

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Karola Urbańskiego

Promotor: prof. dr hab. Tomasz Guzik

Temat pracy doktorskiej: „*Stan zapalny okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w regulacji funkcji śródbłonna naczyniowego w ludzkich naczyniach krwionośnych*” – monografia

Wprowadzenie. Choroby układu sercowo-naczyniowego są główną przyczyną umieralności w krajach rozwiniętych. Miażdżycy jest spowodowana przewlekłym procesem zapalnym rozwijającym się w tętnicach, który jest częściowo uzależniony od obecności czynników ryzyka jak hipercholesterolemia, cukrzyca czy nadciśnienie. Prowadzą one do dysfunkcji śródbłonna, powstania stresu oksydacyjnego, a następnie do migracji komórek zapalnych do ściany naczynia. Liczne modele zwierzęce, jak również obserwacje ludzi wskazują na istotną rolę uogólnionego stanu zapalnego *per se* w zwiększaniu ryzyka sercowo-naczyniowego. Jest on odpowiedzialny za część ryzyka rezydualnego, pozostającego po eliminacji innych znanych do tej pory klasycznych czynników ryzyka miażdżycy. Obserwacje te ukierunkowują nasze działania na bliższe poznanie jego źródeł i mechanizmów zachodzących w ścianie naczyń pod jego wpływem.

Większość naczyń krwionośnych organizmu jest otoczona przez tkankę tłuszczową okołonaczyniową (PVAT-*perivascular adipose tissue*). Tkanka tłuszczowa jest organem aktywnym metabolicznie i produkuje wiele substancji, z których część wykazuje istotny wpływ na funkcję naczyń. Jednak procesy w niej zachodzące są tylko częściowo poznane i to głównie w odniesieniu do trzewnej tkanki tłuszczowej. Okazuje się, że tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa w stanach patologicznych jak miażdżycy czy nadciśnienie wykazuje cechy toczącego się stanu zapalnego. Co ciekawe w warunkach fizjologicznych tkanka ta działa ochronnie na funkcje naczyń.

Wyniki dotychczasowych badań pokazują, że naciek zapalny do PVAT jest większy wokół naczyń o większym nasileniu procesu miażdżycowego oraz jest związany z upośledzeniem funkcji śródbłonna naczyniowego. Nie znamy jednak kierunku opisywanej zależności ani mechanizmów, które za nią stoją.

Celem niniejszej pracy było poznanie wzajemnych powiązań pomiędzy stanem zapalnym, tkanką tłuszczową i funkcją naczyń krwionośnych w populacji osób z zaawansowaną chorobą niedokrwienną serca. Cel ten został zrealizowany poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

1. Porównanie profilu ekspresji wybranych genów charakteryzujących fenotyp tkanki tłuszczowej w zależności od lokalizacji, nasilenia miażdżycy oraz nacieku komórek

zapalnych.

2. Szczegółowa charakterystyka limfocytów T obecnych w kompartmentach tkanki tłuszczowej z uwzględnieniem komórek rezydujących (T_{RM}), powracających do krążenia oraz produkowanych przez nie cytokin.
3. Określenie nacieku limfocytów T regulatorowych w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej oraz ich związku z funkcją śródbłonka naczyniowego.
4. Zbadanie wpływu okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej oraz cytokin prozapalnych na funkcję śródbłonka naczyniowego w kontekście infiltracji tej tkanki przez komórki zapalne.

Metody. Badaniem objętych zostało 131 pacjentów poddawanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego z powodu choroby niedokrwiennej serca z użyciem przeszła z tętnicy piersiowej wewnętrznej (IMA). Pobierane były fragmenty tkanki tłuszczowej otaczającej tętnicę wieńcową ze zwężeniem krytycznym, tkanki tłuszczowej podskórnej oraz fragment tętnicy IMA wraz z tkanką tłuszczową okołonaczyniową. Tkanka tłuszczowa była wykorzystywana do inkubacji z fragmentem IMA jak również trawiona enzymatycznie w celu wyizolowania komórek frakcji stromalnej. Komórki te oraz komórki PBMC wyizolowane z krwi obwodowej analizowane były za pomocą cytometrii przepływowej. Z tkanki tłuszczowej izolowano kwasy mRNA i oznaczano ekspresję genów metodą RT-PCR. Fragmenty tętnicy IMA inkubowano z tkanką tłuszczową, z cytokinami $IFN\gamma$ oraz $TNF\alpha$ a następnie badano funkcję rozkurczową naczyń zależną oraz niezależną od śródbłonka w odpowiedzi na acetylocholinę oraz nitroprusydek sodu. Do analizy uzyskanych wyników wykorzystywano analizę wariancji (jedno- dwu- oraz trójczynnika), testy t-studenta, test Chi², wyznaczano współczynniki korelacji Pearsona, przeprowadzano analizę regresji, weryfikowano założenia odpowiednich testów m.in. przeprowadzając analizę reszt, stosowano poprawki dla wielokrotnych testowań.

Wyniki. Badane kompartmenty tkanki tłuszczowej wykazują różnice w ekspresji badanych genów. PVAT otaczająca tętnicę wieńcową dotkniętą nasiloną miażdżycą wykazuje zwiększoną ekspresję genów związanych z procesami zapalnymi. PVAT otaczająca tętnicę piersiową wewnętrzną niedotkniętą miażdżycą wykazuje zwiększoną ekspresję genów związanych z brunatnym fenotypem tkanki tłuszczowej. Tkanka tłuszczowa podskórna wykazuje zwiększoną ekspresję genów związanych z różnicowaniem tkanki tłuszczowej w porównaniu do pozostałych kompartmentów tkanki tłuszczowej. Nacieku komórek zapalnych w PVAT wokół tętnicy piersiowej wewnętrznej jest związany ze zwiększoną ekspresją genów

dla visfatyny, p22phox, IL-10 i CTLA-4 w tej tkance. Naciek w PVAT wokół tętnic nasierdziowych i w tłuszczu podskórnym nie jest związany ze zmianami ekspresji badanych genów.

Średnio 45-62% limfocytów T (w zależności od rodzaju tkanki) obecnych w tkance tłuszczowej stanowiły komórki T_{RM} . PVAT otaczający IMA charakteryzował się mniejszym odsetkiem komórek T_{RM} w porównaniu z PVAT CORO [44,7%(±6,8) vs. 62,4%(±3,9); $p<0,05$]. Podczas gdy w tkance tłuszczowej podskórnej było to 60,7%(±6,3), $p=ns$. Jest to spowodowane w głównej mierze przez prawie dwukrotnie większy odsetek komórek $CD8^+/CD69^+$ wśród limfocytów $CD3^+$ w PVAT CORO w stosunku do PVAT IMA [23,0%(±3,8) vs 12,9% (±3,4); $p=0,01$]. Wśród limfocytów $CD8^+$ komórki T_{RM} stanowiły w PVAT IMA, PVAT CORO oraz w SC AT odpowiednio 36,8% (±6,0) vs 62,8% (±4,3); $p<0,01$ oraz vs 62,1% (±7,1); $p<0,01$. Nie zaobserwowano różnic w odniesieniu do limfocytów $CD4^+$. Zdecydowana większość komórek T_{RM} obecnych w tkance tłuszczowej nie wykazywała ekspresji antygeny CD103 (86-96%). Wśród limfocytów T $CD3^+$ we wszystkich kompartmentach tkanki tłuszczowej w odniesieniu do obecności antygeny CD69 największą grupę stanowiły komórki o fenotypie $CD4^+/CD69^+/CD103^-$.

Limfocyty T obecne w tkance tłuszczowej charakteryzowały się wysoką zdolnością do produkcji cytokin zapalnych $IFN\gamma$ i $TNF\alpha$ w stosunku do krwi obwodowej (średnio 44-65% vs. 11-43% w zależności od rodzaju tkanki i subpopulacji komórek). Największą zdolność do produkcji $IFN\gamma$ wykazywały limfocyty T $CD8^+$. W odniesieniu do produkcji $TNF\alpha$ różnice pomiędzy subpopulacjami limfocytów T były słabo wyrażone. Spośród komórek produkujących $IFN\gamma$ 65-89% stanowiły komórki wykazujące podwójną produkcję $IFN\gamma^+/TNF\alpha^+$. Biorąc pod uwagę produkcje cytokin wśród wszystkich limfocytów T największą grupę w kompartmentach tkanki tłuszczowej stanowiły komórki $CD4^+$ z podwójną produkcją $IFN\gamma$ oraz $TNF\alpha$ (18-20%), następnie komórki $CD8^+$ produkujące obie cytokiny (15-19%).

Limfocyty $T_{RM} CD4^+$ obecne w tkance tłuszczowej wykazują większą zdolność do produkcji $IFN\gamma$ oraz $TNF\alpha$ niż komórki powracające do krążenia ($CD69^-$). Największa różnica występuje w odniesieniu do tkanki tłuszczowej nasierdziowej. W odniesieniu do limfocytów T $CD8^+$ nie występowały różnice w produkcji cytokin przez komórki $CD69^+$ oraz $CD69^-$. Największą grupę limfocytów T produkujących badane cytokiny (zarówno $IFN\gamma$ jak i $TNF\alpha$) biorąc pod uwagę obecność antygeny CD69 stanowią komórki $CD4^+/CD69^+$. Zwraca uwagę większy udział komórek $CD8^+/CD69^+$ w produkcji $IFN\gamma$ w PVAT CORO niż w PVAT IMA.

Nie wykazano różnic w odsetku komórek Treg pomiędzy kompartmentami tkanki tłuszczowej oraz krwią. Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem komórek Treg w tkance tłuszczowej nasierdziowej i otaczającej IMA ($R=0,40$, $p=0,02$) oraz krwią obwodową ($R=0,33$, $p=0,04$). Naczynia od pacjentów z wyższym odsetkiem komórek Treg we krwi charakteryzowały się lepszą funkcją śródbłonna naczyniowego ($p_{ANOVA}=0,01$). Efekt ten utrzymał się w analizie regresji wielorakiej po uwzględnieniu klasycznych czynników ryzyka miażdżycy. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy funkcją śródbłonna naczyniowego i odsetkiem komórek Treg w PVAT ($p_{ANOVA}=0,3$).

Inkubacja tętnicy IMA z PVAT skutkowała upośledzeniem funkcji śródbłonna naczyniowego. Przy czym stopień tego upośledzenia był tym większy im więcej komórek zapalnych zawierał inkubowany tłuszcz (*three-way ANOVA* $p=0,02$). Podobnie, inkubacja IMA z $IFN\gamma$ skutkowała pogorszeniem funkcji śródbłonna naczyniowego ($p<0,05$), podczas gdy nie obserwowano takiego efektu po inkubacji naczyń z $TNF\alpha$. Nie obserwowano efektu synergistycznego działania obu cytokin na funkcję śródbłonna naczyniowego.

Wnioski. Tkanka tłuszczowa pochodząca z różnych przestrzeni tkankowych wykazuje zróżnicowany profil ekspresji genów u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca. Tkanka tłuszczowa okołonaczyniowa otaczająca dotknięte zaawansowaną miażdżycą naczynia wieńcowe wykazuje cechy toczącego się stanu zapalnego, podczas gdy PVAT otaczający wolną od miażdżycy tętnicę IMA charakteryzuje się fenotypem zbliżonym do brunatnej tkanki tłuszczowej uważanym za ochronny dla funkcji naczyń. Naciek komórek zapalnych do PVAT jest związany ze zwiększoną ekspresją genów związanych ze stanem zapalnym (CTLA-4, IL-10), stresem oksydacyjnym (CYBA), jak również kodujących visfatynę (NAMPT). Ciekawe, że różnice te zaobserwowano jedynie w odniesieniu do PVAT IMA. Brak różnic w PVAT CORO pomiędzy próbkami z wysokim i niskim naciekiem komórek zapalnych może wynikać z wyjściowo nasilonego stanu zapalnego, jednak wymaga to dalszych badań w tym zakresie.

Znaczną część limfocytów T w PVAT stanowią komórki T_{RM} nie powracające do krążenia. Przeważają one zwłaszcza w PVAT otaczającym dotknięte miażdżycą naczynia wieńcowe i jest to spowodowane głównie różnicami w ilości komórek $CD8+$.

Jednymi z głównych cytokin, którym przypisuje się rolę w rozwoju miażdżycy są $TNF\alpha$ oraz związany z odpowiedzią Th1 $IFN\gamma$. Wyspecjalizowanymi komórkami zdolnymi do produkcji cytokin obecnymi w tkance tłuszczowej są limfocyty T_{RM} charakteryzujące się obecnością antygenu $CD69$. Limfocyty T $CD8+$ wykazują największą zdolność do produkcji $IFN\gamma$. W PVAT CORO znajdujemy także więcej limfocytów T $CD8+/CD69+$ niż w PVAT IMA, jak również większy jest ich udział w produkcji $IFN\gamma$. Z drugiej jednak strony pod

względem ilości największą grupą komórek pośród limfocytów T produkującą IFN γ są limfocyty T CD4⁺/CD69⁺. Ponadto wykazują one wzrastającą przewagę w produkcji IFN γ nad populacją CD69⁻ wraz z przechodzeniem pomiędzy kompartmentami tkanki tłuszczowej (SC AT<PVAT IMA<PVAT CORO). Uzyskane wyniki wskazują na znaczący udział limfocytów T_{RM} w produkcji patogenego IFN γ , nie pokazują jednak zdecydowanej przewagi subpopulacji CD4⁺ bądź CD8⁺.

Limfocyty Treg mają za zadanie utrzymanie prawidłowej równowagi procesów immunologicznych. Z tego względu podjęto próbę ich oznaczenia w badanej grupie pacjentów i powiązania z funkcją naczyń. Naczynia od pacjentów z wyższym odsetkiem tych komórek we krwi charakteryzowały się lepszą funkcją śródbłonna naczyniowego, nie zaobserwowano jednak takiego efektu w odniesieniu do limfocytów Treg obecnych w PVAT. Mimo to ich odsetek we krwi oraz PVAT, jak również pomiędzy różnymi lokalizacjami PVAT był wzajemnie skorelowany. Wyniki te sugerują możliwy udział tych komórek w regulacji funkcji naczyń. Niewykluczone jednak, że istnieją mechanizmy modyfikujące na ich działanie w konkretnych tkankach.

Inkubacja naczyń z tkanką tłuszczową istotnie pogarsza funkcję śródbłonna naczyniowego i co niezwykle istotne, stopień pogorszenia jest większy, gdy naczynie inkubujemy z tłuszczem o większym nacieku komórek zapalnych. Pokazuje to bezpośredni wpływ tkanki tłuszczowej na funkcje naczyń oraz wskazuje kierunek obserwowanej we wcześniejszych badaniach zależności pomiędzy zwiększonym naciekiem komórek zapalnych w PVAT a dysfunkcją śródbłonna.

Inkubacja naczyń z badanymi cytokinami skutkowała upośledzeniem funkcji śródbłonna jedynie po ekspozycji naczyń na IFN γ a nie na TNF α . Nie dowodzi to wprost, lecz pozwala postawić wymagającą weryfikacji hipotezę, że negatywny wpływ tkanki tłuszczowej na funkcje naczyń może być przynajmniej częściowo spowodowany wpływem IFN γ .

Streszczenie pracy w języku angielskim

Introduction. Cardiovascular diseases are the main cause of mortality in developed countries. Atherosclerosis is characterized by chronic inflammation of the arteries, which develops at least in part due to risk factors such as hypercholesterolemia, diabetes and hypertension. They lead to endothelial dysfunction, oxidative stress and eventually inflammatory cells migration into the vessel wall. Many animal models as well as observations in humans indicate a principal role of systemic low-dose inflammation *per se* in increasing cardiovascular risk. It is responsible for a part of residual risk, which persists after eliminating other known classical risk factors. These observations lead us to better understand its origins and mechanisms happening in the vessel wall.

Most of the arteries of the body are surrounded by perivascular adipose tissue (PVAT). Adipose tissue is a metabolically active organ and produces many substances, some of which present potent vasoactive function. These processes are however not deeply investigated and mainly according to visceral adipose tissue. In diseases such as atherosclerosis and hypertension PVAT exerts features of ongoing inflammation. Interestingly, physiologically it plays a protective role for the vessel function.

Previous research show that inflammatory infiltration in PVAT is greater around vessels with more pronounced atherosclerotic changes and is connected with endothelial dysfunction. Unfortunately, the direction of these relationships and specific mechanisms responsible for them are not known.

The aim of this study is to investigate the relationships between inflammation, adipose tissue and the blood vessel function in patients with advanced coronary artery disease. The aim has been achieved through the following specific objectives:

1. Comparison of the selected genes expression profiles characterizing adipose tissue phenotype according to its localization, exacerbation of atherosclerosis and inflammatory cells infiltration.
2. Detailed characterization of T lymphocytes in adipose tissue depots taking into account tissue-resident memory T cells (T_{RM}), recirculating cells and released cytokines.
3. Investigation of T regulatory cells in PVAT and their relationship with endothelial function.
4. Investigation of the role of perivascular adipose tissue and inflammatory cytokines on endothelial function according to inflammatory cells infiltration.

Methods. 131 patients undergoing coronary artery bypass grafting with internal mammary artery graft were included into the study. Adipose tissue fragments surrounding critically stenotic coronary arteries (CORO), subcutaneous adipose tissue (SC AT) and internal mammary artery (IMA) fragments with perivascular adipose tissue were collected. Adipose tissue was incubated with IMA as well as enzymatically digested in order to isolate stromal-vascular fraction cells. These cells and peripheral blood mononuclear cells were analyzed using flow cytometry. mRNA was isolated from adipose tissue and genes expression was measured using RT-PCR. IMA parts were incubated with PVAT, cytokines (IFN γ and TNF α) and then endothelial function measurements were performed. The data were analyzed using analysis of variance (one-, two- and three-way), Students t-test, Chi², linear regression, Pearson's correlation coefficients were calculated, appropriate assumptions were verified and corrections for multiple comparisons were used.

Results. The analyzed adipose tissue depots present differences in analyzed genes expression. PVAT surrounding atherosclerotic coronary arteries presents increased expression of genes involved in inflammatory processes. PVAT surrounding atherosclerosis-free IMA presents increased expression of genes related to brown adipose tissue phenotype. Subcutaneous adipose tissue presents increased expression of genes connected with adipose tissue differentiation compared to other adipose tissue compartments. Inflammatory infiltration to IMA PVAT is connected with increased expression of genes coding visfatin, p22phox, IL-10 and CTLA-4. Infiltration to PVAT surrounding coronary arteries and subcutaneous adipose tissue is not connected with changes in the analyzed genes expression.

On average 45-62% of T lymphocytes (depending on tissue type) present in adipose tissue were T_{RM} cells. IMA PVAT was characterized by lower percentage of T_{RM} cells compared to CORO PVAT [44.7%(\pm 6.8) vs. 62.4%(\pm 3.9); p<0.05]. While in SC AT it was 60.7%(\pm 6.3), p=ns. It was mainly caused by almost two-fold higher percentage of CD8⁺/CD69⁺ cells among CD3⁺ lymphocytes in CORO PVAT compared to IMA PVAT [23.0% (\pm 3.8) vs 12.9% (\pm 3.4); p=0.01]. Among CD8⁺ lymphocytes, T_{RM} cells constituted in IMA PVAT, CORO PVAT and SC AT respectively 36.8% (\pm 6.0) vs 62.8% (\pm 4.3); p<0.01 and vs 62.1% (\pm 7.1); p<0.01. No differences were observed according to CD4⁺ lymphocytes. The vast majority of T_{RM} cells in adipose tissue did not express CD103 antigen (86-96%). Among CD3⁺ lymphocytes the largest group in all adipose tissue compartments constituted CD4⁺/CD69⁺/CD103⁻ cells according to CD69 and CD103 antigens.

T lymphocytes present in adipose tissue were characterized by high production of IFN γ and TNF α compared to peripheral blood (on average 44-65% vs. 11-43% depending on tissue

type and cell subpopulation). CD8⁺ T lymphocytes presented the highest production of IFN γ . According to TNF α production the differences were weakly expressed. Among IFN γ producing T lymphocytes 65-89% produced both cytokines (IFN γ ⁺/TNF α ⁺). Analyzing cytokine production among all T lymphocytes the largest group constituted CD4⁺ cells producing IFN γ and TNF α (18-20%), followed by CD8⁺ cells producing both cytokines (15-19%).

T_{RM} CD4⁺ lymphocytes present in adipose tissue present higher production of IFN γ and TNF α than recirculating cells (CD69⁻). The largest difference was observed in CORO PVAT. No differences in cytokine production were detected between CD69⁺ and CD69⁻ cells among CD8⁺ lymphocytes. The largest group of cytokine producing T lymphocytes according to CD69 antigen constituted CD4⁺/CD69⁺ cells. Additionally, an increased contribution in IFN γ production by CD8⁺/CD69⁺ cells was observed in CORO PVAT compared to IMA PVAT.

No differences were detected in Treg cells between adipose tissue compartments and blood. A positive correlation was observed between Tregs in CORO PVAT and IMA PVAT (R=0.40, p=0.02) as well as blood (R=0.33, p=0.04). The higher was Treg percentage in blood, the better was endothelial function (p_{ANOVA}=0.01). This effect persisted in regression analysis after adjusting for classical cardiovascular risk factors. No relationship was observed between endothelial function and PVAT Tregs (p_{ANOVA}=0.3).

IMA incubation with PVAT resulted in deterioration of endothelial function. The more inflammatory cells were present in incubated PVAT, the greater was that deterioration (*three-way ANOVA* p=0.02). Similarly, IMA incubation with IFN γ resulted in endothelial dysfunction (p<0.05). While no such effect was observed after incubating the vessels with TNF α . No synergistic effect of the two cytokines was observed.

Conclusions. Adipose tissue from different tissue compartments present differential genes expression profile in patients with coronary artery disease. CORO PVAT exerts features of ongoing inflammation, while IMA PVAT is characterized by phenotype similar to brown adipose tissue which is considered vasoprotective. Inflammatory cells infiltration in PVAT is connected with increased expression of genes related to inflammation (CTLA-4, IL-10), oxidative stress (CYBA), and coding visfatin (NAMPT). Interestingly, the differences were observed only in IMA PVAT. No differences in CORO PVAT between samples with high and low inflammatory infiltration may be related to initially severe inflammation. This however awaits verification in further research.

The majority of T lymphocytes in PVAT are T_{RM} cells which do not return to circulation. They predominate especially in PVAT surrounding atherosclerotic coronary arteries and it is caused mainly by the differences in CD8⁺ cells.

TNF α and Th1-related IFN γ are the main cytokines considered to be important in the pathogenesis of atherosclerosis. T_{RM} lymphocytes characterized by CD69 expression are specialized cells capable of cytokine production and are present PVAT. CD8⁺ T lymphocytes present the highest ability to produce IFN γ . There are more CD8⁺/CD69⁺ T cells in CORO PVAT than in IMA PVAT, and their contribution to IFN γ production is greater. On the other hand, CD4⁺/CD69⁺ cells constitute quantitatively the largest group producing IFN γ among T lymphocytes. Moreover, they present an increasing predominance over CD69⁻ population in IFN γ production between adipose tissue compartments (SC AT<PVAT IMA<PVAT CORO). The results indicate considerable contribution of T_{RM} cells in producing pathogenic IFN γ with no firm predominance of CD4⁺ nor CD8⁺ subpopulation.

Treg lymphocytes are responsible for maintaining appropriate homeostasis of inflammatory processes. For that reason, we aimed to investigate them in our group of patients and try to relate to endothelial function. The higher was the percentage of Tregs in blood, the better was the endothelial function. However, no such effect was observed in relation to PVAT Tregs. Despite that their percentages in blood and PVTA, as well as different PVAT depots was correlated. These results suggest the potential role of these cells in regulating vessel function. Possibly, there are mechanisms modifying their action in specific tissues.

Incubation of the vessels with adipose tissue substantially deteriorates endothelial function. Importantly, the amount of this deterioration is larger when the vessel is incubated with adipose tissue with higher inflammatory cells infiltration. It shows a direct impact of adipose tissue on the vessel function and demonstrates the direction of previous observation between increased inflammatory cells infiltration and endothelial dysfunction.

Incubation of the vessels with IFN γ , and not TNF α , resulted in deterioration of endothelial function. It does not directly prove, yet let us hypothesize that negative impact of PVAT on the vessel function may be at least in part caused by IFN γ .