, S., AMINI, S. & SAWAYA, B.E. MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 (MCP-1): AN OVERVIEW. *J INTERFERON CYTOKINE RES* **29**, 313-326 (2009).
244. YAO, H.L., *ET AL.* MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 MEDIATES ANGIOTENSIN II-INDUCED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL PROLIFERATION VIA SAPK/JNK AND ERK1/2. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY* **366**, 355-362 (2012).
245. KOYANAGI, M., *ET AL.* ROLE OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 IN CARDIOVASCULAR REMODELING INDUCED BY CHRONIC BLOCKADE OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS. *CIRCULATION* **102**, 2243-2248 (2000).
246. CHAN, C.T., *ET AL.* REVERSAL OF VASCULAR MACROPHAGE ACCUMULATION AND HYPERTENSION BY A CCR2 ANTAGONIST IN DEOXYCORTICOSTERONE/SALT-TREATED MICE. *HYPERTENSION* **60**, 1207-1212 (2012).
247. PASCERI, V., CHENG, J.S., WILLERSON, J.T. & YEH, E.T. MODULATION OF C-REACTIVE PROTEIN-MEDIATED MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 INDUCTION IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS BY ANTI-ATHEROSCLEROSIS DRUGS. *CIRCULATION* **103**, 2531-2534 (2001).
248. MANKA, D., *ET AL.* TRANSPLANTED PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE ACCELERATES INJURY-INDUCED NEOINTIMAL HYPERPLASIA: ROLE OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **34**, 1723-1730 (2014).
249. NEVES, K.B., *ET AL.* CHEMERIN REGULATES CROSSTALK BETWEEN ADIPOCYTES AND VASCULAR CELLS THROUGH NOXNOVELTY AND SIGNIFICANCE. *HYPERTENSION* **66**, 657-666 (2015).
250. ZHU, W., CHENG, KENNETH K.Y., VANHOUTTE, PAUL M., LAM, KAREN S.L. & XU, A. VASCULAR EFFECTS OF ADIPONECTIN: MOLECULAR MECHANISMS AND POTENTIAL THERAPEUTIC INTERVENTION. *CLINICAL SCIENCE* **114**, 361-374 (2008).
251. KIM, D.H., KIM, C., DING, E.L., TOWNSEND, M.K. & LIPSITZ, L.A. ADIPONECTIN LEVELS AND THE RISK OF HYPERTENSION: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *HYPERTENSION* **62**, 27-32 (2013).
252. HOPKINS, T.A., OUCHI, N., SHIBATA, R. & WALSH, K. ADIPONECTIN ACTIONS IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM. *CARDIOVASCULAR RESEARCH* **74**, 11-18 (2007).
253. FESUS, G., *ET AL.* ADIPONECTIN IS A NOVEL HUMORAL VASODILATOR. *CARDIOVASCULAR RESEARCH* **75**, 719-727 (2007).

254. NOUR-ELDINE, W., *ET AL.* ADIPONECTIN ATTENUATES ANGIOTENSIN II-INDUCED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL REMODELING THROUGH NITRIC OXIDE AND THE RHOA/ROCK PATHWAY. *FRONTIERS IN PHARMACOLOGY* **7**(2016).
255. KIRIS, I., *ET AL.* INVERSE RELATIONSHIP BETWEEN ADIPONECTIN LEVELS AND SUBCLINICAL CAROTID ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS UNDERGOING CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING. *INTERNATIONAL HEART JOURNAL* **47**, 855-866 (2006).
256. MAJESKY, M.W. ADVENTITIA AND PERIVASCULAR CELLS. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **35**, E31-35 (2015).
257. KAWANAMI, D., *ET AL.* DIRECT RECIPROCAL EFFECTS OF RESISTIN AND ADIPONECTIN ON VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS: A NEW INSIGHT INTO ADIPOCYTOKINE-ENDOTHELIAL CELL INTERACTIONS. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **314**, 415-419 (2004).
258. VERMA, S., *ET AL.* RESISTIN PROMOTES ENDOTHELIAL CELL ACTIVATION: FURTHER EVIDENCE OF ADIPOKINE-ENDOTHELIAL INTERACTION. *CIRCULATION* **108**, 736-740 (2003).
259. CALABRO, P., SAMUDIO, I., WILLERSON, J.T. & YEH, E.T. RESISTIN PROMOTES SMOOTH MUSCLE CELL PROLIFERATION THROUGH ACTIVATION OF EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 1/2 AND PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE PATHWAYS. *CIRCULATION* **110**, 3335-3340 (2004).
260. KASER, S., *ET AL.* RESISTIN MESSENGER-RNA EXPRESSION IS INCREASED BY PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN VITRO. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **309**, 286-290 (2003).
261. WITTAMER, V., *ET AL.* SPECIFIC RECRUITMENT OF ANTIGEN-PRESENTING CELLS BY CHEMERIN, A NOVEL PROCESSED LIGAND FROM HUMAN INFLAMMATORY FLUIDS. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **198**, 977-985 (2003).
262. ZHAO, R.-J. & WANG, H. CHEMERIN/CHEMR23 SIGNALING AXIS IS INVOLVED IN THE ENDOTHELIAL PROTECTION BY KATP CHANNEL OPENER IPTAKALIM. *ACTA PHARMACOLOGICA SINICA* **32**, 573-580 (2011).
263. KUNIMOTO, H., *ET AL.* CHEMERIN PROMOTES THE PROLIFERATION AND MIGRATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE AND INCREASES MOUSE BLOOD PRESSURE. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY* **309**, H1017-H1028 (2015).
264. WATTS, S.W., *ET AL.* CHEMERIN CONNECTS FAT TO ARTERIAL CONTRACTION. *ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY* **33**, 1320-1328 (2013).
265. LOBATO, N.S., *ET AL.* THE ADIPOKINE CHEMERIN AUGMENTS VASCULAR REACTIVITY TO CONTRACTILE STIMULI VIA ACTIVATION OF THE MEK-ERK1/2 PATHWAY. *LIFE SCIENCES* **91**, 600-606 (2012).
266. NEVES, K.B., *ET AL.* CHEMERIN REDUCES VASCULAR NITRIC OXIDE/CGMP SIGNALLING IN RAT AORTA: A LINK TO VASCULAR DYSFUNCTION IN OBESITY? *CLIN SCI (LOND)* **127**, 111-122 (2014).
267. LAU, D.C., DHILLON, B., YAN, H., SZMITKO, P.E. & VERMA, S. ADIPOKINES: MOLECULAR LINKS BETWEEN OBESITY AND ATHEROSCLEROSIS. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY* **288**, H2031-2041 (2005).
268. DEVARAJ, S., SIEGEL, D. & JIALAL, I. STATIN THERAPY IN METABOLIC SYNDROME AND HYPERTENSION POST-JUPITER: WHAT IS THE VALUE OF CRP? *CURR ATHEROSCLER REP* **13**, 31-42 (2011).
269. VONGPATANASIN, W., *ET AL.* C-REACTIVE PROTEIN CAUSES DOWNREGULATION OF VASCULAR ANGIOTENSIN SUBTYPE 2 RECEPTORS AND SYSTOLIC HYPERTENSION IN MICE. *CIRCULATION* **115**, 1020-1028 (2007).
270. FICHTLSCHERER, S., *ET AL.* ELEVATED C-REACTIVE PROTEIN LEVELS AND IMPAIRED ENDOTHELIAL VASOREACTIVITY IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE. *CIRCULATION* **102**, 1000-1006 (2000).
271. QAMIRANI, E., REN, Y., KUO, L. & HEIN, T.W. C-REACTIVE PROTEIN INHIBITS ENDOTHELIUM-DEPENDENT NO-MEDIATED DILATION IN CORONARY ARTERIOLES BY ACTIVATING P38 KINASE AND NAD(P)H OXIDASE. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **25**, 995-1001 (2005).
272. VENUGOPAL, S.K., DEVARAJ, S., YUHANNA, I., SHAUL, P. & JIALAL, I. DEMONSTRATION THAT C-REACTIVE PROTEIN DECREASES eNOS EXPRESSION AND BIOACTIVITY IN HUMAN AORTIC ENDOTHELIAL CELLS. *CIRCULATION* **106**, 1439-1441 (2002).
273. SINGH, U., DEVARAJ, S., VASQUEZ-VIVAR, J. & JIALAL, I. C-REACTIVE PROTEIN DECREASES ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY VIA UNCOUPLING. *JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY* **43**, 780-791 (2007).
274. DOGGRELL, S.A. & BROWN, L. RAT MODELS OF HYPERTENSION, CARDIAC HYPERTROPHY AND FAILURE. *CARDIOVASCULAR RESEARCH* **39**, 89-105 (1998).

275. BERNATOVA, I., *ET AL.* ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS: FOCUS ON METHODOLOGICAL ASPECTS. *JOURNAL OF HYPERTENSION. SUPPLEMENT : OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF HYPERTENSION* **27**, S27-31 (2009).
276. OKAMOTO, K. & AOKI, K. DEVELOPMENT OF A STRAIN OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS. *JAPANESE CIRCULATION JOURNAL* **27**, 282-293 (1963).
277. MATUSIK, P., GUZIK, B., WEBER, C. & GUZIK, T.J. DO WE KNOW ENOUGH ABOUT THE IMMUNE PATHOGENESIS OF ACUTE CORONARY SYNDROMES TO IMPROVE CLINICAL PRACTICE? *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS* **108**, 443-456 (2012).
278. SKIBA, D.S., *ET AL.* ANTIATHEROSCLEROTIC EFFECT OF ANG- (1-7) NON-PEPTIDE MIMETIC (AVE 0991) IS MEDIATED BY INHIBITION OF PERIVASCULAR AND PLAQUE INFLAMMATION IN EARLY ATHEROSCLEROSIS. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY* (2016).
279. SHERIDAN, B.S. & LEFRANCOIS, L. REGIONAL AND MUCOSAL MEMORY T CELLS. *NATURE IMMUNOLOGY* **12**, 485-491 (2011).
280. TURNER, D.L., GORDON, C.L. & FARBER, D.L. TISSUE-RESIDENT T CELLS, IN SITU IMMUNITY AND TRANSPLANTATION. *IMMUNOLOGICAL REVIEWS* **258**, 150-166 (2014).
281. RADULOVIC, K., *ET AL.* THE EARLY ACTIVATION MARKER CD69 REGULATES THE EXPRESSION OF CHEMOKINES AND CD4 T CELL ACCUMULATION IN INTESTINE. *PLoS ONE* **8**, e65413 (2013).
282. MALEK, T.R. THE BIOLOGY OF INTERLEUKIN-2. *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY* **26**, 453-479 (2008).
283. SCHENKEL, J.M. & MASOPUST, D. TISSUE-RESIDENT MEMORY T CELLS. *IMMUNITY* **41**, 886-897 (2014).
284. HARRISON, D.G., MARVAR, P.J. & TITZE, J.M. VASCULAR INFLAMMATORY CELLS IN HYPERTENSION. *FRONTIERS IN PHYSIOLOGY* **3**, 128 (2012).
285. PODOLEC, J., *ET AL.* CHEMOKINE RANTES IS INCREASED AT EARLY STAGES OF CORONARY ARTERY DISEASE. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE POLISH PHYSIOLOGICAL SOCIETY* **67**, 321-328 (2016).
286. RUDEMILLER, N.P., *ET AL.* C-C MOTIF CHEMOKINE 5 ATTENUATES ANGIOTENSIN II-DEPENDENT KIDNEY INJURY BY LIMITING RENAL MACROPHAGE INFILTRATION. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* **186**, 2846-2856 (2016).
287. GOURAUD, S.S., *ET AL.* DOWN-REGULATION OF CHEMOKINE CCL5 GENE EXPRESSION IN THE NTS OF SHR MAY BE PRO-HYPERTENSIVE. *JOURNAL OF HYPERTENSION* **29**, 732-740 (2011).
288. KIM, H.Y., CHA, H.J. & KIM, H.S. CCL5 UPREGULATES IL-10 EXPRESSION AND PARTIALLY MEDIATES THE ANTIHYPERTENSIVE EFFECTS OF IL-10 IN THE VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS. *HYPERTENS RES* **38**, 666-674 (2015).
289. ZHANG, Y., ZHANG, Y., GU, W. & SUN, B. TH1/TH2 CELL DIFFERENTIATION AND MOLECULAR SIGNALS. *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY* **841**, 15-44 (2014).
290. SYRBE, U., SIVEKE, J. & HAMANN, A. TH1/TH2 SUBSETS: DISTINCT DIFFERENCES IN HOMING AND CHEMOKINE RECEPTOR EXPRESSION? *SPRINGER SEMINARS IN IMMUNOPATHOLOGY* **21**, 263-285 (1999).
291. YURCHENKO, E., *ET AL.* CCR5-DEPENDENT HOMING OF NATURALLY OCCURRING CD4+ REGULATORY T CELLS TO SITES OF LEISHMANIA MAJOR INFECTION FAVORS PATHOGEN PERSISTENCE. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **203**, 2451-2460 (2006).
292. KARBACH, S., *ET AL.* INTERLEUKIN 17 DRIVES VASCULAR INFLAMMATION, ENDOTHELIAL DYSFUNCTION, AND ARTERIAL HYPERTENSION IN PSORIASIS-LIKE SKIN DISEASE. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **34**, 2658-2668 (2014).
293. HIRATA, T., *ET AL.* RECRUITMENT OF CCR6-EXPRESSING TH17 CELLS BY CCL 20 SECRETED FROM IL-1 BETA-, TNF-ALPHA-, AND IL-17A-STIMULATED ENDOMETRIOTIC STROMAL CELLS. *ENDOCRINOLOGY* **151**, 5468-5476 (2010).
294. HIROTA, K., *ET AL.* PREFERENTIAL RECRUITMENT OF CCR6-EXPRESSING TH17 CELLS TO INFLAMED JOINTS VIA CCL20 IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND ITS ANIMAL MODEL. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **204**, 2803-2812 (2007).
295. YAMAZAKI, T., *ET AL.* CCR6 REGULATES THE MIGRATION OF INFLAMMATORY AND REGULATORY T CELLS. *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **181**, 8391-8401 (2008).
296. DUFFAUT, C., *ET AL.* INTERPLAY BETWEEN HUMAN ADIPOCYTES AND T LYMPHOCYTES IN OBESITY: CCL20 AS AN ADIPOCHEMOKINE AND T LYMPHOCYTES AS LIPOGENIC MODULATORS. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* **29**, 1608-1614 (2009).
297. SCHUTYSER, E., *ET AL.* REGULATED PRODUCTION AND MOLECULAR DIVERSITY OF HUMAN LIVER AND ACTIVATION-REGULATED CHEMOKINE/MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN-3 ALPHA FROM NORMAL AND TRANSFORMED CELLS. *J IMMUNOL* **165**, 4470-4477 (2000).

298. TURNER, J.-E., *ET AL.* CCR6 RECRUITS REGULATORY T CELLS AND TH17 CELLS TO THE KIDNEY IN GLOMERULONEPHRITIS. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY : JASN* **21**, 974-985 (2010).