

Agnieszka Modlińska-Cwalińska

**Zakażenie wirusem cytomegalii u młodzieży jako czynnik
ryzyka rozwoju przedklinicznej postaci miażdżycy**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: Prof. dr hab. med. Magdalena Figlerowicz

Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Kliniki: Prof. zw. dr hab. med. Wojciech Służewski

Poznań 2014

Pragnę serdecznie podziękować

promotorowi pracy

Pani Prof. dr hab. med. Magdalenie Figlerowicz

za inspirację, okazane wsparcie i wyrozumiałość
oraz nieocenioną pomoc w prowadzonych badaniach
i w przygotowaniu rozprawy

Składam serdeczne podziękowania:

Pani Dr n. med. Katarzynie Jończyk-Potocznej

Kierownik Zakładu Radiologii Pediatrycznej

Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

za okazaną życzliwość i pomoc w przeprowadzeniu badań ultrasonograficznych

oraz

Pani Dr n. biol. Marii Lewandowskiej-Stachowiak

Kierownik Pracowni Immunonefrologii

Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

za pomoc przy części laboratoryjnej projektu

Pragnę serdecznie podziękować:

Prof. zw. dr hab. med. Wojciechowi Służewskiemu

Kierownikowi Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

za wyrozumiałość, motywację i serdeczność

Koleżankom i Kolegom

z Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej

za życzliwość w trudnych chwilach

Rodzicom i Mężowi

za wiarę i wsparcie w dążeniu do celu

Mojemu Synowi

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	8
1. WSTĘP.....	11
1.1. Ludzki wirus cytomegalii	11
1.1.1. Przynależność taksonomiczna i budowa HCMV	11
1.1.2. Cykl replikacyjny HCMV	12
1.1.3. Obraz kliniczny zakażenia HCMV	13
1.1.4. Immunologia zakażenia HCMV	15
1.1.4.1. Znaczenie komórek NK oraz limfocytów typu T w zakażeniu HCMV	16
1.1.4.2. Rola monocytów i makrofagów w indukcji zapalenia oraz latencji HCMV	18
1.1.5. Diagnostyka i leczenie zakażenia HCMV	19
1.2. Miażdżycy naczyń tętniczych	21
1.2.1. Struktura patomorfologiczna blaszek miażdżycowych	21
1.2.2. Kliniczna manifestacja miażdżycy	25
1.2.3. Molekularne podłoże patogenezy miażdżycy	26
1.2.3.1. Śródbłonkowa teoria indukcji zmian miażdżycowych	26
1.2.3.2. Lipidowa teoria powstawania miażdżycy	30
1.2.3.3. Zapalna teoria indukcji miażdżycy	31
1.2.4. Immunologiczne podstawy rozwoju miażdżycy	32
1.2.4.1. Rola monocytów i makrofagów w patogenezie miażdżycy	32
1.2.4.2. Rola limfocytów w swoistej odpowiedzi immunologicznej w patogenezie miażdżycy	34
1.2.4.3. Cząsteczki adhezyjne jako markery dysfunkcji śródbłonka	35
1.2.4.4. Cytokiny w patogenezie miażdżycy	36
1.2.5. Rola czynników infekcyjnych w rozwoju miażdżycy	37
1.2.6. Czynniki ryzyka miażdżycy	39
1.2.7. Metody nieinwazyjnej oceny zmian miażdżycowych	42
1.2.7.1. Ocena IMT	43
1.2.7.2. Ocena FMD	44
2. CELE PRACY	45
3. PACJENCI, MATERIAŁ I METODY	46
3.1. Pacjenci	46
3.1.1. Etap I - postępowanie kwalifikacyjne	46
3.1.1.1. Ankieta kwalifikacyjna	46
3.1.2. Etap II – podział grupy badanej	47
3.2. Protokół badania	48
3.2.1. Badanie podmiotowe i przedmiotowe	48
3.2.1.1. Badanie podmiotowe	48
3.2.1.2. Badanie przedmiotowe	49
3.2.1.2.1. Pomiaru ciśnienia tętniczego krwi	49
3.2.1.2.2. Pomiaru obwodu talii	49
3.2.1.2.3. Wyliczenia BMI pacjenta	50
3.2.2. Badania laboratoryjne	50
3.2.2.1. Oznaczenie poziomu przeciwciał przeciw HCMV	50
3.2.2.2. Standardowe badania laboratoryjne	50
3.2.2.3. Badania immunoenzymatyczne	52
3.2.2.3.1. Ludzka interleukina 1 β (IL-1 β)	52
3.2.2.3.2. Ludzka interleukina 4 (IL-4)	52

3.2.2.3.3.	Ludzka interleukina 6 (IL-6)	52
3.2.2.3.4.	Ludzka interleukina 10 (IL-10).....	52
3.2.2.3.5.	Interferon gamma (IFN γ)	53
3.2.2.3.6.	Czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF α)	53
3.2.2.3.7.	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF)	53
3.2.2.3.8.	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF)	53
3.2.2.3.9.	Rozpuszczalna forma międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (sICAM-1).....	54
3.2.3.	Ultrasonograficzny pomiar IMT tętnicy szyjnej	54
3.2.4.	Badanie USG jamy brzusznej	55
3.2.5.	Badanie EKG	56
3.3.	Analiza statystyczna	56
4.	WYNIKI.....	57
4.1.	Badanie podmiotowe.....	58
4.1.1.	Ocena częstości występowania nawracających infekcji oraz chorób przewlekłych w grupie badanej	58
4.1.2.	Ocena sposobu odżywiania i aktywności fizycznej	59
4.1.3.	Ocena narażenia na dym tytoniowy	59
4.2.	Badanie przedmiotowe	59
4.2.1.	Pomiar ciśnienia tętniczego krwi w badanych grupach	59
4.2.2.	Pomiar obwodu talii	60
4.2.3.	Wyniki BMI pacjentów	60
4.3.	Badania laboratoryjne.....	61
4.3.1.	Analiza wyników standardowych badań laboratoryjnych	61
4.3.1.1.	Morfologia krwi obwodowej z rozmazem mechanicznym	61
4.3.1.2.	Stężenie białka C-reaktywnego (CRP) w badanych grupach	62
4.3.1.3.	Wyniki badań profilu lipidowego	63
4.3.1.4.	Aktywność aminotransferaz w badanych grupach	64
4.3.1.5.	Poziom glikemii na czczo w badanych grupach	64
4.3.1.6.	Poziom fibrynogenu w grupach badanych	64
4.3.2.	Badania immunoenzymatyczne	64
4.3.2.1.	Analiza stężenia ludzkiej interleukiny 1 β (IL1- β)	64
4.3.2.2.	Analiza stężenia ludzkiej interleukiny 4 (IL-4)	66
4.3.2.3.	Analiza stężenia ludzkiej interleukiny 6 (IL-6)	67
4.3.2.4.	Analiza stężenia ludzkiej interleukiny 10 (IL-10)	68
4.3.2.5.	Analiza stężenia interferonu gamma (IFN γ)	69
4.3.2.6.	Analiza stężenia czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF α)	70
4.3.2.7.	Analiza stężenia czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF)	72
4.3.2.8.	Analiza stężenia czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF)	73
4.3.2.9.	Analiza stężenia rozpuszczalnej formy międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (sICAM-1)	74
4.4.	Analiza wyników ultrasonograficznego pomiaru IMT tętnic szyjnych.....	75
4.4.1.	Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a stężeniem CRP w grupie 1 (n=49)	79
4.4.2.	Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IL-1 β w grupie 1 (n=49)	79
4.4.3.	Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IL-6 w grupie 1 (n=49)	80

4.4.4.	Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT(IMT SR), a poziomem TNF α w grupie 1 (n=49)	81
4.4.5.	Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IFN γ w grupie 1 (n=49)	81
4.4.6.	Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem sICAM-1 w grupie 1 (n=49)	82
4.5.	Badanie USG jamy brzusznej	83
4.6.	Badanie EKG	83
5.	DYSKUSJA	84
6.	WNIOSKI	100
7.	PIŚMIENNICTWO	101
8.	ZAŁĄCZNIKI	135
9.	SPIS RYCIN	139
10.	SPIS TABEL	143
11.	STRESZCZENIE	145
12.	SUMMARY:	148
13.	Słowa kluczowe	151
14.	Key words	151

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

- AII - ang. *angiotensyn II* - angiotensyna II
- ACAT - ang. *Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase*- acylotransferaza acylo-CoA:cholesterol
- ACE - ang. *angiotensin convertase enzyme* - konwertaza angiotensyny
- AHSV - ang. *avium herpes simplex virus* - ptasi wirus opryszczki
- ALT - aminotransferaza alaninowa
- AP-1 - ang. *activator protein 1* - aktywator proteiny 1
- AST - aminotransferaza asparaginowa
- AT III - ang. *antytrombin III* – antytrombina III
- brBP - ang. *brachialresting blood pressure* - spoczynkowe ciśnienia tętnicze na tętnicy ramiennej
- cGMP - ang. *cyclic guanosine monophosphate* - 3'5'cykliczny monofosforan guanozyny
- CID - ang. *generalized cytomegalic inclusion disease*
- CRP - ang. *C-reactive protein* – białko C-reaktywne
- EBV - ang. *Ebstein-Barr virus* – wirus Ebsteina-Barr
- EDHF - ang. *endotelium derived hiperpolarizing factor* - śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący
- EGFR - ang. *epidermal growth factor –receptor* - receptor naskórkowego czynnika wzrostu
- ELISA - ang. *enzyme-linked immunosorbent assay* – test immunoenzymatyczny
- eNOS - ang. *epithelial nitric oxide synthase* - śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
- ER - ang. *endoplasmic reticulum* - reticulum endoplazmatyczne
- ESS - ang. *endotelial shear stress* - naprężenie ścinające
- FGF-R - ang. *fibroblast growth factor receptor* - receptor czynnika wzrostu fibroblastów
- FMD - ang. *flow-mediated vasodilation* – rozszerzalność tętnicy ramiennej
- GM-CSF - ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - czynnik stymulujący wzrost makrofagów
- HAV - ang. *hepatitis A virus* - wirus zapalenia wątroby typu A
- HCMV - ang. *human cytomegalovirus* - ludzki wirus cytomegalii
- HHV 6 - ang. *human herpes virus 6* – ludzki wirus herpes typu 6
- HHV 7 - ang. *human herpes virus 7* – ludzki wirus herpes typu 7
- HHV 8 - ang. *human herpes virus 8* – ludzki wirus herpes typu 8
- HIV - ang. *human immunodeficiency virus* - ludzki wirus niedoboru odporności
- HLA - ang. *human leukocyte antigens* – ludzkie antygeny leukocytarne

- HSV 1 - ang. *herpes simplex virus 1* – wirus opryszczki zwykłej typu 1
- HSV 2 - ang. *herpes simplex virus 2* – wirus opryszczki zwykłej typu 2
- HSP 60 - ang. *heat shock protein 60* – białko szoku cieplnego (o masie cząsteczkowej 60kDa)
- ICAM-1 - ang. *intracellular adhesion molecule-1*- międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1
- IE - ang. *immediate early genes* – geny bezpośrednie wczesne
- IL-1 - ang. *interleukin-1*, interleukina 1
- IL-4 - ang. *interleukin-4*, interleukina 4
- IL-6 - ang. *interleukin-6*, interleukina 6
- IL-8 - ang. *interleukin-8*, interleukina 8
- IL-10 - ang. *interleukin-10*, interleukina 10
- IL-12 - ang. *interleukin-12*, interleukina 12
- IL-18 - ang. *interleukin-18*, interleukina 18
- IFN γ - ang. *interferon γ* - interferon γ
- IgA - immunoglobulina klasy A
- IgM - immunoglobulina klasy M
- IgG - immunoglobulina klasy G
- IMT - ang. *intima-media thickness* - kompleks intima-media
- LDL - ang. *low-density lipoprotein* - lipoproteiny niskiej gęstości
- LFA-1 - ang. *leukocyte function-associated antigen-1*- antygen związany z funkcją leukocytów
- MCP-1 - ang. *monocyte chemotactic protein 1* - białko chemotaktyczne monocytów
- M-CSF - ang. *macrophage colony-stimulating factor* - czynnik stymulujący kolonie makrofagów
- MHC - ang. *major histocompatibility complex* - główny układ zgodności tkankowej
- NF- κ B - ang. *nuclear factor- κ B* - jądrowy czynnik kappa B
- NK - ang. *natural killers*
- NO - ang. *nitric oxide*, tlenek azotu
- PAMP - ang. *pathogen associated molecular patterns* - wzorce molekularne związane z patogenami
- PCR - ang. *Polymerase Chain Reaction* – polimerazowa reakcja łańcuchowa
- PDGF-R - ang. *platelet – derived growth factor receptor* – receptor płytkowego czynnika wzrostu
- PGI₂ - ang. *prostaglandin I₂, prostacyclin* - prostacyklina
- PRR - ang. *pattern recognition receptors* - receptory rozpoznające wzorce
- RCMV - ang. *rat cytomegalovirus* - szczurzy wirus cytomegalii

- RT-PCR - ang. *reverse transcriptase PCR* - polimerazowa reakcja łańcuchowa z odwrotną transkryptazą
- sGC - ang. *soluble guanylyl cyclase* - rozpuszczalna cyklaza guanylowa
- sICAM-1 - ang. *soluble intracellular adhesion molecule-1* – rozpuszczalna międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna - 1
- SMC - ang. *smooth muscle cell* - komórki mięśni gładkich
- SR - ang. *scavenger receptor* - receptory zmiatające
- SR-A - ang. *scavenger receptor-A* - receptor zmiatający klasy A
- sVCAM-1 - ang. *soluble vascular cell adhesion molecule-1*- rozpuszczalna naczyniowa cząsteczka adhezyjna-1
- TAG - ang. *triacylglyceride* - triacyloglicerole
- TF - ang. *tissue factor* – czynnik tkankowy
- TNF- α - ang. *tumor necrosis factor α* - czynnik martwicy guza α
- TNF-R - ang. *tumor necrosis factor – receptor* - receptor czynnika martwicy guza
- TLR - ang. *Toll-like receptor* - receptor toll-podobny
- t-PA - ang. *tissue plasminogen activator* - tkankowy aktywator plazminogenu
- TVS - ang. *transplant vascular stenosis* – stenoza naczyń narządu przeszczepionego
- u-PA - ang. *urokinase plasminogen activator* - urokinazowy aktywator plazminogenu
- VASP - ang. *vasodilator-stimulated phosphoprotein* – fosfoproteina stymulowana przez związki rozszerzające naczynia
- VLA-4 - ang. *very late antigen-4* – bardzo późny antygen aktywacji limfocytów
- vWF - ang. *von Willebrand factor* – czynnik von Willebranda
- VZV - ang. *varicella zoster virus* – wirus ospy wietrznej i półpaśca
- WSS - ang. *wall shear stress* - naprężenie ścinające

1. WSTĘP

1.1. Ludzki wirus cytomegalii

Zakażenie ludzkim wirusem cytomegalii (ang. *human cytomegalovirus*, HCMV) jest szeroko rozpowszechnione na świecie. W zależności od szerokości geograficznej oraz warunków socjoekonomicznych panujących w danym kraju, przeciwciała świadczące o przebytych zakażeniu posiada od 50 do 80% społeczeństwa, najwięcej w Afryce, Azji oraz Ameryce Południowej, najmniej w Europie i Stanach Zjednoczonych [1–3]. W Polsce ten odsetek wynosi ok. 70% [4,5]. Częstość zachorowania rośnie z wiekiem, tym samym w wysoko rozwiniętych krajach większość osób po 80. roku życia przeżyło infekcję HCMV [2].

1.1.1. Przynależność taksonomiczna i budowa HCMV

HCMV (syn. ang. *human herpes virus 5*, HHV-5) obok wirusów opryszczki zwykłej typu 1 i 2 (ang. *herpes simplex virus 1*, HSV 1; ang. *herpes simplex virus 2*, HSV 2), ospy wietrznej i półpaśca (ang. *varicella zoster virus*, VZV), wirusa Ebsteina-Barr (ang. *Ebstein-Barr virus*, EBV), oraz ludzkich wirusów herpes 6, 7 i 8 (ang. *human herpes virus*; HHV-6, HHV7, HHV-8) należy do rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *betaherpesvirinae* [6,7].

Pierwsze wzmianki o zakażeniu HCMV pojawiły się w 1904 roku w pracy niemieckiego patologa Hugo Ribberta. Zauważył on w nerkach i gruczołach ślinowych noworodków zmarłych po porodzie, obecność dużych, balonowatych komórek [8]. W 1932 roku Wyatt połączył objawy kliniczne występujące u pacjentów, ze zmianami patomorfologicznymi tkanek pobranych autopsyjnie wprowadzając pojęcie CID (ang. *generalized cytomegalic inclusion disease*) [9]. Jednak dopiero w 1953 roku, dzięki zastosowaniu mikroskopii elektronowej, Minder stwierdził obecność wtrętów wewnątrzjądrowych w komórkach trzustki i jako pierwszy wysunął podejrzenie infekcji wirusowej jako czynnika sprawczego CID [10]. Era hodowli komórek ludzkich pozwoliła w 1957 roku wyizolować HCMV z tkanek noworodków i niemowląt zmarłych jak początkowo podejrzewano w wyniku wrodzonego zakażenia toksoplazmozą. Jednak po raz pierwszy wirus ten został opisany jako HCMV dopiero w 1960 roku [11].

HCMV wykazuje podobną budowę do pozostałych herpeswirusów. Ikosahedralny wirion o średnicy 65nm, zbudowany jest z 162 kapsomerów otaczających rdzeń. Kapsyd wirusa otoczony jest białkowym tegumentem oraz osłonką lipidową z osadzonymi w niej glikoproteinami o właściwościach antygenowych [12]. Swoista odpowiedź immunologiczna na zakażenie HCMV skierowana jest głównie przeciwko białku pp65. Genom HCMV (szczepu AD160) zbudowany jest w liniowego, dwuniciowego DNA i składa się z około 230 tysięcy par zasad. Co ciekawe stwierdzono, iż pewne fragmenty genomu, jak w przypadku innych herpeswirusów, wykazują homologię z ludzkim DNA [13,14]. Ponadto dzięki obecności powtarzających się sekwencji genów, istnieje możliwość przyjmowania przez DNA kulistego kształtu w trakcie replikacji, natomiast dzięki inwersjom pewnych rejonów DNA, HCMV może istnieć w więcej niż jednej izomerycznej formie [15]. Genom HCMV koduje około 100 białek, z czego większość stanowią enzymy niezbędne w procesie replikacji. Co ważne DNA HCMV, w przeciwieństwie do genomu HSV-1, HSV-2 i VZV, nie koduje kinazy tymidynowej, co powoduje jego niewrażliwość na lek przeciwwirusowy jakim jest acyklovir [16–18].

1.1.2. Cykl replikacyjny HCMV

HCMV posiada zdolność zakażenia wielu typów komórek. Proces replikacji wirusa trwa od 48 do 96 godzin, a rozpoczyna się od identyfikacji receptorów błonowych komórek predysponowanych do zakażenia [19–21]. Genom HCMV koduje dwa kompleksy białek powierzchniowych wirusa: krótszy - kompleks gH/gL/gO odpowiadający za fuzję z błoną komórkową fibroblastów, oraz dłuższy - kompleks gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131, umożliwiających zakażenie komórek nabłonkowych, fibroblastów, komórek progenitorowych szpiku kostnego, monocytów i makrofagów, komórek nerwowych, hepatocytów oraz śródbłonna naczyń [22–24]. Wiele z receptorów powierzchniowych komórek, takich jak receptor: płytkowego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor receptor*, PDGF - R), czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor receptor*, FGF-R), naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor –receptor*, EGFR), czynnika martwicy guza (ang. *tumor necrosis factor – receptor*, TNF-R) czy integryny błonowe jest wiązana przez białka wirusowe [25–28]. Do niedawna uważano, iż w przypadku HCMV rolę tę spełnia EGFR, dla którego ligandem pozostaje glikoproteina B otoczki wirusa, jednak we wrześniu 2008 roku pojawiło się doniesienie o wpływie ekspresji receptora PDGFR α na zakażenie HCMV, w którym na podstawie badań molekularnych stwierdzono, iż komórki pozbawione genu receptora PDGFR α pozostają niewrażliwe na zakażenie [29]. Badania te

pozwołyły podejrzewać, że rozpoznanie komórki docelowej przez HCMV zachodzi głównie w oparciu o PDGFR α . Ostateczna identyfikacja receptora na powierzchni komórki, rozpoznawanego przez wirus, pozwoliłaby w pełni zrozumieć patogenezę infekcji HCMV.

Po wnikięciu do komórki gospodarza kapsyd jest transportowany w kierunku jądra, do którego zostaje uwolniony materiał genetyczny wirusa. Przy udziale komórkowej polimerazy RNA w procesie translacji powstaje wirusowy mRNA. Służy on dalej jako matryca do syntezy białek wirusa w cytozolu zainfekowanej komórki [30,31]. Geny HCMV ulegają różnoczasowej ekspresji. Geny wczesne UL123 i UL122, kodują białka regulatorowe, odpowiednio IE72 i IE86, które transportowane ponownie do jądra komórkowego, uczestniczą w ekspresji genów późnych [32–34]. Ponadto do genów wczesnych zaliczamy również geny IRS1 i TRS1, odpowiedzialne za stymulację odpowiedzi immunologicznej zakażonego ustroju [35,36]. Udowodniono, iż produkty genów wczesnych powodują zwiększoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórki takich jak ICAM-1 (ang. *intracellular adhesion molecule-1*), stymulują produkcję cytokin prozapalnych (IL-1 i TNF- α) oraz czynników wzrostu i mitogenów komórkowych (IL-6, TGF- β , GM-SCF) [37]. Późne geny HCMV stanowią natomiast matrycę dla białek strukturalnych wirusa [38]. Na dalszym etapie dochodzi do degradacji chromatyny jądrowej, z rozfragmentowaniem jądra, co w konsekwencji prowadzi do zniszczenia komórki gospodarza. Uformowane cząstki potomne wirusa przechodzą do cytoplazmy, gdzie odbywa się proces syntezy kapsydu oraz białek tegumentu. Wirus dojrzewa następnie w aparacie Golgiego zainfekowanej komórki i opuszcza go powodując jej lizę [39,40].

1.1.3. Obraz kliniczny zakażenia HCMV

Większość pierwotnych infekcji HCMV u dzieci i dorosłych ma przebieg bezobjawowy lub ograniczony do tak zwanego zespołu mononukleozopodobnego. Zespół ten charakteryzuje się głównie podwyższeniem ciepłoty ciała, powiększeniem węzłów chłonnych i zapaleniem gardła oraz nieznaczną hepatosplenomegalią. Towarzyszą mu charakterystyczne zmiany obrazu krwi obwodowej z typowo monocytarnym rozmazem, nieznacznym podwyższeniem wykładników stanu zapalenia oraz zwykle nieznaczną hipertransaminazemią [40,41]. W przypadku współistnienia u pacjenta zespołu zaburzeń odporności, u osób poddanych leczeniu onkologicznemu, immunosupresji, czy zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*, HIV) pierwotne zakażenie, bądź jego reaktywacja prowadzi do ciężkich postaci choroby [40]. U części pacjentów dochodzi do

rozwinęcia ostrego zapalenia wątroby z następującą niewydolnością tego narządu [43], śródmiąższowego zapalenia płuc, zapalenia przełyku oraz jelita grubego [44–49], zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu [50], zapalenia siatkówki doprowadzającego często do upośledzenia pola widzenia lub nieodwracalnej ślepoty [51–53]. Do powyższych stanów predysponowane są również noworodki matek, u których rozpoznano pierwotne aktywne zakażenie HCMV w trzecim trymestrze ciąży lub w trakcie porodu [54]. Ponadto zakażenie wirusem cytomegalii pozostaje najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń wrodzonych w krajach rozwiniętych i dotyczy 0,4-2,3% żywo urodzonych noworodków [55–60]. Udowodniono, iż ryzyko zakażenia płodu wzrasta w miarę trwania ciąży, natomiast skutki zakażenia są tym większe, im wcześniej ono nastąpi. Pierwotne zakażenie lub jego reaktywacja do 20 tygodnia ciąży prowadzi bądź do obumarcia płodu, bądź do powstania ciężkich zaburzeń neurologicznych, takich jak małogłowie, niedosłuch typu odbiorczego, zaburzenia narządu wzroku, czy opóźnienie rozwoju psychoruchowego [61–63]. Materiał genetyczny HCMV jest obecny we wszystkich płynach ustrojowych. Około 15% noworodków zostaje zakażonych HCMV w trakcie porodu w wyniku kontaktu z wydzieliną szyjki macicy matki, natomiast około 25-40% noworodków i niemowląt nabywa infekcję w trakcie karmienia naturalnego [3]. Liczne badania wskazują, iż do zakażenia w wieku przedszkolnym dochodzi najczęściej drogą kropelkową lub kontaktową od innych dzieci [64,65].

Wspólną cechą wszystkich herpeswirusów jest zdolność do wywoływania zakażeń utajonych (latentnych) i ta właśnie cecha HCMV odpowiada za jego potencjał aterogenny. Latencja wirusa nie ogranicza się bowiem jedynie do skutecznego „ukrywania się” przed organizmem gospodarza. Wirus podsyca przewlekły proces zapalny poprzez stymulowanie zarówno populacji monocytów i makrofagów, jak i komórek śródbłonna naczyń do syntezy cytokin prozapalnych [38,66–70]. To właśnie w tym mechanizmie upatrywana jest zdolność HCMV do wywołania restenozy naczyń po zabiegach angioplastyki [65–67]. Rozwijająca się transplantologia, również stanęła przed problemem reaktywacji HCMV. Udowodniono, iż zakażenie HCMV podwaja 5-letnie ryzyko przewlekłej dysfunkcji przeszczepu serca [71,72]. Podobnie sytuacja wygląda w przypadku przeszczepu wątroby i nerek. Pod wpływem HCMV dochodzi do rozwinięcia zmian miażdżycowych w naczyniach narządu przeszczepionego (ang. *transplant vascular stenosis*, TVS), z całkowitym zamknięciem światła naczynia i następowym niedokrwieniem narządu. Najszybsze zmiany zachodzą w przypadkach naiwnego biorcy seropozytywnego przeszczepu. Dochodzi wówczas do pierwotnego zakażenia w warunkach immunosupresji, co często łączy się z rozwinięciem

u biorcy ciężkiej postaci choroby (w tym śródmiąższowego zapalenia płuc obarczonego 80% śmiertelnością, kłębuszkowego zapalenia nerek, zapalenia wątroby), lub z podostrą dysfunkcją narządu przeszczepionego. Na całym świecie w zastosowaniu są protokoły profilaktyczno-lecznicze z użyciem między innymi gancyklowiru. Złotym standardem pozostaje badanie materiału przeszczepionego na obecność HCMV i w miarę możliwości przeszczepianie narządów niezakażonych. W obliczu jednak tak szeroko rozpowszechnionej infekcji HCMV w społeczeństwie spełnienie powyższych warunków jest zwykle nieosiągalne [1,73–75].

1.1.4. Immunologia zakażenia HCMV

Charakterystyczna dla HCMV jest zdolność do przechodzenia w fazę latencji. Na poziomie molekularnym polega ona na minimalnej ekspresji genów wirusowych oraz przejściowym zahamowaniu tworzenia kompletnych wirionów, co zapewnia utrzymanie integralności strukturalnej i funkcjonalnej zainfekowanej komórki [21]. Dzięki temu HCMV może być transportowane poprzez monocyty do komórek śródbłonna, komórek będących w centrum zainteresowania badaczy w kontekście patogenezy miażdżycy. To właśnie monocyty i komórki śródbłonna stanowią największy rezerwuar wirusa w fazie latencji w zakażonym organizmie [76]. Ponadto jak już wspomniano, wczesne geny wirusa mają zdolność do aktywowania procesu zapalnego, poprzez produkcję przez zainfekowane komórki specyficznych klas cytokin oraz cząsteczek sygnałowych. Pod ich wpływem dochodzi do chemotaksji komórek do ściany naczynia, zwiększenia przepuszczalności komórek endotelium, migracji i następnej proliferacji komórek mięśni gładkich w błonie wewnętrznej naczynia, czy wreszcie stymulacji układu krzepnięcia [77,78]. Przewlekły proces zapalny indukuje również nadmierną produkcję wolnych rodników i utlenianie lipoprotein niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*, LDL), będących głównym składnikiem rdzenia lipidowego blaszki miażdżycowej [79,80].

Mechanizmem umożliwiającym HCMV latencję, jest również zdolność do hamowania zależnej od białka p53 apoptozy zakażonej komórki. Wirusowe białko IE2-84 posiada zdolność wiązania p53, blokując tym samym jego aktywność [81]. Udowodniono, że brak równowagi procesów apoptozy i proliferacji jest główną przyczyną restenozy naczyń tętniczych po zabiegu angioplastyki [71,82]. Ponadto wczesne geny HCMV posiadają zdolność aktywacji proliferacji komórek gospodarza powodując obserwowaną w blaszkach miażdżycowych nadmierną podśródbłonkową ekspansję komórek mięśni gładkich

(ang. *smooth muscle cell*, SMC) [83]. Patomechanizmy reaktywacji nie zostały dotychczas dokładnie poznane. Wyniki badań *in vivo* na materiale przeszczepionym, oraz *in vitro* na hodowlach komórkowych wskazują na znacznie częstszą tendencję do reaktywacji wirusa niż dotychczas sądzono. Dotychczas podejrzewano, iż reaktywacja HCMV ma miejsce głównie w przypadku osób, u których dochodzi do immunosupresji w wyniku zabiegu operacyjnego, procesu nowotworowego, czy po przeszczepach narządów [84–86]. Pojawiło się jednak kilka doniesień o wpływie stresu na reaktywację HCMV. Zależne od stresu obniżenie odporności może prowadzić do reaktywacji herpeswirusów, ponownego pojawienia się antygenów tych wirusów we krwi pacjenta, oraz wzrostu specyficznych przeciwciał zarówno w klasie IgG, jak i okresowo IgM [87]. Najnowsze badania z zakresu psychoneuroimmunologii dowodzą wpływu stresu na wzrost miana przeciwciał przeciwko HCMV w surowicy krwi zarówno u dorosłych, jak i u dzieci. Wykazano, że okresowa reaktywacja zarówno HCMV, jak i HSV-1 i EBV, dotyczy studentów medycyny w okresie okołoegzaminacyjnym [87,88], kadetów szkół wojskowych [89], osób z bliskiej rodziny opiekujących się chorym na chorobę Alzheimera [90], osób doświadczających traumatycznych zdarzeń [91], samotnych z objawami depresji [92], osób z zespołem przewlekłego zmęczenia [93] czy wreszcie małżeństw w trakcie procesu rozwodowego [93,94]. W stosunku do HCMV stwierdzono znacznie podwyższone miano przeciwciał w surowicy krwi studentów różnych kierunków studiów w okresie silnego narażenia na stres akademicki [95] oraz astronautów w trakcie misji kosmicznych [96,97]. W populacji pediatrycznej u dzieci narażonych na silny stres w warunkach domowych i szkolnych wykazano zarówno zwiększenie miana przeciwciał przeciwko HCMV jak i procentowy wzrost specyficznych dla zakażenia HCMV limfocytów CD4+ i CD8+ we krwi tych dzieci [98]. Ponadto aktywną replikację HCMV stwierdzano *in vitro* i *in vivo* w przypadku zależnej od katecholamin odpowiedzi na stres [87,96].

1.1.4.1. Znaczenie komórek NK oraz limfocytów typu T w zakażeniu HCMV

Komórki NK (ang. *natural killers*) biorące udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, zdolne są do spontanicznego niszczenia komórek zainfekowanych wirusem. Rozpoznawanie zmienionych patologicznie komórek odbywa się poprzez połączenie receptorów hamujących KIR (ang. *killer inhibitory receptor*) z białkami głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I (MHC I, HLA I) znajdującymi się na powierzchni komórek efektorowych. Do zmniejszenia ekspresji MHC I na powierzchni komórek dochodzi w przebiegu wirusowego zakażenia komórki efektorowej, co indukuje atak

cytotoksyczny NK [99]. Mechanizmem, który pozwala komórce zainfekowanej HCMV uniknąć zniszczenia, jest prezentowanie na jej powierzchni białek bliźniaczo podobnych do białek HLA I. Jednym z takich białek jest UL18, homolog cząsteczki HLA I, który po połączeniu z receptorem LIR-1 hamuje aktywność cytotoksyczną komórek NK [100,101]. Co ciekawe receptor LIR-1 znajduje się na powierzchni wszystkich monocytów, komórek dendrytycznych, limfocytów B oraz T, zatem komórka zainfekowana HCMV pozostaje niewidoczna również dla powyższych komórek układu odpornościowego. Ponadto w badaniach *in vitro* udowodniono, że białko UL18 posiada zdolność silniejszego wiązania LIR-1, aniżeli cząsteczka HLA I, zatem nawet niewielka ilość białka wirusa na powierzchni komórki gospodarza chroni ją przed zniszczeniem [102]. Kolejnym mechanizmem adaptacyjnym wirusa, zapobiegającym aktywacji komórek NK jest synteza białka UL40, tworzącego kompleks z obecnymi na powierzchni każdej komórki HLA-E. W warunkach prawidłowych nieuszkodzona komórka jest identyfikowana przez NK dzięki połączeniu receptora CD94/NKG2A z cząsteczką HLA-E stabilizowaną kompleksem białek TAP. Synteza kompleksu TAP ulega zahamowaniu w trakcie replikacji genomu HCMV. Genom wirusa syntetyzuje zamiennie własne białko, UL40, które rozpoznawane w kontekście HLA-E jako prawidłowe, zapobiega cytotoksycznej aktywacji NK [103,104].

Limfocyty T cytotoksyczne (CD8+) stanowią główną swoistą linię obrony immunologicznej przeciwko zakażeniom wirusowym. Cytotoksyczna reakcja niszczenia komórek zainfekowanych HCMV podlega restrykcji MHC, oraz jest regulowana poprzez wydzielanie szeregu cytokin [105,106]. I w tym przypadku HCMV próbuje uniknąć zniszczenia poprzez modulowanie odpowiedzi immunologicznej limfocytów T. Na powierzchni zakażonej komórki dochodzi do prezentacji białek wirusa, powstających w procesie translacji w kontekście MHC I. HCMV dzięki produkcji specyficznych białek częściowo ogranicza ten proces. Białko US3 posiada zdolność wiązania cząsteczek MHC na poziomie reticulum endoplazmatycznego (ang. *endoplasmic reticulum*, ER), następnie kolejne białka US11 i US2 unieczynnają pozostałe cząsteczki MHC I, ograniczając ich czas półtrwania z ponad sześciu godzin w warunkach prawidłowych do dwóch minut [107]. Następnie cząsteczki MHC I ulegają degradacji w lizosomach cytozolu. Ponadto białka HCMV (m.in.US6) wiążą białka kompleksu TAP, zapobiegając dalszej prezentacji antygenów wirusowych w kontekście MHC I [108]. Pomimo syntezy białek zaangażowanych w proces „ucieczki immunologicznej” HCMV nie jest w stanie całkowicie zahamować mechanizmów obrony przeciwwirusowej ustroju. Obecności białek US2, US3, US6 i US11 organizm gospodarza przeciwstawia syntezę interferonu γ (ang. *interferon γ* , IFN γ), który

nasila ekspresję cząstek układu MHC I, znosząc tym samym częściowo immunosupresyjny wpływ powyższych białek [109,110]. W badaniach *in vivo* na modelu zwierzęcym we krwi krążącej oraz w blaszkach miażdżycowych, w których wykryto DNA MCMV (ang. *Mouse CMV*), stwierdzono podwyższenie bezwzględnej liczby limfocytów T o fenotypie powierzchniowym CD8+CD57+ [111]. Komórki te wykazują niespecyficzne właściwości cytotoksyczne i immunosupresyjne. Liczne badania ujawniły supresyjny wpływ tej subpopulacji na aktywność cytotoksyczną limfocytów T oraz NK, poprzez zmniejszenie produkcji TNF α i IFN γ , oraz zwiększenie wydzielania IL-10 [112–114]. Podobne funkcje do komórek CD8+CD57+ pełni subpopulacja limfocytów CD8+CD28-. Receptor CD28 stanowi cząstkę kostymulacyjną limfocyta T, a jej połączenie z ligandem CD80/CD86 na powierzchni komórki prezentującej antygen wzmacnia sygnał stymulacji limfocytów T. Przy braku receptora CD28, limfocyty te wykazują działanie immunosupresyjne, a dodatkowo poprzez blokadę cząsteczek CD80 i CD86 hamują aktywację odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów T pomocniczych. Aktywacja limfocytów pomocniczych (CD4+) zachodzi poprzez prezentację antygenów w kontekście cząsteczek MHC II. Także w tym przypadku HCMV, między innymi dzięki syntezie białka US2, posiada zdolność do zmniejszenia dostępności cząsteczek MHC II (głównie HLA-DMA i MB), co przyczynia się do częściowego zahamowania aktywności limfocytów T. Wykazano również, iż infekcja HCMV zmniejsza o 99% syntezę IL-1 w zakażonych fibroblastach [115].

1.1.4.2. Rola monocytów i makrofagów w indukcji zapalenia oraz latencji HCMV

Makrofagi, których prekursorami są monocyty, są heterogenną populacją komórek wywodzących się progenitorowej komórki linii mieloidalnej szpiku. Wyróżniamy dwie subpopulacje monocytów we krwi krążącej. Klasyczne monocyty charakteryzują się ekspresją cząsteczki CD14+ na powierzchni komórki, aktywowane natomiast dodatkowo ekspresją CD16+. Ponadto dojrzałe monocyty wykazują zwiększoną ekspresję cząsteczek HLA-DR, -DP i -DQ, co świadczy o zaangażowaniu tych komórek w prezentację antygenów w kontekście MHC klasy II oraz stymulację dalszej odpowiedzi immunologicznej. To właśnie te komórki odpowiedzialne są za wysoką produkcję cytokin prozapalnych, w tym TNF α i IL-1, sprzyjających podtrzymywaniu stanu zapalnego [116,117]. Rozpoznanie patogenów odbywa się na drodze współdziałania cząsteczek CD14+ oraz receptorów toll-podobnych (ang. *Toll-like receptor*, TLR). Do tej pory potwierdzono istnienie trzynastu klas TLR, różniących się specyficznością względem antygenów bakteryjnych i wirusowych.

W przypadku HCMV ligandem dla TLR-2 jest białko otoczki wirusa. Na modelu *in vitro* udowodniono, że w fazie latencji HCMV obecny jest już na etapie progenitorowej komórki linii mieloidalnej [118–120]. Replikacja wirusa pozostaje zahamowana do czasu aktywacji pod wpływem cytokin prozapalnych monocytów CD14+. Udowodniono, że do reaktywacji wirusa niezbędna jest jednoczesna aktywacja limfocytów CD4+ i CD8+, oraz wysoki poziom produkowanych przez nie cytokin: IL-2 oraz IFN γ [86,121,122]. Co ciekawe wyniki badań molekularnych znalazły swoje odzwierciedlenie w badaniach klinicznych. Pacjenci z rozpoznaną stabilną chorobą niedokrwienną serca, oraz pacjenci po ostrych incydentach sercowo-naczyniowych charakteryzowali się przewagą bezwzględnej liczby komórek CD14+CD16+ we krwi obwodowej, oraz podwyższeniem poziomu TNF α w surowicy [123,124]. Komórki te stwierdzano również w blaszkach miażdżycowych powstałych w wyniku restenozy naczyń tętniczych po zabiegach angioplastyki [125,126].

1.1.5. Diagnostyka i leczenie zakażenia HCMV

W praktyce klinicznej rozpoznanie zakażenia HCMV opiera się na głównie na badaniach serologicznych oraz na analizie kwasów nukleinowych metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Podstawowym badaniem diagnostycznym pozostają testy immunoenzymatyczne, głównie test ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) pozwalający na wykrycie swoistych przeciwciał klasy IgM i IgG. Stwierdzenie serokonwersji u osoby uprzednio seronegatywnej w badaniu wykonanym po 14-28 dniach jest dowodem potwierdzającym pierwotne zakażenie HCMV [127,128]. W przypadku noworodka wykrycie swoistych przeciwciał w obu klasach, lub stwierdzenie jedynie wysokiego miana IgG, które narasta w badaniach kontrolnych świadczy o zakażeniu wewnątrzmacicznym. Interpretacja wyniku badania ELISA, może niekiedy przysparzać problemów diagnostycznych. Udowodniono, że stwierdzenie miana IgM w surowicy krwi może być związane nie tylko z ostrą fazą infekcji, ale również z reaktywacją w fazie latentnej. Różne źródła podają od, że u 0,5-10% pacjentów okresowo stwierdzano ponowne pojawienie się IgM w surowicy krwi. W stwierdzeniu, czy mamy do czynienia z ostrą infekcją HCMV, czy z jego reaktywacją pomaga miano IgG. Udowodniono, że wysokie miano IgG i równocześnie niskie, nienarastające IgM pozwala przypuszczać, że jesteśmy świadkami reaktywacji wirusa. Ponadto wykazano również, że dodatnie miano IgM utrzymuje się niekiedy 6-9.miesiący od zakażenia, co jeszcze bardziej uprawdopodobnia fakt stwierdzenia IgM w zakażeniu HCMV w fazie latencji. Badanie metodą ELISA nie

pozwała jednak rozstrzygnąć, czy nastąpiła reaktywacja latentnego zakażenia, czy reinfekcja innym serotypem wirusa [129,130].

Metody biologii molekularnej oparte na analizie kwasów nukleinowych wykorzystuje się najczęściej we wczesnej fazie zakażenia, w okresie tzw. okna serologicznego lub w przypadku konieczności weryfikacji badań serologicznych u noworodków matek seropozytywnych. Ponadto obecność DNA wirusa we krwi lub płynach ustrojowych pozwala rozstrzygnąć, czy mamy do czynienia z pierwotnym zakażeniem HCMV, czy reinfekcją innym serotypem wirusa. Główną zaletą metody PCR jest jej wysoka czułość i swoistość, wadą – wysokie ryzyko kontaminacji i niebezpieczeństwo uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Na odróżnienie aktualnie toczącego się zakażenia od zakażenia latentnego pozwala rzadziej używana reakcja PCR poprzedzona odwrotną transkrypcją (RT-PCR, ang. *reverse transcriptase PCR*) [58,131,132]. W diagnostyce zakażenia HCMV bardzo rzadko wykorzystuje się również metody cytologiczne, histopatologiczne oraz immunohistochemiczne z użyciem znakowanych fluoresceiną lub peroksydazą przeciwciał monoklonalnych i poliklonalnych.

W leczeniu aktywnego zakażenia HCMV u osób po przeszczepach oraz zakażonych HIV stosowanych jest szereg leków przeciwwirusowych takich jak gancyklowir, foscarnet, cydofowir i walgancyklowir. Leczenie to obarczone jest niestety poważnymi działaniami ubocznymi: w przypadku gancyklowiru i cydofowiru - supresją szpiku kostnego, foscarnetu-neurotoksycznością [133,134]. Terapię noworodków i niemowląt z wrodzonym zakażeniem HCMV prowadzi się w oparciu o zastosowanie gancyklowiru oraz koncentratu ludzkiej, wysokoimmunizowanej immunoglobuliny o wysokiej zawartości przeciwciał przeciw wirusowi cytomegalii [135,136]. Trwają badania nad zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych w leczeniu ostrej choroby cytomegalicznej. Największe nadzieje wiąże się z zastosowaniem przeciwciała G1-k przeciwko wirusowej glikoproteinie H. Obecnie trwają również wielośrodkowe badania nad stworzeniem szczepionki przeciwko HCMV [114,137–139].

1.2. Miażdżyca naczyń tętniczych

Początkowo miażdżyca była uważana za zwyrodnieniową chorobę naczyń. Już w drugiej połowie XIX wieku Rudolf Virchow zauważył złożoność jej patogenezę opisując w swojej definicji wszystkie procesy istotne w indukcji i rozwoju zmian miażdżycowych poczynając od uszkodzenia śródbłonka naczynia, poprzez migrację elementów morfotycznych krwi do jej ściany, aż do proliferacji komórek i rozwoju dalszych procesów [140]. Zgodnie z teorią współczesną miażdżyca jest przewlekłą, zapalno-proliferacyjną odpowiedzią ściany naczynia na działanie czynników zewnętrznych zarówno mechanicznych, chemicznych jak i biologicznych. Jej istotą są zaburzenia w interakcjach pomiędzy śródbłonkiem naczynia, składnikami osocza i elementami morfotycznymi krwi. Prowadzi to do uszkodzenia śródbłonka naczynia, migracji, następnej modyfikacji i retencji lipoprotein w obrębie błony wewnętrznej naczynia oraz aktywacji procesu zapalenia, czego skutkiem jest rozwój klinicznie jawnej blaszki miażdżycowej [141].

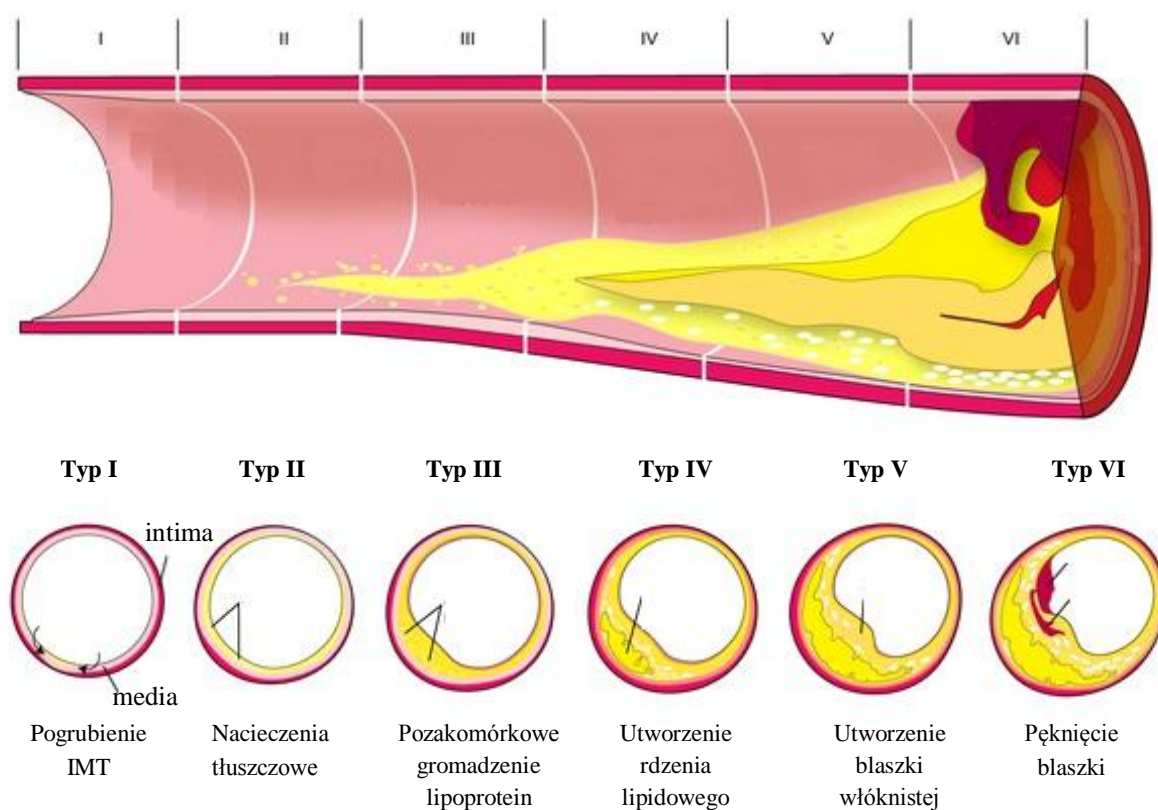
1.2.1. Struktura patomorfologiczna blaszek miażdżycowych

Blaszki miażdżycowe w ludzkich naczyniach tętniczych zostały sklasyfikowane w oparciu o ich cechy morfologiczne, histochemiczne oraz ultrastrukturalne przez American Heart Association Comittette on Vascular Lesions (AHA) w 1994 roku, z późniejszymi modyfikacjami w roku 2000. Na podstawie licznych badań stwierdzono, iż skład komórkowy i morfologia blaszki miażdżycowej decydują o stanie klinicznym pacjenta w większym stopniu niż sam stopień zwężenia naczynia tętniczego [142,143]. Zgodnie z powyższą klasyfikacją rozróżniamy sześć typów zmian miażdżycowych, z czego trzy pierwsze określane są łącznie jako początkowa faza procesu miażdżycowego. W typie I, niewidocznym makroskopowo, podśródbłonkowo dochodzi do akumulacji makrofagów oraz tworzenia pojedynczych komórek piankowatych. Grubość błony wewnętrznej naczynia ulega nieznacznemu zwiększeniu. W typie II komórki piankowate zaczynają układać się warstwowo wzdłuż błony podstawnej śródbłonka. Już na tym etapie następuje migracja komórek mięśni gładkich z błony środkowej do błony wewnętrznej naczynia. Typ III charakteryzuje się pozakomórkowym gromadzeniem lipidów oraz rozpoczynającym się włóknieniem blaszki miażdżycowej. W obu powyższych zmiany widoczne są makroskopowo pod postacią nacieczeń tłuszczowych (ang. *fatty streak*). Zmiany typu I i II stwierdzano

w badaniach autopsyjnych naczyń niemowląt i dzieci w wieku przedszkolnym, typ III miażdżycy częściej stwierdzano w obrębie ściany aorty i tętnic szyjnych dzieci w okresie dojrzewania [144–146]. Po wyeliminowaniu czynników uszkodzających śródbłonek oraz zmniejszeniu stężenia LDL we krwi komórki piankowe wracają do krwiobiegu, następuje gojenie błony wewnętrznej, zmiany te są zatem całkowicie odwracalne. Ich propagacja zależy również od umiejscowienia w naczyniach tętniczych. I tak najwcześniej tworzenie blaszki miażdżycowej ma miejsce w aorcie (pierwsza dekada życia), następnie tętnicach szyjnych w drugiej dekadzie, oraz w obrębie naczyń wieńcowych – trzecia dekada życia, w czwartej obejmuje naczynia mózgowie [143,147]. Początkowe zmiany w aorcie zanikają, natomiast te pojawiające się w późniejszym okresie życia, przede wszystkim dotyczące naczyń wieńcowych, z wiekiem i pod wpływem pojawiających się stopniowo czynników ryzyka miażdżycy ulegają progresji.

Dalsze gromadzenie lipoprotein w błonie wewnętrznej prowadzi do powstawania tak zwanych złożonych blaszek miażdżycowych. Charakterystyczne jest dla nich zlewanie pozakomórkowych złogów lipidowych tworzących rdzeń lipidowy blaszki miażdżycowej, oraz przyspieszenie procesu włóknienia. Rdzeń lipidowy składa się głównie z częściowo płynnych estrów oraz kryształów cholesterolu pochodzących z martwiczych komórek piankowatych, w mniejszej części z lipoprotein osocza. W zależności od umiejscowienia i typu blaszki może on stanowić od 10% do 70% jej objętości. Na tym etapie blaszka rozszerza się koncentrycznie w ścianie naczynia i częściowo wpukła się do jego światła, pozostając nadal niemą klinicznie. Rdzeń lipidowy w zależności od typu zmiany, posiada mniej bądź bardziej złożoną otoczkę. W typie IV jest nią jedynie warstwa komórek śródbłonna spoczywających na nieco zwłókniałej błonie podstawnej. W typie V natomiast, otoczka rdzenia lipidowego jest znacznie grubsza i składa się z tkanki łącznej oraz warstwy komórek mięśniowych. W typie V wyodrębniono ponadto podtypy Va – z wyraźnym rdzeniem lipidowym, Vb- z obecnymi w rdzeniu zwapnieniami oraz Vc- z dużą ilością tkanki łącznej oddzielającej rdzeń od warstwy śródbłonna. Ponadto charakterystyczna dla złożonych blaszek miażdżycowych jest neoangiogeneza w obrębie zmiany. W badaniach autopsyjnych tego typu zmiany były stwierdzane w tętnicach wieńcowych 20% mężczyzn w wieku między 30 a 35 rokiem życia [148–150].

Rozwój blaszki miażdżycowej zgodnie z klasyfikacją AHA



Rycina 1. Zaawansowanie zmian miażdżycowych w klasyfikacji AHA (rycina pochodzi ze strony www.cambridgemedicine.org w modyfikacji własnej)

Ostatni, szósty typ, określa się mianem powikłanej lub niestabilnej blaszki miażdżycowej. Głównym zagrożeniem z nią związanym jest krytyczne ograniczenie przepływu przez naczynie, lub nagłe zamknięcie jego światła przez tworzącą się skrzepinę. Mechanizm powstania zakrzepu częściej związany jest z pęknięciem blaszki, rzadziej z erozją komórek śródbłonna ją pokrywających, co jest częstsze w przypadku blaszek z niewielkim rdzeniem lipidowym, występujących zwykle u kobiet. Otoczka blaszki narażona jest na stałe działanie naprężeń ścinających, wynikających z pulsacyjnego przepływu krwi w naczyniu tętniczym. Udowodniono również, iż blaszki miażdżycowe charakteryzujące się aktywnym naciekiem zapalnym znacznie częściej ulegają pęknięciu. Do destabilizacji blaszki miażdżycowej przyczyniają się przede wszystkim makrofagi i limfocyty T. Pierwsze wydzielają szereg metaloproteinaz, takich jak kolagenaza, czy stromielizyna, przyczyniając się trawienia zrębu łącznotkankowego otoczki blaszki miażdżycowej, drugie poprzez syntezę

IFN γ , hamują syntezę kolagenu przez komórki mięśni gładkich. Interferon γ posiada również zdolność wywoływania apoptozy komórki, co jeszcze bardziej przyczynia się do kruchości blaszki miażdżycowej [105,151,152].

W wyniku pęknięcia blaszki zostaje odsłonięty czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*, TF), który jest głównym czynnikiem aktywującym zewnątrzpochodny układ krzepnięcia. W warunkach prawidłowych TF występuje jedynie w błonie zewnętrznej naczynia, zapewniając szybkie zatrzymanie krwawienia w przypadku uszkodzenia tętnicy od zewnątrz. W blaszce miażdżycowej jest on syntetyzowany przez aktywowane makrofagi, stąd jego obecność w błonie wewnętrznej tętnicy. Powstały zakrzep może ulec organizacji i włóknieniu, powiększając tym samym objętość blaszki i nasilając zwężenie naczynia. Może jednak również rozprzestrzeniać się w głąb naczynia, doprowadzając do całkowitego zamknięcia światła tętnicy [153–155].

Procesowi narastania blaszki miażdżycowej, towarzyszy początkowo dodatnia przebudowa nieobjętej zmianami ściany tętnicy (tzw. zjawisko Glasgowa). Polega ona na kompensacyjnym poszerzeniu światła tętnicy (z jej przebudową lub bez) w obrębie zdrowej ściany w odpowiedzi na wynikające ze zwężenia, zwiększenie naprężenia ścinającego [126]. Ponadto mechanizm adaptacyjny śródbłonna, pod postacią wydzielania tlenu azotu, zapewnia dodatkowe poszerzenie tętnicy. Ten typ przebudowy jest korzystny z hemodynamicznego punktu widzenia, odbywa się jednak kosztem nasilenia procesów zapalnych w blaszce miażdżycowej, co w znacznym stopniu powoduje jej niestabilność [156,157].

Kolejnym punktem zajmujących badaczy jest specyficzna lokalizacja zmian miażdżycowych w obrębie naczyń tętniczych. Znacznie częściej blaszki miażdżycowe występują przy bocznych ścianach bifurkacji, w pobliżu odejścia gałęzi bocznych oraz tuż poniżej zwężającej naczynie już powstałej blaszki miażdżycowej. To właśnie w tych miejscach na śródbłonek naczyniowy oddziałuje niskie (rzędu 4–6 dyn/cm²) i oscylacyjne (\pm 4 dyn/cm²) naprężenie ścinające. Naprężenie ścinające (ang. *endotelial shear stress*, ESS lub ang. *wall shear stress*, WSS) jest siłą styczną, działającą na śródbłonek naczyniowy zgodnie z kierunkiem przepływu [158]. Niskie i oscylacyjne naprężenie ścinające powoduje utratę integralności endotelium, dalej rozszczelnienie połączeń międzykomórkowych i powstanie kanałów, umożliwiających wnikanie lipoprotein i składników morfotycznych krwi do błony wewnętrznej. Ponadto postuluje się fakt, że dysfunkcja śródbłonna jest również skutkiem tzw. mechanotransdukcji. Zjawisko to polega na odbieraniu przez

mechanoreceptory błony endotelium działających na niego naprężeń ścinających. Wskutek dalszego przenoszenia sygnału przy udziale czynników transkrypcyjnych, takich jak jądrowy czynnik kappa B (ang. *nuclear factor-κB*, NF-κB) oraz aktywator proteiny 1 (ang. *activator protein 1*, AP-1) dochodzi do zwiększenia ekspresji niektórych genów, przy zahamowaniu innych. Należą one do grupy ok.100 genów określanych mianem genów regulowanych przepływem (ang. *shear regulated genes*), a ich aktywacja doprowadza do zmiany fenotypu śródbłonna z anty- w proaterogeny [159].

1.2.2. Kliniczna manifestacja miażdżycy

Efekty kliniczne rozwoju miażdżycy związane są nierozzerwalnie z jej patomorfologiczną manifestacją. Istotnym z tego punktu widzenia wydaje się fakt, że stwardnienie tętnic dotyczy przede wszystkim naczyń wysokociśnieniowych, zatem układ żylny-kapilarny, oraz krążenie płucne pozostaje wolne od rozwoju blaszek miażdżycowych. Wyniki prac badających transformację miażdżycową naczyń obrazują złożoność tego procesu zależną w znacznym stopniu od lokalizacji i funkcji tętnicy. Duże arterie zawierające większą ilość włókien elastycznych, charakteryzuje rozwój wspomnianych już wcześniej płytek miażdżycowych. Zawarte w nich tzw. masy kaszowate czynią ścianę naczynia kruchą i niestabilną, co w konsekwencji decyduje o zmniejszeniu elastyczności tętnicy. Zwyródnienie naczyń średniego kalibru, czyli tętnic mięśniowych przebiega głównie w obrazie tak zwanej miażdżycy Monckeberga, tj. zmian o charakterze martwiczo-włóknistych oraz zwapnień. Końcowe odcinki układu tętniczego również mogą zostać dotknięte rozwojem zmian miażdżycowych, w zależności od poszczególnych etapów patogenezy tętnice mogą albo ulec zwyrodnieniu białkowemu – szkliwieniu (łac. *hyalinosis*), albo ściana naczynia obrasta w elementy sprężysto-włókniste (łac. *elastosis*) [160].

Analizując powyższe informacje jasnym staje się fakt, że kliniczna manifestacja istniejącej miażdżycy będzie związana z nagłą dysfunkcją narządu, w którym upośledzeniu ulegała dystrybucja krwi tętniczej. Wśród najczęściej wymienianych zespołów chorobowych jest choroba wieńcowa wraz z powikłaniami, udar mózgu, ostre niedokrwienie tętnic kończyn dolnych, zatorowość lub zakrzepica tętnic krezkowych, tętnic nerkowych oraz tętnicy środkowej siatkówki. W toku tworzącej się miażdżycy zwiększa się również ryzyko rozwoju patologii naczyniowych strukturalnych takich jak tętniak aorty brzusznej, czy tętniaki tętnic mózgowych. W tym wypadku negatywne efekty hemodynamiczne związane są głównie

z utrudnionym laminarnym przepływem krwi, prowadząc do zmiany rozkładu naprężeń i destrukcji ściany naczynia [161].

Niewątpliwie choroba niedokrwienna serca należy do najbardziej znanych i najlepiej opisanych klinicznych manifestacji miażdżycy. W zależności o charakteru i zaawansowania destrukcji naczyń wieńcowych choroba przebiega pod postacią stabilnych lub niestabilnych zespołów wieńcowych. Z kolei udar mózgu może mieć charakter udaru niedokrwiennego wywołanego przez zakrzep lub zator, oraz udaru krwotocznego związanego z bezpośrednim urazem naczynia, np. pęknięciem powstałego w wyniku procesu miażdżycowego tętniaka. W części przypadków rozwój udaru przebiega na podłożu powstałej wcześniej anomalii naczyniowej (tętniaki naczyń mózgowych) lub niewydolności naczyń tętnicznych (miażdżycy tętnic szyjnych i kręgowych) [162].

Również zatorowość naczyń tętnicznych lub rozwój w ich świetle zakrzepicy, ma kluczowe znaczenie dla patogenezy zmian narządowych indukowanych istniejącą miażdżycą. Zarówno ostre niedokrwienie kończyn dolnych, niedokrwienie tętnic kręgowych, nerkowych czy tętnicy środkowej siatkówki może przebiegać w obu wymienionych mechanizmach, przy czym to właśnie wcześniejsze zmiany miażdżycowe zwiększają ryzyko incydentu niedokrwiennego. Późniejszy efekt kliniczny zależy głównie od miejsca w którym doszło do blokady przepływu i zdolności jego kompensacji przez krążenie oboczne. Należy zaznaczyć, że nawet częściowe upośledzenie przepływu krwi tętniczej może dawać niekorzystne efekty kliniczne. Przykładem jest chociażby wspomniane wcześniej miażdżycowe zwężenie tętnic zaopatrujących mózg (tętnic szyjnych i kręgowych), jak również tętnic nerkowych. W tym drugim przypadku dochodzi do znacznego upośledzenia przepływu krwi przez nerki, co prowadzi do wtórnego rozwoju nadciśnienia tętniczego [148,150,160,162].

1.2.3. Molekularne podłoże patogenezy miażdżycy

1.2.3.1. Śródbłonkowa teoria indukcji zmian miażdżycowych

Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego pozostaje kluczowym i najwcześniejszym etapem rozwoju blaszki miażdżycowej. Prowadzi do migracji monocytów i limfocytów przez ścianę naczynia, zwiększenia jej przepuszczalności dla lipoprotein oraz zaburzeń równowagi między układem krzepnięcia i fibrynolizy [163]. W warunkach prawidłowych endotelium kontroluje homeostazę naczyniową, produkując szereg mediatorów. Posiada właściwości antyadhezyjne względem leukocytów, co ogranicza podśródbłonkowe procesy zapalne. Stanowi barierę dla lipoprotein, zapobiegając ich akumulacji w ścianie wewnętrznej naczynia,

ponadto hamuje proliferację mięśni gładkich, wpływając tym samym na zdolności utrzymania prawidłowego napięcia ściany naczyniowej [164]. Istnieje wiele czynników indukujących uszkodzenie endotelium. Należą do nich czynniki mechaniczne takie jak podwyższone ciśnienie tętnicze krwi, czy zaburzenia przepływu laminarnego w świetle naczynia [165,166]; czynniki biochemiczne, między innymi wzrost stężenia wolnych rodników, niedotlenienie, kwasica [166], czy wreszcie zwiększenie stężenia LDL przy spadku HDL [167]. Jednymi z kluczowych czynników uszkadzających nabłonek okazały się być również niektóre bakterie oraz wirusy powodujące przewlekły stan zapalny ściany naczyniowej [76,168–172].

Śródbłonek będąc pierwszą warstwą komórek oddzielających ścianę naczynia od krwi krążącej jest stale poddawany działaniu sił mechanicznych związanych z jej przepływem. Jak już wspomniano dysfunkcja śródbłonka jest tym większa, im mniejsza jest wartość naprężenia ścinającego w naczyniu, co powoduje turbulentny przepływ krwi. Udowodniono, iż przepływ nielaminarny wpływa na ekspresję genów cząstek adhezyjnych VCAM-1 i ICAM-1 uczestniczących w adhezji i transmigracji leukocytów do błony wewnętrznej naczynia [173]. Ligandem dla VCAM-1 jest VLA-4 (ang. *Very Late Antigen-4*), β 1-integryna obecna jedynie na powierzchni limfocytów i monocytów, natomiast dla ICAM-1 ligandem pozostaje LFA-1 (ang. *leukocyte function-associated antigen-1*), β 2-integryna – glikoproteina wchodząca w skład błony komórkowej wszystkich leukocytów. Początkowo leukocyty toczą się po powierzchni śródbłonka poprzez interakcje z selektynami. Do trwałej adhezji dochodzi dopiero na skutek interakcji VCAM-1 i ICAM-1 z odpowiednimi dla nich integrzynami. Prowadzi to w konsekwencji do transmigracji monocytów i limfocytów do ściany naczynia [169]. Od czynników chemotaktycznych wytwarzanych przez śródbłonek oraz rodzaju cząstek adhezyjnych zależy jak szybko zapoczątkowany proces zapalny doprowadzi do powstania klinicznie jawnej blaszki miażdżycowej. Wpływ na zainicjowanie zapalenia poprzez ekspresję cząstek adhezyjnych, oraz późniejszą proliferację i różnicowanie komórek uczestniczących w tworzeniu blaszki miażdżycowej ma zaliczany do prozapalnych czynników transkrypcyjnych NF- κ B. Czynnikiem ten w fazie nieaktywnej, tzn. połączony z białkami inhibitorowymi, znajduje się w cytoplazmie większości komórek. W wyniku działania szeregu czynników takich jak zwiększenie stężenia ox-LDL w komórce, angiotensyny II (ang. *angiotensyn II*, AII), homocysteiny oraz cytokin m.in. interleukiny-1 (ang. *interleukin-1*, IL-1), interleukiny-6 (ang. *interleukin-6*, IL-6), oraz czynnika martwicy guza α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), następuje uwolnienie NF- κ B z połączeń z białkami inhibitorowymi i tym samym jego aktywacja. Obecność aktywnej formy NF- κ B wykazano w komórkach śródbłonka, mięśni gładkich oraz makrofagów w zmienionej

miażdżycowo ścianie naczynia, w przeciwieństwie do ściany zdrowej tętnicy [174,175]. Ponadto w wyniku zmiennych warunków hemodynamicznych w obrębie naczynia dochodzi również do ekspresji genów odpowiedzialnych za utrzymanie prawidłowego napięcia ściany tętnicy. W licznych opracowaniach wykazano wpływ niskiego naprężenia ścinającego na zwiększenie aktywności genów czynników prowadzących pośrednio do rozszerzenia jego ściany takich jak syntaza NO (ang. *epithelial nitric oxide synthase*, eNOS). Enzym ten katalizuje reakcję powstawania tlenku azotu (ang. *nitric oxide*, NO) z L-argininy poprzez oksydację jej N-końcowej guaniny. NO przenika do komórek mięśniówki naczyń, gdzie aktywuje rozpuszczalną cyklazę guanylową (ang. *soluble guanylyl cyclase*, sGC). Enzym ten katalizuje reakcję powstawania 3'5'cyklicznego monofosforanu guanozyny (ang. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP). Na drodze zależnej od kinaz białkowych fosforylacji transmembranowych białek transportowych, a następnie zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, cGMP prowadzi do zahamowania czynności białek kurczliwych w komórce mięśniowej [176,177]. Tlenek azotu posiada również działanie parakryne poprzez zmniejszenie agregacji i adhezji płytek krwi do śródbłonka naczyniowego. Jako antyoksydant reaguje z wolnymi rodnikami, ograniczając powstawanie utlenionych form lipoprotein o małej gęstości, jest tym samym bardzo nietrwały, a jego okres połowicznego półtrwania, do czasu inaktywacji przez hemoglobinę, sięga kilku sekund. Zmniejszenie syntezy i biodostępności NO prowadzi zatem do szeregu zaburzeń procesów czynnościowych i metabolicznych zachodzących z jego udziałem [178,179]. Do innych czynników prowadzących do rozszerzenia naczynia należą śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (ang. *endothelium derived hyperpolarizing factor*, EDHF), prostacyklina (ang. *prostaglandin I2*, PGI₂) oraz fosfoproteina stymulowana przez związki rozszerzające naczynia (ang. *vasodilator-stimulated phosphoprotein*, VASP). Z drugiej strony pod wpływem naprężenia ścinającego na ścianę naczynia dochodzi do aktywacji genów czynników naczynioskurczowych takich jak endotelina 1 [180]. Aktywacji ulegają również transkrypcja i translacja genu konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin convertase enzyme*, ACE), co w konsekwencji powoduje nadmierny naczynioskurczowy efekt angiotensyny II w wyniku lokalnie zwiększonej aktywności układu renina-angiotensyna [181].

Nieuszkodzony śródbłonek naczyniowy warunkuje prawidłową hemostazę. Potencjał profibrynolityczny powierzchni naczynia zapewnia syntetyzowany przez endotelium tkankowy aktywator plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator*, t-PA) oraz urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. *urokinase plasminogen activator*, u-PA).

W obecności fibryny nasila on przekształcenie plazminogenu w plazminę. Synteza plazminy może się odbywać bez udziału fibryny, w wyniku związania t-PA i plazminogenu z występującym w śródbłonku koreceptorem aktywującym, jakim jest aneksyna II. W warunkach prawidłowych widoczna jest znaczna przewaga aktywatorów plazminogenu nad inhibitorami aktywatorów plazminogenu. Ponadto główną funkcją śródbłonka jest hamowanie syntezy trombiny oraz czynników IXa, Xa, XIa i XIIa, dzięki interakcjom siarczanu heparanu i heparyny z wydzielaną przez endotelium antytrombiną III (ang. *antytrombin III*, AT III). Ponadto przy udziale białka C, który jest kofaktorem białka S, następuje inaktywacja czynników Va i VIIa. Na powierzchni śródbłonka występuje również inhibitor zależny od czynnika Xa (ang. *tissue factor pathway inhibitor*, TFPI), który po związaniu czynnika Xa ogranicza powstawanie kompleksu czynnika VIIIa i czynnika tkankowego. Komórki śródbłonka po stymulacji przez mediatory układu krzepnięcia (m.in. plasminę, trombinę) oraz mediatory stanu zapalnego (leukotrieny, cytokiny prozapalne, TNF α , antygeny wirusowe, endotoksyny, histaminę) wydzielają czynnik von Willebranda (ang. *von Willebrand Factor*, vWF), będący nośnikiem czynnika VIII, oraz pośredniczący w adhezji płytek krwi do ściany naczynia. W wyniku wysokiego ciśnienia w naczyniach tętniczych oraz znacznej prędkości przepływu krwi, większe komórki płyną środkiem strumienia, natomiast mniejsze bardziej obwodowo. Powoduje to *de facto* toczenie się płytek krwi po powierzchni śródbłonka za pośrednictwem interakcji receptora GpIb (glikoproteina Ib) obecnego na powierzchni płytek, z czynnikiem von Willebranda. Zaburzenie przepływu i uszkodzenie śródbłonka charakteryzuje się zwiększoną ekspresją vWF oraz odsłonięciem kolagenu i glikoprotein błony podstawnej. Pozornie nietrwałe połączenia pomiędzy receptorem GpIb, przy zwiększonej ilości vWF, aktywują drogi wewnątrzsygnałowe płytek prowadząc do zmiany konformacji w zakresie receptora GpIIb/IIIa. Płytki uzyskują zdolność do trwałego związania z fibrynogenem, kolagenem podśródbłonkowym oraz czynnikiem von Willebranda. Prowadzi to do trwałego zakotwiczenia płytek na powierzchni śródbłonka oraz wytworzenia przyściennego zakrzepu [182].

1.2.3.2. Lipidowa teoria powstawania miażdżycy

Obecnie związek pomiędzy miażdżycą, a zaburzeniami metabolizmu lipoprotein w organizmie człowieka nie budzi kontrowersji. Zwolennicy teorii lipidowej powstawania miażdżycy zgodnie twierdzą, iż istotą powstawania płytki miażdżycowej jest nadmierny wychwyty cholesterolu oraz jego gromadzenie początkowo w przestrzeni podśródbłonkowej a następnie w makrofagach. Głównym nośnikiem cholesterolu stanowiącego budulec blaszki miażdżycowej jest LDL. Działanie wolnych rodników, wynikające z obniżenia ilości naturalnych antyoksydantów w krążeniu, powoduje powstanie minimalnie zmodyfikowanych LDL (m-LDL) już w świetle naczynia. Na podstawie licznych badań udowodniono, że te częściowo utlenione lipoproteiny zwiększają przepuszczalność komórek śródbłonka. W błonie wewnętrznej naczyń tętniczych LDL oraz mLDL ulegają dalszym procesom biochemicznym. Początkowo dzięki zawartej w otoczce apolipoproteinie-B (apo-B), zawierającej aminokwasy, głównie argininę i lizynę o dodatnim ładunku, łączą się z ujemnymi grupami siarczanowymi proteoglikanów będących składnikiem macierzy pozakomórkowej. Połączenie z proteoglikanami blokuje dalsze przechodzenie LDL w głąb ściany naczynia [170]. Komórki śródbłonka, a w mniejszym stopniu komórki mięśniowe błony środkowej naczynia, produkują wolne rodniki, w wyniku których powstają hydroksynadtlenki cholesterolu, nadtlenki nienasyconych kwasów tłuszczowych i fosfolipidów. Utlenione w ten sposób LDL (ox-LDL) bierze udział w szeregu procesów indukujących powstanie blaszki miażdżycowej. Cząsteczki ox-LDL prowadzą do dysfunkcji komórek śródbłonka naczyń. Obecna w ścianie otoczki ox-LDL lizofosfatydylocholina indukuje ekspresję cząsteczek adhezyjnych VCAM-1 i ICAM-1 na powierzchni endotelium, co powoduje migrację monocytów oraz limfocytów do błony wewnętrznej naczynia [80]. Ponadto pod wpływem ox-LDL komórki śródbłonka zwiększają syntezę inhibitora aktywatora plazminogenu (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1), zmniejszając jednocześnie syntezę trombospondyny oraz tkankowego aktywatora plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator*, tPA), co w konsekwencji zaburza równowagę układu krzepnięcia [183,184]. Ox-LDL wpływają również na wazodylatację naczyń zależną od śródbłonka poprzez zmniejszenie biodostępności tlenku azotu, stymulowanie wydzielania endoteliny-1 oraz upośledzenie syntezy prostacyklin. W konsekwencji naczynia częściowo tracą elastyczność i zdolność do remodelowania ściany tętnicy przeciwległej do blaszki miażdżycowej. Prowadzi to do zwiększenia zaburzeń przepływu krwi przez naczynie, co skutkuje silniejszym

uszkodzeniem śródbłonka naczyniowego przez turbulentny przepływ krwi oraz tworzeniem zakrzepów przyściennych [185].

1.2.3.3. Zapalna teoria indukcji miażdżycy

Po raz pierwszy hipotezę o zapalnym podłożu miażdżycy zaproponował w roku 1998 Russel Ross. Zwrócił on uwagę na budowę blaszki miażdżycowej począwszy od najwcześniejszych etapów jej powstawania. Na podstawie badań patomorfologicznych udowodnił istnienie podśródbłonkowych nacieczeń tłuszczowych w naczyniach tętniczych niemowląt i małych dzieci. Struktury te składają się wyłącznie ze skupisk monocytów, makrofagów oraz limfocytów T CD4+ [186]. Jak już wcześniej wspomniano, toczenie się leukocytów po powierzchni śródbłonka odbywa się głównie za pomocą VCAM. Ligandem dla niej jest obecny jedynie na limfocytach i makrofagach VLA, co tłumaczy selektywną rekrutację powyższych komórek na wczesnym etapie powstawania blaszki miażdżycowej. Późniejsze badania wykazały, iż obecny na limfocytach ligand CD40 L aktywuje receptor CD40 w błonie komórkowej śródbłonka, co w konsekwencji dodatkowo nasila ekspresję cząsteczek adhezyjnych VCAM i ICAM, selektyny E oraz czynnika tkankowego. Co ciekawe na powierzchni limfocytów aktywowanych w przewlekłym procesie zapalnym pojawia się szereg ligandów dla selektyny E: ESL-1 (ang. *E-selectin ligand*), PSGL-1 (ang. *P-selectin glycoprotein ligand*) [187,188] oraz CLA (ang. *cutaneous lymphocyte antigen*) [189,190]. Obecne w blaszce miażdżycowej limfocyty uwalniają szereg cytokin takich jak: interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6), interferon- γ (INF- γ) oraz czynnik martwicy guza- α (TNF- α) [169,191]. Kluczową rolę w dalszym rozwoju blaszki miażdżycowej pełnią monocyty i makrofagi. Pod wpływem stresu oksydacyjnego w komórkach śródbłonka dochodzi do wzmożonej syntezy białka chemotaktycznego monocytów (ang. *monocyte chemotactic protein 1*, MCP-1), czynnika stymulującego kolonie makrofagów (ang. *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) oraz czynnika stymulującego wzrost granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) [125,143,190]. Obecność MCP-1 oraz zwiększona ekspresja cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka, umożliwia adhezję krążących we krwi monocytów oraz ich migrację do ściany naczynia. Następnie w wyniku działania M-CSF oraz GM-CSF następuje różnicowanie monocytów do makrofagów, co wiąże się z pojawieniem na ich powierzchni szeregu receptorów zmiatających (ang. *scavenger receptor*, SR). Równolegle dochodzi do zwiększenia przepuszczalności ściany naczynia dla lipoprotein oraz ich akumulacji w błonie wewnętrznej. Aktywny proces zapalny rozwijający się

podśródbłonkowo, powoduje powstanie stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji prowadzi do utleniania kwasów tłuszczowych LDL. Utworzone w ten sposób oxy-LDL są wiązane poprzez receptory SR, a następnie fagocytowane. W odróżnieniu od fizjologicznego działania receptora apoB/E, którego aktywność maleje wraz ze wzrostem cholesterolu w komórce, działanie receptorów zmiatających nie podlega takim regulacjom. Prowadzi to do dalszego wchłaniania oxy-LDL, oraz uwalniania wewnątrz komórki cholesterolu, który następnie ulega estryfikacji przy współdziałaniu enzymu ACAT (ang. *Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase*). To właśnie wzrastające stężenie estrów cholesterolu powoduje przekształcenie makrofagów w komórki piankowate. Proces dalszej fagocytozy oxy-LDL nie zostaje zahamowany, co w konsekwencji prowadzi do wytrącania się kryształów wolnego cholesterolu we wnętrzu komórek piankowatych, pęknięcia ich błony i tworzenia pozakomórkowych złogów cholesterolu, tzw. rdzenia lipidowego blaszki miażdżycowej [105,116,153,155].

Szereg badań molekularnych komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych wskazuje na swego rodzaju swoistość reakcji limfocytów i makrofagów na konkretny antygen bakteryjny, bądź wirusowy. Wykazano, iż receptory limfocytów T znalezione w zmienionych miażdżycowo ścianach naczyń tętniczych, wykazują aktywność względem określonej liczby antygenów. W komórkach śródbłonka naczyniowego oraz aktywowanych limfocytach T wykryto materiał genetyczny HCMV [192,193], natomiast w makrofagach oraz w rdzeniu lipidowym blaszki miażdżycowej - DNA *Chlamydia pneumoniae* [194]. Co ciekawe obok czynników infekcyjnych również utlenione formy LDL mogą być rozpoznawane jako obce antygeny i indukować powstanie swoistych przeciwciał anti-LDL [195–197].

1.2.4. Immunologiczne podstawy rozwoju miażdżycy

1.2.4.1. Rola monocytów i makrofagów w patogenezie miażdżycy

Makrofagi stanowią najważniejszy element nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Ich działanie przebiega w dwojaki sposób. Dzięki obecności receptorów SR będących grupą białek błonowych makrofagi wiążą i fagocytują zmodyfikowane chemicznie polianiony, lipoproteiny (m.in. oxLDL) oraz komórki ulegające apoptozie. Fagocytoza drobnoustrojów odbywa się jednak dzięki receptorom rozpoznającym wzorce (ang. *pattern recognition receptors* PRR), z których najważniejszą grupą pozostają TLR. Ligandami dla TLR są struktury drobnoustrojów, tzw. wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP), niezbędne do ich funkcjonowania, a nieobecne w organizmach wyższych. Należą do nich m.in. lipopolisacharyd, oraz peptydoglikany

bakteryjnej ściany komórkowej, mannany ściany komórkowej drożdży czy składniki otoczki wirusów bądź też dwuniciowy RNA stanowiący genom niektórych z nich. Po rozpoznaniu swoistego PAMP, poprzez kaskady sygnałowe kinaz MAP, receptory toll-podobne aktywują makrofagi do wytwarzania cytokin prozapalnych takich jak: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 oraz TNF α [198–200]. W licznych badaniach wykazano, iż najważniejszą rolę w patogenezie miażdżycy pełnią IL-1 i TNF α . Stymulują one ekspresję śródbłonkowych cząsteczek adhezyjnych oraz zwiększają przepuszczalność komórek endotelium na lipoproteiny, przyczyniając się niejako do ich akumulacji w błonie wewnętrznej naczynia [201,202]. Ponadto w mechanizmie autoregulacji nasilają ekspresję SR-A oraz sekrecję M-CSF, stymulują śródbłonek oraz komórki mięśni gładkich do syntezy MCP-1 i IL-8, co jeszcze pobudza migrację leukocytów jednojądrzastych do błony wewnętrznej [199]. TNF α , a w szczególności IL-1 przyczyniają się także do zmiany fibrynolitycznej funkcji śródbłonka, zwiększając potencjał trombogenny endotelium, poprzez nasilenie syntezy PAI-1, a hamowanie t-PA. Ponadto cytokiny te, synergistycznie z IFN- γ , stymulują makrofagi, komórki śródbłonka oraz mięśni gładkich do produkcji silnego aktywatora zewnętrznej drogi krzepnięcia, jakim jest czynnik tkankowy [200]. W drodze autoregulacji IL-1 oraz TNF α zwiększają również zdolność makrofagów do produkcji reaktywnych form tlenu oraz mieloperoksydazy. Ich wysokie stężenie stwierdzono w blaszkach miażdżycowych począwszy od typu II wg AHA. Makrofagi posiadają również zdolność do syntezy IL-6, a poprzez działanie IL-1 i TNF α stymulują również komórki śródbłonka do syntezy tej cytokiny. IL-6 wpływa na aktywację i proliferację limfocytów B, oraz pobudza hepatocyty do nasilonej syntezy białek ostrej fazy, w tym CRP oraz fibrynogenu. Jak udowodniono w wielu badaniach stężenie CRP oraz IL-6 jest dwukrotnie wyższe u chorych z udowodnionymi zmianami miażdżycowymi w obrębie naczyń wieńcowych oraz w postaci niestabilnej choroby niedokrwiennej serca [80,202,203]. Wzrost poziomu IL-6 stwierdzano również w przypadkach rozwinięcia procesu miażdżycowego w naczyniach narządów przeszczepionych [204,205].

Makrofagi syntetyzują również czynniki wzrostowe m.in. płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) oraz insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1). Pobudzają one proliferację komórek mięśni gładkich błony środkowej oraz wyodrębnienie SMC o fenotypie sekrecyjnym, syntetyzujących kolagen oraz proteoglikany macierzy pozakomórkowej, co w konsekwencji prowadzi do utworzenia blaszki włóknistej i widocznego zwężenia światła naczynia. Wreszcie makrofagi, jako komórki układu APC (ang. *antigen presenting cell*),

w kontekście MHC II prezentują antygen limfocytom pomocniczym –Th CD4+, stymulując dalszą, już „swoistą”, odpowiedź zapalną w obrębie blaszki miażdżycowej [199,206].

1.2.4.2. Rola limfocytów w swoistej odpowiedzi immunologicznej w patogenezie miażdżycy

Wpływ na rozwój i progresję miażdżycy ma również, zależna od antygeny, swoista odpowiedź immunologiczna. W blaszce miażdżycowej, na jej wczesnym etapie tworzenia, wykazano obecność głównie komórek efektorowych oraz komórek pamięci, przy czym liczba aktywnych limfocytów T wzrastała w miarę rozwoju blaszki [106,199]. W badaniach z wykorzystaniem myszy transgenicznym stwierdzono, iż do prezentacji antygenów znajdujących się w blaszce miażdżycowej dochodzi głównie dzięki komórkom dendrytycznym. Podczas tego procesu dochodzi do stymulacji ekspresji cząstek prezentujących antygen (MHCI, MHCII) oraz cytokin zapalnych. Komórki dendrytyczne wędrują następnie do węzłów chłonnych, gdzie prezentują antygen „naiwnym” limfocytom T, co prowadzi do ich różnicowania. W momencie, gdy powstałe w ten sposób limfocyty T efektorowe lub limfocyty „pamięci” immunologicznej znajdują się w ścianie naczynia, ulegają wtórnej aktywacji przez komórki prezentujące antygen [207,208]. Nasilony proces zapalny prowadzi do przyspieszenia progresji zmian, znacznej destabilizacji blaszki miażdżycowej i jej pęknięcia. Efektywna aktywacja limfocytów T, poza połączeniem receptora TCR z fragmentami antygenów prezentowanych przez MHC, wymaga kostymulacji poprzez połączenie receptorów CD40L limfocytów z CD40 komórek prezentujących antygen. Udowodniono zwiększoną ekspresję receptora CD40 na komórkach śródbłonna, mięśni gładkich oraz makrofagach ściany tętnic objętych procesem miażdżycowym, w przeciwieństwie do zdrowych naczyń. Interakcja CD40L z CD40 powoduje aktywację komórek, na których znajdują się ww. receptory [209]. W przypadku komórek śródbłonna dochodzi do zwiększenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1, selektyny E) oraz uwalniania cytokin (IL-1, IL-6, IL-8). Aktywowane w ten sposób makrofagi uwalniają IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α oraz zwiększają syntezę ICAM-1 [199,210], wreszcie powyższe interakcje receptorowe prowadzą do powstania różnych subpopulacji limfocytów. W blaszce miażdżycowej dominują limfocyty CD4+, z których największą liczbę stanowią, odpowiedzialne za odpowiedź komórkową, limfocyty Th1. Wydzielają one przede wszystkim cytokiny o udowodnionym promiażdżycowym działaniu - IL-2, IFN γ oraz TNF α . Populacja limfocytów Th2, regulujących odpowiedź humoralną, stanowi znikomy odsetek komórek

stwierdzanych w blaszce miażdżycowej. Główną cytokiną o udowodnionym prozapalnym działaniu, produkowaną przez subpopulację limfocytów typu Th1 jest IFN- γ . Jest on silnym aktywatorem makrofagów, pobudza syntezę TF, stymuluje ekspresję śródbłonkowych cząstek adhezyjnych, oraz zwiększa tym samym rekrutację leukocytów jednojądrzastych do ściany naczynia. Ponadto stymuluje apoptozę komórek, przyczyniając się tym samym do osłabienia struktury blaszki miażdżycowej [168,172,199,210–212].

1.2.4.3. Cząsteczki adhezyjne jako markery dysfunkcji śródbłonka

Jak już wcześniej wspomniano wczesna faza rozwoju miażdżycy łączy się z aktywacją szeregu komórek układu odpornościowego oraz ich migracją do błony wewnętrznej naczynia. Proces ten zachodzi dzięki ekspresji białek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka oraz leukocytów krwi krążącej. Ich ekspresja ulega zwiększeniu pod wpływem szeregu wspomnianych mediatorów. Białka adhezyjne należą do nadrodziny immunoglobulin, a ich przedstawicielami są selektyny P, E i L, oraz międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna i naczyniowa cząsteczka adhezyjna. Do celów badawczych wykorzystywane są pomiary stężeń rozpuszczalnych form sICAM-1 (ang. *soluble intracellular adhesion molecule-1*) oraz sVCAM-1 (ang. *soluble vascular cell adhesion molecule-1*) [213–215]. W badaniach ARIC (The Atherosclerosis Risk In Communities) stwierdzono, że wzrost stężenia sICAM w surowicy krwi pacjentów ze stabilną postacią choroby niedokrwiennej serca, koreluje z ryzykiem rozwoju ostrego incydentu sercowo-naczyniowego [216]. Co ciekawe w innych badaniach potwierdzono znaczenie sICAM w prognozowaniu ryzyka rozwoju jawnej klinicznie postaci miażdżycy u zdrowych pacjentów dorosłych [217]. Ponadto stwierdzono dodatnią korelację między poziomami CRP, IL-6 oraz sICAM u pacjentów ze stabilną postacią choroby niedokrwiennej serca [203,214]. Podobne zależności stwierdzono w przypadku sVCAM. Osoczowe stężenie cząsteczek ICAM-1 i VCAM-1 spada wraz z wiekiem pacjenta. Co ciekawe ich ekspresja u dzieci z udowodnionymi wczesnymi zmianami miażdżycowymi w naczyniach tętniczych może być większa niż u pacjentów dorosłych z rozwiniętą chorobą niedokrwinną serca. Badania wykonane w populacji dziecięcej wykazały dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sICAM-1 i sVCAM-1 a poziomem triglicerydów i LDL we krwi pacjentów [214,218,219]. Ponadto podwyższone stężenie sICAM-1 występuje u pacjentów z cukrzycą typu I, nadciśnieniem tętniczym [220,221] oraz hipercholesterolemią rodzinną [222,223]. U tych dzieci stwierdzono również dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sICAM-1, a grubością kompleksu intima-media

(ang. *intima-media thickness*, IMT) oraz upośledzeniem rozszerzalności naczyń (ang. *flow-mediated vasodilation*, FMD) [214,224,225].

1.2.4.4. Cytokiny w patogenezie miażdżycy

Pierwsze doniesienia o udziale cytokin w patogenezie miażdżycy pojawiły się w 1980. roku w publikacji Hanssona i współpracowników. Stwierdzono wówczas, że komórki blaszki miażdżycowej wykazuje zwiększoną ekspresję antygeny HLA-DR, pod wpływem podwyższonego stężenia interferonu gamma [226]. W późniejszych badaniach przeprowadzanych w różnych ośrodkach klinicznych na całym świecie, w blaszkach miażdżycowych usuniętych z naczyń tętniczych osób dorosłych, wykazano zwiększone stężenie IL-1 [227–229], IL-6 [230], TNF- α , MCP- 1 , IFN- γ , PDGF [231,232] oraz M-CSF [233]. Ponadto stwierdzono, że wzrost poziomu cytokin prozapalnych we krwi pacjenta koreluje z zaawansowaniem procesu miażdżycowego w naczyniach tętniczych chorego. Charakterystykę poszczególnych z nich przedstawia poniższa tabela.

Tabela 1. Cytokiny uczestniczące w patogenezie zmian miażdżycowych

Cytokina	Komórka syntetyzująca	Komórka efektorowa	Funkcja
IL-1β	Makrofagi Limfocyty Komórki śródbłonna	Komórki śródbłonna	Wzrost ekspresji ICAM, VCAM, selektyn Wzrost przepuszczalności dla lipoprotein Wzrost syntezy TF
		Komórki mięśni gładkich	Stymulacja proliferacji
		Monocyty	Stymulacja proliferacji i różnicowania
IL-2	Aktywowane Limfocyty T	Makrofagi	Wzrost syntezy TGF- β
		Limfocyty T	Aktywacja limfocytów Th1
		Komórki NK	Wzrost aktywności
IL-4	Limfocyty Th2 Mastocyty	Limfocyty B	Stymulacja proliferacji i różnicowania
		Limfocyty Th1	Hamowanie odpowiedzi Th1
IL-6	Makrofagi Limfocyty T i B Komórki śródbłonna	Komórki śródbłonna	Wzrost ekspresji ICAM, VCAM Działanie prokoagulacyjne
		Komórki mięśni gładkich	Stymulacja proliferacji
		Hepatocyty	Synteza białek ostrej fazy
IL-10	Makrofagi Limfocyty Th2	Makrofagi	Hamowanie syntezy IL-6, IFN γ , TNF α
		Limfocyty Th1	Hamowanie odpowiedzi Th1
		Limfocyty regulatorowe	Stymulacja proliferacji i różnicowania

Cytokina	Komórka syntetyzująca	Komórka efektorowa	Funkcja
TNF-α	Makrofagi Limfocyty T i B Komórki mięśni gładkich	Działanie plejotropowe	Stymulacja wydzielania IL-1, IL-6, MCP-1 Wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych Synteza białek ostrej fazy Stymulacja proliferacji i różnicowania komórek śródbłonna, monocytów, komórek mięśni gładkich
IFN-γ	Limfocyty Th1 Komórki NK	Limfocyty Th1	Wzrost syntezy IL-2, IFN γ , TNF α w mechanizmie dodatniego sprzężenia zwrotnego
		Komórki mięśni gładkich	Zmniejsza syntezę macierzy pozakomórkowej
M-CSF	Makrofagi Komórki śródbłonna	Komórki układu monocytarnego	Proliferacja i różnicowanie

1.2.5. Rola czynników infekcyjnych w rozwoju miażdżycy

Koncepcja infekcyjnego podłoża miażdżycy pojawiła się już na początku XX. wieku, jednakże dopiero w 1978 roku opublikowano pierwsze doniesienie o wpływie zakażenia komórek śródbłonna naczyniowego ptasim wirusem opryszczki (ang. *avium herpes simplex virus* - AHSV) na indukcję zmian miażdżycowych w naczyniach tętniczych u ptaków [234]. Od tamtego czasu o możliwy udział w patogenezie miażdżycy podejrzewano kilka patogenów, między innymi *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, wirus zapalenia wątroby typu A (ang. *hepatitis A virus* - HAV), wirusy opryszczki typu 1 i 2, czy wirus grypy [235–239]. Największe znaczenie przypisywano jednak dwóm z nich: HCMV oraz *Chlamydia pneumoniae*. Początkowo sądzono, że poszczególne bakterie oraz wirusy mogą wywoływać miażdżycę poprzez bezpośredni mechanizm uszkodzający śródbłonek naczyniowy, lub autoimmunologiczne mechanizmy mimikry molekularnej. Jako główny mechanizm stymulujący proces tworzenia blaszki miażdżycowej przyjęto rozpoznawanie przez TLR specyficznych ligandów bakteryjnych i podtrzymywanie procesu zapalnego, dzięki zwiększonej syntezie NF- κ B [118,228,232,237,240,241]. Mechanizm taki udowodniono w związku z zakażeniem *Chlamydia pneumoniae*. Na podstawie badań *in vitro* w oparciu o hodowlę ludzkich fibroblastów i monocytów stwierdzono, iż ligandem dla TLR makrofagów jest lipopolisacharyd *Chlamydia pneumoniae* oraz białko HSP60 (ang. *heat shock protein 60*). Ponadto obecność genomu *Chlamydia pneumoniae* potwierdzono

w badaniach metodą PCR materiału z ludzkich blaszek miażdżycowych [194,235,236,242,243].

Pierwsze doniesienia o wpływie zakażenia HCMV na patogenezę miażdżycy i dalej choroby niedokrwiennej serca pochodzą z badań Melnick'a i współpracowników z lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku. W komórkach mięśni gładkich wyizolowanych z blaszek miażdżycowych pacjentów z objawową chorobą niedokrwinną serca, stwierdzono obecność genomu wirusa. Ponadto komórki te charakteryzowały się wysoką ekspresją antygenów HCMV na powierzchni błony komórkowej [244,245]. Badania nad patogenezą miażdżycy, prowadzone symultanicznie w różnych ośrodkach medycznych na świecie, prowadziły do podobnych wniosków. Kamieniem milowym dociekań naukowców stało się jednak stwierdzenie aktywnej replikacji HCMV w śródbłonku naczyń tętnicznych u pacjentów z aktywną restenozą naczyń tętnicznych po zabiegach angioplastyki [246–248], oraz w tętnicach narządów przeszczepionych [249–254]. W badaniu ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities), potwierdzono związek pomiędzy poziomem przeciwciał przeciwko HCMV, a ryzykiem rozwinięcia miażdżycy naczyń tętnicznych. Wykazano, że podwyższony poziom obu klas przeciwciał anti-HCMV we krwi pacjenta ściśle koreluje z wskaźnikiem IMT [255]. Doniesienia o wpływie wirusa cytomegalii na inicjowanie procesów prowadzących do powstania blaszki miażdżycowej pochodzą również z badań na modelu zwierzęcym. W badaniach molekularnych nad wpływem zakażenia szczurzego wirusa cytomegalii (ang. *rat cytomegalovirus* - RCMV) na cytoarchitekturę i funkcję śródbłonka naczyniowego aorty szczurów, stwierdzono obecność zaawansowanych zmian miażdżycowych pomimo braku pozostałych, klasycznych czynników ryzyka miażdżycy. Stopień rozwinięcia blaszek miażdżycowych okazał się być większy, w porównaniu z blaszkami szczurów karmionych dietą bogatocholesterolową. Ponadto stwierdzono znaczną niestabilność blaszek miażdżycowych szczurów zainfekowanych RCMV, wynikającą z współistnienia aktywnego nacieku zapalnego w obrębie błony wewnętrznej naczynia [256,257]. W badaniach *in vitro* potwierdzono wpływ zakażenia HCMV na zwiększoną ekspresję śródbłonkowych cząsteczek adhezyjnych oraz cytokin prozapalnych i czynników wzrostu w tym PDGF. W blaszkach miażdżycowych zainfekowanych HCMV stwierdzono nasilenie proliferacji SMC w obrębie błony wewnętrznej naczynia. Ponadto wykazano wpływ zakażenia na zwiększenie ekspresji receptora zmiatającego klasy A (ang. *scavenger receptor-A*, SR-A) na powierzchni makrofagów, co znacząco zwiększało akumulację wewnątrzkomórkowych lipidów i prowadziło do tworzenia komórek piankowatych [258,259]. Nowego narzędzia doświadczalnego dostarczyło wyhodowanie myszy transgenicznych pozbawionych genu apoE

(ang. *apoE*^{-/-} mouse), charakteryzujących się tendencją do spontanicznego rozwijania zmian miażdżycowych. Zainfekowanie zwierząt MCMV spowodowało progresję zmian miażdżycowych. Według protokołu w powyższym badaniu zarażano myszy po osiągnięciu przez nie wieku dwóch tygodni. W wieku tym układ odpornościowy tych zwierząt jest jeszcze nie w pełni dojrzały, co ogranicza nieco wagę powyższych wniosków [260]. W późniejszych, przeprowadzonych przez Rott'a i współpracowników badaniach stwierdzono, iż nasilenie zmian miażdżycowych w krótkim czasie od infekcji HCMV występuje jedynie u osób z upośledzonymi mechanizmami odporności [261]. Co ciekawe kolejne badania na modelu mysim *apoE*^{-/-} z roku 2004, udowodniły długofalowy wpływ infekcji MCMV na indukcję zmian miażdżycowych w łuku aorty u osobników immunokompetentnych [262]. Obecnie wpływ zakażenia HCMV na patogenezę miażdżycy nie budzi już takich kontrowersji. W dalszym ciągu jednak pomimo dysponowania skutecznym lekiem stosowanym w aktywnej fazie zakażenia, latentne postaci HCMV nadal pozostają poza możliwościami terapeutycznymi. Tak długo, jak długo nie uda się stworzyć skutecznego leczenia postaci latentnej zakażenia HCMV, nie ograniczymy jego wpływu na procesy miażdżycowe.

1.2.6. Czynniki ryzyka miażdżycy

Koncepcja czynników ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych powstała po raz pierwszy na podstawie badań The Framingham Heart Study [161], z czasem określano kolejne, mogące mieć wpływ na rozwój procesu miażdżycowego, wśród których najważniejszą grupę stanowią tak zwane czynniki klasyczne. Należą do nich zarówno czynniki poddające się, jak i nie poddające modyfikacji (Tabela 2).

Tabela 2. Czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy

Czynniki modyfikowalne	Czynniki niemodyfikowalne	Styl życia
<ul style="list-style-type: none"> • Dyslipidemia • Cukrzyca • Nadciśnienie • Otyłość • Zespół metaboliczny • Homocysteinemia • Czynniki 	<ul style="list-style-type: none"> • Wiek • Płeć • Wywiad rodzinny przedwczesnego występowania chorób sercowo-naczyniowych • Obecność choroby 	<ul style="list-style-type: none"> • Dieta • Palenie tytoniu • Mała aktywność fizyczna

Czynniki modyfikowalne	Czynniki niemodyfikowalne	Styl życia
prozakrzepowe <ul style="list-style-type: none"> • Markery procesu zapalnego 	sercowo-naczyniowej, lub innej na podłożu miażdżycy <ul style="list-style-type: none"> • Markery genetyczne 	

W celu prowadzenia pierwotnej i wtórnej prewencji chorób sercowo-naczyniowych, w Europie opracowano system oceny 10-letniego ryzyka zgonu dla zdrowej populacji na podstawie tablic SCORE (ang. *Systematic Coronary Risk Evaluation*). Uwzględniają one pięć klasycznych czynników ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych: wiek, płeć, skurczowe ciśnienie tętnicze, stężenie cholesterolu oraz palenie tytoniu. Tablice SCORE opracowano w dwóch wersjach, dla krajów z niskim i wysokim ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych, do których zalicza się Polska [263]. W roku 2002 przeprowadzone badania NATPOL III PLUS (Nadciśnienie Tętnicze w Polsce Plus Zaburzenia Lipidowe i Cukrzyca) ujawniły znacznie częstsze niż sądzono występowanie w populacji polskiej nadciśnienia tętniczego i zaburzeń lipidowych [264]. W 2004 roku opublikowano wyniki badania INTERHEART, przeprowadzone w oparciu o grupę prawie 30 tysięcy pacjentów z 52. krajów świata, po niedawno przeżytym zawale serca. Wykazały one, że to właśnie dziewięć z potencjalnie poddających się modyfikacji czynników ryzyka, takich jak nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia, cukrzyca, otyłość trzewna, dieta, palenie tytoniu, spożycie alkoholu, aktywność fizyczna odpowiada za blisko 90-procentowe ryzyko zawału serca [265].

Wobec udowodnionego początku miażdżycy w pierwszych dwóch dekadach życia człowieka, prewencja chorób sercowo-naczyniowych wieku dorosłego powinna mieć swój początek w dzieciństwie. W badaniach PDAY (The Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Research Group) potwierdzono, iż miażdżyca rozwija się już w wieku dziecięcym, a jej progresja zależy od tych samych czynników co u ludzi dorosłych [266]. Obecnie jednym z najważniejszych klasycznych czynników ryzyka miażdżycy jest cukrzyca. W ciągu ostatnich kilkunastu lat odnotowano wzrost zachorowalności na cukrzycę typu 1 i typu 2 wśród dzieci i młodzieży. W przypadku tych pacjentów, mamy do czynienia ze zdecydowanie wyższym wskaźnikiem śmiertelności z powodu incydentów sercowo-naczyniowych niż w populacji ogólnej, między innymi wynikającym ze znacznie szybszego rozwoju miażdżycy u tych chorych. Zgony z powodu choroby niedokrwiennej

serca u pacjentów chorych na cukrzycę typu 1, dotyczyły już osób 31-35-letnich, natomiast w wieku 55 lat skumulowany wskaźnik umieralności z powodu choroby niedokrwiennej serca wynosił 35% w tej grupie [267,268].

W badaniu PDAY w latach 1986-1996 u 2876 osób stwierdzono, że zmiany w błonie wewnętrznej pod postacią nacieczeń tłuszczowych występują we wszystkich tętnicach, w 50% natomiast dotyczą prawej tętnicy wieńcowej (wiek grupy badanej: 15-19 lat). Stwierdzono również dodatnią korelację pomiędzy aterogennym profilem lipidowym, a grubością kompleksu IMT i zmianami w ścianach tętnicznych stwierdzanych w badaniu autopsyjnym [266]. Zgodnie z wytycznymi WHO leczenie zaburzeń lipidowych powinno być rozważane u dzieci przy poziomie LDL > 4,1 mmol/l, a przy więcej niż jednym czynniku ryzyka miażdżycy lub cukrzycy nawet poniżej 3,4 mmol/l [269]. W badaniach PDAY nasilenie zmian miażdżycowych zależało także od pozostałych elementów zespołu metabolicznego jakim jest podwyższone stężenie triglicerydów (≥ 110 mg/dl), obniżone stężenia HDL-cholesterolu (<40 mg/dl) we krwi pacjenta, glikemia na czczo przekraczająca 110 mg/dl, czy otyłość brzuszna z obwodem talii przekraczającym 90. centyl na siatce centylowej [266]. Wyniki badań Bogalusa Heart Study wykazały jednoznacznie, że wzrost ciśnienia u dzieci, młodzieży i młodych dorosłych koreluje z rozwojem zmian miażdżycowych. Badaniem objęto 200 zmarłych osób, zwykle w wyniku wypadków komunikacyjnych. Uzyskana wcześniej wiedza o czynnikach ryzyka miażdżycy, występujących u tych osób, pozwoliła udowodnić, że skurczowe i rozkurczowe nadciśnienie tętnicze, podwyższone stężenie lipidów we krwi oraz podwyższony wskaźnik masy ciała są odpowiedzialne za rozległość wczesnych zmian miażdżycowych obserwowanych w naczyniach tętnicznych [270]. W przypadku dzieci i młodzieży nadciśnienie tętnicze rozpoznaje się, gdy powtarzalne pomiary wartości ciśnień przekraczają 95. centyl na siatce centylowej uwzględniającej płeć, wiek i wzrost pacjenta. Pomiary pomiędzy 90. a 95. centylem określa się obecnie, jako stan przednadciśnieniowy (ang. *prehypertension*), będący fazą wstępną choroby nadciśnieniowej, nie jak kiedyś sądzono mechanizmem adaptacji krążenia do etapu dojrzewania [269]. Ponadto w wielu badaniach wykazano dodatnią korelację pomiędzy nadciśnieniem tętniczym u dzieci, a wskaźnikami IMT [271,272] oraz wzrostem masy lewej komory serca [273]. W badaniach przeprowadzanych na populacji osób dorosłych stwierdzono, że siedzący tryb życia, w szczególności u mężczyzn chorujących na cukrzycę, aż trzykrotnie zwiększa ryzyko zgonu z powodu chorób sercowo-naczyniowych. Zarówno u dorosłych, jak u dzieci zwiększenie intensywnego (odpowiednik

6 równoważników metabolicznych) wysiłku fizycznego do 20 min dziennie, trzy razy w tygodniu znacząco obniżyło wartości zaburzonych parametrów lipidowych, jak również zwiększyło wrażliwość komórek na insulinę [274]. Wykazano również niekorzystne skutki narażenia zarówno czynnego i biernego na dym tytoniowy u dorosłych i dzieci. Według różnych źródeł 15-37% ciężarnych w krajach rozwiniętych pali, pomimo wiedzy na temat skutków nałogu dla zdrowia swojego i dziecka. Czynne palenie w ciąży prowadzi do przedwczesnych zmian degeneracyjnych naczyń łożyska, co w konsekwencji prowadzi do przewlekłego niedotlenienia i hipotrofii płodu. W ten sposób, już na początku życia dziecko narażone jest na wcześniejszy rozwój zmian miażdżycowych, gdyż właśnie niska masa urodzeniowa i niedotlenienie w życiu płodowym są uznanymi czynnikami przyspieszającymi powstawanie nacieczeń tłuszczowych w ścianie tętnic [275,276]. Dalsze narażenie bierne na dym tytoniowy zwiększa ryzyko chorób sercowo-naczyniowych o 30%. Toksyczność tak zwanego dymu strumienia bocznego, jest większa niż dymu częściowo filtrowanego, wdychanego przez palacza. Badania Whincup i wsp. opublikowane w 2004 roku w dwudziestoletniej obserwacji prospektywnej wykazały, że ryzyko rozwinięcia choroby niedokrwiennej serca przez osoby narażone na dym tytoniowy, jest co najmniej tak duże, jak u osób rzeczywiście palących do dziewięciu papierosów dziennie [277]. W badaniach Barnoya i wsp. we krwi nastolatków codziennie narażonych biernie na dym tytoniowy, stwierdzono podwyższony poziom fibrynogeny, CRP, natomiast obniżony poziom HDL-cholesterolu. Ponadto wykazano, iż narażenie na dym tytoniowy przyczynia się znacznie do ograniczenia naturalnej ochrony antyoksydacyjnej, a tym samym sprzyja tworzeniu blaszek miażdżycowych w naczyniach tętniczych dzieci i młodzieży [278].

1.2.7. Metody nieinwazyjnej oceny zmian miażdżycowych

W obliczu udowodnionego rozwoju zmian miażdżycowych w naczyniach tętniczych począwszy od wczesnego dzieciństwa, pojawiła się konieczność poszukiwań nieinwazyjnych metod badawczych, pozwalających ocenić zaawansowanie tych zmian u dzieci. Doskonałym narzędziem diagnostycznym okazała się być ultrasonografia. Obecnie dwa parametry ultrasonograficzne są uznawane za wiarygodny marker subklinicznej miażdżycy tętnic:

- i) ocena grubości warstwy środkowej i wewnętrznej ściany tętnicy szyjnej wspólnej-
IMT (ang. *intimal-medial thickness*)
- ii) ocena rozszerzalności tętnicy ramiennej w następstwie reaktywnego przekrwienia-
FMD (ang. *flow mediated dilatation*).

Do przeprowadzenia powyższych pomiarów wykorzystuje się aparaty ultrasonograficzne z sondą linearną, emitującą ultradźwięki o częstotliwości minimum 7MHz. Badania te są nieinwazyjne, dość łatwe do wykonania, tanie, a przede wszystkim charakteryzuje je duża czułość i powtarzalność.

1.2.7.1. Ocena IMT

Do pogrubienia IMT prowadzą już wczesne zmiany miażdżycowe związane z rekrutacją mononuklearów w błonie wewnętrznej, gromadzeniem lipoprotein oraz tworzeniem komórek piankowatych [224]. Pierwsze doniesienia o przydatności oceny grubości warstwy środkowej i wewnętrznej ściany tętnicy pochodzą z badań Pignoli i współpracowników. Porównano w nich uzyskany w badaniach ultrasonograficznych obraz ściany aorty brzusznej oraz tętnicy szyjnej wewnętrznej z ich budową makro- i mikroskopową. Zgodność powyższych obrazów sięgała 77% [279,280]. Obecnie dzięki zastosowaniu ultrasonografii wysokiej rozdzielczości, z badaniem dopplerowskim znakowanym kolorem i metodą fali impulsowej odsetek rzeczywistych pomiarów sięga 95% [281,282]. Najczęściej pomiarów dokonuje się obustronnie w tętnicy szyjnej wspólnej poniżej 1cm od opuszki, w obrębie opuszki tętnicy szyjnej wspólnej, oraz w odległości 1cm od rozwidlenia w tętnicy szyjnej wewnętrznej. Tętnice szyjne, jako naczynia elastyczne z niskooporowym spectrum przepływu, charakteryzują się stosunkowo niewielką grubością błony mięśniowej w porównaniu z tętnicami obwodowymi, stąd zwiększenie kompleksu IMT, odzwierciedla pogrubienie głównie błony wewnętrznej naczynia. Pomiary IMT w obrębie tętnic szyjnych wspólnych znalazły ugruntowane miejsce w szacowaniu zagrożenia przedwczesnym rozwojem miażdżycy zarówno u dorosłych, jak i u dzieci [283]. Wartości te zwiększają się wraz z wiekiem pacjenta (ok. 0,01-0,02mm/rok), oraz są nieznacznie wyższe u płci męskiej [281]. U zdrowych osób dorosłych zwiększone ryzyko wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych związane jest, jak podają niektórzy autorzy z grubością IMT rzędu 10mm. Co ciekawe udowodniono, iż w przypadku współistnienia więcej niż jednego czynnika ryzyka choroby sercowo-naczyniowej, wartość punktu odcięcia w stratyfikacji ryzyka powikłań narządowych miażdżycy spada do $IMT \leq 8mm$ [284–287]. U dzieci z otyłością prostą i nadciśnieniem tętniczym stwierdza się znacząco wyższe wartości IMT w porównaniu ze zdrowymi rówieśnikami [146,272,288–291]. W przypadku pacjentów z cukrzycą (typu 1 i 2) [146,272,292,293], oraz hipercholesterolemią rodzinną stwierdzono ponadto dodatnią korelację pomiędzy IMT, a stężeniem LDL oraz triglicerydów, ujemną natomiast

w odniesieniu do HDL [146,292]. Również u dzieci z wywiadem rodzinnym obciążonym wczesnie występującymi chorobami układu sercowo-naczyniowego wartości IMT są nieznacznie większe [294–296]. Wreszcie pogrubienie kompleksu intima-media obserwowano wtórnie do uszkodzenia śródbłonna naczyniowego przez infekcje bakteryjne i wirusowe w tym HCMV [255,297,298].

1.2.7.2. Ocena FMD

Ocena rozszerzalności tętnicy ramiennej w wyniku przekrwienia biernego (FMD), jest badaniem trudniejszym do wykonania od oceny IMT. Z uwagi na brak standaryzacji metody stanowi raczej narzędzie badań naukowych, niż oceny klinicznej. Badanie polega na wywołaniu przekrwienia biernego przez zaciśnięcie mankietu ciśnieniomierza (nawet do 300mmHg) na przedramieniu pacjenta przez okres 5 minut. Po zdjęciu mankieta, następuje faza przekrwienia reaktywnego. Działania te powodują przejściowe zwiększenie naprężenia ścinającego działającego na ściany naczyń, co prowadzi do reaktywnego poszerzenia tętnicy zależnego od wytworzonego przez śródbłonek tlenku azotu [299]. Badania rozszerzalności tętnicy ramiennej znalazły zastosowanie w analizach populacyjnych ludzi dorosłych. Przydatność badania u dzieci udowodniono u pacjentów z cukrzycą typu 1, gdzie niskie wartości FMD uzyskiwano w przypadkach chorych z niedostatecznym wyrównaniem metabolicznym [271,272,292].

2. CELE PRACY

Celem pracy było określenie:

1. zależności pomiędzy przebyłym zakażeniem ludzkim wirusem cytomegalii (HCMV), a wartością wskaźnika IMT tętnic szyjnych u młodzieży
2. wpływu przebytego zakażenia HCMV na profil cytokin u badanej młodzieży
3. roli latentnego zakażenia HCMV w rozwoju miażdżycy poprzez indukcję syntezy cytokin proaterogennych
4. zależności pomiędzy poziomami cytokin stwierdzanych w grupie badanej, a wskaźnikiem IMT

3. PACJENCI, MATERIAŁ I METODY

3.1. Pacjenci

Badaniem objęto łącznie 80 pacjentów (n=80), w wieku pomiędzy 14. a 18. rokiem życia, zakwalifikowanych do diagnostyki neurologicznej w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2010-2012.

Dobór grupy badanej miał charakter dwuetapowy:

3.1.1. Etap I - postępowanie kwalifikacyjne

W etapie 1. u wszystkich pacjentów w wieku pomiędzy rozpoczęciem 14. a ukończonym 18. rokiem życia (n=114), przyjętych do Kliniki celem obserwacji stanu neurologicznego przeprowadzono badanie podmiotowe w formie ankiety (załącznik 1) wypełnianej wspólnie z pacjentem w obecności rodzica/opiekuna prawnego, oraz wstępną ocenę pacjenta w badaniu przedmiotowym (wyliczenie BMI, pomiar ciśnienia tętniczego krwi, pomiar obwodu talii).

Celem etapu pierwszego było wykluczenie z badania chorych z istotnym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych. Utworzono w ten sposób grupę badaną (n=80).

3.1.1.1. Ankieta kwalifikacyjna

Celem ankiety było wykluczenie z grupy badanej pacjentów z istotnym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych. Założono następujące kryteria wyłączenia z badania:

- nadciśnienie tętnicze w wywiadzie
- cukrzyca
- zespół metaboliczny
- dyslipidemia
- obecność choroby sercowo-naczyniowej, lub innej na podłożu miażdżycy
- wada serca
- choroba nowotworowa (aktywna i w wywiadzie)
- stwierdzony zespół zaburzeń odporności

- dodatni wywiad rodzinny (obejmujący krewnych wstępnych I i II stopnia) w kierunku przedwczesnego (<55. r.ż. u mężczyzn, <65. r.ż. u kobiet) występowania chorób sercowo-naczyniowych
- nasilone próchnicze zmiany uzębienia
- antykoncepcja hormonalna
- nieprawidłowe BMI określane wg odpowiednich siatek centylowych [300], jako kryterium otyłości przyjęto BMI \geq 95.centyl

3.1.2. Etap II – podział grupy badanej

W etapie 2. na podstawie badań serologicznych miana przeciwciał IgG przeciwko HCMV w grupie badanej (n=80) wyodrębniono 2 główne grupy pacjentów:

- grupę 1 stanowiło 49 dzieci (n=49), u których stwierdzono w surowicy krwi obecność przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV i na podstawie znanych właściwości wirusa założono obecność zakażenia latentnego
- grupę 2 (grupę kontrolną) – 31 pacjentów (n=31), u których nie wykazano w surowicy krwi obecności przeciwciał IgG przeciwko HCMV

W grupie 1 znalazło się 9. dzieci, u których stwierdzono również przeciwciała w klasie IgM przeciwko HCMV.

Następnie powyższe grupy podzielono na kolejne dwie podgrupy z uwzględnieniem płci pacjentów (Tabela 3).

Tabela 3. Podział grupy badanej. Grupa 1 (podgrupy M IgG i K IgG)- pacjenci, u których stwierdzono w surowicy krwi obecność przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV. Grupa 2 (podgrupy M i K) - pacjenci, u których nie wykazano obecności ww. przeciwciał

GRUPA BADANA (n=80)				
	GRUPA 1 (n=49)		GRUPA 2 (n=31)	
	Podgrupa M IgG (Chłopcy)	Podgrupa K IgG (Dziewczęta)	Podgrupa M (Chłopcy)	Podgrupa K (Dziewczęta)
N	n=22	n=27	n=18	n=13
% ogółu	27,5	33,75	22,5	16,25

3.2. Protokół badania

W celu ustalenia prawdopodobieństwa rozwoju przedklinicznej postaci miażdżycy u chorych w grupie badanej ustalono następujący protokół badań:

- Badanie podmiotowe i przedmiotowe
- Badania laboratoryjne
- Ultrasonograficzny obustronny pomiar IMT tętnic szyjnych
- Badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej (USG)
- Badanie elektrokardiograficzne (EKG)

Protokół badania został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu nr 849/10 z dnia 08.10.10r

Pacjenci zakwalifikowani do badań zostali poinformowani o założeniach pracy i protokole badawczym oraz wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w projekcie (załącznik 2). Rodzicom lub opiekunom prawnym pacjentów przekazano pismo (załącznik 3) informujące o celu i przebiegu badania oraz uzyskano ich zgodę na udział dziecka w projekcie.

3.2.1. Badanie podmiotowe i przedmiotowe

3.2.1.1. Badanie podmiotowe

Poza uprzednio uzyskanymi odpowiedziami na pytania ankiety kwalifikacyjnej u wszystkich pacjentów zebrano szczegółowy wywiad dotyczący:

- przebiegu ciąży, okresu okołoporodowego oraz rozwoju psychoruchowego dziecka
- dotychczasowego stanu zdrowia pacjenta, ze szczególnym uwzględnieniem nawracających infekcji (przyjęto granicę 6. infekcji układu oddechowego na rok) oraz chorób przewlekłych
- sposobu odżywiania z uwzględnieniem spożywania produktów typu fast food, oraz napojów z wysoką zawartością cukru
- aktywności fizycznej
- narażenia na dym tytoniowy

3.2.1.2. Badanie przedmiotowe

Wszystkich pacjentów poddano badaniu przedmiotowemu, ze szczególnym uwzględnieniem:

3.2.1.2.1. Pomiaru ciśnienia tętniczego krwi

Ciśnienie tętnicze krwi mierzono obustronnie na tętnicy ramiennej za pomocą sfingomanometru rtęciowego zgodnie z zasadami rekomendowanymi w IV Raporcie Grupy Roboczej ds. Kontroli Ciśnienia u Dzieci i Młodzieży [269]. Pierwszorazowy pomiar spoczynkowego ciśnienia tętniczego-brBP (ang. *brachialresting blood pressure*) wykonywano na kończynie lewej i prawej. Pomiar w kolejnych dniach wykonywano na kończynie, na której stwierdzono wyższe średnie ciśnienie tętnicze krwi. Badania odbywały się w godzinach porannych, w sali chorych. Do analizy przyjęto średnią z co najmniej 6 pomiarów z 3 kolejnych dni. Uzyskane wartości umieszczono na siatkach centylowych ciśnienia tętniczego z uwzględnieniem płci, wieku i wzrostu pacjenta [300]. Przyjętą klasyfikację nadciśnienia tętniczego przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego u dzieci po ukończeniu 1. roku życia [269]

Prawidłowe ciśnienie tętnicze	Ciśnienie skurczowe i rozkurczowe niższe niż 90.centyl
Faza przednadciśnieniowa (ang . <i>Prehypertension</i>)	Ciśnienie skurczowe i rozkurczowe wyższe niż 90.centyl, ale niższe niż 95.centyl
Nadciśnienie tętnicze	Ciśnienie skurczowe lub rozkurczowe równe/wyższe niż 95.centyl
Stopień I nadciśnienia tętniczego	Ciśnienie skurczowe lub rozkurczowe wyższe niż 95.centyl, ale niższe niż 99.centyl plus 5mmHg
Stopień II nadciśnienia tętniczego	Ciśnienie skurczowe lub rozkurczowe wyższe niż 99.centyl plus 5mmHg

3.2.1.2.2. Pomiaru obwodu talii

Pomiary wykonywano zgodnie z protokołem badania OLAF (PL0080) Za otyłość brzuszną uznano wartość powyżej 90.centyla dla płci i wieku dziecka, zgodnie

z kryteriami rozpoznawania zespołu metabolicznego [301]. W badaniu wykorzystano najnowsze siatki centylowe obwodów talii, opracowane w ramach projektu OLAF (PL0080) [302].

3.2.1.2.3. Wyliczenia BMI pacjenta

Nadwagę zdefiniowano w oparciu o siatki centylowe dla BMI w zakresie 85-95 centyla dla określonej płci i wieku. Zastosowano siatki centylowe opracowane w ramach projektu OLAF (PL0080) [303].

3.2.2. Badania laboratoryjne

U wszystkich pacjentów z grupy badanej w chwili przyjęcia do szpitala pobrano krew do standardowych oznaczeń laboratoryjnych. Pacjenci pozostawali na czczo co najmniej 8 godzin przed badaniem.

W celu wykonania odroczonej badań immunoenzymatycznych pobrano równocześnie 10ml krwi do próbki z dwutlenkiem krzemu (SiO₂). Po ustabilizowaniu skrzepu próbkę dwukrotnie odwirowano (10min, 1700obrotów/min). Uzyskaną surowicę rozlano do 9 probówek (EppendorfTubes 0,5-2ml) oraz zamrożono w temperaturze -72⁰C.

3.2.2.1. Oznaczenie poziomu przeciwciał przeciw HCMV

W dniu przyjęcia w grupie badanej (n=80) oznaczono poziom swoistych przeciwciał przeciw HCMV w klasie IgM oraz IgG metodą ELISA. Badanie wykonano przy użyciu testu SERION ELISA classic Cytomegalovirus IgM i IgG (Institut Virion\Serion GmbH). Jako miano dodatnie uznano poziom >0,399 (index) dla przeciwciał w klasie IgM oraz >15 (AU/ml) dla przeciwciał w klasie IgG.

Badanie wykonano w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Kierownik: mgr Maria Glema) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta powyższego testu.

3.2.2.2. Standardowe badania laboratoryjne

U wszystkich pacjentów wykonano standardowe badania laboratoryjne, które obejmowały:

- Morfologię krwi obwodowej z rozmazem mechanicznym
- Stężenie CRP (mg/dl)
- Profil lipidowy- stężenie cholesterolu całkowitego, LDL, HDL oraz TAG (mg/dl)

- Aktywność aminotransferazy asparaginowej- AST (U/l) oraz aktywność aminotransferazy alaninowej –ALT (U/l)
- Stężenie glukozy na czczo (mg/dl)
- Stężenie fibrynogenu (mg/dl)

Wartości referencyjne powyższych parametrów poddawanych dalszej analizie statystycznej w pracy umieszczono w tabeli 5.

Tabela 5. Wartości referencyjne wykonanych badań laboratoryjnych z uwzględnieniem wieku i płci pacjentów grupy badanej.

PARAMETR	WARTOŚĆ REFERENCYJNA			
Leukocyty (WBC) x 10 ³ /ul	4-10			
Płytki krwi (PLT) x 10 ³ /ul	150-400			
Rozmaz krwi obwodowej (%):				
Neutrocyty	25-60			
Eozynocyty	1-5			
Bazocyty	0-1			
Monocyty	1-6			
Limfocyty	20-50			
Białko C-reaktywne (CRP) mg/dl	<0,5			
Cholesterol całkowity mg/dl	150-200			
LDL mg/dl	<130			
HDL mg/dl	>40 K		> 35M	
TAG mg/dl	50-150			
AST U/l	13-17 r.ż.		>17 r.ż.	
	< 25 K	< 29 M	< 30 K	< 37 M
ALT U/l	13-17 r.ż.		>17 r.ż.	
	< 23 K	< 26 M	< 33 K	< 40 M
Glukoza na czczo mg/dl	<100			
Fibrynogen mg/dl	180-350			

Badania wykonano przy użyciu standardowych analizatorów laboratoryjnych w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Kierownik: mgr Maria Glema) zgodnie z protokołami wewnętrznymi poszczególnych oznaczeń laboratoryjnych.

3.2.2.3. Badania immunoenzymatyczne

Do badań wykorzystywano próbki surowicy uprzednio zmagazynowanej w -72°C . Dokonano następujących oznaczeń:

3.2.2.3.1. Ludzka interleukina 1 β (IL-1 β)

Stężenie ludzkiej IL-1 β w próbkach surowicy mierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA typu „*sandwich*” (R&D Systems, Memphis, USA). Pomiar wykonywano przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze EL x 808 (Bio-Tek Instruments, USA). Stężenie IL-1 β w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość metody wynosiła 1 pg/ml.

3.2.2.3.2. Ludzka interleukina 4 (IL-4)

Stężenie ludzkiej IL-4 w próbkach surowicy oznaczano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA typu „*sandwich*” (R&D Systems, Memphis, USA). Czulość metody wynosiła 10 pg/ml. Detekcję absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze EL x 808 (Bio-Tek Instruments, USA). Stężenie IL-4 w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

3.2.2.3.3. Ludzka interleukina 6 (IL-6)

Stężenie ludzkiej IL-6 w próbkach surowicy oznaczano za pomocą techniki immunoenzymatycznej ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*) typu „*sandwich*” wykorzystując zestaw do oznaczeń firmy R&D Systems (R&D Systems, Memphis, USA). Pomiar wykonywano na spektrofotometrze *EL x 800* (Bio-Tek Instruments, USA), przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenie IL-6 w badanych próbkach odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość metody wynosiła 0,7 pg/ml.

3.2.2.3.4. Ludzka interleukina 10 (IL-10)

Stężenie ludzkiej IL-10 w próbkach surowicy oceniano wykorzystując metodę opartą na immunoabsorpcji enzymozależnej (ELISA), przebiegającej z wykorzystaniem płytek fabrycznie opłaszczonych specyficznymi przeciwciałami dla ludzkiej IL-10 (R&D Systems, Memphis, USA). Pomiar wykonywano wobec próby ślepej przy długości fali 450 nm (wobec

długości fali referencyjnej 540 nm) za pomocą spektrofotometru ELx808 (Bio-Tech. Instruments, USA). Czulość metody wynosiła 3,9 pg/ml.

3.2.2.3.5. Interferon gamma (IFN γ)

Stężenie IFN γ w próbkach surowicy oznaczano za pomocą techniki immunoenzymatycznej ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*) typu „sandwich” wykorzystując zestaw do oznaczeń firmy R&D Systems (R&D Systems, Memphis, USA). Pomiar wykonywano na spektrofotometrze *EL x 800 (Bio-Tek Instruments, USA)*, przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenie IFN γ w badanych próbkach odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość metody wynosiła 8pg/ml.

3.2.2.3.6. Czynniki martwicy nowotworów alfa (TNF α)

Stężenie TNF α w próbkach surowicy mierzono przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA typu „sandwich”(R&D Systems, Memphis, USA). Detekcję absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru EL x808 (Bio-Tek Instruments, USA) przy długości fali 450 nm oraz 540 nm. Stężenie TNF α w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość testu wynosiła 5,5pg/ml.

3.2.2.3.7. Czynniki stymulujące tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF)

Stężenie GM-CSF w próbkach surowicy mierzono przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA typu „sandwich”(R&D Systems, Memphis, USA). Detekcję absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru EL x808 (Bio-Tek Instruments, USA) przy długości fali 450 nm oraz 540 nm. Stężenie GM-CSF w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość testu wynosiła 3 pg/ml.

3.2.2.3.8. Czynniki stymulujące tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF)

Stężenie M-CSF w próbkach surowicy mierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA typu „sandwich”(R&D Systems, Memphis, USA). Pomiar wykonywano przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze EL x 808 (Bio-Tek Instruments, USA). Stężenie M-CSF w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość metody wynosiła 47,3pg/ml.

3.2.2.3.9. Rozpuszczalna forma międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (sICAM-1)

Stężenie sICAM-1 w próbkach surowicy oznaczano za pomocą techniki immunoenzymatycznej ELISAtypu „sandwich” wykorzystując zestaw do oznaczeń firmy R&D Systems (R&D Systems, Memphis, USA). Pomiar wykonywano na spektrofotometrze *EL x 800 (Bio-Tek Instruments, USA)*, przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenie sICAM-1 w badanych próbkach odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość metody wynosiła 0,254 ng/ml.

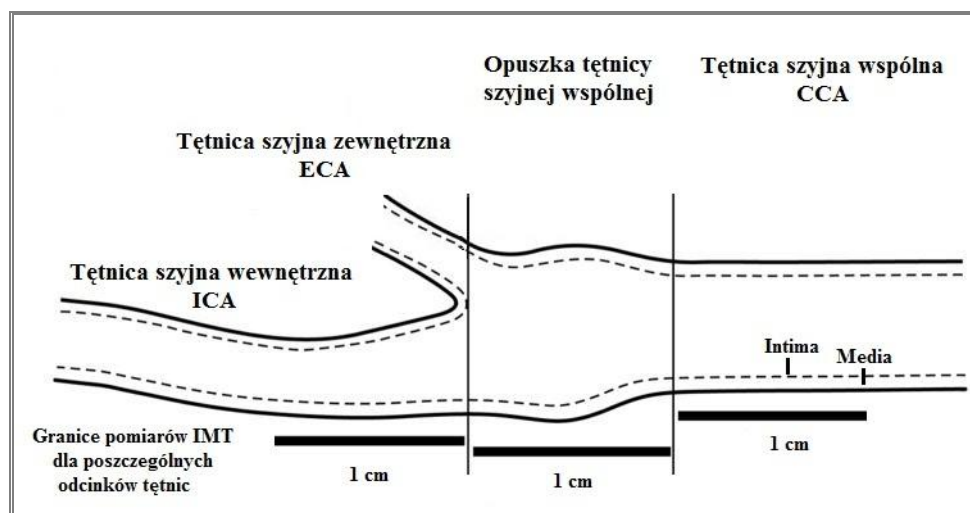
Wszystkie oznaczenia wykonano w Pracowni Diagnostyki Chorób Wirusowych Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (dr n. biol. Marią Lewandowską-Stachowiak;

Kierownik Pracowni: Prof. dr hab. med. Magdalena Figlerowicz)

3.2.3. Ultrasonograficzny pomiar IMT tętnicy szyjnej

Badanie ultrasonograficzne tętnic szyjnych wykonano w aparacie Philips Healthcare IU 22, z wykorzystaniem głowicy liniowej o częstotliwości 10MHz zgodnie ze schematem pomiaru IMT opublikowanym w 2006 roku w Mannheim Intima-Media Thickness Consensus [304].

Pomiary IMT wykonano obustronnie zarówno w zakresie tętnicy szyjnej wspólnej (1-2cm poniżej rozwidlenia), opuszki tętnicy szyjnej wspólnej oraz w początkowym odcinku tętnicy szyjnej wewnętrznej (Rycina 2).

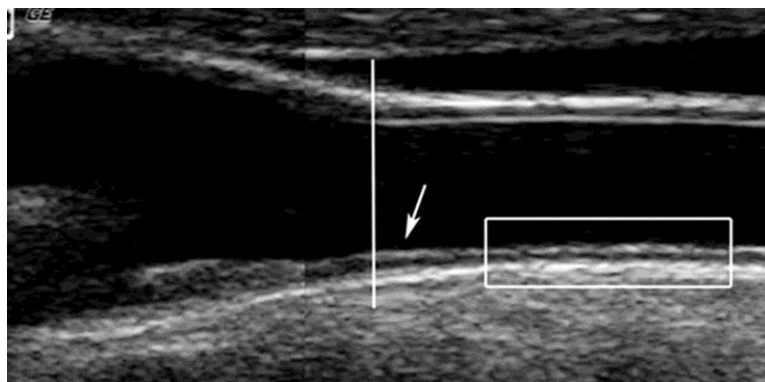


Rycina 2. Schemat podziału tętnicy szyjnej wspólnej (CCA)

Badanie przeprowadzono w pozycji leżącej na plecach z wykorzystaniem dwóch sposobów dostępu:

- Przedni z lekkim odgięciem głowy ku tyłowi
- Tylno-boczny z za mięśnia mostkowo-obończykowo-sutkowego przy skręceniu szyi w stronę przeciwną do badanej

Płaszczyznę głowicy sondy orientowano równolegle do przebiegu naczynia, tak by wiązka fal ultradźwiękowych padała prostopadłe do ściany tętnicy. W prezentacji 2D uwidoczniono ścianę dalszą naczynia, w obrębie której za IMT przyjęto odległość pomiędzy pierwszą linią hiperechogenną strukturą naczynia począwszy od jego światła, a linią oddzielającą błonę środkową od przydanki (Rycina 3).



Rycina 3. Obraz ultrasonograficzny miejsca pomiaru CCA IMT (materiał własny)

Uzyskane wyniki (po 10 pomiarów w każdym odcinku, po każdej stronie) przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej dla danej projekcji.

3.2.4. Badanie USG jamy brzusznej

Badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej przeprowadzono na aparacie Philips Healthcare IU 22 głowicami liniowymi oraz convex o częstotliwości 3,5 MHz. Badanie wykonano zgodnie ze Standardami Badań Ultrasonograficznych opracowanych przez Grupę Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ultrasonograficznego w 1998 roku, z modyfikacją w roku 2008 [305]. Badanie objęło ocenę wątroby, pęcherzyka żółciowego, dróg żółciowych wewnątrz i zewnątrzwątrobowych, trzustki, śledziony, nerek i nadnerczy, pęcherza moczowego, węzłów chłonnych jamy brzusznej oraz dużych naczyń (aorta, żyła główna

dolna, tętnica kręzkowa górna. Standardowe badanie obejmowało ocenę echogeniczności mięszu narządu, jego wielkości i położenia.

Badanie wykonywano na czczo, przy wypełnionym pęcherzu moczowym.

Badania ultrasonograficzne przeprowadzono w Zakładzie Radiologii Pediatrycznej Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego (Kierownik/wykonawca: Dr n. med. Katarzyna Jończyk-Potoczna).

3.2.5. Badanie EKG

U każdego pacjenta wykonano 12-odprowadzeniowe badanie elektrokardiograficzne (aparat MAC5000, GE, USA) zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Opis badań powierzono specjalście z zakresu Kardiologii Dziecięcej.

Badania przeprowadzono w Pracowni EKG i Prób Czynnościowych Układu Krążenia Kliniki Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego (Kierownik: Prof. UM dr hab. n. med. Waldemar Bobkowski).

3.3. Analiza statystyczna

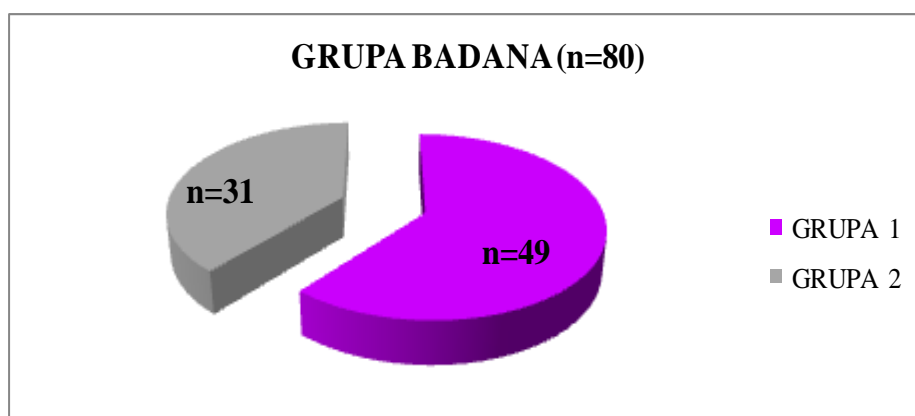
Uzyskane dane analizowano przy pomocy programu Statistica 8.0 firmy StatSoft, wykresy statystyczne wykonano przy użyciu programu Graph Pad Prism 6.

Zgodność rozkładu zmiennych ilościowych z rozkładem normalnym badano testem Kołmogorowa-Smirnowa. Do porównania dwóch zmiennych ilościowych zgodnych z rozkładem normalnym stosowano test t Studenta. Większość zmiennych ilościowych analizowana w badaniu nie była zgodna z rozkładem normalnym. Dlatego też do porównania dwóch zmiennych ilościowych stosowano test nieparametryczny U Manna-Whitneya, a do porównania wielu zmiennych stosowano test nieparametryczny ANOVA rang Kruskala Wallisa. Zmienne jakościowe były analizowane za pomocą testu χ^2 . Do analizy korelacji pomiędzy zmiennymi ilościowymi zastosowano testy Pearsona oraz Spearmana.

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

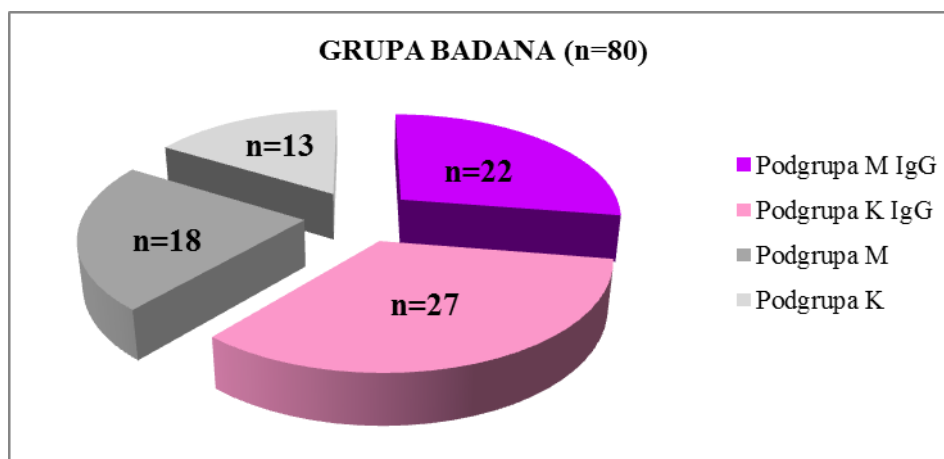
4. WYNIKI

Analizą objęto 80 pacjentów ($n=80$), w tym 40 dziewcząt (50%) oraz 40 chłopców (50%). Wiek pacjentów oscylował pomiędzy rozpoczętym 14., a ukończonym 18. rokiem życia. Grupę badaną podzielono następnie na dwie grupy w zależności od stwierdzonej w dniu przyjęcia na podstawie badania ELISA, obecności w surowicy krwi swoistych przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG. Grupa 1 obejmowała 49 osób (61%), u których wykazano obecność przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG. Grupę 2 stanowiło 31 pacjentów (39%), u których na podstawie badań serologicznych wykluczono zakażenie HCMV. Graficzne przedstawienie liczebności grup badanych przedstawia rycina 4.



Rycina 4 . Podział grupy badanej na grupę 1, obejmującą pacjentów, u których wykazano obecność przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV oraz grupę 2 – pacjentów, u których na podstawie badań serologicznych wykluczono zakażenie HCMV

W celu przeprowadzenia dalszej analizy klinicznej i epidemiologicznej powyższe grupy podzielono pod względem płci na dwie kolejne podgrupy. W grupie 1 wydzielono podgrupę M IgG, obejmującą 22 chłopców ($n=22$, średnia wieku 16 lat 2 miesiące), oraz podgrupę K IgG obejmującą 27 dziewcząt ($n=21$, średnia wieku 16 lat 1 miesiąc). Grupę 2 podzielono na podgrupy M i K, złożoną odpowiednio z 18 chłopców ($n=18$, średnia wieku 16 lat) i 13 dziewcząt ($n=13$, średnia wieku 15 lat 8 miesięcy). Powyższy podział obrazuje rycina 5.



Rycina 5. Podział grupy badanej na grupę 1, obejmującą pacjentów, u których wykazano obecność przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV, grupę 2 – pacjentów, u których na podstawie badań serologicznych wykluczono zakażenie HCMV, oraz odpowiednie podgrupy z uwzględnieniem płci pacjentów: chłopcy (M), dziewczęta (K)

Na podstawie analizy statystycznej badanych grup nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy zarówno w ilościowym rozkładzie płci, jak i w zakresie wieku pacjentów.

4.1. Badanie podmiotowe

4.1.1. Ocena częstości występowania nawracających infekcji oraz chorób przewlekłych w grupie badanej

Poddano ocenie stan zdrowia badanych pacjentów i wykazano, że u 12 (n=12, 15%) pacjentów występowały choroby przewlekłe. Rodzaj i częstość występowania tych schorzeń zobrazowano w tabeli 6.

Tabela 6. Występowanie chorób przewlekłych u dzieci z badanych grup. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2-grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta)

Choroba przewlekła n (% ogółu)	GRUPA 1 n=49		GRUPA 2 n=31	
	M IgG (n=22)	K IgG (n=27)	M (n=18)	K (n=13)
Alergia wziewna sezonowa	2 (2,5%)	1 (1,25%)	1 (1,25%)	2 (2,5%)
Alergia pokarmowa	2 (2,5%)	0	1 (1,25%)	2 (2,5%)
Refluks żołądkowo-przełykowy	1 (1,25%)	0	0	0

W chwili przyjęcia do szpitala pacjenci nie przyjmowali przewlekłe żadnych leków.

U jednego z chłopców w grupie 1 stwierdzono w wywiadzie nawracające zapalenia zatok przynosowych (sześciokrotnie w roku 2011).

4.1.2. Ocena sposobu odżywiania i aktywności fizycznej

Na podstawie analizy statystycznej badanych grup nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w częstotliwości spożywania produktów wysokoprzetworzonych. Nie wykazano również różnic zarówno w częstotliwości podejmowania aktywności fizycznej jak i czasu jej trwania.

4.1.3. Ocena narażenia na dym tytoniowy

Dwóch pacjentów z grupy kontrolnej przyznało się do okresowego palenia papierosów (do 5 sztuk miesięcznie). W przypadku pozostałych pacjentów na podstawie wywiadu wykluczono nikotynizm. Czworo pacjentów z grupy 1 i sześcioro z grupy 2 zgłaszało narażenie bierne na dym tytoniowy w środowisku domowym.

4.2. Badanie przedmiotowe

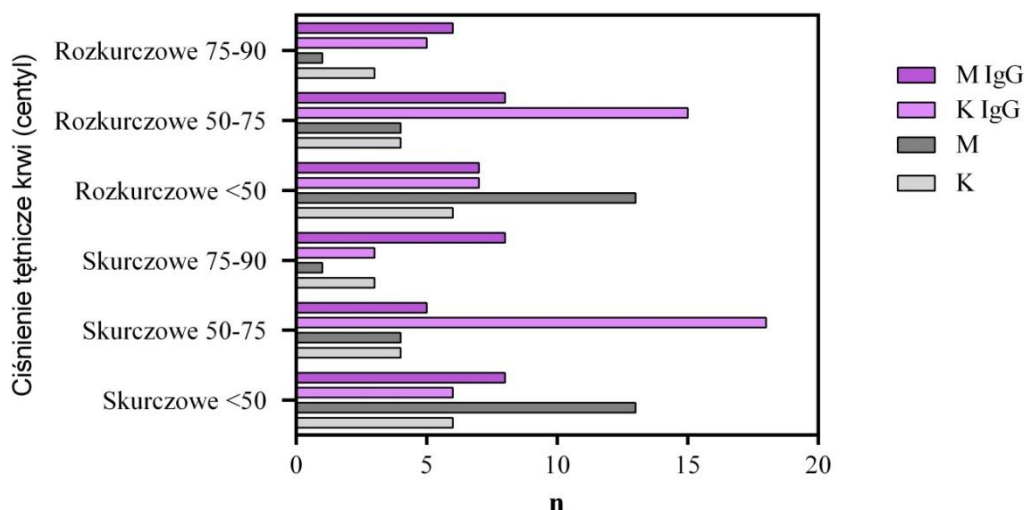
4.2.1. Pomiar ciśnienia tętniczego krwi w badanych grupach

W obu analizowanych grupach u żadnego z pacjentów nie stwierdzono w badaniu cech nadciśnienia tętniczego krwi. W tabeli (Tabela 7) przedstawiono rozkład pomiarów ciśnienia w centylach w grupie 1 oraz w grupie 2.

Tabela 7. Wartości ciśnienia tętniczego krwi (centyle) w grupach badanych. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2-grupa kontrolna

CIŚNIENIE TĘTNICZE KRWI (centyle)						
	SKURCZOWE			ROZKURCZOWE		
	<50	50-75	75-90	<50	50-75	75-90
Grupa 1 (n)	14	23	12	17	23	9
Grupa 2 (n)	19	8	4	19	8	4

W przypadku chłopców, w których surowicy stwierdzono obecność przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV (M IgG) obserwowano nieco wyższe średnie wartości ciśnień skurczowych i rozkurczowych, niż w przypadku dziewcząt z grupy 1 (K IgG), oraz zdrowych chłopców i dziewcząt. Nie wykazano jednak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy powyższymi podgrupami (Rycina 6).



Rycina 6. Rozkład wartości ciśnienia tętniczego krwi (centyle) w grupach badanych. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2-grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta)

4.2.2. Pomiar obwodu talii

U żadnego z pacjentów na podstawie pomiaru obwodu talii nie stwierdzono otyłości brzusznej. Otyłość brzuszna zdefiniowano w oparciu o siatki centylowe opracowane w ramach programu OLAF (PL0080) [302].

Tabela 8. Rozkład wartości obwodów talii (centyle) w grupach badanych. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna

	OBWÓD TALII (centyle)		
	<50	50-75	75-90
Grupa 1 (n)	10	22	17
Grupa 2 (n)	9	12	10

4.2.3. Wyniki BMI pacjentów

U czterech pacjentów z grupy 1 i trzech z grupy 2 stwierdzono nadwagę. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy zakresu BMI pomiędzy badanymi grupami. BMI zdefiniowano w oparciu o siatki centylowe OLAF (PL0080) dla określonej płci i wieku [303].

Tabela 9. Rozkład wartości BMI (centyle) w grupach badanych. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna

	BMI (centyle)		
	<50	50-85	85-90
Grupa 1 (n)	8	36	5
Grupa 2 (n)	11	18	2

4.3. Badania laboratoryjne

4.3.1. Analiza wyników standardowych badań laboratoryjnych

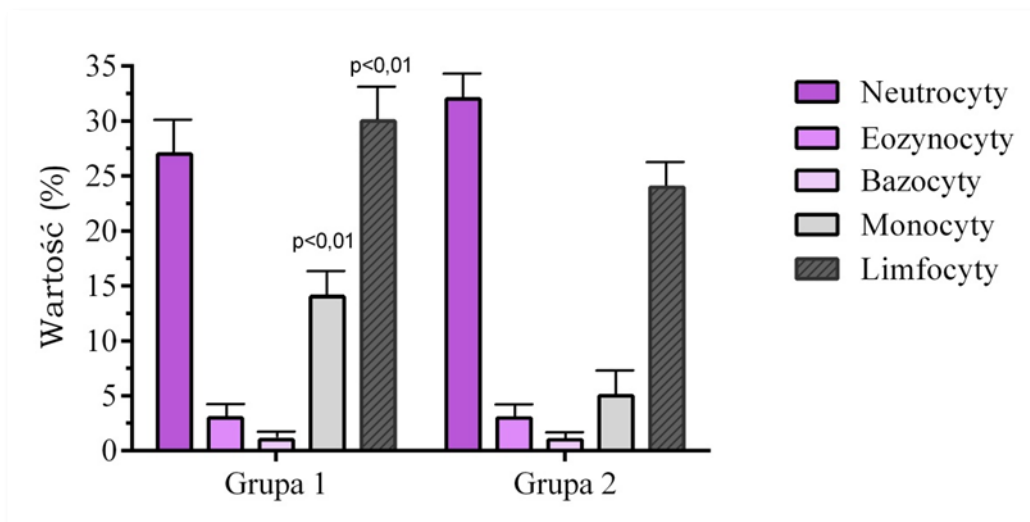
4.3.1.1. Morfologia krwi obwodowej z rozmazem mechanicznym

W zakresie morfologii krwi analizą statystyczną objęto poziom leukocytów oraz płytek krwi. Średnie badanych parametrów nie przekraczały granic norm wartości referencyjnych ustalonych dla wieku dzieci. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami (Tabela 8).

Tabela 10. Porównanie poziomów leukocytów i płytek krwi w badanych grupach (przedstawiono średnie z pomiarów oraz SD). Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta)

Parametr średnia (\pm SD)	GRUPA1 n=49	Podgrupa M IgG	Podgrupa K IgG	GRUPA2 n=31	Podgrupa M	Podgrupa K	p
Leukocyty (WBC) x 10 ³ /ul	5,63 (\pm 1,28)	5,66 (\pm 1,24)	5,58 (\pm 2,13)	5,55 (\pm 2,12)	5,57 (\pm 2,13)	5,54 (\pm 1,56)	NS
Płytki krwi (PLT) x 10 ³ /ul	266,46 (\pm 134,56)	278,33 (\pm 143,56)	258,34 (\pm 160,34)	258,50 (\pm 144,24)	245,90 (\pm 156,34)	260,35 (\pm 112,32)	NS

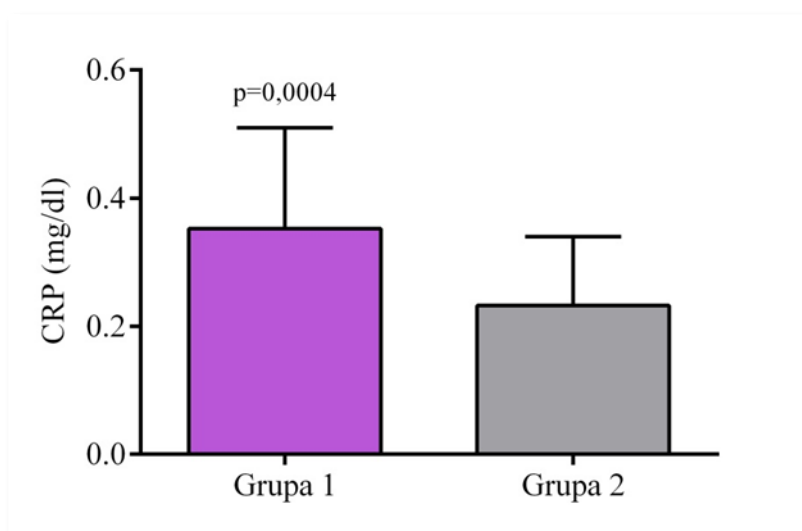
W zakresie wartości parametrów rozmazu krwi obwodowej stwierdzono istotne statystycznie wyższe wartości procentowe monocytów i limfocytów krwi krążącej ($p < 0,01$) w grupie pacjentów zakażonych HCMV, w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono różnic pomiędzy badanymi grupami w zakresie poziomu neutrocytów, eozynocytów oraz bazocytów (Rycina 7).



Rycina 7. Porównanie wyników rozmazów krwi obwodowej pacjentów z grupy 1 (zakażonych HCMV) i grupy 2 (kontrolnej)- wartości średnie składu odsetkowego wraz z SD

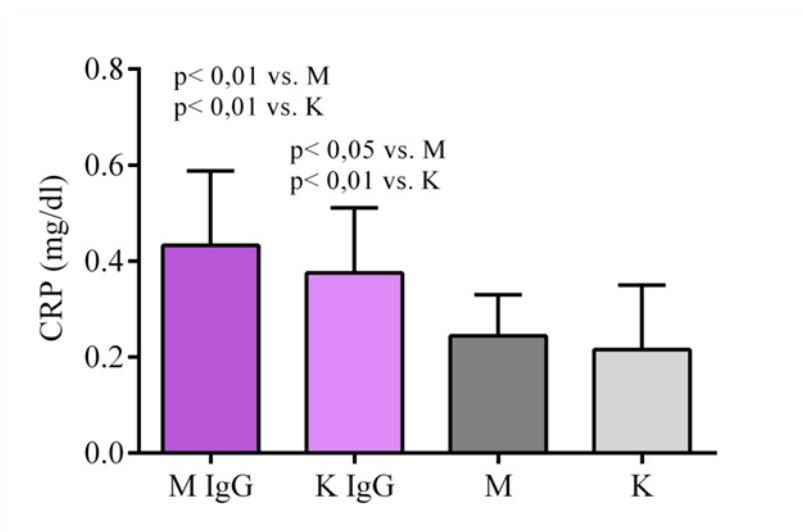
4.3.1.2. Stężenie białka C-reaktywnego (CRP) w badanych grupach

Uzyskano istotną statystycznie różnicę stężeń CRP ($p=0,01$) pomiędzy grupą 1 (średnia: 0,36mg/dl), a grupą 2 (średnia: 0,23mg/dl). Średnie stężenie CRP, pomimo iż nie przekraczało wartości granicznej normy, było znamienne wyższe w grupie pacjentów, u których stwierdzono obecność w surowicy krwi przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG (Rycina 8).



Rycina 8. Stężenie CRP (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy stężenia CRP w surowicy krwi chłopców i dziewcząt w obrębie tych samych grup badanych (Rycina 9).



Rycina 9. Stężenie CRP (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

4.3.1.3. Wyniki badań profilu lipidowego

Przeanalizowano poziomy cholesterolu całkowitego, LDL, HDL oraz TAG w grupach badanych (Tabela 9). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą 1 i 2, jak i poszczególnymi podgrupami pacjentów.

Tabela 11. Porównanie poziomów cholesterolu całkowitego, LDL, HDL oraz TAG w badanych grupach (przedstawiono średnie z pomiarów oraz SD). Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta)

Parametr (średnia±SD)	GRUPA1 n=49	Podgrupa M IgG	Podgrupa K IgG	GRUPA2 n=31	Podgrupa M	Podgrupa K	p
Cholesterol całkowity mg/dl	170,32 (±43,13)	182,74 (±48,89)	168,26 (±38,65)	164,26 (±35,35)	162,35 (±32,69)	168,99 (±40,34)	NS
LDL mg/dl	100,00 (±23,23)	110,48 (±28,65)	98,54 (±20,68)	100,32 (±28,35)	98,89 (±23,36)	94,65 (±18,14)	NS
HDL mg/dl	50,24 (±6,80)	46,43 (±5,50)	62,43 (±6,53)	61,67 (±4,58)	55,47 (±6,54)	65,28 (±7,52)	NS
TAG mg/dl	122,70 (±25,20)	120,27 (±18,34)	132,49 (±35,14)	110,37 (±27,23)	112,48 (±22,23)	104,92 (±18,23)	NS

4.3.1.4. Aktywność aminotransferaz w badanych grupach

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w zakresie aktywności AST i ALT w porównywanych grupach. Wyniki badań przedstawiono w tabeli (Tabela 10).

Tabela 12. Porównanie aktywności AST i ALT w badanych grupach 1 i 2 oraz podgrupach dziewcząt i chłopców (przedstawiono średnie z pomiarów, oraz SD). Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta)

Parametr (średnia±SD)	GRUPA1 n=49	Podgrupa M IgG	Podgrupa K IgG	GRUPA2 n=31	Podgrupa M	Podgrupa K	p
AST U/l	23,43 (±5,67)	23,21 (±4,73)	22,32 (±4,76)	21,20 (±5,43)	20,13 (±4,34)	19,42 (±5,32)	NS
ALT U/l	22,43 (±6,56)	20,13 (±5,43)	21,23 (±4,56)	20,34 (±5,32)	21,78 (±4,36)	18,43 (±2,56)	NS

4.3.1.5. Poziom glikemii na czczo w badanych grupach

W obu badanych grupach poziomy glikemii na czczo nie przekraczały granicy normy. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą 1 (średnia: 72,45mg/dl± SD: 11,23mg/dl), a grupą 2 (średnia: 76,55mg/dl ± SD: 9,89mg/dl).

4.3.1.6. Poziom fibrynogenu w grupach badanych

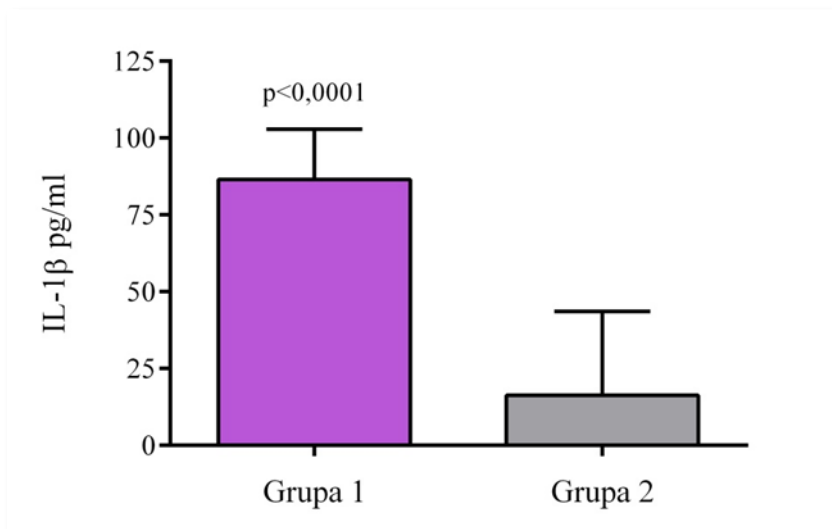
Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w poziomach fibrynogenu pomiędzy grupą pacjentów zakażonych HCMV (średnia: 250,45 mg/dl ± SD: 89,99 mg/dl), a grupą kontrolną (średnia: 245,34 mg/dl ±SD: 96,98 mg/dl).

4.3.2. Badania immunoenzymatyczne

4.3.2.1. Analiza stężenia ludzkiej interleukiny 1β (IL1-β)

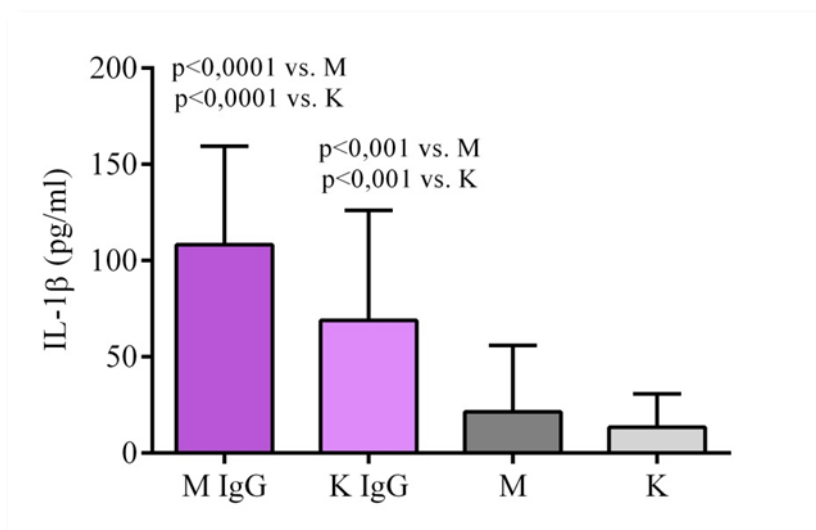
Analizie poddano stężenie IL-1β w grupie pacjentów z dodatnim mianem przeciwciał IgG przeciwko HCMV (grupą 1), oraz w grupie dzieci, u których na podstawie badania ELISA wykluczono zakażenie HCMV (grupa 2). Stwierdzono znamienne statystycznie

wyższe stężenie IL-1 β w surowicy krwi pacjentów z grupy 1 (średnia 86,50 pg/ml), w porównaniu z grupą 2 (średnia 16,34 pg/ml) (Rycina 10).



Rycina 10. Stężenie IL-1 β (średnia \pm SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

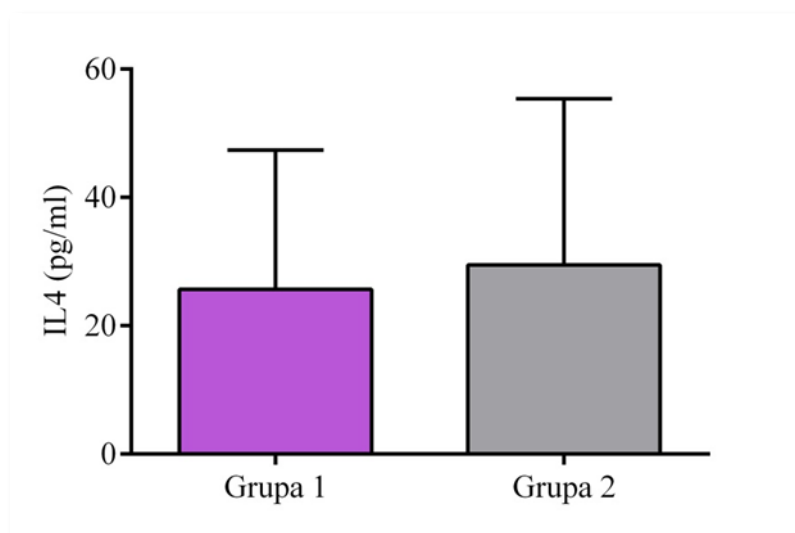
Najwyższe średnie stężenie IL-1 β w surowicy krwi obserwowano u dzieci z grupy 1, u chłopców średnia 108,30 pg/ml, dziewcząt średnia 68,85 pg/ml. Najniższa synteza IL-1 β charakteryzowała podgrupy chłopców i dziewcząt z grupy kontrolnej, w podgrupie M średnia wynosiła 21,35 pg/ml, w podgrupie K 13,42 pg/ml. Pomędzy podgrupami pacjentów zakażonych HCMV (M IgG i K IgG), a podgrupami kontrolnymi (M i K) stwierdzono istotne statystycznie różnice ($p < 0,0001$, $p < 0,001$) (Rycina 11).



Rycina 11. Stężenie IL-1 β (średnia \pm SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

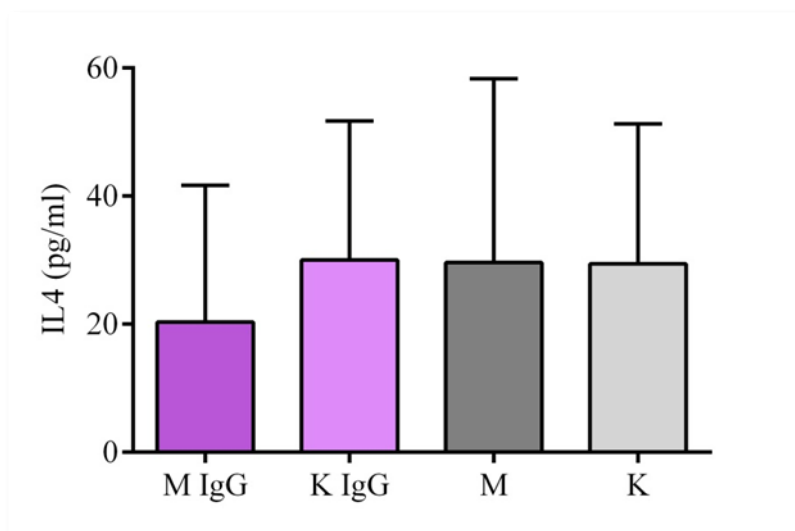
4.3.2.2. Analiza stężenia ludzkiej interleukiny 4 (IL-4)

U dzieci z obu badanych grup stwierdzono zbliżony poziom IL-4 w surowicy krwi: w grupie 1 średnia pomiarów wynosiła 25,69 pg/ml, w grupie 2 natomiast 29,45 pg/ml. Nie stwierdzono znamiennej statystycznie różnicy stężenia IL-4 pomiędzy powyższymi grupami ($p=0,4863$) (Rycina 12).



Rycina 12. Stężenie IL-4 (średnia \pm SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

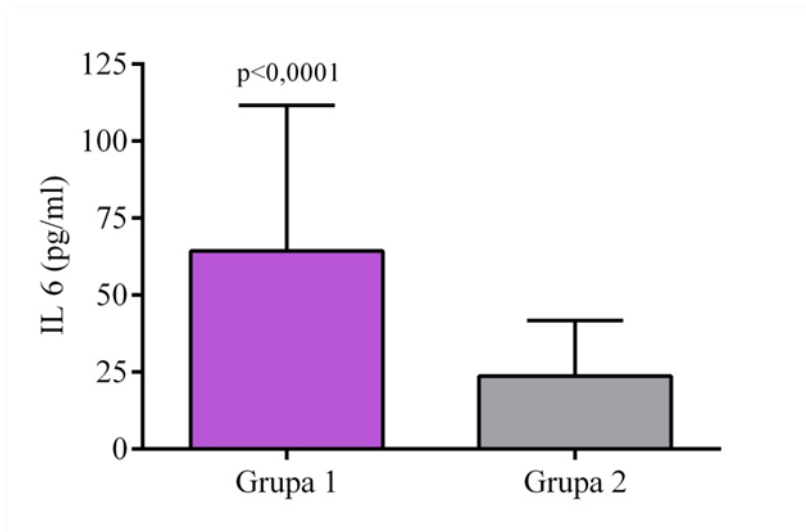
Nie odnotowano również istotnej statystycznie różnicy średniego poziomu IL-4 pomiędzy poszczególnymi podgrupami pacjentów (Rycina 13).



Rycina 13. Stężenie IL-4 (średnia \pm SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

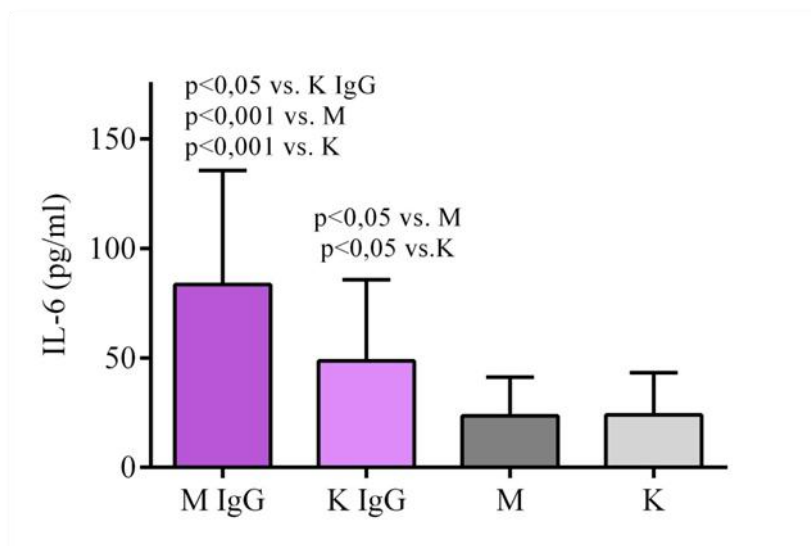
4.3.2.3. Analiza stężenia ludzkiej interleukiny 6 (IL-6)

Wyższe stężenie IL-6 w surowicy krwi charakteryzowało pacjentów z grupy 1 (średnia: 64,31 pg/ml), w porównaniu z dziećmi z grupy 2 (średnia: 23,70 pg/ml), a różnica była istotna statystycznie ($p < 0,0001$). Powyższą zależność obrazuje rycina (Rycina 14).



Rycina 14. Stężenie IL-6 (średnia \pm SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

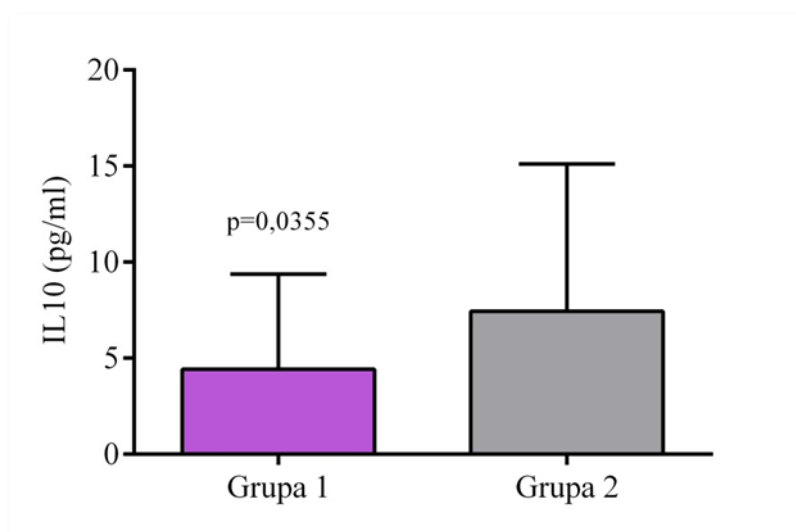
Analiza poziomów IL-6 w podgrupach z uwzględnieniem płci pacjentów wykazała istotną statystycznie różnicę pomiędzy podgrupą chłopców (M IgG), a podgrupą dziewcząt z dodatnim mianem IgG HCMV (K IgG) ($p < 0,05$). Istotną różnicę stwierdzono również w zakresie średnich stężeń IL-6 pomiędzy podgrupą M IgG, a chłopcami i dziewczętami z grupy kontrolnej (podgrupy M i K) ($p < 0,001$), oraz pomiędzy podgrupą K IgG, podgrupami M i K ($p < 0,05$) (Rycina 15)



Rycina 15. Stężenie IL-6 (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

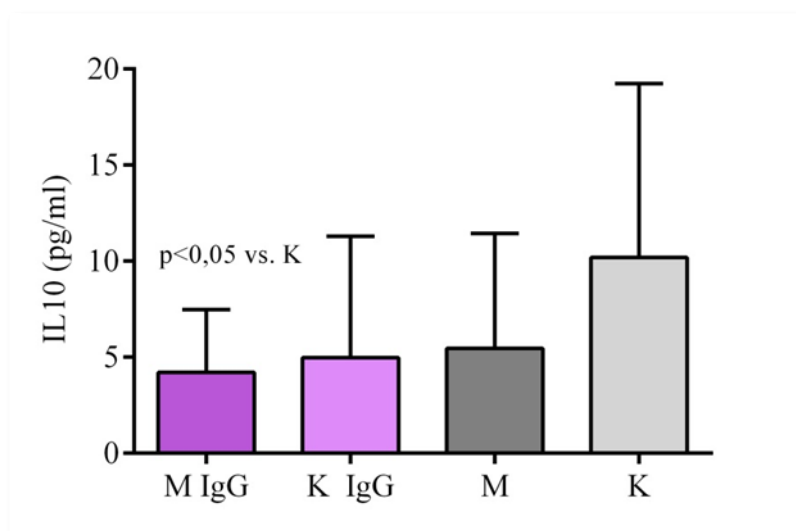
4.3.2.4. Analiza stężenia ludzkiej interleukiny 10 (IL-10)

Analizie poddano stężenie IL-10 w grupie pacjentów z dodatnim mianem przeciwciał IgG przeciwko HCMV (grupa 1), oraz w grupie dzieci, u których wykluczono zakażenie HCMV (grupa 2). Stwierdzono niższe średnie stężenie IL-10 w surowicy krwi pacjentów z grupy 1 (średnia: 4,43 pg/ml), w porównaniu z grupą 2 (średnia: 7,44 pg/ml) ($p=0,0355$) (Rycina 16).



Rycina 16. Stężenie IL-10 (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

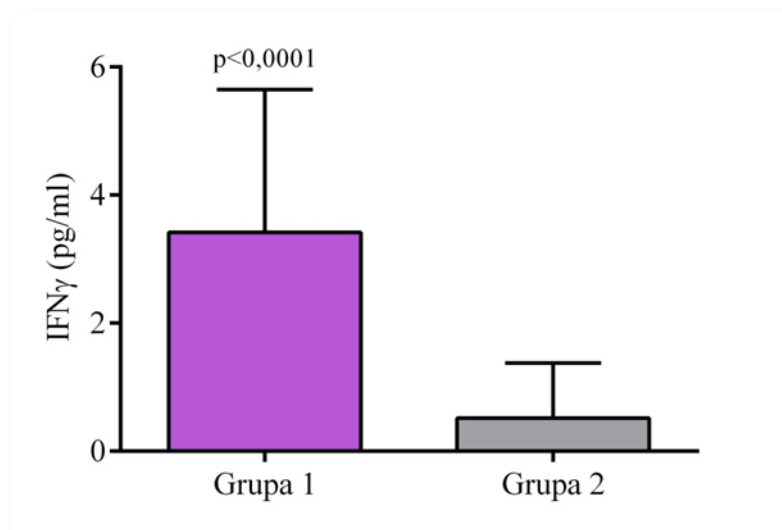
W badanych podgrupach najniższe średnie stężenie IL-10 charakteryzowało podgrupę chłopców z dodatnim mianem IgG HCMV (średnia 4,20 pg/ml), najwyższe natomiast dziewczęta z mianem ujemnym (średnia 10,18 pg/ml). Tylko pomiędzy tymi dwiema podgrupami stwierdzono istotną statystycznie różnicę ($p < 0,05$) (Rycina 17).



Rycina 17. Stężenie IL-10 (średnia \pm SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

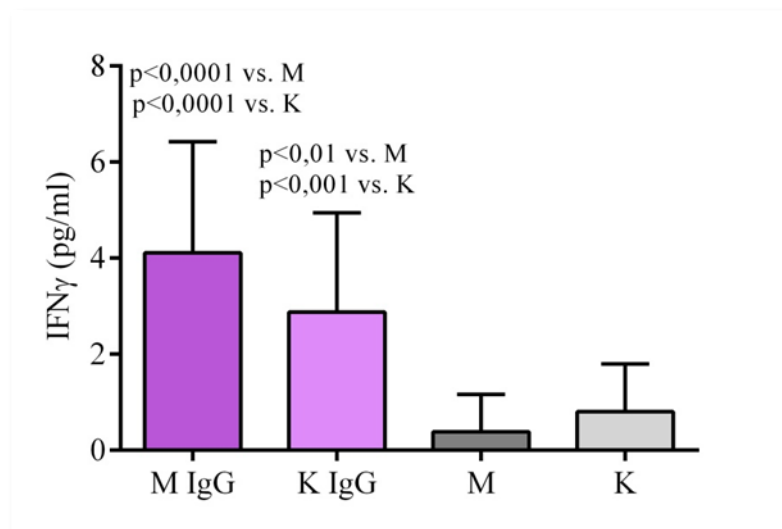
4.3.2.5. Analiza stężenia interferonu gamma (IFN γ)

W grupie pacjentów z dodatnim mianem przeciwciał IgG HCMV stwierdzono wyższy poziom średniego stężenia IFN γ w surowicy krwi (średnia 3,41 pg/ml), niż w grupie 2 (średnia 0,51 pg/ml), co stanowiło istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupami ($p < 0,0001$) (Rycina 18).



Rycina 18. Stężenie IFN γ (średnia \pm SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

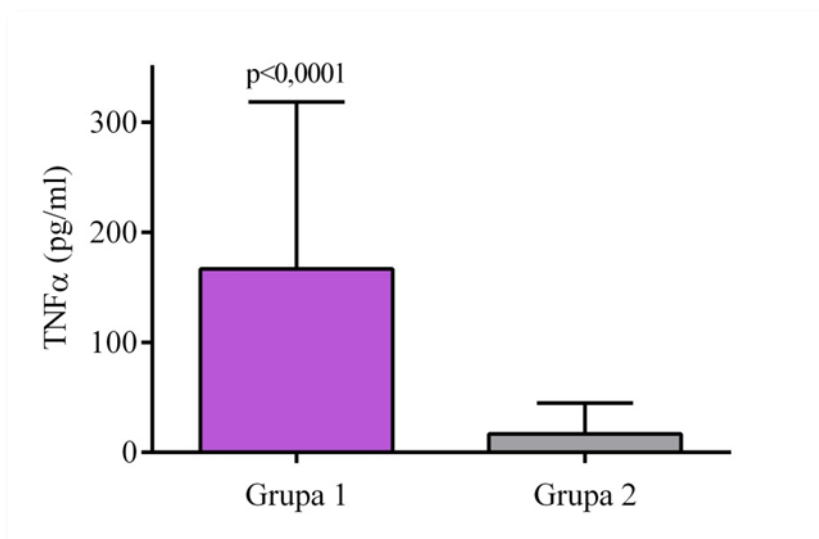
Po przeanalizowaniu średniego poziomu IFN γ w badanych podgrupach potwierdzono statystycznie istotną różnicę pomiędzy pacjentami z dodatnim i ujemnym mianem IgG HCMV. Powyższe zależności przedstawia rycina (Rycina 19).



Rycina 19. Stężenie IFN γ (średnia \pm SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

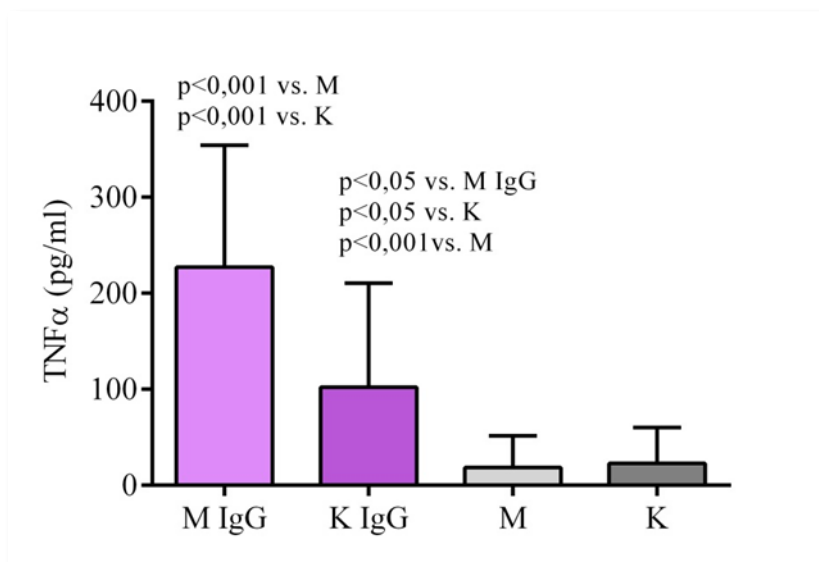
4.3.2.6. Analiza stężenia czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF α)

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w zakresie stężeń TNF α w surowicy pomiędzy pacjentami z grupy 1 i grupy 2 ($p < 0,0001$). Średnia pomiarów w grupie 1 wynosiła 166,50 pg/ml, natomiast w grupie 2 zaledwie 16,98 pg/ml (Rycina 20).



Rycina 20. Stężenie TNFα (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

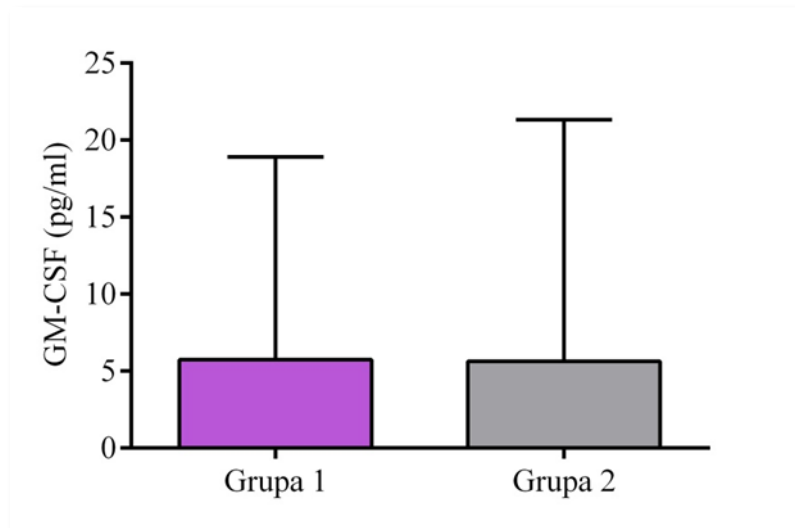
Najwyższe średnie stężenie TNFα obserwowano w podgrupie chłopców z dodatnim mianem IgG HCMV (średnia 227,56 pg/ml), co w porównaniu ze średnim stężeniem TNFα w podgrupie dziewcząt z dodatnim mianem IgG HCMV (średnia 102,23 pg/ml) stanowiło istotną różnicę ($p < 0,05$). Istotne statystycznie różnice stwierdzono również pomiędzy poszczególnymi podgrupami pacjentów z dodatnim mianem IgG HCMV, a pacjentami z podgrup kontrolnych (Rycina 21).



Rycina 21. Stężenie TNFα (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

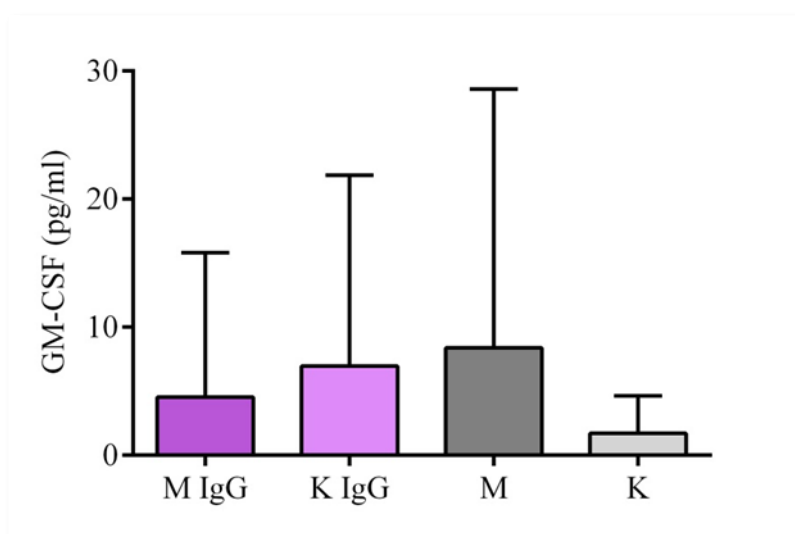
4.3.2.7. Analiza stężenia czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF)

W grupie 1 średnie stężenie GM-CSF wynosiło 5,72 pg/ml, w grupie 2 natomiast 5,64 pg/ml. Nie udowodniono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnimi stężeniami GM-CSF w badanych grupach (Rycina 22).



Rycina 22. Stężenie GM-CSF (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

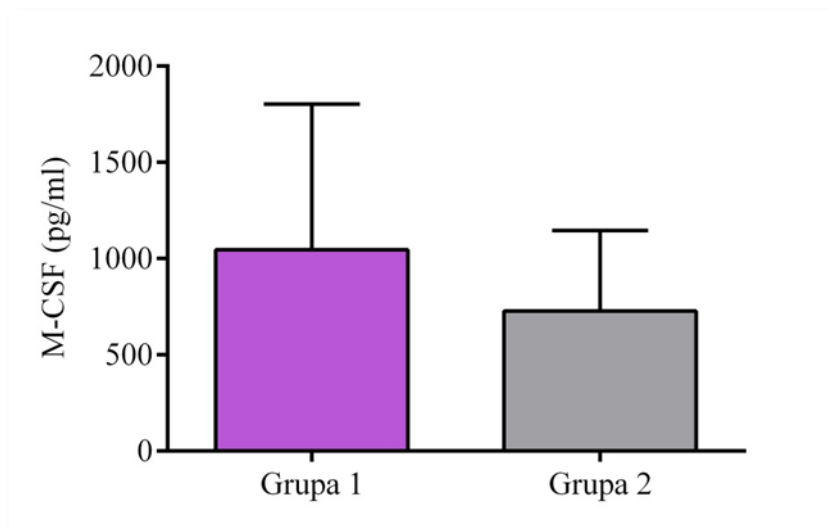
Nie stwierdzono również istotnej statystycznie różnicy średniego poziomu GM-CSF pomiędzy poszczególnymi podgrupami pacjentów (Rycina 23).



Rycina 23. Stężenie GM-CSF (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

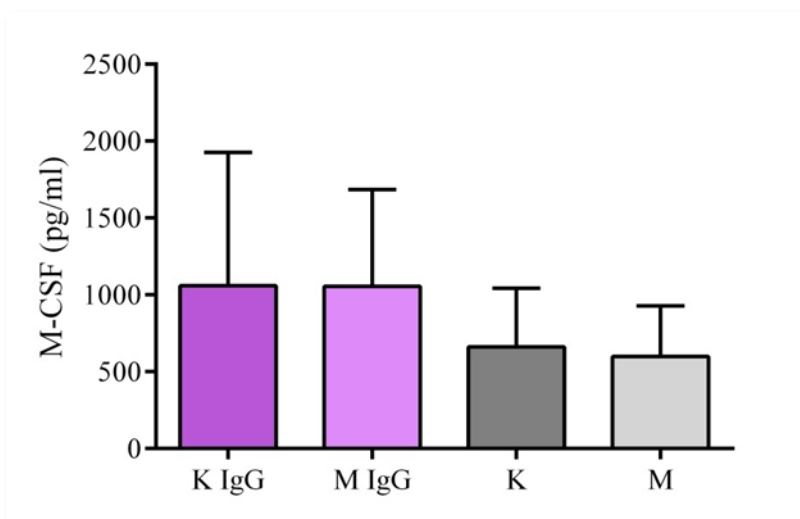
4.3.2.8. Analiza stężenia czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF)

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnimi stężeniami M-CSF w badanych grupach. W grupie 1 średnia stężenia M-CSF wynosiła 1046,25 pg/ml, natomiast w grupie kontrolnej 727,51pg/ml (Rycina 24).



Rycina 24. Stężenie GM-CSF (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

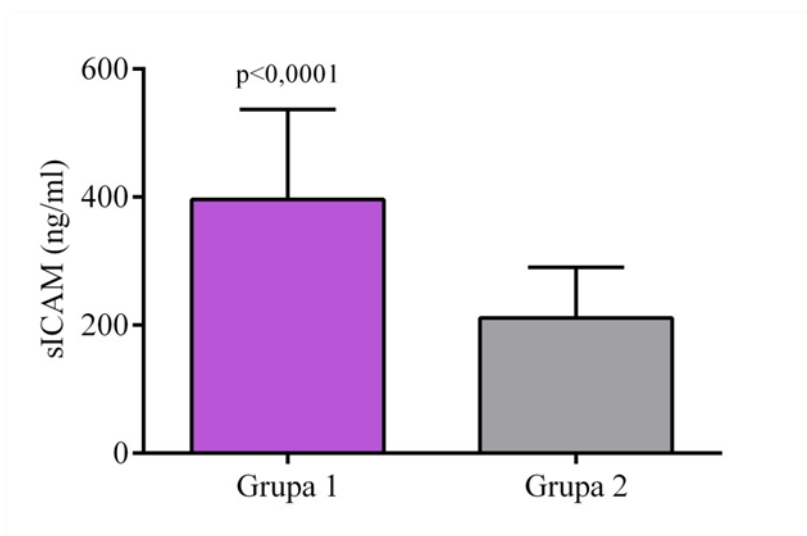
Nie uzyskano również istotnych statystycznie różnic pomiędzy podgrupami chłopców i dziewcząt w grupach badanych (Rycina 25).



Rycina 25. Stężenie M-CSF (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

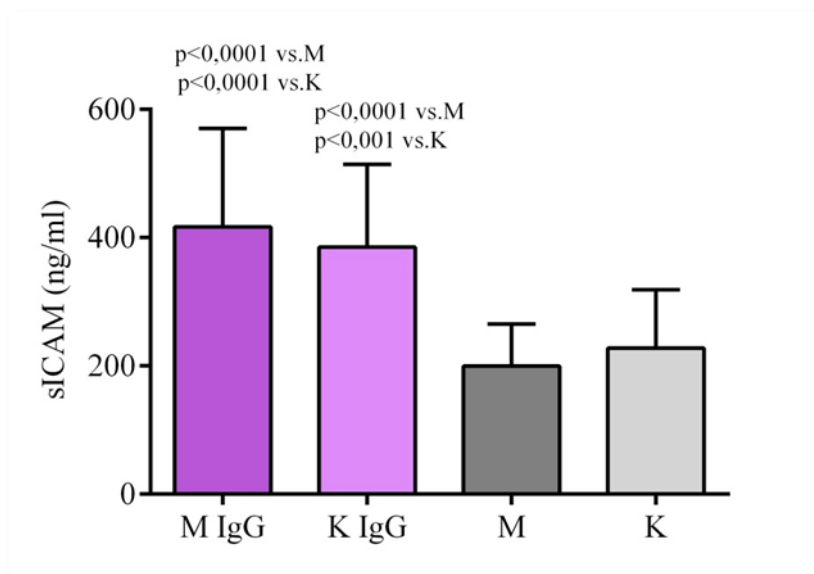
4.3.2.9. Analiza stężenia rozpuszczalnej formy międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (sICAM-1)

Analizie poddano stężenie sICAM-1 w grupie pacjentów z dodatnim mianem przeciwciał IgG przeciwko HCMV (grupa 1), w porównaniu z grupą dzieci, u których na podstawie badania ELISA wykluczono zakażenie HCMV (grupa 2). Stwierdzono znamienne statystycznie wyższe stężenie sICAM-1 w surowicy krwi pacjentów z grupy 1 (średnia: 396,22 ng/ml), w porównaniu z grupą 2 (średnia: 211,25 ng/ml) ($p < 0,0001$) (Rycina 26).



Rycina 26. Stężenie sICAM (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

Wyższe średnie stężenie sICAM-1 prezentowały podgrupy chłopców (średnia: 416,80 ng/ml) i dziewcząt (średnia: 385,38 ng/ml) z dodatnim mianem IgG HCMV. W porównaniu z grupami chłopców (średnia: 199,67 ng/ml) i dziewcząt (średnia: 227,89 ng/ml) niezakażonych HCMV wyniki średnich stężeń sICAM-1 różniły się istotnie statystycznie (Rycina 27).



Rycina 27. Stężenie sICAM (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

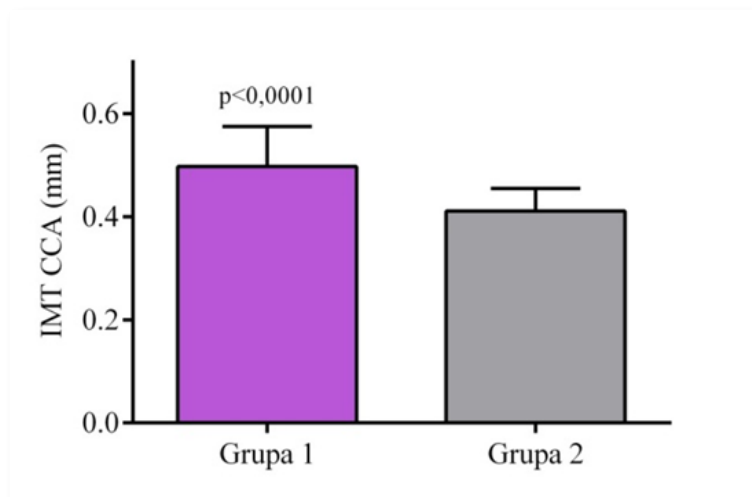
4.4. Analiza wyników ultrasonograficznego pomiaru IMT tętnic szyjnych

Porównano średnie z pomiarów IMT w poszczególnych odcinkach tętnic szyjnych wspólnych, w zakresie opuszki tętnic szyjnych wspólnych oraz tętnic szyjnych wewnętrznych. Wyniki przedstawiono w tabeli (Tabela 11).

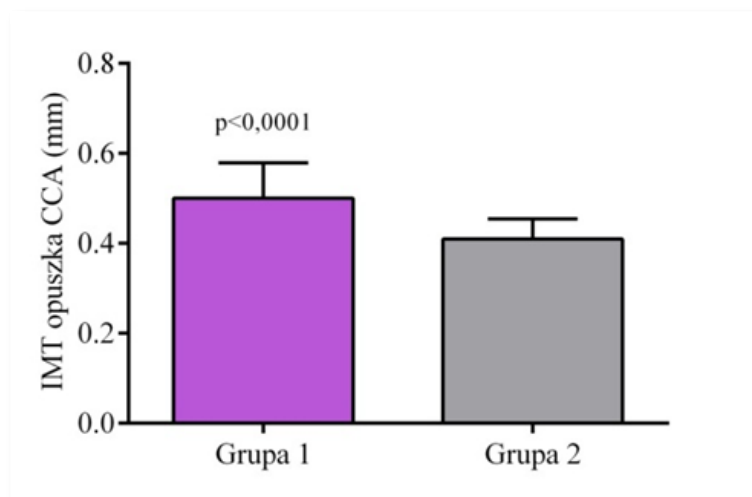
Tabela 13. Wyniki pomiarów IMT w obrębie tętnic szyjnych wspólnych (CCA), opuszki CCA oraz tętnic szyjnych wewnętrznych (ICA) w badanych grupach 1 i 2 oraz podgrupach dziewcząt i chłopców (przedstawiono średnie z pomiarów obustronnych ±SD). Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta)

Parametr (średnia±SD)	GRUPA1	Podgrupa M IgG	Podgrupa K IgG	GRUPA2	Podgrupa M	Podgrupa K
IMT CCA (mm)	0,52 (±0,06)	0,55 (±0,06)	0,46 (±0,04)	0,40 (±0,04)	0,41 (±0,03)	0,39 (±0,04)
IMT opuszka CCA (mm)	0,50 (±0,05)	0,54 (±0,05)	0,45 (±0,04)	0,39 (±0,06)	0,40 (±0,03)	0,38 (±0,07)
IMT ICA (mm)	0,51 (±0,03)	0,53 (±0,03)	0,44 (±0,04)	0,39 (±0,04)	0,40 (±0,04)	0,38 (±0,03)

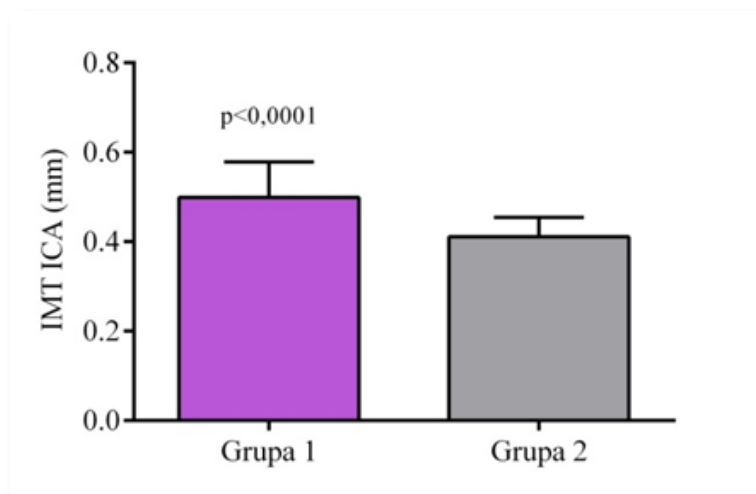
Uzyskano istotne statystycznie różnice średnich pomiarów IMT w obrębie ściany wszystkich badanych naczyń tętniczych pomiędzy grupą 1, a grupą 2 ($p < 0,0001$). Zależności te zobrazowano na poniższych rycinach.



Rycina 28. Wartość wskaźnika IMT CCA (średnia \pm SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

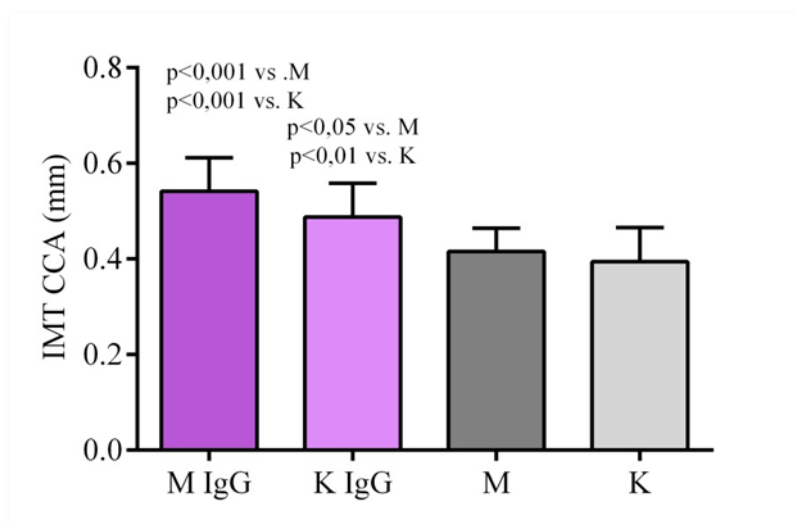


Rycina 29. Wartość wskaźnika IMT w zakresie opuszki CCA (średnia \pm SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

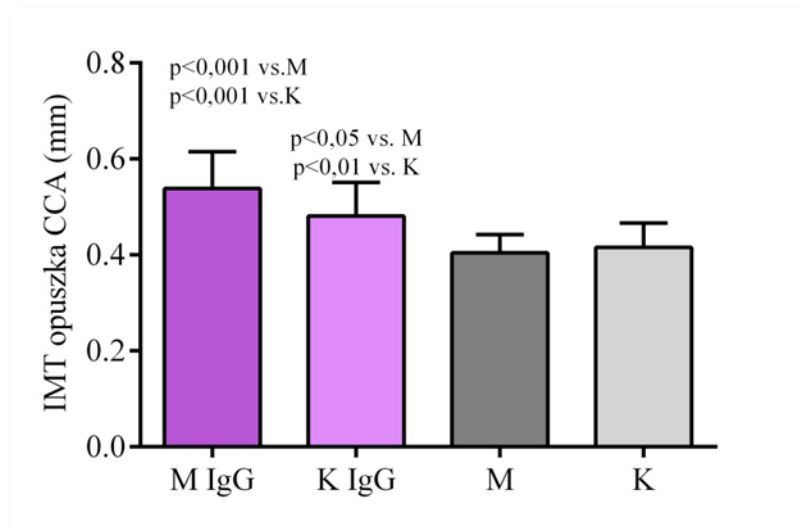


Rycina 30. Wartość wskaźnika IMT ICA (średnia \pm SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)

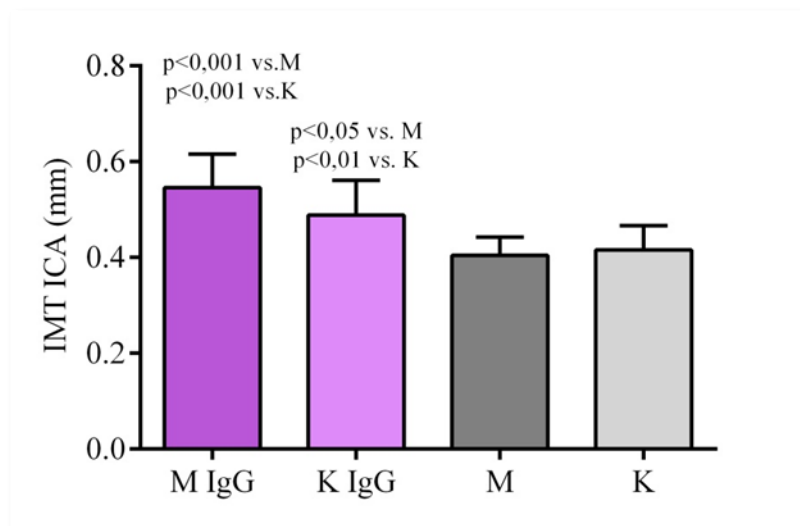
Najwyższe średnie wartości wskaźnika IMT w obrębie ściany wszystkich badanych tętnic prezentowała podgrupa chłopców z serologicznymi wykładnikami przebytego zakażenia HCMV. Pomiędzy powyższą podgrupą, a podgrupą dziewcząt z tej samej grupy nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy. Natomiast stwierdzono istotną statystycznie różnicę wartości IMT między podgrupami chłopców z grupy 1 i 2 ($p < 0,001$), oraz dziewcząt z grupy 1 i 2 ($p < 0,01$). Ryciny 31, 32, 33).



Rycina 31. Wartość wskaźnika IMT tętnicy szyjnej wspólnej (średnia \pm SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)



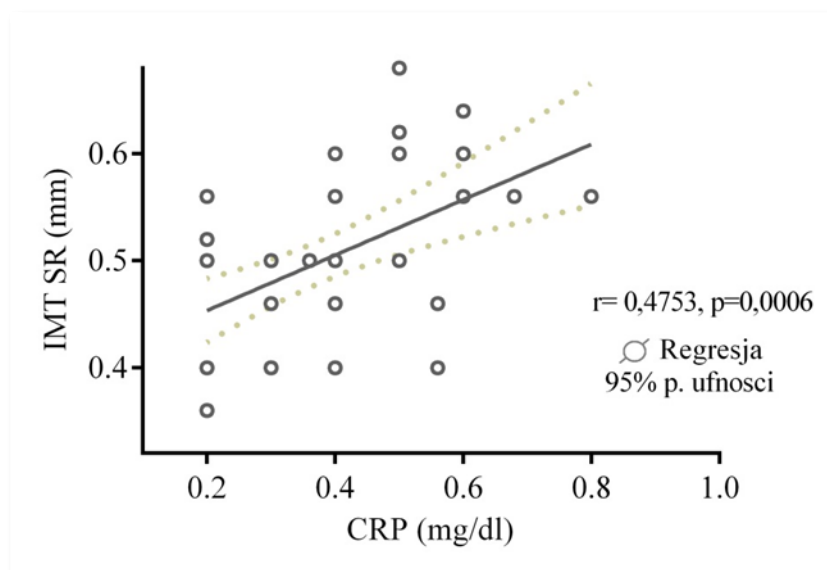
Rycina 32. Wartość wskaźnika IMT opuszki tętnicy szyjnej wspólnej (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)



Rycina 33. Wartość wskaźnika IMT tętnicy szyjnej wewnętrznej (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)

4.4.1. Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a stężeniem CRP w grupie 1 (n=49)

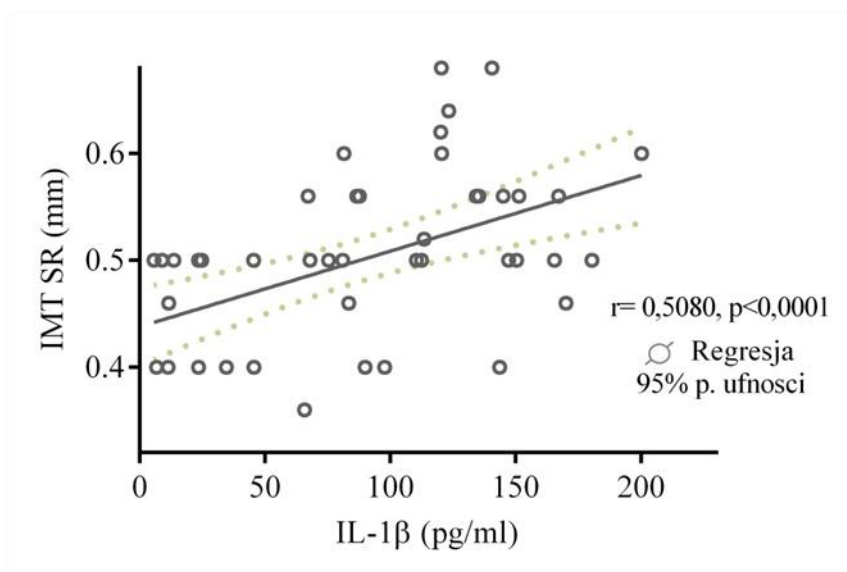
Przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR, średnia arytmetyczna pomiarów w zakresie tętnicy szyjnej wspólnej, opuszki tętnicy szyjnej wspólnej i tętnicy szyjnej wewnętrznej), a stężeniem CRP (mg/dl) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV. Stwierdzono istotny stopień korelacji pomiędzy badanymi cechami ($r=0,4753$, $p=0,0006$). Powyższą zależność przedstawia poniższy wykres (Rycina 34).



Rycina 34. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a stężeniem CRP (mg/dl) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1)

4.4.2. Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IL-1 β w grupie 1 (n=49)

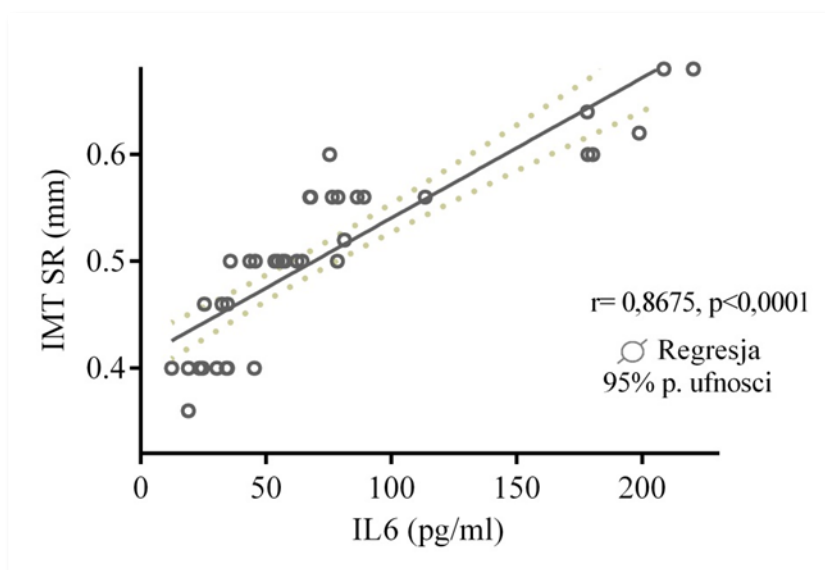
Analizowano zależność pomiędzy wzrostem średniego IMT, a stężeniem IL-1 β w grupie pacjentów z obecnością w surowicy krwi przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV. Stwierdzono wysoką korelację pomiędzy badanymi czynnikami ($r=0,5080$, $p<0,0001$) (Rycina 35).



Rycina 35. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IL-1 β (pg/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1)

4.4.3. Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IL-6 w grupie 1 (n=49)

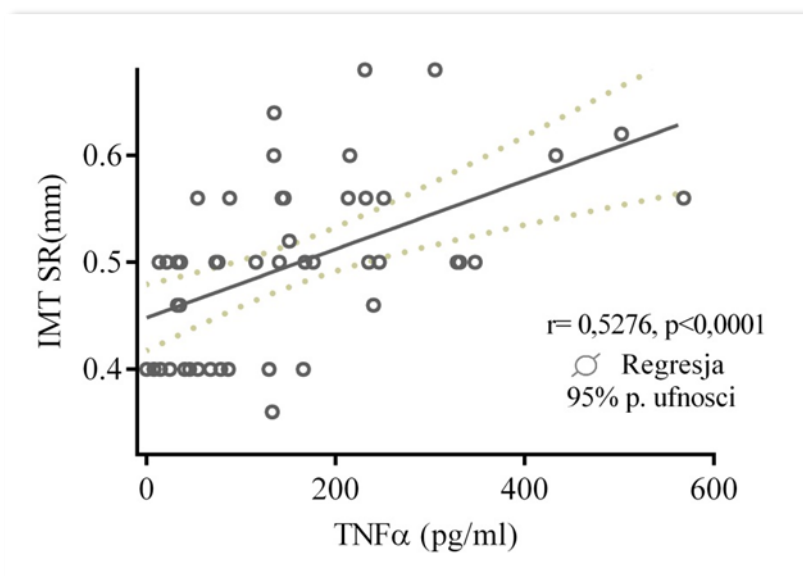
Na podstawie krzywej regresji stwierdzono silną korelację pomiędzy IMT SR, a stężeniem IL-6 w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV ($r=0,8675$, $p<0,001$). Powyższą zależność obrazuje wykres rozrzutu (Rycina 26).



Rycina 36. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IL-6 (pg/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1)

4.4.4. Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem TNF α w grupie 1 (n=49)

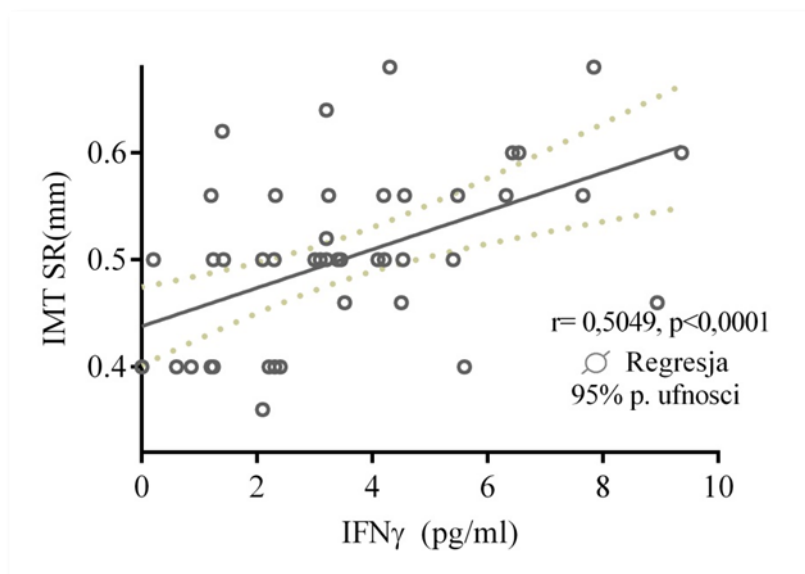
Przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a stężeniem TNF α w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV. Stwierdzono istotny stopień korelacji pomiędzy badanymi cechami ($r=0,5276$, $p=0,0006$) (Rycina 37).



Rycina 37. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem TNF α (pg/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1)

4.4.5. Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IFN γ w grupie 1 (n=49)

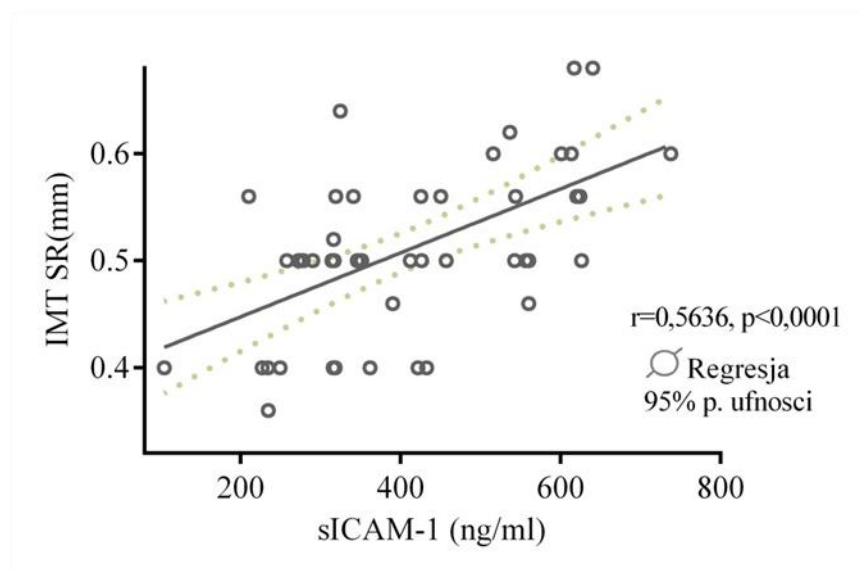
Wykazano istotną korelację pomiędzy średnim IMT (IMT SR), a stężeniem IFN γ we krwi pacjentów z obecnością w surowicy krwi przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG ($r=0,5049$, $p<0,0001$) (Rycina 38).



Rycina 38. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem $\text{IFN}\gamma$ (pg/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1)

4.4.6. Analiza korelacji pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem sICAM-1 w grupie 1 (n=49)

W wyniku przeprowadzenia analizy zależności pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT, a stężeniem sICAM-1 w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV, udowodniono istotny stopień korelacji ($r=0,5636$, $p=0,0006$). Powyższą zależność przedstawia wykres rozrzutu (Rycina 39).



Rycina 39. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem sICAM-1 (ng/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1)

4.5. Badanie USG jamy brzusznej

W wyniku przeprowadzonego badania USG jamy brzusznej u żadnego pacjenta z grupy badanej nie stwierdzono istotnych nieprawidłowości w obrazie narządów mięsaszowych, węzłów chłonnych oraz dużych naczyń jamy brzusznej.

4.6. Badanie EKG

U żadnego pacjenta z grupy badanej nie stwierdzono istotnych nieprawidłowości w zapisie EKG.

5. DYSKUSJA

Istnieje szereg publikacji opisujących wpływ latentnego zakażenia HCMV na rozwój miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca. W przypadku allogenicznych przeszczepów narządów udowodniono, że HCMV zarówno przyspiesza rozwój włóknienia naczyń w narządzie przeszczepionym, jak i stymuluje rozwój miażdżycy w naczyniach obwodowych biorcy przeszczepu. To właśnie jednoczesna stymulacja układu immunologicznego biorcy poprzez komórki allogenicznego przeszczepu oraz immunosupresja farmakologiczna stwarzają idealne warunki do reaktywacji i aktywnej replikacji HCMV [132,192,193,249,250,253]. Jednak wpływ zakażenia HCMV na rozwój miażdżycy u osób immunokompetentnych w dalszym ciągu powoduje dyskusje w kręgach badaczy. W momencie pojawienia się hipotezy o zapalnym podłożu miażdżycy, zaczęto zastanawiać się, czy czynnikiem spustowym reakcji zapalnej mogą być konkretne patogeny. W rozważaniach najczęściej brano pod uwagę dwa z nich: HCMV i *Chlamydia pneumoniae* [194,235,242,254,306]. Trudności w udowodnieniu wpływu HCMV na indukcję miażdżycy wynikały głównie z braku wielośrodkowych badań prospektywnych zajmujących się tym zagadnieniem. Poszczególne doniesienia dotyczyły głównie niewielkich grup pacjentów, lub opisów przypadków klinicznych. I tak w 1999r John Danesh i wsp. na podstawie przeprowadzenia metaanalizy trzech dostępnych wówczas badań prospektywnych poddali w wątpliwość wpływ HCMV na procesy miażdżycowe i zwiększenie ryzyka rozwinięcia choroby niedokrwiennej serca [248]. W kolejnych badaniach analizowano zależność pomiędzy obecnością przeciwciał przeciwko HCMV, a ryzykiem wystąpienia późniejszych zdarzeń sercowo-naczyniowych (zawału serca, udaru mózgu). Wyniki badań pozostawały jednak niejednoznaczne. W prospektywnym badaniu PHS (ang. *The Physicians Health Study*) analizowano obecność przeciwciał przeciwko HCMV w grupie mężczyzn po przebytych jednokrotnie zawałach mięśnia sercowego oraz w grupie mężczyzn w podobnym wieku, z dodatnim pojedynczym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Nie stwierdzono wpływu zakażenia HCMV na zwiększenie ryzyka wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych w tej grupie pacjentów w okresie 12 lat od rozpoczęcia badań (RR 0,77; 95% CI 0,6-0,9) [307]. W prowadzonym w 2000r przez Siscovick' a badaniu Cardiovascular Health Study, również nie udowodniono wpływu HCMV na zwiększenie ryzyka wystąpienia zawału serca (RR 1,2; 95% CI 0,7-1,9). Badaniem objęto wówczas 213

pacjentów w wieku powyżej 65 lat, po przebytych zawale serca [242]. Kolejne dwa badania wykazały niewielką zależność pomiędzy dodatnim mianem HCMV, a ryzykiem wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego. W badaniu HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation*), obejmującym 494 pacjentów z podwyższonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych, wskaźnik RR dla infekcji HCMV wynosił 1,24 (95% CI 1,01-1,53) [308]. Natomiast w badaniu NHANES III (*The National Health and Nutrition Examination Survey III*) obejmującym 14000 pacjentów w wieku 6-78 lat wykazano, że latentne zakażenie wirusem HCMV nieznacznie zwiększa ryzyko wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego (RR 1,19; 95%CI 0,95-1,49) [309]. W 2009r Roberts i wsp. opublikowali wyniki badania SALSA (*The Sacramento Area Latino Study on Aging*), w którym przeanalizowano poziom przeciwciał HCMV w grupie 1468 pacjentów pomiędzy 60., a 100. rokiem życia. Dla całej grupy badanej stwierdzono zwiększone ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych zależne od miana HCMV IgG (RR 1,35; 95% CI 1,10-1,81) [310]. Podobne wyniki uzyskano w badaniu ARIC (*The Atherosclerosis Risk in Communities Study*), w którym pacjenci z wysokim mianem przeciwciał IgG HCMV mają prawie dwukrotnie większe ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych (RR 1,89; 95% CI 0,98-3,67) [255].

Powyższe badania wskazują na istnienie związku pomiędzy latentnym zakażeniem HCMV, a ryzykiem rozwoju miażdżycy. Poza dużymi badaniami prospektywnymi istnieje szereg doniesień o wpływie HCMV na rozwój miażdżycy w predysponowanych do niej grupach pacjentów. W 2000r. Sorlie i wsp. dokonali porównania ryzyka rozwinięcia klinicznie jawnej choroby sercowo-naczyniowej w grupie pacjentów chorych na cukrzycę typu 2. Pacjenci z tej grupy z dodatnim mianem IgG HCMV istotnie częściej rozwijali niestabilną postać choroby niedokrwiennej serca. Synergistyczny wpływ cukrzycy i latentnego zakażenia HCMV na rozwój miażdżycy udowodniono również w kolejnych pracach [311,312]. Informacje dotyczące latentnej postaci zakażenia HCMV w odniesieniu do rozwinięcia subklinicznej postaci miażdżycy w grupie pediatrycznej są nieliczne. Co ciekawe rezultaty podobnych badań przeprowadzonych wśród nastolatków i osób dorosłych są porównywalne.

W badanym materiale dokonano porównania profilu cytokin pro- i antyzapalnych oraz sICAM-1 uznanych za tzw. nowe czynniki ryzyka miażdżycy z IMT w grupie pacjentów z serologicznymi wykładnikami zakażenia HCMV z grupą kontrolną. Średnia wieku dzieci wyniosła 16 lat, rozkład płci był proporcjonalny w obu grupach. W celu uzyskania

homogennych grup pacjentów z badania wykluczono dzieci z udowodnionymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, takimi jak dyslipidemia, cukrzyca, nadciśnienie czy zespół metaboliczny. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa, stwierdzono bowiem, że obecność choćby jednego z czynników ryzyka miażdżycy, u młodzieży i dorosłych znamienne wpływa na stan śródbłonna naczyniowego naczyń tętniczych i grubość IMT [313]. Z badania wykluczono również dzieci z rodzinnym obciążeniem przedwczesnym wystąpieniem chorób sercowo-naczyniowych, gdyż wyniki wielośrodkowych badań wskazują, że nawet odosobnione istnienie powyższego czynnika ryzyka u dzieci i młodzieży, związane jest ze wzrostem poziomu IL-6 i TNF α w surowicy krwi [212], czy znacząco wyższym wskaźnikiem IMT w tej grupie [314]. Ponadto z uwagi na niekwestionowany wpływ nikotynizmu na rozwój miażdżycy, z badania wykluczono również pacjentów narażonych na dym tytoniowy [216].

W badanej grupie pacjentów w żadnym z przypadków nie stwierdzono nadciśnienia tętniczego. Co prawda w przypadku chłopców, u których stwierdzono w surowicy krwi obecność przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG, obserwowano nieco wyższe średnie wartości ciśnień skurczowych i rozkurczowych. Powyższe obserwacje nie pozwalają jednak wysnuć wniosku o wpływie HCMV na wartości ciśnienia tętniczego u dzieci. Doniesienia światowe w tym względzie charakteryzuje duża rozpiętość, przy czym brakuje analogicznych badań w grupie pediatrycznej. W badaniu NHANES (1999–2002) współistnienie zakażenia HCMV i nadciśnienia tętniczego potwierdzono jedynie w grupie kobiet ($p=0,002$), przy czym po wprowadzeniu jako dodatkową zmienną wieku pacjentek utracono powyższą zależność [315]. Z kolei Haarala i wsp. na podstawie wyników badania Cardiovascular Risk in Young Finns Study wykazali istotną zależność pomiędzy obecnością przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV, a nadciśnieniem tętniczym w grupie mężczyzn pomiędzy 24., a 39. rokiem życia [316]. Rozważania teoretyczne na temat wpływu HCMV na rozwój nadciśnienia tętniczego obejmują kilka mechanizmów. Po pierwsze HCMV prowadzi do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, podsycając procesy zapalne w ścianie naczynia. Ciągła stymulacja prozapalna indukowana poprzez okresową reaktywację latentnego zakażenia HCMV, powoduje zmniejszenie elastyczności ściany naczynia [317–319]. Ponadto zgodnie z najnowszą hipotezą nadciśnienia tętniczego jako choroby o podłożu zapalnym, w którym główną rolę odgrywają limfocyty typu T [259], wykazano, że aktywacja przez HCMV limfocytów T CD8 $^{+}$ wpływa na szybszy rozwój nadciśnienia u tych chorych [258,320]. Wykazano również, że infekcja HCMV stymuluje ekspresję genów reniny w śródbłonku

naczyniowym, co w następstwie prowadzi do zwiększenia stężenia angiotensyny I i II we krwi pacjenta i w konsekwencji wzrost ciśnienia tętniczego krwi [321–324].

Analizując badania laboratoryjne w grupie pacjentów z obecnością w surowicy krwi przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG, stwierdzono istotnie wyższe średnie procentowe wartości limfocytów i monocytów w rozmazie krwi obwodowej, oscylujące jednak nadal w zakresie wartości referencyjnych. Wyniki te korespondują z dostępnym piśmiennictwem [41,128,129]. Analiza cytometryczna krwi obwodowej pacjentów z latentną postacią HCMV i z postacią ostrą pozwoliła udowodnić, że głównym rezerwuarem wirusa w ustroju są monocyty CD 14+. W postaciach latentnych zakażenia HCMV obserwowano okresowy niewielki wzrost poziomu monocytów we krwi obwodowej, przy braku klinicznych i laboratoryjnych wykładników stanu zapalenia, co mogło odpowiadać krótkim okresom reaktywacji wirusa [325].

W celu oceny nasilenia procesu zapalnego porównano stężenie CRP w badanych grupach. Średnie wartości CRP utrzymywały się w zakresie wartości referencyjnych, pomimo to stwierdzono istotnie statystyczną różnicę pomiędzy grupą pacjentów, u których w surowicy krwi stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG, a grupą kontrolną ($p=0,004$). Dane te znajdują potwierdzenie w badaniach innych autorów i wydają się mieć istotne znaczenie kliniczne, dowodząc wpływu HCMV na podtrzymywanie procesu zapalnego na stałym niskim poziomie. Zależność pomiędzy stężeniem CRP, a ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych udowodniło wielu badaczy. W pracy Cao i wsp. z 2003 roku określono ryzyko wystąpienia ostrego incydentu sercowo-naczyniowego w grupie pacjentów dorosłych w zależności od poziomu CRP, przy czym wartości, przy których ryzyko to rosło znacząco, oscylowały w zakresach wartości referencyjnych danego laboratorium, lub minimalnie je przekraczały [326]. Podobnie badania przeprowadzone w 2006 roku przez Kawamoto i wsp. wykazały ścisłą korelację pomiędzy stężeniem CRP, a IMT oraz obecnością plak miażdżycowych stwierdzanych w USG tętnic szyjnych. Także w tej analizie stężenie CRP, dla którego stwierdzano istotną statystycznie korelację z IMT nie przekraczało granicy normy. Ponadto w badaniu ryzyko sercowo-naczyniowe było większe u pacjentów, u których poza wyższym niż w grupie kontrolnej stężeniem CRP stwierdzano nadciśnienie tętnicze, czy zaburzenia profilu lipidowego [327]. Chociaż zależność pomiędzy stężeniem CRP, a ryzykiem rozwinięcia miażdżycy u dorosłych zostało udowodnione, brakuje badań przeprowadzonych w populacji dziecięcej. W 2007 roku opublikowano wyniki

pracy zespołu irańsko-amerykańskich badaczy, w której poddano analizie zależności pomiędzy stężeniem CRP, a współistnieniem pozostałych czynników ryzyka miażdżycy w grupie 512 osób w wieku pomiędzy 10., a 18.r.ż. Stwierdzono, iż stężenie CRP koreluje jedynie z BMI pacjentów, nie wykazano natomiast istotnej zależności pomiędzy stężeniem CRP, a poziomami lipidów oraz homocysteiny we krwi dzieci. Nie stwierdzono również zależności pomiędzy wartością CRP, a skurczowym i rozkurczowym średnim ciśnieniem tętniczym [328]. Z kolei Juonala i wsp. wykazali, że stężenie CRP stwierdzone w dzieciństwie, ściśle koresponduje z poziomem tego białka u młodych dorosłych, co predysponuje tę grupę pacjentów do wcześniejszego, w porównaniu z rówieśnikami, rozwoju subklinicznej postaci miażdżycy [329]. CRP utrzymuje się na stałym, wyższym niż w przypadku zdrowej populacji poziomie, u dzieci otyłych. W licznych badaniach potwierdzono zależność pomiędzy BMI pacjenta, a stężeniem CRP w jego krwi. Wynika to z faktu, iż tkanka tłuszczowa jest jednym z miejsc produkcji dwóch prozapalnych cytokin: IL-6 i TNF α , które indukują produkcję CRP i innych białek ostrej fazy przez komórki wątroby [330–334]. W niniejszej pracy wyższe stężenie CRP w grupie dzieci z latentną postacią zakażenia HCMV w stosunku do grupy kontrolnej nie wynikało jednak z większej aktywności tkanki tłuszczowej, gdyż w obu grupach pacjentów stwierdzono prawidłowe BMI.

W 2001r pojawiło się doniesienie o wpływie zakażenia HCMV na wzrost stężenia cholesterolu całkowitego we krwi. Stwierdzono, że w grupie badanych kobiet (średnia wieku 38 lat) z dodatnim mianem IgG HCMV poziom cholesterolu całkowitego był wyższy w porównaniu z grupą kobiet z ujemnym mianem przeciwciał ($p=0,012$). Podobnej zależności nie stwierdzono natomiast pomiędzy analogicznymi grupami mężczyzn [335]. Wyniki te nie znalazły odzwierciedlenia w kolejnych pracach [336]. W badaniach opublikowanych w 2005 roku w grupie dzieci (5-11 r.ż), nie wykazano zależności pomiędzy poziomem IgG HCMV, a zaburzeniami lipidowymi [243]. W analizowanym materiale również nie stwierdzono nieprawidłowości w profilu lipidowym pacjentów w badanych grupach. Nie wykazano także zależności pomiędzy stężeniami poszczególnych lipidów, a zakażeniem HCMV w całej grupie badanej, oraz w poszczególnych podgrupach.

Jak już wcześniej wspomniano miażdżycę tętnic jest przewlekłą chorobą zapalną naczyń stymulowaną poprzez mechanizmy wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Mediatorzy zapalenia kontrolują zarówno rozwój, jak i późniejszą stabilizację blaszki miażdżycowej. Najnowsze wyniki badań wskazują na fakt, iż w procesie miażdżycowym biorą udział czynniki nie tylko pro- ale również antyzapalne. To właśnie brak równowagi

między prozapalnym charakterem odpowiedzi Th1, a antyzapalnym Th2 prowadzi do rozwoju blaszek miażdżycowych. Do cytokin prozapalnych o udowodnionym działaniu proaterogennym należą: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-18, TNF α , IFN γ , oraz M-CSF i MCP-1 [169]. Większość doniesień naukowych opiera się na wynikach badań eksperymentalnych w oparciu o hodowle ludzkich komórek śródbłonka w warunkach *in vitro* lub na modelu mysim i szczurzym. Jednak w ostatnim czasie coraz większa liczba badaczy koncentruje się na analizowaniu stężenia powyższych cytokin w surowicy krwi pacjentów z rozpoznaną objawową miażdżycą oraz na klinicznej przydatności takich oznaczeń.

IL-1 β jest jedną z cytokin zapalnych o udowodnionym działaniu promiażdżycowym [201,337]. Jej źródłem są głównie makrofagi, komórki śródbłonka i adipocyty, a za jej wydzielanie odpowiedzialny jest TNF α [338]. IL-1 β zwiększa aktywność limfocytów T stymulując je do wydzielania IL-2, IL-6, TNF α oraz samej IL-1 β . Ponadto stymuluje syntezę cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka naczyniowego (VCAM-1, ICAM-1) [339]. Poprzez zwiększenie adhezji leukocytów do komórek śródbłonka, wzrost przepuszczalności błony wewnętrznej i nasilenie proliferacji mięśni gładkich naczyń IL-1 β uczestniczy w procesie przebudowy naczyń [340]. Cytokina ta aktywuje również wydzielanie metaloproteinaz macierzy (ang. *Matrix Metalloproteinases*, MMPs), które to odpowiedzialne są za rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej i destabilizują blaszki miażdżycowej [201]. Ponadto IL-1 β wpływa na akumulację ox-LDL i nasilenie formowania komórek piankowatych oraz zwiększa prokoagulacyjny profil osocza [201,337]. Badania Kirii i wsp. dowodzą, że w populacji myszy z niedoborem apoE, brak IL-1 β łączy się z ograniczeniem procesów miażdżycowych w ścianie aorty u tych osobników, co związane jest najprawdopodobniej z obniżeniem ekspresji VCAM-1 i ICAM-1 na powierzchni śródbłonka naczyniowego [341]. Według ostatnich badań nad polimorfizmem genów IL-1, wykazano wpływ IL-1 β na syntezę CRP [342]. Wielośrodkowe badania genetyczne populacji włoskiej, chińskiej i koreańskiej wykazały zależność pomiędzy polimorfizmem genów IL-1 β , a rozwinięciem zawału serca [343–345]. Wykazano również, że obecność antagonistów receptora dla IL-1 β prowadzi do ograniczenia tworzenia neointymy w naczyniach wieńcowych po zabiegu angioplastyki [346]. Dotychczas nie prowadzono badań nad aterogennym wpływem IL-1 β na naczynia tętnicze w populacji pediatrycznej.

W bieżącym opracowaniu stwierdzono wyższe stężenie IL-1 β w grupie pacjentów z latentną postacią HCMV, w porównaniu z grupą kontrolną. Wynik ten może wskazywać na

podtrzymywanie przez HCMV stałego, niskiego poziomu stanu zapalenia, który sprzyja rozwojowi subklinicznej postaci miażdżycy.

W prognozowaniu ryzyka sercowo-naczyniowego u osób dorosłych coraz większe znaczenie odgrywa ocena stężenia dwóch kolejnych cytokin prozapalnych: IL-6 i TNF α . W badaniach eksperymentalnych udowodniono, że głównym źródłem IL-6 są monocyty, makrofagi, komórki śródbłonka, limfocyty T i B oraz adipocyty. Pod wpływem IL-6 dochodzi do syntezy CRP i fibrynogeny w wątrobie, co dodatkowo podsyca proces aterogenezy. W pętli sprzężenia zwrotnego IL-6 aktywuje również syntezę cytokin prozapalnych m.in. IL-1 oraz TNF α [347]. Ponadto nasila ona migrację i proliferację komórek mięśni gładkich w ścianie naczynia. IL-6 wpływa również na syntezę cząsteczek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1, E-selektyny), oraz innych czynników chemotaktycznych (MCP-1) [348,349]. TNF α natomiast syntetyzowany jest głównie przez monocyty i makrofagi pod wpływem IFN γ , IL-1 β , a także autokrynowo (przez sam TNF α). Cytokina ta stymuluje powstawanie i różnicowanie limfocytów B, limfocytów T, limfocytów NK, oraz wzmacnia cytotoksyczność monocytów i makrofagów. Rola TNF α w rozwoju miażdżycy wiąże się poza tym z nasileniem ekspresji receptorów dla monocytów na powierzchni uszkodzonego śródbłonka.

Głównym mechanizmem indukcji miażdżycy jest wpływ obu powyższych cytokin na dysfunkcję śródbłonka naczyniowego. W badaniach Tentolouris'a i wsp. oceniano zależność pomiędzy stężeniami IL-6 i TNF α , a funkcją śródbłonka naczyniowego u chorych z chorobą niedokrwinną serca, niewydolnością serca, kardiomiopatią rozstrzeniową oraz w grupie kontrolnej. Funkcję śródbłonka oceniano w oparciu o zdolność do rozszerzenia naczyń w odpowiedzi na przekrwienie lub nitraty. We wszystkich grupach badanych stwierdzono istotną zależność pomiędzy dysfunkcją śródbłonka, a stężeniem IL-6 i TNF α we krwi pacjentów [350]. Ciekawych danych dostarczyło prospektywne badanie Hedmana i wsp., w którym oceniano wartość prognostyczną IL-6 i CRP w przewidywaniu wczesnej okluzji w zespoleniach aortalno-wieńcowych oraz późnych epizodów sercowo-naczyniowych po operacji pomostowania aortalno-wieńcowego (ang. *Coronary Artery Bypass Graft*, CABG). Badanie przeprowadzono u chorych w stabilnym okresie choroby wieńcowej. Okazało się, że podwyższone przedoperacyjnie stężenie CRP było predyktorem jedynie wczesnej okluzji zespolenia, natomiast to poziom IL-6 okazał się być wskaźnikiem ryzyka nie tylko wczesnej okluzji naczynia, ale także późnych epizodów sercowo-naczyniowych po CABG [203]. W opublikowanej w 2005 roku pracy Bautisty i wsp. wyższe stężenie IL-6 i TNF α korelowało zarówno z dysfunkcją śródbłonka, jak również z nadciśnieniem tętniczym [351].

Do podobnych wniosków doszli badacze japońscy. Stwierdzili oni, że u młodych chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym stężenie powyższych cytokin jest znamienne wyższe niż w grupie kontrolnej [352]. W badaniu Weiss i wsp. (2001) wykazano ścisłą zależność pomiędzy stężeniem IL-6, CRP, VCAM-1, ICAM-1, a stwierdzanymi badaniem metodą rezonansu magnetycznego zmianami w tętnicach szyjnych wspólnych i brzuszny odcinku aorty [353]. W dużych, randomizowanych badaniach klinicznych wykazano, że w stratyfikacji ryzyka chorych z ostrym zespołem przydatne jest oznaczenie IL-6. W 2001 zakończono badanie FRISC II (*Fragmin and fast revascularization during instability in coronary artery disease*), w którym wykazano, że ryzyko zgonu oraz jednocześnie korzyści z wcześniejszego włączenia intensywnego leczenia charakteryzowały pacjentów z wyższym poziomem IL-6. W podobnym badaniu prowadzonym w Finlandii, potwierdzono prognostyczną rolę IL-6 w szacowaniu ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych. W badanej grupie pacjentów z najwyższym poziomem IL-6 ryzyko zgonu w przeciągu 17. najbliższych miesięcy rosło 6-krotnie [354]. Z kolei w badaniu GUSTO IV (*Fourth Global Utilization of Strategies To Open Occluded Arteries*) wykazano istotną wartość prognostyczną CRP, IL-6 oraz troponiny T w ocenie ryzyka zgonu u chorych z zawałem serca i cukrzycą. Istnieją pojedyncze badania dotyczące wpływu latentnego zakażenia HCMV na środowisko cytokinowe w kontekście rozwoju miażdżycy. W 2010 roku opublikowano ciekawą pracę polskich ekspertów, w której badano zależność pomiędzy ilością kopii DNA HCMV w ścianie aorty (próbki naczyń uzyskano w trakcie CABG) i w surowicy krwi, a aktywnością transkrypcyjną IL-6 i TNF α . Analiza wykazała istotną statystycznie korelację w przypadku IL-6, natomiast w przypadku TNF α stwierdzono niewielki wzrost stężenia cytokiny zależny od ilości kopii DNA HCMV, nie uzyskano jednak istotności statystycznej [355]. Z kolei w badaniach Krogerus i wsp. na modelu szczurzym wykazano zwiększenie syntezy TNF α przez komórki śródbłoka zakażone HCMV [356].

Doniesienia o wpływie IL-6 i TNF α na stan naczyń tętniczych w populacji dziecięcej są nieliczne. W publikacji Garanty-Bogackiej i wsp. z 2005 roku wykazano, że wyższe poziomy IL-6 w surowicy krwi ściśle korelują z nadciśnieniem tętniczym stwierdzanym u dzieci otyłych [357]. Podobne wyniki przedstawiono również w pracy Głowińskiej i Urban z 2003r [218]. Z kolei Haddy i wsp. na podstawie badania STANISLAS wykazali, że podwyższony poziom IL-6 u dorosłych i ich dzieci ściśle koreluje z tradycyjnymi czynnikami ryzyka miażdżycy takimi jak: wiek, płeć męska, podwyższone BMI, nadciśnienie tętnicze [202].

Badania nad etiologią miażdżycy w populacji dzieci z chorobami reumatycznymi, dostarczyły informacji o wpływie przewlekłego stanu zapalnego na ścianę naczyń tętniczych u młodocianych. Stwierdzono istotne zmniejszenie grubości IMT, jak i obniżenie stężenia cytokin proaterogennych u pacjentów poddanych leczeniu antagonistami TNF α [358,359].

W badanym materiale stwierdzono, że w grupie pacjentów z serologicznymi wykładnikami zakażenia HCMV poziomy IL-6 i TNF α są istotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną. Z uwagi na fakt, iż u żadnego z dzieci nie stwierdzono czynników ryzyka miażdżycy, różnica ta wynikała prawdopodobnie z permanentnej stymulacji antygenowej przez HCMV jaka miała miejsce w tej grupie. Jak już wcześniej wspomniano, okresowa reaktywacja wirusa w ścianie naczyniowej może mieć miejsce nawet w przypadku krótkotrwałej aktywacji stanu zapalnego np. w wyniku stresu. Prowadzi to do podtrzymywania prozapalnego środowiska cytokinowego na stale niskim poziomie, co znacząco wpływa na rozwój subklinicznej postaci miażdżycy. Ciekawą zależność zaobserwowano w przypadku dziewcząt z grupy 1, u których stwierdzono obecność w surowicy krwi przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG. W odniesieniu do stężeń obu cytokin wykazano statystycznie istotną różnicę w stosunku do grupy chłopców i dziewcząt z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Jednakże tą samą zależność stwierdzono w odniesieniu do grupy chłopców z dodatnim mianem IgG HCMV ($p < 0,05$). Istnieją co prawda doniesienia o wpływie przeciwzapalnym estrogenów na obniżenie poziomów CRP, IL-1 β , IL-6, TNF α , ale dotyczą one głównie badań przeprowadzanych w grupie kobiet w wieku okołomenopauzalnym, u których zastosowano hormonalną terapię zastępczą [360]. Być może jednak w przypadku aktywacji procesów zapalnych przez HCMV, poziom niektórych cytokin prozapalnych u dziewcząt wzrasta w mniejszym stopniu niż u chłopców.

Kolejną cytokiną analizowaną w pracy jest IFN γ . W badanej populacji stwierdzono, że w grupie pacjentów z latentną postacią HCMV stężenie IFN γ było znacząco wyższe niż w przypadku grupy niezakażonej tym wirusem. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że podwyższone stężenie IFN γ związane jest ze stymulacją układu immunologicznego przez okresową reaktywację HCMV. Wyniki te znajdują odzwierciedlenie w dostępnym piśmiennictwie. W badaniu Sainz'a i wsp. wykazano, że ostra infekcja HCMV prowadzi do nasilonego wyrzutu IFN α/β przez komórki zakażone i IFN γ przez aktywowane limfocyty T CD8 $^+$ oraz przez komórki NK. W przypadku latentnej postaci zakażenia zwiększenie stężenia IFN γ wynika z aktywności głównie limfocytów T CD8 $^+$, w trakcie okresowej niemej klinicznie reaktywacji zakażenia [361]. W badaniach eksperymentalnych zarówno na modelu

mysim, jak i komórkach śródbłónka naczyniowego w warunkach *in vitro* stwierdzono, że główną rolą IFN γ w indukowaniu i podtrzymywaniu procesów miażdżycowych jest jego wpływ na rekrutację makrofagów do ściany naczynia [362,363]. W opublikowanej w 2006 roku pracy Schroecksnael i wsp. wykazali natomiast, że u pacjentów z niestabilną chorobą niedokrwienną serca stwierdzano istotnie wyższe stężenie IFN γ w surowicy krwi, w porównaniu z grupą pacjentów zdrowych [364].

W stosunku do dwóch kolejnych cytokin, nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy badanymi grupami, co znajduje odzwierciedlenie w dostępnym piśmiennictwie. Rola M-CSF, jako czynnika proaterogennego została udowodniona w badaniach na modelu mysim [340], hodowlach komórek naczyń [365] oraz *in vivo* w odniesieniu do pacjentów z zaawansowaną chorobą niedokrwienną serca [206]. Pod wpływem stresu oksydacyjnego śródbłonek naczyniowy wydziela znaczne ilości zarówno M-CSF, jak i GM-CSF. W wyniku ich działania dochodzi do różnicowania monocytów do makrofagów, co wiąże się z pojawieniem na ich powierzchni receptorów SR i w dalszym etapie formowania rdzenia lipidowego blaszki miażdżycowej.

Zwiększone stężenie M-CSF i GM-CSF stwierdzano wielokrotnie w płakach miażdżycowych pacjentów po CABG, przy czym im większa była ekspresja tych cytokin, tym blaszka charakteryzowała się większą niestabilnością [366]. Poziom M-CSF we krwi pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym, okazał się być dobrym predyktorem zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych. Ponadto stężenie M-CSF oznaczone sześć tygodni po zawale serca, ściśle korelowało z wystąpieniem kolejnego ostrego zespołu wieńcowego w ciągu najbliższych dwóch lat [367]. Badania poziomu M-CSF i GM-CSF nie stanowią zatem predyktora zmian naczyniowych na wczesnym etapie miażdżycy.

Tworzenie blaszki miażdżycowej jest wieloczynnikowym, długotrwałym procesem. Stopień nasilenia zmian w naczyniu zależy w dużej mierze od nasilenia stanu zapalnego. Udowodniono, że przewaga cytokin odpowiedzi Th2 chroni przez rozwojem miażdżycy, a w przypadku istniejących już zmian naczyniowych, spowalnia ich rozwój oraz stabilizuje blaszkę miażdżycową [169,191,340]. W badaniu analizowano dwie z nich: IL-4 i IL-10.

Interleukina-4 została początkowo uznana za cytokinę o wyłącznie antyaterogennym charakterze [169]. Kolejne badania wykazały jej bardziej plejotropowy charakter. Stwierdzono, że IL-4 podtrzymuje procesy miażdżycowe, poprzez aktywację szeregu mediatorów dla komórek śródbłónka [98,169,215,368–376]. Dodatkowo IL-4 pobudza

syntezę IL-1 β , TNF α oraz ekspresję VCAM-1 na komórkach śródbłonna [377]. Ponadto IL-4 posiada zdolność indukowania apoptozy komórek śródbłonna, co przyczynia się do destabilizacji blaszki miażdżycowej [378]. Proaterogenne działanie tej interleukiny potwierdzono również na modelu mysim. King i wsp. wykazali, że przeszczep komórek macierzystych szpiku kostnego pochodzących od myszy pozbawionych genu IL-4, znacznie obniżyło stopień rozwoju blaszek miażdżycowych u biorców przeszczepu [379]. Ponadto zaobserwowano znaczące spowolnienie procesu miażdżycowego u myszy z niedoborem ApoE pozbawionych genu IL-4 [380]. Mechanizmy indukcji miażdżycy przez IL-4 *in vivo* pozostają jednak dalej nieznanymi. W 2010 roku opublikowano wyniki pracy Shahzad'a i wsp. o wpływie IL-4 na stężenie ox-LDL w surowicy krwi pacjentów z udowodnionym procesem miażdżycowym. Nie wykazano jednak istotnych zależności pomiędzy stężeniami IL-4 i oxLDL, a stopniem rozwoju miażdżycy [381]. W badanym materiale również nie stwierdzono podwyższenia stężenia IL-4 we krwi pacjentów z dodatnim mianem IgG HCMV, pomimo, iż wykazano podwyższone poziomy IL-1 β , IL-6 i TNF α , co wskazuje na przewagę proaterogennego profilu cytokin w osoczu. Być może na etapie subklinicznej postaci miażdżycy synteza IL-4 jest niewielka, a jej wyższe stężenie obserwuje się jedynie w złożonej blaszce miażdżycowej, nie w surowicy krwi.

W zakresie poziomu IL-10 wykazano znaczną różnicę pomiędzy grupą pacjentów z dodatnim mianem przeciwciał IgG HCMV w porównaniu z grupą kontrolną. Dalsza analiza wykazała jednak, że po podziale grup względem płci najniższe stężenie IL-10 charakteryzowało podgrupę chłopców z latentną postacią HCMV. Najwyższe poziomy cytokiny prezentowały dziewczęta z grupy kontrolnej. To właśnie pomiędzy tymi dwiema grupami stwierdzono istotną statystycznie różnicę ($p < 0,05$). Co ciekawe poziomy IL-10 w przypadku dziewcząt IgG HCMV dodatnich były niższe niż w podgrupach kontrolnych, nie uzyskano jednak różnicy istotnej statystycznie. Powyższe obserwacje wskazywałyby na fakt większej prozapalnej aktywacji układu immunologicznego u chłopców, niż u dziewcząt, co w kontekście uprzednio stwierdzanych różnic w stężeniach IL-6 oraz TNF α , stanowi przyczynek do dyskusji, czy przeciwzapalny wpływ estrogenów może być obserwowany już w tak młodym wieku. Co prawda nie ulega wątpliwości fakt, że do okresu okołomenopauzalnego procesy miażdżycowe u kobiet przebiegają znacznie wolniej niż u mężczyzn i gwałtownie przyspieszają w momencie znacznego spadku hormonów płciowych po menopauzie [382–385]. Istnieją również doniesienia o większej predyspozycji do rozwinięcia miażdżycy u kobiet z zespołem PCO (ang. *polycystic ovary syndrome*), w którym

jednym z jego laboratoryjnych wyznaczników są obniżone poziomy estrogenów, a podwyższone androstendionu i testosteronu [386–389]. Jednak czy na tej podstawie można wysnuć wnioski o większym wpływie HCMV na rozwój miażdżycy w grupie chłopców. Konieczne wydaje się przeanalizowanie tego problemu w przyszłości. W odniesieniu do samego wpływu IL-10 na procesy miażdżycowe badacze są zgodni, że podwyższony poziom IL-10 chroni przed rozwojem miażdżycy. Ponadto oznaczanie stężenia IL-10, znalazło miejsce w prognozowaniu ryzyka sercowo-naczyniowego u osób z niestabilną postacią choroby niedokrwiennej serca (ang. *Unstable Angina*, UA). Welsh i wsp. wykazali, że pacjenci z UA, w ciągu trzech miesięcy badań, prezentowali znamienne niższe poziomy IL-10, w porównaniu z pacjentami ze stabilną postacią choroby niedokrwiennej serca [390]. CAPTURE trial, randomizowane badanie z użyciem abciximabu przed i w trakcie angioplastyki, wykazało, że zarówno stopień obniżenia IL-10, jak i wzrostu troponiny T, korelował ściśle z ciężkością stanu pacjenta, a IL-10 okazała się niezależnym predyktorem zgonu chorego [391]. Zależność pomiędzy obniżonym poziomem IL-10, a pogrubieniem CCA IMT, w kontekście subklinicznej postaci miażdżycy wykazał Ambrosius i wsp. [392].

Nowym, obiecującym markerem miażdżycy jest sICAM-1. W badaniach eksperymentalnych na modelu mysim z niedoborem apoE podwyższony poziom sICAM-1 wyraźnie korelował z progresją zmian w aorcie brzusznej [393]. Doniesienia te znalazły potwierdzenie w szeregu badań klinicznych. Podwyższenie stężenia sICAM-1 we krwi pacjentów z chorobą niedokrwinną serca wiązało się z pogorszeniem obrazu tej choroby [394–396]. Podobne spostrzeżenia poczyniono w grupie pacjentów z cukrzycą typu II, u których ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych rosło wraz ze wzrostem sICAM-1 [397]. Co ciekawe stężenie sICAM-1 w surowicy krwi pacjentów z chorobą niedokrwinną serca, pod wpływem leczenia statynami znamienne spadało [314,398–400]. W odniesieniu do pozostałych czynników ryzyka miażdżycy takich jak zaburzenia profilu lipidowego czy podwyższenie CRP, stwierdzono, że wraz ze wzrostem poziomu cholesterolu całkowitego i CRP w surowicy pacjentów, rośnie również stężenie sICAM-1 [401].

Wyniki wielośrodkowych prospektywnych badań klinicznych w grupie osób zdrowych, obciążonych co najmniej dwoma czynnikami ryzyka miażdżycy pokazują, że stężenie sICAM-1 może być doskonałym czynnikiem prognostycznym rozwinięcia choroby niedokrwiennej serca. W badaniu ARIC wykazano, że sICAM-1 jest niezależnym czynnikiem ryzyka ostrego zespołu wieńcowego [402]. Podobny wynik uzyskano na podstawie *Physicians Health Study*, w którym u zdrowych mężczyzn podwyższone stężenie sICAM-1

związane było z rozwinięciem choroby niedokrwiennej serca w przyszłości. Analogiczną zależność uzyskano również w badaniu Women's Health Study, aczkolwiek po wykluczeniu pacjentek z podwyższonym CRP oraz IL-6 utracono powyższą zależność. Stwierdzono ponadto nieco niższe stężenia sICAM-1 u kobiet w porównaniu z mężczyznami w tym samym wieku [403]. Również w badaniu PRIME obejmującym zdrowych mężczyzn w wieku pomiędzy 50-59r.ż., potwierdzono wartość sICAM-1 jako czynnika ryzyka choroby niedokrwiennej serca [404]. W odniesieniu do subklinicznej postaci miażdżycy w populacji młodych dorosłych (n=2500) przeprowadzono badanie CARDIA (*Coronary Artery Risk Development in Young Adults*), w którym stwierdzono, że u pacjentów ze znacznym przyrostem wskaźnika CCA IMT w ciągu 20 lat badania, wykładniczo rosło również stężenie sICAM-1. Wykazano, że sICAM-1 jest najlepszym predyktorem subklinicznej postaci miażdżycy [405]. Ponadto w kolejnych badaniach stwierdzano, że poziom sICAM-1 koreluje z nadciśnieniem tętniczym [224,406,407], izolowanym niedoborem HDL oraz hipercholesterolemią [218]. Co ważne zwiększenie wskaźnika IMT tętnic szyjnych wspólnych w grupie młodych dorosłych wiązało się ściśle z podwyższeniem stężenia sICAM-1 u tych pacjentów [58]. W odniesieniu do roli czynników infekcyjnych w patogenezie miażdżycy stwierdzono, że zakażenie HCMV powoduje zwiększenie ekspresji ICAM-1 oraz VCAM-1 na powierzchni komórek endotelium, promując w ten sposób akumulację makrofagów i innych komórek krwi krążącej w błonie wewnętrznej naczynia [408–411]. Wykazano ponadto, że w trakcie reaktywacji zakażenia HCMV w narządzie przeszczepionym, w surowicy krwi pacjenta znacząco wzrasta stężenie sICAM-1 [412].

W odniesieniu do populacji dziecięcej badania nad wpływem sICAM-1 na procesy miażdżycowe dotyczą głównie kilku grup pacjentów: dzieci otyłych, z zespołem metabolicznym, cukrzycą oraz dzieci z chorobami reumatycznymi. W badaniach z 2007r. Głowińska-Olszewska i wsp. udowodnili, że u dzieci z otyłością i nadciśnieniem sICAM-1 ściśle korelowało z IMT oraz FMD. Ci sami badacze potwierdzili również powyższy związek w populacji dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 i 2 [225,413]. Do podobnych wniosków doszli Beauloye i wsp., którzy poza wartością sICAM-1, jako czynnika prognostycznego subklinicznej postaci miażdżycy, zwrócili uwagę na podobne znaczenie adiponektyny w populacji dzieci z otyłością [414]. Z kolei Narverud i wsp. wykazali związek pomiędzy rodzinną hipercholesterolemią, a podwyższonym stężeniem sICAM-1 i IMT w grupie osób pomiędzy 7., a 20. rokiem życia. Wykazano ponadto, że stężenie sICAM-1 w surowicy krwi chłopców było istotnie większe niż u dziewcząt [415–417].

W badanym materiale stwierdzono znacząco wyższe stężenie sICAM-1 we krwi dzieci z przebyłym zakażeniem HCMV. Co ciekawe zauważono tendencję do wyższych poziomów sICAM-1 w grupie chłopców z dodatnim mianem IgG HCMV w porównaniu z grupą dziewcząt, wartości te nie uzyskały jednak znamion istotnych statystycznie. Porównując stężenie sICAM-1 w badanych grupach z podwyższonym poziomem cytokin proaterogennych stwierdzanych uprzednio (IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ), wyraźnie zarysowuje się przewaga czynników prozapalnych nad antyzapalnymi w grupie pacjentów z latentnym zakażeniem HCMV. Ponadto poza bezpośrednim wpływem HCMV na syntezę sICAM-1 w śródbłonku naczyniowym, trudno pominąć fakt, że powyższe cytokiny należą do głównych aktywatorów ekspresji ICAM-1.

Od wczesnych lat 90', ocena wskaźnika IMT w obrębie ściany tętnicy wewnętrznej stała się jednym z bardziej zaawansowanych narzędzi do oceny subklinicznej postaci miażdżycy. Na podstawie licznych badań powzięto próbę ustalenia wartości granicznej wskaźnika w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego w populacji dorosłych dla poszczególnych grup wiekowych. W badaniach Groota i wsp. obserwowano liniowy wzrost IMT od wartości średnio 0,53 mm w wieku lat 10, do 0,78 mm w wieku lat 80 [418]. Z kolei Howard i wsp. w podobnych grupach wiekowych uzyskali wartości 0,46mm do 1mm [419]. Średnie roczne fizjologiczne pogrubienie CCA IMT oceniono na 0,0147mm zarówno u dorosłych, jak i u dzieci [420]. Powyższe wyniki badań zostały ujednolicone w Mannheim Consensus z 2011 roku, którego autorzy proponują przyjęcie wartości 1,5mm mierzonej w CCA, jako granicznej dla zróżnicowania IMT od blaszki miażdżycowej. Ponadto za blaszki miażdżycowe uznaje się zmiany miejscowe, wpuklające się do światła naczynia co najmniej 0,5mm, lub takie, które przekraczają o 50% grubość IMT mierzoną w ich sąsiedztwie.

Pomiar CCA IMT w grupie pacjentów pediatrycznych znalazł zastosowanie w ocenie subklinicznej postaci miażdżycy u dzieci i młodzieży [421]. Z uwagi na brak ściśle wyznaczonej wartości IMT pozwalającej ocenić ryzyko rozwinięcia miażdżycy w populacji dzieci i młodzieży, wyniki poszczególnych pomiarów w grupach badanych odnoszono do wyników IMT w populacji dzieci zdrowych w podobnym wieku. Podwyższone wartości CCA IMT stwierdzono u dzieci rodziców z hypercholesterolemią [146,314,422–424], u dzieci z nadciśnieniem tętniczym [425–427], cukrzycą typu 1 [146,428], otyłością [294,429]. Prospektywne długofalowe badania wykazały, że podwyższenie wartości IMT u dzieci, skutkowało pogrubieniem IMT u młodych dorosłych i szybszym rozwinięciem miażdżycy i innych chorób sercowo-naczyniowych w tej grupie pacjentów [430–435]. Wykazano

również, że pogrubienie IMT u osób dorosłych, ściśle korelowało z podwyższonym poziomem LDL, nadciśnieniem tętniczym, otyłością, czy przewlekłym procesem zapalnym stwierdzanymi w wieku dziecięcym u tych osób [432,436]. Badania IMT znalazły również zastosowanie w przewidywaniu ryzyka sercowo-naczyniowego u dzieci z przewlekłym stanem zapalnym: m.in. kłębuszkowym zapaleniem nerek [437], toczniem rumieniowatym układowym, młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów [269], chorobą Kawasaki [438], czy zakażonych HIV [439]

Odmienne niż w przypadku osób dorosłych, w zdrowej populacji dziecięcej nie stwierdzono różnicy w IMT pomiędzy płcią męską i żeńską [440–442], co znalazło odzwierciedlenie również w analizowanej pracy. Co ciekawe Jourdan i wsp. podają w badaniach własnych przedziały wartości IMT norm dla wieku dzieci zdrowych (bez czynników ryzyka miażdżycy): i tak dla wieku 14-17 przyjęto wartość 0,35-0,44mm, natomiast dla osób pomiędzy 17-20 r.ż., odpowiednio 0,36-0,44mm.

Podobne obserwacje poczyniono analizując wyniki IMT w grupie kontrolnej w bieżącym badaniu. Średnia pomiarów IMT dzieci, u których na podstawie badań serologicznych wykluczono zakażenie HCMV oscylowała w pomiędzy 0,39, a 0,40mm. Co ciekawe w bieżącym materiale stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy średnim IMT w grupie chłopców i dziewcząt z dodatnim mianem przeciwciał IgG HCMV, a grupą kontrolną. Różnica ta może wynikać z wspomnianej wcześniej silniejszej indukcji stanu zapalnego stwierdzonej w grupie z latentną postacią zakażenia HCMV. Dotychczas nie prowadzono analogicznych badań w populacji dziecięcej, natomiast w badaniach własnych w grupie pacjentów dorosłych Jastrzębski i wsp. wykazali, że wartość IMT była istotnie wyższa u chorych z dodatnim mianem przeciwciał IgG HCMV, z nieznaczną przewagą mężczyzn w tej grupie [443].

Z uwagi na stwierdzoną w grupie pacjentów z dodatnim mianem IgG HCMV przewagę prozapalnego profilu cytokin, zbadano korelacje pomiędzy CRP, IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ , sICAM-1, a IMT. Najsilniejszą zależność uzyskano w odniesieniu do IL-6 i TNF α . Pacjenci, u których w surowicy krwi stwierdzano istotnie wyższe stężenie wspomnianych cytokin, charakteryzowali się najwyższym wskaźnikiem IMT. Podobną, choć nieco słabszą korelację wykazano w stosunku do IL-1 β oraz IFN γ . Ponadto wraz ze wzrostem sICAM-1, stwierdzano również wyższe wartości IMT. Równoległy wzrost wskaźnika IMT, stężeń powyższych cytokin prozapalnych oraz sICAM-1 w surowicy krwi u dzieci

z latentnym zakażeniem HCMV może być przedklinicznym markerem rozwoju miażdżycy u tych pacjentów.

Podobne wyniki uzyskali inni badacze. Järvisalo i wsp. wykazali zależność pomiędzy wzrostem CRP, oraz IL-6, a grubością CCA IMT u 79. dzieci, ze średnią wieku 10,5 lat. Badacze uznali, że wpływ CRP na śródbłonek naczyniowy jest szczególnie istotny na wczesnym etapie procesu miażdżycowego, co ma odzwierciedlenie we wskaźniku IMT [444]. W badaniach Rumińskiej i wsp., wykazano istotną korelację pomiędzy IMT, a stężeniem CRP w populacji dzieci z otyłością. IMT korelowało w tej grupie również ze stopniem otyłości i insulinoopornością [445]. Badanie Suh i wsp., przeprowadzone w grupie dorosłych (40-70r.ż.) wykazało natomiast, że IMT wzrasta wraz ze wzrostem CRP, jedynie w grupie kobiet. Podobną zależność wykazano początkowo w grupie mężczyzn, jednak po wprowadzeniu dodatkowych zmiennych w postaci czynników ryzyka miażdżycy, utracono istotność statystyczną dowodu [446]. W odniesieniu do IL-6, Kang i wsp. wykazali, ścisłą korelację pomiędzy stężeniem tej cytokiny we krwi pacjentów z reumatycznym zapaleniem stawów, a CCA IMT [447]. Jastrzębski i wsp. zauważyli natomiast związek pomiędzy podwyższonym stężeniem TNF α , a powikłaniami sercowo-naczyniowymi u osób z nadciśnieniem tętniczym. W badaniu tym stwierdzono istotną korelację pomiędzy IMT tętnic szyjnych, a stężeniem TNF α w surowicy krwi pacjentów ($p < 0,05$) [448]. Jak już wcześniej wspomniano wielu badaczy wykazywało korelację pomiędzy sICAM-1, a IMT zarówno w grupie dzieci, młodzieży, jak i dorosłych: u dzieci z otyłością [269,272,413], cukrzycą [449], zespołem metabolicznym [414], czy hipercholesterolemią rodzinną [415].

Wyniki powyższej pracy stanowią kolejny głos w dyskusji nad etiologią miażdżycy, jednocześnie uprawdopodobniając wpływ HCMV na rozwinięcie subklinicznej jej postaci. Wiemy już, że stopień rozwoju odpowiedzi immunologicznej przeciwko HCMV i zmiany w naczyniu zależą od stanu układu immunologicznego pacjenta i częstości okresowej reaktywacji HCMV. Rola HCMV w indukowaniu i podtrzymywaniu procesów miażdżycowych skłania do prowadzenia dalszych badań w celu zrozumienia mechanizmów immunologicznych wpływu HCMV na komórki ściany naczyniowej w organizmie człowieka i znalezieniu skutecznych metod przeciwdziałania reaktywacji wirusa.

6. WNIOSKI

1. U dzieci z latentnym zakażeniem HCMV stwierdzono wyższe wartości wskaźnika IMT w stosunku do dzieci zdrowych, co sugeruje obecność wczesnych zmian strukturalnych ściany naczyń tętnicznych u tych pacjentów.
2. Istnieje korelacja pomiędzy wskaźnikiem IMT, a stężeniem wybranych cytokin prozapalnych.
3. Wzrost wskaźnika IMT, oraz stężeń badanych cytokin oraz sICAM-1 w surowicy krwi u dzieci z latentnym zakażeniem HCMV może być przedklinicznym markerem rozwoju miażdżycy u tych pacjentów.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Pass RF. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev.* 2002;23(5):163–70.
2. Ludwig A, Hengel H. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveill.* 2009;14:26–32.
3. Nyholm JL. Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects. *Int J Womens Health.* 2010;9:23–35.
4. Siwak E, Kondrusik M, Daniluk J. Zakażenie wirusem cytomegalii. *Pol Tyg Lek.* 1992;47(36-37):814–8.
5. Dunal M, Trzcińska A, Siennicka J. Wirus cytomegalii - problem zakażeń wrodzonych. *Post Mikrobiol.* 2013;53(1):17–28.
6. Mocarski E, Courcelle C. Cytomegaloviruses and their replication. *Fields Virol 4th Edn* Lippincott Williams Wilkins. 2001;2629–73.
7. Rice G, Schrier R, Oldstone M. Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc Natl Acad Sci.* 1984;81.
8. Ribbert H. Ueber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zbl Pathol.* 1904;15:945–8.
9. Wyatt J, Saxton J, Lee R, Pinkerton H. Generalized cytomegalic inclusion disease. *Amer J Path.* 1932;8:121–3.
10. Minder W. Die Aetiologie der Cytomegalia infantum. *Schweiz Med Wochenschr.* 1953;83:1180–2.
11. Weller T, Hanshaw J, Scott D. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology.* 1960; 108:843–68.
12. Chen D, Jiang H, Lee M, Liu F, Zhou Z. Three-dimensional visualization of tegument/Capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology.* 1999;260:10–6.
13. Landini M, La Placa M. Humoral immune response to human cytomegalovirus proteins: a brief review. *Comp Immun Microbiol Infect Dis.* 1991;14:97–105.
14. Kern F, Bunde T, Faulhaber N. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis.* 2002;185:1709–16.
15. Sinzger C, Schmidt K, Knapp J. Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *Gen Virol.* 1999;80:2867–77.

16. Schubert A, Gentner E, Bohn K. Single nucleotide polymorphisms of thymidine kinase and DNA polymerase genes in clinical herpes simplex virus type 1 isolates associated with different resistance phenotypes. *Antivir Res.* 2014; 18(107C):16–22.
17. De Clercq E. Dancing with chemical formulae of antivirals: A panoramic view (Part 2). *Biochem Pharmacol.* 2013;86(10):1397–410.
18. Kowalski S, Arnon R, Posada R. Prevention of cytomegalovirus following solid organ transplantation: a literature review. *Review. Pediatr Transpl.* 2013;17(6):499–509.
19. Emery V. Viral dynamics during active cytomegalovirus infection and pathology. *Intervirol.* 1999;42:405–11.
20. Figlerowicz M. Najczęstsze postacie kliniczne zakażeń wywołanych przez wirusy z rodziny Herpesviridae. *Przew Lek.* 2006;8:61–7.
21. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol.* 2013;5:14–6.
22. Kinzler E, Compton T. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *Viol.* 2005;79(12):7827–37.
23. Rasmussen L, Geissler A, Cowan C, Chase A. The genes encoding the gCIII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. *J Virol.* 2002;76(21):10841–8.
24. Theiler R, Compton T. Distinct glycoprotein O complexes arise in a post-Golgi compartment of cytomegalovirus-infected cells. *J Virol.* 2002;76(6):2890–8.
25. Bentz G, Yurochko A. Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(14):5531–6.
26. Matsumura K, Nakase H, Kosugi I, Honzawa Y. Establishment of a novel mouse model of ulcerative colitis with concomitant cytomegalovirus infection: in vivo identification of cytomegalovirus persistent infected cells. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(9):1951–63.
27. Melnick M, Deluca K, Sedghizadeh P, Jaskoll T. Cytomegalovirus-induced salivary gland pathology: AREG, FGF8, TNF- α , and IL-6 signal dysregulation and neoplasia. *Exp Mol Pathol.* 2013; 94(2):386–97.
28. Zhang Z, Kim S, Varghese T, Thomas G. TNF receptor independent activation of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in response to transplantation. *Transplantation.* 2008;85(7):1039–45.
29. Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet-derived growth factor- α receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature.* 2008; 18;455(7211):391–5.
30. Mocarski E, Shenk T, Pass RF. *Cytomegaloviruses.* Philadelphia 2007: Lippincott Williams & Wilkins.; Fields virology. 2702-2772 p.

31. Marschall E, Geballe A. Multifaceted evasion of the interferon response by Cytomegalovirus. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29:609–19.
32. Sinclair J, Sissons P. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 2006;87:1763–79.
33. Zhang J, Xiang Z, Liu X, Wang H. Effects of allitridin on transcription of immediate-early, early and late genes of human cytomegalovirus in vitro. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2011;36(14):1988–92.
34. Xiaofei E, Stadler B, Wang S, Lu S. RNA interference-mediated targeting of human cytomegalovirus immediate-early or early gene products inhibits viral replication with differential effects on cellular functions. *J Virol.* 2012;86(10):5660–73.
35. Wyrwicz L, Rychlewski L. Cytomegalovirus immediate early gene UL37 encodes a novel MHC-like protein. *Acta Biochim Pol.* 2008;55(1):67–73.
36. Marschall E, Bierle C, Brune W, Geballe A. Essential role for either TRS1 or IRS1 in human cytomegalovirus replication. *J Virol.* 2009;83(9):4112–20.
37. Iwamoto G, Konicek S. Cytomegalovirus immediate early genes upregulate interleukin-6 gene expression. *J Investig Med.* 1997;45(4):175–82.
38. Rana R, Biegelke B. Human cytomegalovirus UL34 early and late proteins are essential for viral replication. *Viruses.* 2014;6(2):476–88.
39. Gurczynski S, Das S, Pellet P. Deletion of the human cytomegalovirus US17 gene increases the ratio of genomes per infectious unit and alters regulation of immune and endoplasmic reticulum stress response genes at early and late times after infection. *J Virol.* 2014;88(4):2168–82.
40. Malarowska M. Wieloletnia ewolucja kliniczna wrodzonych i nabytych zakażeń wirusem cytomegalii u dzieci. Poznań, 2009
41. Malarowska M, Mazur-Melewska K, Mania A. Charakterystyka kliniczna cytomegalii wrodzonej i nabytej u dzieci na podstawie własnych obserwacji. *Przeg Pediatr.* 2009;178-182.
42. Naito T, Kudo N, Inui A, Matsumoto N. Causes of infectious mononucleosis-like syndrome in adult patients. *Intern Med.* 2006;45(13):833–4.
43. Yu Y, Park G, Park P, Choi Y. Cytomegalovirus infection-associated fulminant hepatitis in an immunocompetent adult requiring emergency living-donor liver transplantation: report of a case. *Surg Today.* 2013;43(4):424–8.
44. Bobak D. Gastrointestinal Infections Caused by Cytomegalovirus. *Curr Infect Rep.* 2003;5(2):101–7.
45. Zalar A, Olmos M, Piskorz E, Magnanini F. Esophageal motility disorders in HIV patients. *Dig Sci.* 2003;48(5):962–7.

46. Attwood S, Lamb C. Eosinophilic oesophagitis and other non-reflux inflammatory conditions of the oesophagus: diagnostic imaging and management. *Best Pr Res Clin Gastroenterol.* 2008;22(4):639–60.
47. Lemonovich T, Watkins R. Update on cytomegalovirus infections of the gastrointestinal system in solid organ transplant recipients. *Curr Infect Rep.* 2012;14(1):33–40.
48. Restrepo-Gualteros S, Jaramillo-Barberi L, Gonzalez-Santos M, Rodriguez-Martinez C, Perez G, Gutierrez M, et al. Characterization of Cytomegalovirus Lung Infection in Non-HIV Infected Children. *Viruses.* 2014; 6(5):2038–51.
49. Hong K, Kim S, Kim Y, Wie S, Kim Y, Yoo J, et al. Acute cytomegalovirus pneumonia and hepatitis presenting during acute HIV retroviral syndrome. *Infection.* 2011;39(2):155–9.
50. De Ory F, Avellón A, Echevarría J, Sánchez-Seco M, Trallero G, Cagrerizo M, et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol.* 2013;85(3):554–62.
51. Dutt K, Ezeonu I. Human retinal and brain cell lines: A model of HCMV retinitis and encephalitis. *DNA Cell Biol.* 2006 Oct;25(10):581–96.
52. Costagliola C, Romano MR, Parmeggiani F, Dell’omo R, Cultrera R. Epiretinal membrane in a 12-year-old immunocompetent girl with cytomegalovirus infection. *Eur J Ophthalmol.* 2009 Dec;19(6):1098–101.
53. Vogel J-U, Otte J, Koch F, Gumbel H, Doerr HW, Cinatl J. Role of human cytomegalovirus genotype polymorphisms in AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2013; 202(1):37–47.
54. Ghekiere S, Allegaert K, Cossey V, Van Ranst M, Cassiman C, Casteels I. Ophthalmological findings in congenital cytomegalovirus infection: when to screen, when to treat? *Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2012; 49(5):274–82.
55. Seale H, Booy R, MacIntyre CR. Trends in hospitalizations for diagnosed congenital cytomegalovirus in infants and children in Australia. *BMC Pediatr.* 2009;9:7.
56. Noyola DE, Jiménez-Capdeville ME, Demmler-Harrison GJ. Central nervous system disorders in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Neurol Res.* 2010; 32(3):278–84.
57. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(1):86–102.
58. Atkinson C, Emery VC, Griffiths PD. Development of a novel single tube nested PCR for enhanced detection of cytomegalovirus DNA from dried blood spots. *J Virol Methods.* 2014; 196:40–4.
59. Longo S, Borghesi A, Tzialla C, Stronati M. IUGR and infections. *Early Hum Dev.* 2014; 90 Suppl 1:S42–44.

60. Basha J, Iwasenko JM, Robertson P, Craig ME, Rawlinson WD. Congenital cytomegalovirus infection is associated with high maternal socio-economic status and corresponding low maternal cytomegalovirus seropositivity. *J Paediatr Child Health*. 2014; 50(5):368–72.
61. Cudnoch K. Zakażenie ludzkim wirusem cytomegalii jako przyczyna zaburzeń neurologicznych u dzieci. Praca doktorska, Poznań, 2012.
62. Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, Guitton S, Senat MV, Fuchs F, et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diagn*. 2013; 33(8):751–8.
63. Leruez-Ville M, Sellier Y, Salomon LJ, Stirnemann JJ, Jacquemard F, Ville Y. Prediction of fetal infection in cases with cytomegalovirus immunoglobulin M in the first trimester of pregnancy: a retrospective cohort. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013; 56(10):1428–35.
64. Leroux MC, Reinert P, Boucher J, Lasry S. Diffusion of cytomegalovirus in infant nurseries. *Arch Pédiatrie Organe Off Société Fr Pédiatrie*. 2002; 9 Suppl 2:271s-273s.
65. Blackman JA, Murph JR, Bale JF Jr. Risk of cytomegalovirus infection among educators and health care personnel serving disabled children. *Pediatr Infect Dis J*. 1987;6(8):725–9.
66. Jenkins C, Garcia W, Abendroth A, Slobedman B. Expression of a human cytomegalovirus latency-associated homolog of interleukin-10 during the productive phase of infection. *Virology*. 2008 Jan 20;370(2):285–94.
67. Miller-Kittrell M, Sparer TE. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virology*. 2009;6:4.
68. McSharry BP, Avdic S, Slobedman B. Human cytomegalovirus encoded homologs of cytokines, chemokines and their receptors: roles in immunomodulation. *Viruses*. 2012 Nov;4(11):2448–70.
69. Bennett JM, Glaser R, Malarkey WB, Beversdorf DQ, Peng J, Kiecolt-Glaser JK. Inflammation and reactivation of latent herpesviruses in older adults. *Brain Behav Immun*. 2012 Jul;26(5):739–46.
70. Mason GM, Poole E, Sissons JGP, Wills MR, Sinclair JH. Human cytomegalovirus latency alters the cellular secretome, inducing cluster of differentiation (CD)4+ T-cell migration and suppression of effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(36):14538–43.
71. Roman A, Manito N, Campistol JM, Cuervas-Mons V, Almenar L, Arias M, et al. The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients. *Transplant Rev Orlando Fla*. 2014; 28(2):84–91.
72. Costello JP, Mohanakumar T, Nath DS. Mechanisms of chronic cardiac allograft rejection. *Tex Heart Inst J Tex Heart Inst St Lukes Episcop Hosp Tex Child Hosp*. 2013;40(4):395–9.

73. Linares L, Sanclemente G, Cervera C, Hoyo I, Cofán F, Ricart MJ, et al. Influence of cytomegalovirus disease in outcome of solid organ transplant patients. *Transplant Proc.* 2011;43(6):2145–8.
74. Zhao W, Fakhoury M, Fila M, Baudouin V, Deschênes G, Jacqz-Aigrain E. Individualization of valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus infection in pediatric kidney transplant patients. *Ther Drug Monit.* 2012;34(3):326–30.
75. Kute VB, Vanikar AV, Shah PR, Gumber MR, Patel HV, Godara SM, et al. Post-renal transplant cytomegalovirus infection: study of risk factors. *Transplant Proc.* 2012;44(3):706–9.
76. Bolovan-Fritts CA, Spector SA. Endothelial damage from cytomegalovirus-specific host immune response can be prevented by targeted disruption of fractalkine-CX3CR1 interaction. *Blood.* 2008;111(1):175–82.
77. Bentz GL, Jarquin-Pardo M, Chan G, Smith MS, Sinzger C, Yuroc hko AD. Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *J Virol.* 2006;80(23):11539–55.
78. Frascaroli G, Varani S, Moepps B, Sinzger C, Landini MP, Mertens T. Human cytomegalovirus subverts the functions of monocytes, impairing chemokine-mediated migration and leukocyte recruitment. *J Virol.* 2006;80(15):7578–89.
79. Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Hart NI, Lim T, Habashi J, et al. Cytomegalovirus stimulated mRNA accumulation and cell surface expression of the oxidized LDL scavenger receptor, CD36. *Atherosclerosis.* 2004;177(1):53–9.
80. Mayr M, Kiechl S, Tsimikas S, Miller E, Sheldon J, Willeit J, et al. Oxidized low-density lipoprotein autoantibodies, chronic infections, and carotid atherosclerosis in a population-based study. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(12):2436–43.
81. Tanaka K, Zou JP, Takeda K, Ferrans VJ, Sandford GR, Johnson TM, et al. Effects of human cytomegalovirus immediate-early proteins on p53-mediated apoptosis in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation.* 1999;99(13):1656–9.
82. Costello JP, Mohanakumar T, Nath DS. Mechanisms of chronic cardiac allograft rejection. *Tex Heart Inst J Tex Heart Inst St Lukes Episcop Hosp Tex Child Hosp.* 2013;40(4):395–9.
83. Fahmy RG, Khachigian LM. Antisense Egr-1 RNA driven by the CMV promoter is an inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation and regrowth after injury. *J Cell Biochem.* 2002;84(3):575–82.
84. Marchesi F, Mengarelli A, Giannotti F, Tendas A, Anaclerico B, Porrini R, et al. High incidence of post-transplant cytomegalovirus reactivations in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation after treatment with bortezomib-based

- regimens: a survey from the Rome Transplant Network. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2014;16(1):158–64.
85. Kim SI, Kim YJ, Choi JY, Yoon SK, Choi HJ, Na GH, et al. Strategies to reduce infectious complication using epidemiologic data analysis in liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 2013;45(8):3061–4.
86. Gratama JW, Brooimans RA, van der Holt B, Sintnicolaas K, van Doornum G, Niesters HG, et al. Monitoring cytomegalovirus IE-1 and pp65-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk for recurrent CMV reactivations. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008;74(4):211–20.
87. Prösch S, Wendt CE, Reinke P, Priemer C, Oppert M, Krüger DH, et al. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology.* 2000;272(2):357–65.
88. Sarid O, Anson O, Yaari A, Margalith M. Human cytomegalovirus salivary antibodies as related to stress. *Clin Lab.* 2002;48(5-6):297–305.
89. Glaser R, Friedman SB, Smyth J, Ader R, Bijur P, Brunell P, et al. The differential impact of training stress and final examination stress on herpesvirus latency at the United States Military Academy at West Point. *Brain Behav Immun.* 1999;13(3):240–51.
90. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(3):243–51.
91. Antoni MH, Esterling B, Lutgendorf S, Fletcher M, Schneiderman N. Psychosocial stressors, herpesvirus reactivation and HIV-1 infection. *AIDS Oncol Perspect Behav Med.* 1995;135–68.
92. Phillips AC, Carroll D, Khan N, Moss P. Cytomegalovirus is associated with depression and anxiety in older adults. *Brain Behav Immun.* 2008;22(1):52–5.
93. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-associated immune modulation: relevance to viral infections and chronic fatigue syndrome. *Am J Med.* 1998;105(3):35–42.
94. Janicki-Deverts D, Cohen S, Doyle WJ, Marsland AL, Bosch J. Childhood environments and cytomegalovirus serostatus and reactivation in adults. *Brain Behav Immun.* 2014;0;174-181
95. Matalka KZ, Sidki A, Abdul-Malik SM, Thewaini A-J. Academic stress—influence on Epstein-Barr virus and cytomegalovirus reactivation, cortisol, and prolactin. *Lab Med.* 2000;31(3):163–8.
96. Mehta SK, Stowe RP, Feiveson AH, Tyring SK, Pierson DL. Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1761–4.
97. Stowe RP, Mehta SK, Ferrando AA, Feedback DL, Pierson DL. Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight. *Aviat Space Environ Med.* 2001;72(10):884–91.

98. Caserta MT, O'Connor TG, Wyman PA, Wang H, Moynihan J, Cross W, et al. The associations between psychosocial stress and the frequency of illness, and innate and adaptive immune function in children. *Brain Behav Immun.* 2008;22(6):933–40.
99. Pampou SY, Gnedoy SN, Bystrevskaya VB, Smirnov VN, Chazov EI, Melnick JL, et al. Cytomegalovirus genome and the immediate-early antigen in cells of different layers of human aorta. *Virchows Arch.* 2000;436(6):539–52.
100. Vitale M, Castriconi R, Parolini S, Pende D, Hsu M-L, Moretta L, et al. The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1+ NK cell clones. *Int Immunol.* 1999;11(1):29–35.
101. Kim J-S, Choi S-E, Yun I-H, Kim J-Y, Ahn C, Kim S-J, et al. Human cytomegalovirus UL18 alleviated human NK-mediated swine endothelial cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315(1):144–50.
102. Wilkinson GW, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, Aicheler R, et al. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol.* 2008;41(3):206–12.
103. Ulbrecht M, Martinozzi S, Grzeschik M, Hengel H, Ellwart JW, Pla M, et al. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol.* 2000;164(10):5019–22.
104. Wang EC, McSharry B, Retiere C, Tomasec P, Williams S, Borysiewicz LK, et al. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(11):7570–5.
105. Frostegaard J, Ulfgren A-K, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999;145(1):33–43.
106. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol.* 1989;135(1):169.
107. Park B, Oh H, Lee S, Song Y, Shin J, Sung YC, et al. The MHC class I homolog of human cytomegalovirus is resistant to down-regulation mediated by the unique short region protein (US) 2, US3, US6, and US11 gene products. *J Immunol.* 2002;168(7):3464–9.
108. Wiertz E, Hill A, Tortorella D, Ploegh H. Cytomegaloviruses use multiple mechanisms to elude the host immune response. *Immunol Lett.* 1997;57(1-3):213–6.
109. Navarro L, Mowen K, Rodems S, Weaver B, Reich N, Spector D, et al. Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol Cell Biol.* 1998;18(7):3796–802.

110. Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN- γ -producing CD4⁺ T cells in protection against CMV disease. *Blood*. 2003;101(7):2686–92.
111. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol*. 2002;169(4):1984–92.
112. Dolstra H, Preijers F, Kemenade E, Schattenberg A, Galama J, Witte T de. Expansion of CD8⁺ CD57⁺ T cells after allogeneic BMT is related with a low incidence of relapse and with cytomegalovirus infection. *Br J Haematol*. 1995;90(2):300–7.
113. Bandres E, Merino J, Vazquez B, Inoges S, Moreno C, Subira ML, et al. The Increase of IFN- γ Production through Aging Correlates with the Expanded CD8^{high} CD28⁻ CD57⁺ Subpopulation. *Clin Immunol*. 2000;96(3):230–5.
114. Söderberg-Nauclér C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Virol*. 2008;41(3):218–23.
115. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciufoca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8⁺ CD28-T cells. *Int Immunol*. 1998;10(6):775–83.
116. Becker S, Warren MK, Haskill S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J Immunol*. 1987;139(11):3703–9.
117. Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(1):23–8.
118. Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and λ interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2004;34(3):796–805.
119. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5(10):987–95.
120. Yang K, Puel A, Zhang S, Eidenschenk C, Ku C-L, Casrouge A, et al. Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN- α/β and - λ is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity*. 2005;23(5):465–78.
121. Rauser G, Einsele H, Sinzger C, Wernet D, Kuntz G, Assenmacher M, et al. Rapid generation of combined CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood*. 2004;103(9):3565–72.
122. Vescovini R, Biasini C, Fagnoni FF, Telera AR, Zanlari L, Pedrazzoni M, et al. Massive load of functional effector CD4⁺ and CD8⁺ T cells against cytomegalovirus in very old subjects. *J Immunol*. 2007;179(6):4283–91.

123. Ford ES, Greenwald JH, Richterman AG, Rupert A, Dutcher L, Badralmaa Y, et al. Traditional risk factors and D-dimer predict incident cardiovascular disease events in chronic HIV infection. *AIDS Lond Engl.* 2010;24(10):1509.
124. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007;81(3):584–92.
125. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage Diversity and Polarization in Atherosclerosis A Question of Balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(10):1419–23.
126. Imanishi T, Akasaka T. Biomarkers associated with vulnerable atheromatous plaque. *Curr Med Chem.* 2012;19(16):2588–96.
127. Figlerowicz M, Mania A, Mazur-Melewska K, Kemnitz P, Malarowska M, Cudnoch K i wsp. Replikacja HCMV w surowicy krwi i moczu dzieci z cytomegalią wrodzoną. *Pediatr Pol.* 2011;86(1):15–21.
128. Jang E-Y, Park SY, Lee EJ, Song EH, Chong YP, Lee S-O, et al. Diagnostic performance of the cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay in patients with CMV gastrointestinal disease. *Clin Infect Dis.* 2009;48(12):e121–e124.
129. De la Hoz RE, Stephens G, Sherlock C. Diagnosis and treatment approaches of CMV infections in adult patients. *J Clin Virol.* 2002;25:1–12.
130. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2008;197(2):65–73.
131. Nelson CT, Istaş AS, Wilkerson MK, Demmler GJ. PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol.* 1995;33(12):3317–8.
132. Machida U, Kami M, Fukui T, Kazuyama Y, Kinoshita M, Tanaka Y, et al. Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol.* 2000;38(7):2536–42.
133. Reusser P, Einsele H, Lee J, Volin L, Rovira M, Engelhard D, et al. Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2002;99(4):1159–64.
134. Ljungman P, Deliliers GL, Platzbecker U, Matthes-Martin S, Bacigalupo A, Einsele H, et al. Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. *Blood.* 2001;97(2):388–92.
135. Adler SP, Nigro G, Pereira L. Recent advances in the prevention and treatment of congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in perinatology.* Elsevier; 2007
136. Michaels MG, Greenberg DP, Sabo DL, Wald ER. Treatment of children with congenital cytomegalovirus infection with ganciclovir. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(6):504–8.

137. Supe-Markovina K, Melquist JJ, Connolly D, Dicarlo HN, Waltzer WC, Fine RN, et al. Alemtuzumab with corticosteroid minimization for pediatric deceased donor renal transplantation: A seven-yr experience. *Pediatr Transplant*. 2014;18(4):363–8.
138. Freed DC, Tang Q, Tang A, Li F, He X, Huang Z, et al. Pentameric complex of viral glycoprotein H is the primary target for potent neutralization by a human cytomegalovirus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(51):E4997–5005.
139. Puttini C, Carmellini M, Garosi G, Rossetti B, Riccio ML, Tordini G, et al. HCMV infection in renal transplant recipients: a retrospective cohort study. *New Microbiol*. 2013;36(4):363–71.
140. Virchow RLK. *Cellular pathology*. John Churchill; 1860
141. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis. *Circ J*. 2010;74:213–20.
142. Alberti K, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640–5.
143. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(9):1512–31.
144. Newman WP, Wattigney W, Berenson GS. Autopsy studies in United States children and adolescents. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;623(1):16–25.
145. Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arterioscler Dallas Tex*. 1988;9(1 Suppl):I19–32.
146. Järvisalo MJ, Jartti L, Näntö-Salonen K, Irjala K, Rönnemaa T, Hartiala JJ, et al. Increased aortic intima-media thickness a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation*. 2001;104(24):2943–7.
147. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1262–75.
148. Sary HC. *Atherosclerotic Lesions: Evolution and Regression*. Pan Vascular Medicine. Springer; 2002
149. McGill HC, McMahan CA, Zieske AW, Sloop GD, Walcott JV, Troxclair DA, et al. Associations of coronary heart disease risk factors with the intermediate lesion of atherosclerosis in youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(8):1998–2004.

150. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1262–75.
151. Erbel C, Sato K, Meyer FB, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, et al. Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque. *Basic Res Cardiol.* 2007;102(2):123–32.
152. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation.* 1990;82(3 Suppl):II47–59.
153. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(10):1859–67.
154. Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, et al. Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):200.
155. Fishbein MC. The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Pathol.* 2010;19(1):6–11.
156. Kubica J, Radomski M, Sukiennik A, Gil R, Sielski S, Kozłowski D i wsp. Wpływ budowy blaszki miażdżycowej na remodeling ściany tętnic wieńcowych. *Cardiol F.* 2001;8(3):233–50.
157. Radomski M, Kubica J, Gil R, Sielski S, Sukiennik A. Jak oceniać remodeling tętnic wieńcowych? Kryteria wyboru przekrojów referencyjnych. *Cardiol F.* 2001;8(2):181–95.
158. DeBakey ME, Lawrie GM, Glaeser DH. Patterns of atherosclerosis and their surgical significance. *Ann Surg.* 1985;201(2):115.
159. Stein Y, Stein O. Does therapeutic intervention achieve slowing of progression or bona fide regression of atherosclerotic lesions? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(2):183–8.
160. Beręsewicz A, Skierczyńska A. Miażdżycyca-choroba całego życia i całej populacji krajów cywilizacji zachodniej. *Chor Serca Naczyń.* 2006;3(1):1–6.
161. Kannel WB, Skinner JJ, Schwartz MJ, Shurtleff D. Intermittent claudication incidence in the Framingham study. *Circulation.* 1970;41(5):875–83.
162. Klingenberg R, Hasun M, Corti R, Lüscher TF. Clinical Manifestations of Atherosclerosis. *Inflammation and Atherosclerosis.* Springer; 2012;39–58.
163. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 suppl 1):III–27.
164. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(2):168–75.

165. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001;104(2):191–6.
166. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840–4.
167. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104(22):2673–8.
168. Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou VG. Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;31(4):386–93.
169. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006;86(2):515–81.
170. Mallika V, Goswami B, Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology*. 2007;58(5):513–22.
171. Simmonds J, Fenton M, Dewar C, Ellins E, Storry C, Cubitt D, et al. Endothelial dysfunction and cytomegalovirus replication in pediatric heart transplantation. *Circulation*. 2008;117(20):2657–61.
172. Mahmoudi M, Curzen N, Gallagher PJ. Atherogenesis: the role of inflammation and infection. *Histopathology*. 2007;50(5):535–46.
173. De Caterina R, Libby P, Peng H-B, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone Jr MA, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995;96(1):60.
174. Collins T, Cybulsky MI. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001;107(3):255–64.
175. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001;107(1):7–11.
176. Gimbrone Jr MA. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1999;155(1):1.
177. Sokabe T, Yamamoto K, Ohura N, Nakatsuka H, Qin K, Obi S, et al. Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by fluid shear stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2004;287(5):H2027–H2034.
178. Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;902(1):230–40.
179. Ando J, Yamamoto K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(5):1389–403.

180. Garnarczyk A, Jurzak M, Gojniczek K. Charakterystyka endogennych peptydów–endotelin i ich rola w procesach chorobowych przebiegających z włóknieniem tkanek. *Wiad Lek.* 2008;4(6):126–34.
181. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, et al. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol.* 2000;525(3):761–70.
182. Obońska K, Grąbczewska Z, Fisz J. Ocena czynności śródbłonna naczyniowego-gdzie jesteśmy, dokąd zmierzamy? *Folia Cardiol Excerpta.* 2010;5(5):292–7.
183. Latron Y, Chautan M, Anfosso F, Alessi MC, Nalbone G, Lafont H, et al. Stimulating effect of oxidized low density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1991;11(6):1821–9.
184. Mussoni L, Madema P, Camera M, Bemini F, Sironi L, Sirtori M, et al. Atherogenic lipoproteins and release of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by endothelial cells. *Fibrinolysis.* 1990;4:79–81.
185. Martynowicz H, Skoczyńska A, Silber M, Andrzejak R. Rola stresu oksydacyjnego w patogenezie nadciśnienia tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze.* 2004;8(6):431–8.
186. Epstein FH, Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115–26.
187. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med.* 2003;9(6):263–8.
188. Wenze K, Felix S, Kiebert FX, Brachold R, Menke T, Schattke S, et al. E-selectin polymorphism and atherosclerosis: an association study. *Hum Mol Genet.* 1994;3(11):1935–7.
189. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med.* 2001;194(2):205–18.
190. Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1992;141(6):1427.
191. Mallat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A. Regulatory T cell responses: potential role in the control of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(5):518–24.
192. Weseslindtner L, Kerschner H, Steinacher D, Kundi M, Jaksch P, Simon B, et al. Association of human cytomegalovirus DNAemia and specific granzyme B responses in lung transplant recipients. *Clin Exp Immunol.* 2013;173(3):438–43.
193. Gandhi MK, Wills MR, Okecha G, Day EK, Hicks R, Marcus RE, et al. Late diversification in the clonal composition of human cytomegalovirus-specific CD8+ T

- cells following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102(9):3427–38.
194. Di Pietro M, Filardo S, De Santis F, Sessa R. Chlamydia pneumoniae infection in atherosclerotic lesion development through oxidative stress: a brief overview. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):15105–20.
195. Tsimikas S, Brilakis ES, Lennon RJ, Miller ER, Witztum JL, McConnell JP, et al. Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. *J Lipid Res*. 2007;48(2):425–33.
196. Zhang B, Bai H, Liu R, Kumagai K, Itabe H, Takano T, et al. Serum high-density lipoprotein-cholesterol levels modify the association between plasma levels of oxidatively modified low-density lipoprotein and coronary artery disease in men. *Metabolism*. 2004;53(4):423–9.
197. Moohebati M, Kabirirad V, Ghayour-Mobarhan M, Esmaily H, Tavallaie S, Akhavan Rezayat A, et al. Investigation of serum oxidized low-density lipoprotein IgG levels in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Int J Vasc Med*. 2014;2014:845960.
198. Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron Oxf Engl* 1993. 2006;37(3):208–22.
199. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2129–38.
200. Yan Z, Hansson GK. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev*. 2007;219:187–203.
201. Merhi-Soussi F, Kwak BR, Magne D, Chadjichristos C, Berti M, Pelli G, et al. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2005;66(3):583–93.
202. Haddy N, Sass C, Drosch S, Zaiou M, Siest G, Ponthieux A, et al. IL-6, TNF- α and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: the STANISLAS cohort. *Atherosclerosis*. 2003;170(2):277–83.
203. Hedman A, Larsson PT, Alam M, Wallen NH akan, Nordlander R, Samad BA. CRP, IL-6 and endothelin-1 levels in patients undergoing coronary artery bypass grafting. Do preoperative inflammatory parameters predict early graft occlusion and late cardiovascular events? *Int J Cardiol*. 2007;120(1):108–14.
204. Bamoulid J, Courivaud C, Deschamps M, Gaugler B, Tiberghien P, Chalopin J-M, et al. The interleukin-6 gene promoter polymorphism -174 and atherosclerotic events in overweight transplanted patients. *J Transplant*. 2011;2011:803429.
205. Botto S, Streblov DN, DeFilippis V, White L, Kreklywich CN, Smith PP, et al. IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin. *Blood*. 2011;117(1):352–61.

206. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135–43.
207. Jawien J. The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(13):2435–9.
208. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci*. 2002;70(8):855–65.
209. Mach F, Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 1998;137 Suppl:S89–95.
210. Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):7458–63.
211. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 2011;12(3):204–12.
212. Fragakis N, Ioannidou E, Bounda A, Theodoridou S, Klonizakis P, Garipidou V. Increased levels of proinflammatory cytokines in children with family history of coronary artery disease. *Clin Cardiol*. 2010;33(4):E6–E10.
213. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJH, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993;171(3):223–9.
214. Głowińska B, Urban M, Peczyńska J, Florys B. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metabolism*. 2005;54(8):1020–6.
215. Lee YW, Kühn H, Hennig B, Neish AS, Toborek M. IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(1):83–94.
216. Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, Diez-Roux A, Evans GW, McGovern P, et al. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Jama*. 1998;279(2):119–24.
217. Silvestro A, Brevetti G, Schiano V, Scopacasa F, Chiariello M. Adhesion molecules and cardiovascular risk in peripheral arterial disease. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 improves risk stratification. *Thromb Haemost*. 2005;93(3):559–63.
218. Głowińska B, Urban M, Koput A, Galar M. New atherosclerosis risk factors in obese, hypertensive and diabetic children and adolescents. *Atherosclerosis*. 2003;167(2):275–86.
219. Ohta T, Saku K, Takata K, Adachi N. Soluble vascular cell-adhesion molecule-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 correlate with lipid and apolipoprotein risk factors for coronary artery disease in children. *Eur J Pediatr*. 1999;158(7):592–8.

220. Shalia KK, Mashru MR, Vasvani JB, Mokal RA, Mithbawkar SM, Thakur PK. Circulating levels of cell adhesion molecules in hypertension. *Indian J Clin Biochem IJCB*. 2009;24(4):388–97.
221. Shavelle DM, Katz R, Takasu J, Lima JA, Jenny NS, Budoff MJ, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and aortic valve calcification in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *J Heart Valve Dis*. 2008;17(4):388–95.
222. Calan M, Calan O, Gonen MS, Bilgir F, Kebapcilar L, Kulac E, et al. Examination of adhesion molecules, homocysteine and hs-CRP in patients with polygenic hypercholesterolemia and isolated hypertriglyceridemia. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2011;50(15):1529–35.
223. Vladimirova-Kitova L, Deneva T, Marinov B. Predictors of the intima-media thickness of carotid artery in asymptomatic newly detected severe hypercholesterolemic patients. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2010;30(4):250–9.
224. Głowińska-Olszewska B, Totwińska J, Urban M. Dysfunkcja śródbłonna, grubość kompleksu IMT tętnic szyjnych wspólnych i cząsteczki adhezyjne u dzieci i młodzieży z otyłością i nadciśnieniem tętniczym. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2007 13(1).
225. Głowińska-Olszewska B, Moniuszko M, Hryniewicz A, Jeznach M, Rusak M, Dąbrowska M, et al. Relationship between circulating endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes: a novel paradigm of early atherosclerosis in high-risk young patients. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*. 2013;168(2):153–61.
226. Hansson GK, Bondjers G. Endothelial proliferation and atherogenesis in rabbits with moderate hypercholesterolemia. *Artery*. 1980;7(4):316–29.
227. Yehuda H, Szuchman-Sapir A, Khatib S, Musa R, Tamir S. Human atherosclerotic plaque lipid extract promotes expression of proinflammatory factors in human monocytes and macrophage-like cells. *Atherosclerosis*. 2011;218(2):339–43.
228. Kim TW, Febbraio M, Robinet P, Dugar B, Greene D, Cerny A, et al. The critical role of IL-1 receptor-associated kinase 4-mediated NF- κ B activation in modified low-density lipoprotein-induced inflammatory gene expression and atherosclerosis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2011;186(5):2871–80.
229. Rader DJ. IL-1 and atherosclerosis: a murine twist to an evolving human story. *J Clin Invest*. 2012;122(1):27–30.
230. Zhang K, Huang X, Li X, Feng M, Li L, Cai X, et al. Interleukin 6 destabilizes atherosclerotic plaques by downregulating prolyl-4-hydroxylase α 1 via a mitogen-activated protein kinase and c-Jun pathway. *Arch Biochem Biophys*. 2012;528(2):127–33.
231. Van der Valk FM, van Wijk DF, Stroes ESG. Novel anti-inflammatory strategies in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2012;23(6):532–9.
232. Lu Z, Li Y, Jin J, Zhang X, Lopes-Virella MF, Huang Y. Toll-like receptor 4 activation in microvascular endothelial cells triggers a robust inflammatory response and

- cross talk with mononuclear cells via interleukin-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(7):1696–706.
233. Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, Shimada K. Increased levels of monocyte-related cytokines in patients with unstable angina. *Atherosclerosis.* 2002;161(2):403–8.
234. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med.* 1978;148(1):335–40.
235. Campbell LA, Kuo C. Chlamydia pneumoniae--an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(1):23–32.
236. Gutiérrez J, de Dios Luna J, Linares J, del Rosario Montes M, Quesada E, Rojas A, et al. Relationship between peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and chronic Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae infection. A meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2005;93(6):1153–60.
237. Leinonen M, Saikku P. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(1):11–7.
238. Morré SA, Stoker W, Lagrand WK, van den Brule AJ, Niessen HW. Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis. *J Clin Pathol.* 2000;53(9):647–54.
239. Moutsopoulos NM, Madianos PN. Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1088:251–64.
240. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783–801.
241. Uematsu S, Akira S. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;(183):1–20.
242. Siscovick DS, Schwartz SM, Corey L, Grayston JT, Ashley R, Wang S-P, et al. Chlamydia pneumoniae, Herpes Simplex Virus Type 1, and Cytomegalovirus and Incident Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease Death in Older Adults The Cardiovascular Health Study. *Circulation.* 2000;102(19):2335–40.
243. Volanen I, Raitakari OT, Vainionpää R, Arffman M, Aarnisalo J, Anglé S, et al. Serum lipid profiles poorly correlate with Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, and cytomegalovirus seropositivity in prospectively followed-up healthy children. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(4):827–32.
244. Melnick JL, Petrie BL, Dreesman GR, Burek J, McCollum CH, DeBaakey ME. Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. *Lancet.* 1983;2(8351):644–7.
245. Adam E, Melnick JL, Probstfield JL, Petrie BL, Burek J, Bailey KR, et al. High levels of cytomegalovirus antibody in patients requiring vascular surgery for atherosclerosis. *Lancet.* 1987;2(8554):291–3.

246. Hendrix MG, Dormans PH, Kitslaar P, Bosman F, Bruggeman CA. The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients. *Am J Pathol.* 1989;134(5):1151–7.
247. Hendrix MG, Salimans MM, van Boven CP, Bruggeman CA. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1990;136(1):23–8.
248. Danesh J, Muir J, Wong YK, Ward M, Gallimore JR, Pepys MB. Risk factors for coronary heart disease and acute-phase proteins. A population-based study. *Eur Heart J.* 1999;20(13):954–9.
249. Abele-Ohl S, Leis M, Wollin M, Mahmoudian S, Hoffmann J, Müller R, et al. Human cytomegalovirus infection leads to elevated levels of transplant arteriosclerosis in a humanized mouse aortic xenograft model. *Am J Transplant.* 2012;12(7):1720–9.
250. Streblov DN, Kreklywich CN, Andoh T, Moses AV, Dumortier J, Smith PP, et al. The role of angiogenic and wound repair factors during CMV-accelerated transplant vascular sclerosis in rat cardiac transplants. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2008;8(2):277–87.
251. Reinhardt B, Winkler M, Schaarschmidt P, Pretsch R, Zhou S, Vaida B, et al. Human cytomegalovirus-induced reduction of extracellular matrix proteins in vascular smooth muscle cell cultures: a pathomechanism in vasculopathies? *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 10):2849–58.
252. Reinhardt B, Mertens T, Mayr-Beyrle U, Frank H, Lüske A, Schierling K, et al. HCMV infection of human vascular smooth muscle cells leads to enhanced expression of functionally intact PDGF beta-receptor. *Cardiovasc Res.* 2005;67(1):151–60.
253. Sambiasi NV, Higuchi ML, Nuovo G, Gutierrez PS, Fiorelli AI, Uip DE, et al. CMV and transplant-related coronary atherosclerosis: an immunohistochemical, in situ hybridization, and polymerase chain reaction in situ study. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2000;13(2):173–9.
254. Horváth R, Cerný J, Benedík J, Hökl J, Jelínková I, Benedík J. The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2000;16(1):17–24.
255. Sorlie PD, Nieto FJ, Adam E, Folsom AR, Shahar E, Massing M. A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arch Intern Med.* 2000;160(13):2027–32.
256. Span AH, Frederik PM, Grauls G, Van Boven GP, Bruggeman CA. CMV induced vascular injury: an electron-microscopic study in the rat. *Vivo Athens Greece.* 1993;7(6A):567–73.
257. Span AH, Grauls G, Bosman F, van Boven CP, Bruggeman CA. Cytomegalovirus infection induces vascular injury in the rat. *Atherosclerosis.* 1992;93(1-2):41–52.

258. Wong WT, Wong SL, Tian XY, Huang Y. Endothelial dysfunction: the common consequence in diabetes and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55(4):300–7.
259. Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, et al. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension.* 2011;57(2):132–40.
260. Burnett MS, Gaydos CA, Madico GE, Glad SM, Paigen B, Quinn TC, et al. Atherosclerosis in apoE knockout mice infected with multiple pathogens. *J Infect Dis.* 2001;183(2):226–31.
261. Rott D, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Zalles-Ganley A, Ogunmakinwa J, et al. Effects of MF-tricyclic, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on atherosclerosis progression and susceptibility to cytomegalovirus replication in apolipoprotein-E knockout mice. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(10):1812–9.
262. Vliegen I, Duijvestijn A, Grauls G, Herngreen S, Bruggeman C, Stassen F. Cytomegalovirus infection aggravates atherogenesis in apoE knockout mice by both local and systemic immune activation. *Microbes Infect Inst Pasteur.* 2004;6(1):17–24.
263. Podolec P., Kopeć G., Gruchała M., Rynkiewicz A. Europejski system oceny ryzyka ogólnego SCORE. *Podręcznik Pol Forum Profil Tom Pod Red P Podolca Wyd Med Prakt* 2007.
264. Wysocki MJ., Zejda JE. Epidemiologia chorób niezakaźnych w Polsce w drugiej połowie dwudziestego wieku. *Przeegl Epidemiol.* 2007;61:615 – 628.
265. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanus F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364(9438):937–52.
266. Wissler RW, Strong JP. Risk factors and progression of atherosclerosis in youth. PDAY Research Group. *Pathological Determinants of Atherosclerosis in Youth.* *Am J Pathol.* 1998;153(4):1023–33.
267. Otto-Buczowska E. *Cukrzyca typu 1.* Cornetis, Wrocław 2006;
268. Królewski AS, Kosiński EJ, Warram JH, Leland OS, Busick EJ, Asmal AC, et al. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 1987;59(8):750–5.
269. National High Blood Pressure Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescent. The fourth report on diagnosis, evaluation and treatment of high blood pressure in children and adolescent. *Pediatrics* 2004; 114: 555-576
270. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 1998;338(23):1650–6.
271. Yamasaki Y, Kawamori R, Matsushima H, Nishizawa H, Kodama M, Kajimoto Y, et al. Atherosclerosis in carotid artery of young IDDM patients monitored by ultrasound high-resolution B-mode imaging. *Diabetes.* 1994;43(5):634–9.

272. Tołwińska J., Głowińska B., Urban M., Pieciukiewicz B. Ocena zaawansowania procesu miażdżycowego u dzieci z otyłością prostą i nadciśnieniem za pomocą badania ultrasonograficznego tetnic szyjnych i ramiennych. *Przeegl Lek.* 2005;62:1346–51.
273. Felício JS, Pacheco JT, Ferreira SR, Plavnik F, Moisés VA, Kohlmann O, et al. Hyperglycemia and nocturnal systolic blood pressure are associated with left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in hypertensive diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol.* 2006;5:19.
274. Otto-Buczowska E., Jarosz-Chobot P. Insulina jako regulator przemian metabolicznych w mięśniach szkieletowych w utrzymaniu homeostazy glukozy. *Przeegl Lek.* 2001;58:782–7.
275. Hofhuis W, de Jongste JC, Merkus PJFM. Adverse health effects of prenatal and postnatal tobacco smoke exposure on children. *Arch Dis Child.* 2003;88(12):1086–90.
276. DiFranza JR, Aligne CA, Weitzman M. Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. *Pediatrics.* 2004;113(4 Suppl):1007–15.
277. Whincup PH, Gilg JA, Emberson JR, Jarvis MJ, Feyerabend C, Bryant A, et al. Passive smoking and risk of coronary heart disease and stroke: prospective study with cotinine measurement. *BMJ.* 2004;329(7459):200–5.
278. Barnoya J, Bialous SA, Glantz SA. Effective interventions to reduce smoking-induced heart disease around the world: time to act. *Circulation.* 2005;112(4):456–8.
279. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation.* 1986;74(6):1399–406.
280. Poli A, Tremoli E, Colombo A, Sirtori M, Pignoli P, Paoletti R. Ultrasonographic measurement of the common carotid artery wall thickness in hypercholesterolemic patients. A new model for the quantitation and follow-up of preclinical atherosclerosis in living human subjects. *Atherosclerosis.* 1988;70(3):253–61.
281. Irace C, Carallo C, De Franceschi MS, Scicchitano F, Milano M, Tripolino C, et al. Human common carotid wall shear stress as a function of age and gender: a 12-year follow-up study. *Age Dordr Neth.* 2012;34(6):1553–62.
282. Zito C, Mohammed M, Todaro MC, Khandheria BK, Cusmà-Piccione M, Oreto G, et al. Interplay between arterial stiffness and diastolic function: a marker of ventricular-vascular coupling. *J Cardiovasc Med Hagerstown Md.* 2014;
283. Savić ŽN, Soldatović II, Brajović MD, Pavlović AM, Mladenović DR, Škodrić-Trifunović VD. Comparison between carotid artery wall thickness measured by multidetector row computed tomography angiography and intima-media thickness measured by sonography. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:1582–90.
284. Cuspidi C, Ambrosioni E, Mancia G, Pessina AC, Trimarco B, Zanchetti A, et al. Role of echocardiography and carotid ultrasonography in stratifying risk in patients with

- essential hypertension: the Assessment of Prognostic Risk Observational Survey. *J Hypertens*. 2002;20(7):1307–14.
285. Cuspidi C, Michev I, Macca G, Meani S, Salerno M, Valerio C, et al. Impact of carotid intima-media thickening on risk stratification in elderly hypertensives. *Blood Press*. 2003;12(1):25–31.
286. Cuspidi C, Lonati L, Macca G, Sampieri L, Fusi V, Michev I, et al. Prevalence of left ventricular hypertrophy and carotid thickening in a large selected hypertensive population: impact of different echocardiographic and ultrasonographic diagnostic criteria. *Blood Press*. 2001;10(3):142–9.
287. Naqvi TZ, Lee M-S. Carotid Intima-Media Thickness and Plaque in Cardiovascular Risk Assessment. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7(10):1025-38
288. Zhu W, Li M, Huang X, Neubauer H. Association of hyperviscosity and subclinical atherosclerosis in obese schoolchildren. *Eur J Pediatr*. 2005;164(10):639–45.
289. Zhu W, Huang X, He J, Li M, Neubauer H. Arterial intima-media thickening and endothelial dysfunction in obese Chinese children. *Eur J Pediatr*. 2005;164(6):337-44.
290. Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RYT, Qiao M, Leung SSF, et al. Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children. *Circulation*. 2004;109(16):1981–6.
291. Lakka TA, Lakka HM, Salonen R, Kaplan GA, Salonen JT. Abdominal obesity is associated with accelerated progression of carotid atherosclerosis in men. *Atherosclerosis*. 2001;154(2):497–504.
292. Järvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, Lehtimäki T, Solakivi T, Rönnemaa T, et al. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(2):493–8.
293. Groner JA, Joshi M, Bauer JA. Pediatric precursors of adult cardiovascular disease: noninvasive assessment of early vascular changes in children and adolescents. *Pediatrics*. 2006;118(4):1683–91.
294. Meyer AA, Joharchi MS, Kundt G, Schuff-Werner P, Steinhoff G, Kienast W. Predicting the risk of early atherosclerotic disease development in children after repair of aortic coarctation. *Eur Heart J*. 2005;26(6):617–22.
295. Sgorbini L, Scuteri A, Leggio M, Gianni W, Nevola E, Leggio F. Carotid intima-media thickness, carotid distensibility and mitral, aortic valve calcification: a useful diagnostic parameter of systemic atherosclerotic disease. *J Cardiovasc Med Hagerstown Md*. 2007;8(5):342–7.
296. Sgorbini L, Scuteri A, Leggio M, Leggio F. Association of mitral annulus calcification, aortic valve calcification with carotid intima media thickness. *Cardiovasc Ultrasound*. 2004;2:19.

297. Helanterä I, Koskinen P, Finne P, Loginov R, Kyllönen L, Salmela K, et al. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2006;19(11):893–900.
298. Nieto FJ, Adam E, Sorlie P, Farzadegan H, Melnick JL, Comstock GW, et al. Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimal-medial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis. *Circulation*. 1996;94(5):922–7.
299. Järvisalo MJ, Rönnemaa T, Volanen I, Kaitosaari T, Kallio K, Hartiala JJ, et al. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(1):H87–92.
300. Krzyżaniak A., Stawińska-Witoszyńska B., Krzywińska-Wiewiorowska M., Gałęcki J., Sowińska A. *Zdrowie poznańskich uczniów*. Wydawnictwo Miejskie; Poznań 2009.
301. Zachurzok-Buczyńska A, Małecka-Tendera E. Zespół metaboliczny u dzieci i młodzieży. *Endokrynol Otyłość Zaburzenia Przemiany Materii*. 2005;1(3):13–20.
302. Kułaga Z., Litwin M., Zajączkowska M., Wasilewska A., Morawiec-Knysak A., Rózdzińska A. Porównanie wartości obwodów talii i bioder dzieci i młodzieży polskiej w wieku 7–18 lat z wartościami referencyjnymi dla oceny ryzyka sercowo-naczyniowego – wyniki wstępne projektu badawczego OLAF (PL0080). *Stand Med*. 2008;5:473–85.
303. Kułaga Z., Rózdzińska A., Palczewska I., Grajda A., Gurzkowska B., Napieralska E. Siatki centylowe wysokości, masy ciała i wskaźnika masy ciała dzieci i młodzieży w Polsce – wyniki badania OLAF. *Stand Med*. 2010;7:690–700.
304. Touboul P-J, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004–2006). *Cerebrovasc Dis*. 2006;23(1):75–80.
305. Jakubowski W. Standardy badań ultrasonograficznych Polskiego Towarzystwa Ultrasonograficznego. *Roztoczańska Szkoła Ultrasonografii*; 2011.
306. Voisard R, Krügers T, Reinhardt B, Vaida B, Baur R, Herter T, et al. HCMV-infection in a human arterial organ culture model: effects on cell proliferation and neointimal hyperplasia. *BMC Microbiol*. 2007;7:68.
307. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ, Wang F. Prospective study of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and the risk of future myocardial infarction and stroke. *Circulation*. 1998;98(25):2796–9.
308. Smieja M, Gnarpe J, Lonn E, Gnarpe H akan, Olsson G, Yi Q, et al. Multiple infections and subsequent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation*. 2003;107(2):251–7.
309. Hagger-Johnson G, Deary IJ, Davies CA, Weiss A, Batty GD. Reaction Time and Mortality from the Major Causes of Death: The NHANES-III Study. *PLOS ONE*. 2014;9(1):e82959.

310. Roberts ET, Haan MN, Dowd JB, Aiello AE. Cytomegalovirus antibody levels, inflammation, and mortality among elderly Latinos over 9 years of follow-up. *Am J Epidemiol.* 2010;172(4):363–71.
311. Guech-Ongey M, Brenner H, Twardella D, Hahmann H, Rothenbacher D. Role of cytomegalovirus sero-status in the development of secondary cardiovascular events in patients with coronary heart disease under special consideration of diabetes. *Int J Cardiol.* 2006;111(1):98–103.
312. Kalil RS, Hudson SL, Gaston RS. Determinants of cardiovascular mortality after renal transplantation: a role for cytomegalovirus? *Am J Transplant.* 2003;3(1):79–81.
313. Sternby NH, Fernandez-Britto JE, Nordet P. Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PBDAY Study), 1986-96. *Bull World Health Organ.* 1999;77(3):250–7.
314. Koeijvoets KC, Rodenburg J, Hutten BA, Wiegman A, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Low-Density Lipoprotein Receptor Genotype and Response to Pravastatin in Children With Familial Hypercholesterolemia Substudy of an Intima-Media Thickness Trial. *Circulation.* 2005;112(20):3168–73.
315. Li C, Samaranayake NR, Ong KL, Wong HK, Cheung BM. Is Human Cytomegalovirus Infection Associated with Hypertension? The United States National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *PloS One.* 2012;7(7):e39760.
316. Haarala A, Kähönen M, Lehtimäki T, Aittoniemi J, Jylhävä J, Hutri-Kähönen N, et al. Relation of high cytomegalovirus antibody titres to blood pressure and brachial artery flow-mediated dilation in young men: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(2):309–16.
317. Shen YH, Zhang L, Utama B, Wang J, Gan Y, Wang X, et al. Human cytomegalovirus inhibits Akt-mediated eNOS activation through upregulating PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10). *Cardiovasc Res.* 2006;69(2):502–11.
318. Weis M, Kledal TN, Lin KY, Panchal SN, Gao SZ, Valantine HA, et al. Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway role of asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. *Circulation.* 2004;109(4):500–5.
319. Petrakopoulou P, Kübrich M, Pehlivanli S, Meiser B, Reichart B, von Scheidt W, et al. Cytomegalovirus infection in heart transplant recipients is associated with impaired endothelial function. *Circulation.* 2004;110(11 suppl 1):II–207.
320. Savoia C, Schiffrin E. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci.* 2007;112:375–84.
321. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 1990;70(4):1067–116.
322. Hall JE. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol.* 2003;24(1):27–39.
323. Ibrahim MM. RAS inhibition in hypertension. *J Hum Hypertens.* 2006;20(2):101–8.

324. Sachetelli S, Liu Q, Zhang SL, Liu F, Hsieh TJ, Brezniceanu ML, et al. RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int.* 2006;69(6):1016–23.
325. Söderberg-Nauclér C, Streblov DN, Fish KN, Allan-Yorke J, Smith PP, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14+ monocytes is differentiation dependent. *J Virol.* 2001;75(16):7543–54.
326. Cao JJ, Thach C, Manolio TA, Psaty BM, Kuller LH, Chaves PH, et al. C-reactive protein, carotid intima-media thickness, and incidence of ischemic stroke in the elderly the cardiovascular health study. *Circulation.* 2003;108(2):166–70.
327. Kawamoto R, Tomita H, Inoue A, Ohtsuka N, Kamitani A. Impact of C-reactive protein on the likelihood of carotid atherosclerosis in Japanese adults. *J Atheroscler Thromb.* 2006;13(4):175–82.
328. Kelishadi R, Sharifi M, Khosravi A, Adeli K. Relationship between C-reactive protein and atherosclerotic risk factors and oxidative stress markers among young persons 10–18 years old. *Clin Chem.* 2007;53(3):456–64.
329. Juonala M, Viikari JS, Rönnemaa T, Taittonen L, Marniemi J, Raitakari OT. Childhood C-Reactive Protein in Predicting CRP and Carotid Intima-Media Thickness in Adulthood The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1883–8.
330. Caballero AE, Bousquet-Santos K, Robles-Osorio L, Montagnani V, Soodini G, Porramatikul S, et al. Overweight Latino children and adolescents have marked endothelial dysfunction and subclinical vascular inflammation in association with excess body fat and insulin resistance. *Diabetes Care.* 2008;31(3):576–82.
331. Quijada Z, Paoli M, Zerpa Y, Camacho N, Cichetti R, Villarroel V, et al. The triglyceride/HDL-cholesterol ratio as a marker of cardiovascular risk in obese children; association with traditional and emergent risk factors. *Pediatr Diabetes.* 2008;9(5):464–71.
332. Lambert M, Delvin EE, Paradis G, O’Loughlin J, Hanley JA, Levy E. C-reactive protein and features of the metabolic syndrome in a population-based sample of children and adolescents. *Clin Chem.* 2004;50(10):1762–8.
333. Hiura M, Kikuchi T, Nagasaki K, Uchiyama M. Elevation of serum C-reactive protein levels is associated with obesity in boys. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* 2003;26(7):541–6.
334. Martos R, Valle M, Morales RM, Cañete R, Gascón F, Urbano MM. Changes in body mass index are associated with changes in inflammatory and endothelial dysfunction biomarkers in obese prepubertal children after 9 months of body mass index SD score loss. *Metabolism.* 2009;58(8):1153–60.
335. Froberg MK, Seacotte N, Dahlberg E. Cytomegalovirus seropositivity and serum total cholesterol levels in young patients. *Ann Clin Lab Sci.* 2001;31(2):157–61.

336. Al-Ghamdi A. Role of herpes simplex virus-1, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in atherosclerosis. *Pak J Pharm Sci.* 2012;25(1): 124-134
337. Jawień J. Nowe, immunologiczne spojrzenie na patogenezę miażdżycy. *Pol Arch Med Wewnętrznej.* 2008;118(3):127–31.
338. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, Pache J-C, Velebit V, Dayer J-M, et al. Production of Chemokines by Perivascular Adipose Tissue A Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(12):2594–9.
339. Kampoli A-M, Tousoulis D, Antoniadis C, Siasos G, Stefanadis C. Biomarkers of premature atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 2009;15(7):323–32.
340. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008;79(3):360–76.
341. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, et al. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(4):656–60.
342. Latkovskis G, Licis N, Kalnins U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur J Immunogenet.* 2004;31(5):207–13.
343. Ye F, Jin X-Q, Chen G-H, Den X-L, Zheng Y-Q, Li C-Y. Polymorphisms of interleukin-1 and interleukin-6 genes on the risk of ischemic stroke in a meta-analysis. *Gene.* 2012;499(1):61–9.
344. Iacoviello L, Santimone I, Latella MC, de Gaetano G, Donati MB. Nutrigenomics: a case for the common soil between cardiovascular disease and cancer. *Genes Nutr.* 2008;3(1):19–24.
345. Lai P-T, Chen S-Y, Lee Y-S, Ho Y-P, Chiang Y-Y, Hsu H-Y. Relationship between acute stroke outcome, aspirin resistance, and humoral factors. *J Chin Med Assoc.* 2012;75(10):513–8.
346. Isoda K, Shiigai M, Ishigami N, Matsuki T, Horai R, Nishikawa K, et al. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation.* 2003;108(5):516–8.
347. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis.* 2000;148(2):209-14.
348. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation.* 2000;101(12):1372–8.
349. Von der Thüsen JH, Kuiper J, Van Berkel TJ, Biessen EA. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev.* 2003;55(1):133–66.

350. Tentolouris C, Tousoulis D, Antoniadis C, Bosinakou E, Kotsopoulou M, Trikas A, et al. Endothelial function and proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2004;94(2):301–5.
351. Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2005;19(2):149–54.
352. Furumoto T, Saito N, Dong J, Mikami T, Fujii S, Kitabatake A. Association of cardiovascular risk factors and endothelial dysfunction in Japanese hypertensive patients: implications for early atherosclerosis. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* 2002;25(3):475–80.
353. Weiss CR, Arai AE, Bui MN, Agyeman KO, Waclawiw MA, Balaban RS, et al. Arterial wall MRI characteristics are associated with elevated serum markers of inflammation in humans. *J Magn Reson Imaging.* 2001;14(6):698–704.
354. Koukkunen H, Penttilä K, Kemppainen A, Halinen M, Penttilä I, Rantanen T, et al. C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α in the prognostic classification of unstable angina pectoris. *Ann Med.* 2001;33(1):37–47.
355. Fudal M, Domal-Kwiatkowska D, Kuczaj A, Ryfiński B, Sliupkas-Dyrda E, Wilczewski P i wsp. Obecność wirusa cytomegalii w obrębie ściany aorty a miejscowa aktywacja zapalna u pacjentów z przewlekłą chorobą wieńcową poddawanych zabiegowi pomostowania aortalno-wieńcowego. *Wiad Lek Wars Pol* 1960. 2010;63(4):276–88.
356. Krogerus L, Soots A, Loginov R, Bruggeman C, Lautenschlager I. CMV increases tubular apoptosis through the TNF- α -TNF-R1 pathway in a rat model of chronic renal allograft rejection. *Transpl Immunol.* 2008;18(3):232–6.
357. Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Syrenicz A, Gebala A, Lulka D, Walczak M. Serum markers of inflammation and endothelial activation in children with obesity-related hypertension. *Neuroendocrinol Lett.* 2005;26(3):242–6.
358. De Sanctis Sara BL, Del Torto Marianna NM, Lucantoni Marta SM, Angelika M, Francesco C. Etanercept improves pro-atherosclerotic biomarkers in children with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology.* 2011;9(1):169.
359. Tam L-S, Kitis GD, González-Gay MA. Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of subclinical atherosclerosis in inflammatory arthritis? *Rheumatology.* 2014;53(6):1108–19.
360. Piché M-È, Lemieux S, Weisnagel SJ, Corneau L, Nadeau A, Bergeron J. Relation of high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and fibrinogen to abdominal adipose tissue, blood pressure, and cholesterol and triglyceride levels in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol.* 2005;96(1):92–7.
361. Sainz B, LaMarca HL, Garry RF, Morris CA. Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma. *Virology.* 2005;2(1):14.

362. Leon MA, Zuckerman SH. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res*. 2005;54(10):395–411.
363. McLaren JE, Ramji DP. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(2):125–35.
364. Schroecksnadel K, Frick B, Winkler C, Fuchs D. Crucial role of interferon-gamma and stimulated macrophages in cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006;4(3):205-13.
365. Murayama T, Yokode M, Kataoka H, Imabayashi T, Yoshida H, Sano H, et al. Intraperitoneal administration of anti-c-fms monoclonal antibody prevents initial events of atherogenesis but does not reduce the size of advanced lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999;99(13):1740–6.
366. Saitoh T, Kishida H, Tsukada Y, Fukuma Y, Sano J, Yasutake M, et al. Clinical significance of increased plasma concentration of macrophage colony-stimulating factor in patients with angina pectoris. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):655–65.
367. Rallidis LS, Zolindaki MG, Pentzeridis PC, Pouloupoulos KP, Velissaridou AH, Apostolou TS. Raised concentrations of macrophage colony stimulating factor in severe unstable angina beyond the acute phase are strongly predictive of long term outcome. *Heart Br Card Soc*. 2004;90(1):25–9.
368. Lee YW, Kühn H, Kaiser S, Hennig B, Daugherty A, Toborek M. Interleukin 4 induces transcription of the 15-lipoxygenase I gene in human endothelial cells. *J Lipid Res*. 2001;42(5):783–91.
369. Lee YW, Hennig B, Toborek M. Redox-regulated mechanisms of IL-4-induced MCP-1 expression in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2003;284(1):185–192.
370. Lee YW, Eum SY, Chen KC, Hennig B, Toborek M. Gene Expression Profile in Interleukin-4–Stimulated Human Vascular Endothelial Cells. *Mol Med*. 2004;10(1-6):19.
371. Lee YW, Hirani AA. Role of interleukin-4 in atherosclerosis. *Arch Pharm Res*. 2006;29(1):1–15.
372. Walch L, Massade L, Dufilho M, Brunet A, Rendu F. Pro-atherogenic effect of interleukin-4 in endothelial cells: modulation of oxidative stress, nitric oxide and monocyte chemoattractant protein-1 expression. *Atherosclerosis*. 2006;187(2):285–91.
373. Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Cholinergic stimulation attenuates the IL-4 induced expression of E-selectin and vascular endothelial growth factor by equine pulmonary artery endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;132(2):116–21.
374. Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Lavoie J-P. IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(5):1147–54.

375. Lee YW, Lee WH, Kim PH. Oxidative mechanisms of IL-4-induced IL-6 expression in vascular endothelium. *Cytokine*. 2010;49(1):73–9.
376. Lee YW, Lee WH, Kim PH. Role of NADPH oxidase in interleukin-4-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular endothelium. *Inflamm Res*. 2010;59(9):755–65.
377. Blease K, Seybold J, Adcock IM, Hellewell PG, Burke-Gaffney A. Interleukin-4 and lipopolysaccharide synergize to induce vascular cell adhesion molecule-1 expression in human lung microvascular endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18(5):620–30.
378. Lee YW, Kühn H, Hennig B, Toborek M. IL-4 induces apoptosis of endothelial cells through the caspase-3-dependent pathway. *FEBS Lett*. 2000;485(2):122–6.
379. King VL, Szilvassy SJ, Daugherty A. Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(3):456–61.
380. Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*. 2003;163(3):1117–25.
381. Shahzad F, Tawwab S, Afzal N. Association of interleukin-4 and IgE levels with LDL oxidation in atherosclerosis. *Iran J Immunol*. 2010;7:109–16.
382. Barrett-Connor E. Menopause, atherosclerosis, and coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(2):186–91.
383. Ebong IA, Watson KE, Goff Jr DC, Bluemke DA, Srikanthan P, Horwich T, et al. Age at menopause and incident heart failure: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Menopause*. 2014;21(6):1.
384. Wellons M, Ouyang P, Schreiner PJ, Herrington DM, Vaidya D. Early Menopause Predicts Future Coronary Heart Disease and Stroke: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Menopause N Y NY*. 2012;19(10):1081.
385. Woodard GA, Brooks MM, Barinas-Mitchell E, Mackey RH, Matthews KA, Sutton-Tyrrell K. Lipids, menopause, and early atherosclerosis in Study of Women's Health Across the Nation Heart women. *Menopause N Y NY*. 2011;18(4):376–84.
386. Talbott EO, Guzick DS, Sutton-Tyrrell K, McHugh-Pemu KP, Zborowski JV, Remsberg KE, et al. Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(11):2414–21.
387. Shroff R, Kerchner A, Maifeld M, Van Beek EJ, Jagasia D, Dokras A. Young obese women with polycystic ovary syndrome have evidence of early coronary atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4609–14.

388. Carmina E, Orio F, Palomba S, Longo RA, Cascella T, Colao A, et al. Endothelial dysfunction in PCOS: role of obesity and adipose hormones. *Am J Med.* 2006;119(4):356–e1.
389. Bickerton AST, Clark N, Meeking D, Shaw KM, Crook M, Lumb 24 P., et al. Cardiovascular risk in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Clin Pathol.* 2005;58(2):151–4.
390. Welsh P, Murray HM, Ford I, Trompet S, de Craen AJ, Jukema JW, et al. Circulating Interleukin-10 and Risk of Cardiovascular Events A Prospective Study in the Elderly at Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(10):2338–44.
391. Umans VA, Kloeg PH, Bronzwaer J. The CAPTURE trial. *The Lancet.* 1997;350(9075):445.
392. Ambrosius W, Kaźmierski R, Michalak S, Kozubski W. Anti-inflammatory cytokines in subclinical carotid atherosclerosis. *Neurology.* 2006;66(12):1946–8.
393. Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, Hashimoto H, Kuwabara K, Ohtsuki T, et al. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice. *Atherosclerosis.* 2002;160(2):305–10.
394. Ballantyne CM, Abe Y. Molecular markers for atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk.* 1997;4(5-6):353–6.
395. Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Bang H, Heiss G, Duncan BB, Folsom AR, et al. Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetologia.* 2007;50(1):36–42.
396. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *The Lancet.* 1998;351(9096):88–92.
397. Becker A, Van Hinsbergh VWM, Jager A, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, et al. Why is soluble intercellular adhesion molecule-1 related to cardiovascular mortality? *Eur J Clin Invest.* 2002;32(1):1–8.
398. Hjelstuen A, Anderssen SA, Holme I, Seljeflot I, Ole Klemsdal T. Effect of lifestyle and/or statin treatment on soluble markers of atherosclerosis in hypertensives. *Scand Cardiovasc J.* 2007;41(5):313–20.
399. Lechleitner M. Non lipid related effects of statins. *J Clin Basic Cardiol.* 2002;5(3):205–8.
400. Shovman O, Levy Y, Gilburd B, Shoenfeld Y. Antiinflammatory and immunomodulatory properties of statins. *Immunol Res.* 2002;25(3):271–85.
401. Bemelmans WJ, Lefrandt JD, Feskens EJ, Broer J, Tervaert JWC, May JF, et al. Change in saturated fat intake is associated with progression of carotid and femoral intima-media thickness, and with levels of soluble intercellular adhesion molecule-1. *Atherosclerosis.* 2002;163(1):113–20.

402. Hwang Y-S, Tsai W-C, Lu Y-H, Lin C-C, Tsai K-Y. Effects of angiotensin II-receptor blockers on soluble cell adhesion molecule levels in uncomplicated systemic hypertension: An observational, controlled pilot study in Taiwanese adults. *Curr Ther Res.* 2005;66(3):181–94.
403. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation.* 2003;107(3):391–7.
404. Luc G, Bard J-M, Juhan-Vague I, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease The PRIME study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1255–61.
405. Gross MD, Bielinski SJ, Suarez-Lopez JR, Reiner AP, Bailey K, Thyagarajan B, et al. Circulating soluble intercellular adhesion molecule 1 and subclinical atherosclerosis: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Clin Chem.* 2012;58(2):411–20.
406. Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension.* 2001;38(3):399–403.
407. Kucharska W, Masłowska E, Gromkowska M, Wasicionek M, Kalita D, Drabik A, i wsp. Rozpuszczalne formy cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1) u dzieci z nadciśnieniem tętniczym. *Pediatr Pol.* 2011;86(3):236–41.
408. Maussang D, Langemeijer E, Fitzsimons CP, Stigter-van Walsum M, Dijkman R, Borg MK, et al. The human cytomegalovirus–encoded chemokine receptor US28 promotes angiogenesis and tumor formation via cyclooxygenase-2. *Cancer Res.* 2009;69(7):2861–9.
409. Caposio P, Orloff SL, Strelbow DN. The role of cytomegalovirus in angiogenesis. *Virus Res.* 2011;157(2):204–11.
410. Steinhoff G, You XM, Steinmüller C, Boeke K, Stals FS, Bruggeman CA, et al. Induction of endothelial adhesion molecules by rat cytomegalovirus in allogeneic lung transplantation in the rat. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1994;99:58–60.
411. Hornef MW, Bein G, Fricke L, Steinhoff J, Wagner HJ, Hinderer W, et al. Coincidence of Epstein-Barr virus reactivation, cytomegalovirus infection, and rejection episodes in renal transplant recipients. *Transplantation.* 1995;60(5):474–80.
412. Marino M, Scuderi F, Mazzarelli P, Mannella F, Provenzano C, Bartoccioni E. Constitutive and cytokine-induced expression of MHC and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human myoblasts. *J Neuroimmunol.* 2001;116(1):94–101.
413. Głowińska B, Urban M, Peczyńska J, Szczepańska-Kostro J. Wybrane cząsteczki adhezyjne: sICAM-1 oraz sVCAM-1 jako markery dysfunkcji śródbłonna u dzieci i młodzieży chorych na cukrzycę typu 1. *Pol Merkur Lek Organ Pol Tow Lek.* 2003;14(81):205–9.

414. Beauloye V, Zech F, Tran HTM, Clapuyt P, Maes M, Brichard SM. Determinants of early atherosclerosis in obese children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(8):3025–32.
415. Narverud I, Retterstøl K, Iversen PO, Halvorsen B, Ueland T, Ulven SM, et al. Markers of atherosclerotic development in children with familial hypercholesterolemia: A literature review. *Atherosclerosis.* 2014;235(2):299–309.
416. Narverud I, Ueland T, Nenseter MS, Retterstøl K, Telle-Hansen VH, Halvorsen B, et al. Children with familial hypercholesterolemia are characterized by an inflammatory imbalance between the tumor necrosis factor α system and interleukin-10. *Atherosclerosis.* 2011;214(1):163–8.
417. Narverud I, Retterstøl K, Iversen PO, Halvorsen B, Ueland T, Ulven SM, et al. Markers of atherosclerotic development in children with familial hypercholesterolemia: a literature review. *Atherosclerosis.* 2014;235(2):299–309.
418. De Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, Duriez P, Smit AJ, Fruchart J-C, et al. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation.* 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):33–38.
419. Howard G, Sharrett AR, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA, et al. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. ARIC Investigators. *Stroke J Cereb Circ.* 1993;24(9):1297–304.
420. Bots ML, Evans GW, Riley WA, Grobbee DE. Carotid intima-media thickness measurements in intervention studies: design options, progression rates, and sample size considerations: a point of view. *Stroke J Cereb Circ.* 2003;34(12):2985–94.
421. Rubba F, Gentile M, Iannuzzi A, Panico S, Mattiello A, Quagliata L, et al. Vascular preventive measures: the progression from asymptomatic to symptomatic atherosclerosis management. Evidence on usefulness of early diagnosis in women and children. *Future Cardiol.* 2010;6(2):211–20.
422. Aggoun Y, Bonnet D, Sidi D, Girardet JP, Brucker E, Polak M, et al. Arterial mechanical changes in children with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(9):2070–5.
423. Tonstad S, Joakimsen O, Stensland-Bugge E, Leren TP, Ose L, Russell D, et al. Risk factors related to carotid intima-media thickness and plaque in children with familial hypercholesterolemia and control subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(8):984–91.
424. Wiegman A, de Groot E, Hutten BA, Rodenburg J, Gort J, Bakker HD, et al. Arterial intima-media thickness in children heterozygous for familial hypercholesterolaemia. *The Lancet.* 2004;363(9406):369–70.
425. Lande MB, Carson NL, Roy J, Meagher CC. Effects of childhood primary hypertension on carotid intima media thickness: a matched controlled study. *Hypertension.* 2006;48(1):40–4.

426. Sorof JM, Alexandrov AV, Cardwell G, Portman RJ. Carotid artery intimal-medial thickness and left ventricular hypertrophy in children with elevated blood pressure. *Pediatrics*. 2003;111(1):61–6.
427. Sorof JM, Turner J, Martin DS, Garcia K, Garami Z, Alexandrov AV, et al. Cardiovascular risk factors and sequelae in hypertensive children identified by referral versus school-based screening. *Hypertension*. 2004;43(2):214–8.
428. Singh TP, Groehn H, Kazmers A. Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(4):661–5.
429. Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RYT, Qiao M, Leung SSF, et al. Overweight in children is associated with arterial endothelial dysfunction and intima-media thickening. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. 2004;28(7):852–7.
430. Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Lauer RM. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured from childhood through middle age: The Muscatine Study. *Circulation*. 2001;104(23):2815–9.
431. Li S, Chen W, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Urbina EM, et al. Childhood cardiovascular risk factors and carotid vascular changes in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *JAMA J Am Med Assoc*. 2003;290(17):2271–6.
432. Raitakari OT, Juonala M, Kähönen M, Taittonen L, Laitinen T, Mäki-Torkko N, et al. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *JAMA J Am Med Assoc*. 2003;290(17):2277–83.
433. Oren A, Vos LE, Uiterwaal CSPM, Grobbee DE, Bots ML. Cardiovascular risk factors and increased carotid intima-media thickness in healthy young adults: the Atherosclerosis Risk in Young Adults (ARYA) Study. *Arch Intern Med*. 2003;163(15):1787–92.
434. Gaeta G, De Michele M, Cuomo S, Guarini P, Foglia MC, Bond MG, et al. Arterial abnormalities in the offspring of patients with premature myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2000;343(12):840–6.
435. Wang TJ, Nam B-H, D’Agostino RB, Wolf PA, Lloyd-Jones DM, MacRae CA, et al. Carotid intima-media thickness is associated with premature parental coronary heart disease: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2003;108(5):572–6.
436. Erkoçoğlu M, Ozön ZA, Göçmen R, Alikışıfoğlu A, Gönç N, Kandemir N. Carotid intima media thickness in adolescents with increased risk for atherosclerosis. *Turk J Pediatr*. 2013;55(5):510–8.
437. Lopez LR, Salazar-Paramo M, Palafox-Sanchez C, Hurley BL, Matsuura E, Garcia-De La Torre I. Oxidized low-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I in patients with systemic lupus erythematosus and increased carotid intima-media thickness: implications in autoimmune-mediated atherosclerosis. *Lupus*. 2006;15(2):80–6.

438. Wu T-H, Kuo H-C, Tain Y-L, Lin K-M, Kuo H-C, Chien S-J. Common carotid artery intima-media thickness is useful for diagnosis of the acute stage of Kawasaki disease. *BMC Pediatr.* 2014;14:98.
439. Charakida M, Donald AE, Green H, Storry C, Clapson M, Caslake M, et al. Early structural and functional changes of the vasculature in HIV-infected children: impact of disease and antiretroviral therapy. *Circulation.* 2005;112(1):103–9.
440. Sass C, Herbeth B, Chapet O, Siest G, Visvikis S, Zannad F. Intima-media thickness and diameter of carotid and femoral arteries in children, adolescents and adults from the Stanislas cohort: effect of age, sex, anthropometry and blood pressure. *J Hypertens.* 1998;16(11):1593–602.
441. Ishizu T, Ishimitsu T, Yanagi H, Seo Y, Obara K, Moriyama N, et al. Effect of age on carotid arterial intima-media thickness in childhood. *Heart Vessels.* 2004;19(4):189-95.
442. Jourdan C, Wühl E, Litwin M, Fahr K, Trelewicz J, Jobs K, et al. Normative values for intima-media thickness and distensibility of large arteries in healthy adolescents. *J Hypertens.* 2005;23(9):1707–15.
443. Jastrzębski M, Czarnecka D, Rajzer M, Marcinkowski M, Kawecka-Jaszcz K. Infekcja *Chlamydia pneumoniae* oraz wirusem cytomegalii a przebudowa naczyń i serca w samoistnym nadciśnieniu tętniczym. *Nadciśnienie Tętnicze.* 2005;9(4):266–75.
444. Järvisalo MJ, Harmoinen A, Hakanen M, Paakkunainen U, Viikari J, Hartiala J, et al. Elevated serum C-reactive protein levels and early arterial changes in healthy children. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(8):1323–8.
445. Rumińska M., Czerwonogrodzka-Senczyzna A., Pyrżak B., Majcher A., Brzewski M. Ocena wybranych wskaźników aterogenności u dzieci i młodzieży z otyłością prostą. *Endokryn. Ped.* 2012;11(4 (41)):33–41.
446. Suh M, Lee JY, Ahn SV, Kim HC, Suh I. C-reactive protein and carotid intima-media thickness in a population of middle-aged Koreans. *J Prev Med Public Health Yebang Ŭihakhoe Chi.* 2009;42(1):29–34.
447. Kang Y, Park H-J, Kang M-I, Lee H-S, Lee S-W, Lee S-K, et al. Adipokines, inflammation, insulin resistance, and carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(6):R194.
448. Jastrzębski M., Czarnecka D., Rajzer M., Kawecka-Jaszcz K. Podwyższone stężenia markerów zapalenia u chorych na samoistne nadciśnienie tętnicze z powikłaniami narządowymi. *Kardiol Pol.* 2006;64(8):802–9
449. Głowińska-Olszewska B, Tołwińska J, Urban M. Dysfunkcja śródbłonna, grubość kompleksu IMT tętnic szyjnych wspólnych i cząsteczki adhezyjne u dzieci i młodzieży z otyłością i nadciśnieniem; analiza wzajemnych korelacji. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2007;13(1):7–14.

8. ZAŁĄCZNIKI

ZAŁĄCZNIK nr 1

ANKIETA KWALIFIKACYJNA

do badania klinicznego: Zakażenie wirusem cytomegalii u młodzieży jako czynnik ryzyka rozwoju przedklinicznej postaci miażdżycy

.....
imię i nazwisko PACJENTA (drukowanymi literami)

.....
pesel PACJENTA

Zgoda pacjenta i rodzica/opiekuna prawnego na uzupełnienie poniższej ankiety:

.....
Data i podpis pacjenta

.....
Data i podpis
rodzica/opiekuna prawnego

Uprzejmie proszę o wypełnienie poniższego kwestionariusza. Wszystkie uzyskane informacje będą objęte tajemnicą lekarską i nie będą wykorzystane do celów innych niż medyczne.

Prawidłową odpowiedź proszę zakreślić kółkiem

1. Czy u Państwa dziecka stwierdzono kiedykolwiek:

- | | | |
|-----------------------------------|-----|-----|
| • nadciśnienie tętnicze | TAK | NIE |
| • cukrzycę | TAK | NIE |
| • zespół metaboliczny | TAK | NIE |
| • zaburzenia gospodarki lipidowej | TAK | NIE |
| • otyłość | TAK | NIE |
| • wadę serca | TAK | NIE |
| • chorobę nowotworową | TAK | NIE |
| • zespół zaburzeń odporności | TAK | NIE |

2. Czy u Państwa dziecka stwierdzono inną, niewymienioną powyżej chorobę przewlekłą?

TAK (jaką?) NIE

3. Czy Państwa dziecko przyjmuje przewlekłe jakiegokolwiek leki?
TAK (jakie?).....NIE
4. Czy w Państwa najbliższej rodzinie (krewnych wstępnych I i II stopnia) stwierdzono przedwczesne (<55. r.ż. u mężczyzn, <65. r.ż. u kobiet) występowanie chorób sercowo-naczyniowych (dusznica bolesna, zawał serca, udar mózgu, zgon z przyczyn sercowo-naczyniowych)?
TAK (jakie, u kogo?).....NIE

Pytania poufne kierowane bezpośrednio do pacjenta, bez obecności rodzica/opiekuna prawnego (za zgodą zarówno pacjenta, jak i rodzica/opiekuna prawnego).

1. Czy palisz papierosy?
TAK (ile i jak często?).....NIE
2. Czy jesteś narażony/na na dym tytoniowy w najbliższym otoczeniu?
TAK (gdzie i jak często?).....NIE
3. Czy przyjmujesz hormonalne środki antykoncepcyjne?
TAK (jakie?).....NIE

ZAŁĄCZNIK nr 2

ZGODA RODZICÓW NA UDZIAŁ DZIECKA W BADANIU

Badanie kliniczne: **Zakażenie wirusem cytomegalii u młodzieży jako czynnik ryzyka rozwoju przedklinicznej postaci miażdżycy**

.....
imię i nazwisko rodzica lub prawnego opiekuna dziecka (drukowanymi literami)

Ja niżej podpisany oświadczam, że wyrażam zgodę na udział mojego dziecka:

.....
imię, nazwisko i pesel dziecka (drukowanymi literami)

w badaniu prowadzonym w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu przez lekarza Agnieszkę Modlińską-Cwalińską.

Zostałem/łam poinformowany/a o możliwości odmowy wzięcia udziału w badaniu oraz o możliwości wycofania w każdej chwili zgody na kontynuowanie badania bez podania przyczyny i poniesienia konsekwencji tej decyzji.

Przedstawiono mi w sposób jasny cel badania, warunki i czas trwania, jak również korzyści wynikające z jego przeprowadzenia.

.....
Data i podpis lekarza

.....
Data i podpis rodzica/opiekuna prawnego

.....
Data i podpis dziecka

ZAŁĄCZNIK nr 3

INFORMACJA DLA PACJENTÓW I ICH RODZICÓW dotycząca badania klinicznego:

**Zakażenie wirusem cytomegalii u młodzieży jako czynnik ryzyka rozwoju
przedklinicznej postaci miażdżycy**

Szanowni Państwo!

Miażdżyca jest przewlekłą chorobą tętnic, polegającą na powstaniu w ich błonie wewnętrznej i środkowej zmian prowadzących do zmniejszenia elastyczności ścian i zwężających światło (przekrój) tych naczyń. Zaawansowane zmiany miażdżycowe prowadzą do rozwinięcia u osób dorosłych choroby wieńcowej i zawału serca, zaburzeń przepływu krwi w tętnicach szyjnych i mózgowych z udarem mózgu oraz zaburzeń przepływu krwi w innych narządach. Procesy tworzenia się płytki miażdżycowej są skomplikowane. Rozpoczynają się już w wieku młodzieńczym, nie powodując jeszcze żadnych objawów klinicznych. Jedną z przyczyn zapoczątkowania zmian miażdżycowych w tak młodym wieku jest przewlekły stan zapalny powodowany przez czynniki wirusowe i bakteryjne. Do tych czynników należy między innymi wirus cytomegalii (HCMV). Wirus ten jest szeroko rozpowszechniony w populacji ludzkiej. Przebieg zakażenia może być bardzo różny, a zależy między innymi od wieku pacjenta oraz stanu jego układu immunologicznego. Zakażenie wirusem trwające przewlekłe nie daje widocznych objawów klinicznych, może natomiast powodować zmiany w komórkach naczyń tętnicznych. Wczesne wykrycie takiego zakażenia i jego odpowiednie leczenie może pomóc w zapobieżeniu zachorowania na miażdżycę tętnic u części pacjentów, lub opóźnić rozwinięcie objawów klinicznych tej choroby w wieku dorosłym.

Badania prowadzone przez nasz zespół polegają na analizie surowicy krwi w kierunku zakażenia wirusem cytomegalii oraz wczesnych czynników wykrywania miażdżycy. Próbkę krwi (w ilości ok.10ml) zostanie pobrana w trakcie wykonywania rutynowych badań diagnostycznych i poddana analizie w Pracowni Diagnostyki Chorób Wirusowych naszej Kliniki. Pobranie tej ilości krwi nie wpłynie znacząco na stan zdrowia pacjenta, nie wymaga dodatkowych procedur, ani nie przedłuży czasu hospitalizacji.

Ponadto w celu określenia stanu naczyń tętnicznych chcielibyśmy wykonać również badanie ultrasonograficzne (USG) tętnic szyjnych, oraz badanie USG jamy brzusznej. Badanie to odbędzie się w Pracowni Radiologii na terenie Szpitala.

Uprzejmie prosimy Państwa o wyrażenie zgody na wykonanie przedstawionych badań.

9. SPIS RYCIN

Rycina 1. Zaawansowanie zmian miażdżycowych w klasyfikacji AHA (rycina pochodzi ze strony www.cambridgemedicine.org w modyfikacji własnej).....	23
Rycina 2. Schemat podziału tętnicy szyjnej wspólnej (CCA)	54
Rycina 3. Obraz ultrasonograficzny miejsca pomiaru CCA IMT (materiał własny).....	55
Rycina 4. Podział grupy badanej na grupę 1, obejmującą pacjentów, u których wykazano obecność przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV oraz grupę 2 – pacjentów, u których na podstawie badań serologicznych wykluczono zakażenie HCMV	57
Rycina 5. Podział grupy badanej na grupę 1, obejmującą pacjentów, u których wykazano obecność przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV, grupę 2 – pacjentów, u których na podstawie badań serologicznych wykluczono zakażenie HCMV, oraz odpowiednie podgrupy z uwzględnieniem płci pacjentów: chłopcy (M), dziewczęta (K)	58
Rycina 7. Porównanie wyników rozmazów krwi obwodowej pacjentów z grupy 1 (zakażonych HCMV) i grupy 2 (kontrolnej)- wartości średnie składu odsetkowego wraz z SD.....	62
Rycina 8. Stężenie CRP (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)	62
Rycina 9. Stężenie CRP (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)	63
Rycina 10. Stężenie IL-1 β (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)	65
Rycina 11. Stężenie IL-1 β (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)	65
Rycina 12. Stężenie IL-4 (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)	66
Rycina 13. Stężenie IL-4 (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)	66

- Rycina 14. Stężenie IL-6 (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)67
- Rycina 15. Stężenie IL-6 (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)68
- Rycina 16. Stężenie IL-10 (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)68
- Rycina 17. Stężenie IL-10 (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)69
- Rycina 18. Stężenie IFN γ (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)70
- Rycina 19. Stężenie IFN γ (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)70
- Rycina 20. Stężenie TNF α (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)71
- Rycina 21. Stężenie TNF α (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)71
- Rycina 22. Stężenie GM-CSF (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)72
- Rycina 23. Stężenie GM-CSF (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)72
- Rycina 24. Stężenie GM-CSF (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)73
- Rycina 25. Stężenie M-CSF (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)73
- Rycina 26. Stężenie sICAM (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)74
- Rycina 27. Stężenie sICAM (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)75

Rycina 28. Wartość wskaźnika IMT CCA (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)	76
Rycina 29. Wartość wskaźnika IMT w zakresie opuszki CCA (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna).....	76
Rycina 30. Wartość wskaźnika IMT CCA (średnia±SD) w grupie 1 (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) i w grupie 2 (grupa kontrolna)	77
Rycina 31. Wartość wskaźnika IMT tętnicy szyjnej wspólnej (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna).....	77
Rycina 32. Wartość wskaźnika IMT opuszki tętnicy szyjnej wspólnej (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna)	78
Rycina 33. Wartość wskaźnika IMT tętnicy szyjnej wewnętrznej (średnia±SD) w podgrupach chłopców i dziewcząt grupy 1: odpowiednio M IgG, K IgG (grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV) oraz grupy 2: M, K (grupa kontrolna).....	78
Rycina 34. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a stężeniem CRP (mg/dl) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1).....	79
Rycina 35. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IL-1 β (pg/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1).....	80
Rycina 36. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IL-6 (pg/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1).....	80
Rycina 37. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem TNF α (pg/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1).....	81
Rycina 38. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem IFN γ (pg/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1).....	82

Rycina 39. Korelacja pomiędzy średnim wskaźnikiem IMT (IMT SR), a poziomem sICAM-1 (ng/ml) w grupie pacjentów z wykładnikami serologicznymi przebytego zakażenia HCMV (grupa 1).....82

10. SPIS TABEL

Tabela 1.	Cytokiny uczestniczące w patogenezie zmian miażdżycowych.....	36
Tabela 2.	Czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy	39
Tabela 3.	Podział grupy badanej. Grupa 1 (podgrupy M IgG i K IgG)- pacjenci, u których stwierdzono w surowicy krwi obecność przeciwciał w klasie IgG przeciwko HCMV. Grupa 2 (podgrupy M i K) - pacjenci, u których nie wykazano obecności ww. przeciwciał	47
Tabela 4.	Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego u dzieci po ukończeniu 1. roku życia [269]	49
Tabela 5.	Wartości referencyjne wykonanych badań laboratoryjnych z uwzględnieniem wieku i płci pacjentów grupy badanej.	51
Tabela 6.	Występowanie chorób przewlekłych u dzieci z badanych grup. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2-grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta)	58
Tabela 7.	Wartości ciśnienia tętniczego krwi (centyle) w grupach badanych. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2-grupa kontrolna	59
Rycina 6.	Rozkład wartości ciśnienia tętniczego krwi (centyle) w grupach badanych. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2-grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta).....	60
Tabela 8.	Rozkład wartości obwodów talii (centyle) w grupach badanych. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna	60
Tabela 9.	Rozkład wartości BMI (centyle) w grupach badanych. Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna...61	61
Tabela 10.	Porównanie poziomów leukocytów i płytek krwi w badanych grupach (przedstawiono średnie z pomiarów oraz SD). Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta)	61
Tabela 11.	Porównanie poziomów cholesterolu całkowitego, LDL, HDL oraz TAG w badanych grupach (przedstawiono średnie z pomiarów oraz SD). Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta).....	63

Tabela 12. Porównanie aktywności AST i ALT w badanych grupach 1 i 2 oraz podgrupach dziewcząt i chłopców (przedstawiono średnie z pomiarów, oraz SD). Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta).....64

Tabela 13. Wyniki pomiarów IMT w obrębie tętnic szyjnych wspólnych (CCA), opuszki CCA oraz tętnic szyjnych wewnętrznych (ICA) w badanych grupach 1 i 2 oraz podgrupach dziewcząt i chłopców (przedstawiono średnie z pomiarów obustronnych \pm SD). Grupa 1- grupa pacjentów z serologicznie potwierdzonym zakażeniem HCMV, grupa 2- grupa kontrolna (M-chłopcy; K-dziewczęta)75

11. STRESZCZENIE

Miażdżyca przez długi czas uważana była przez badaczy za zwyrodnieniową chorobę naczyń. Obecnie wiadomo jednak, że główną rolę w jej etiopatogenezie pełni przewlekła reakcja zapalna. Kluczowym etapem rozwoju płytki miażdżycowej jest prezentacja antygenów limfocytom T przez makrofagi. Antygenem tym może być zarówno fragment utlenionej lipoproteiny o małej gęstości (ang. oxidated low density lipoprotein - oxLDL), białka szoku cieplnego (np. β -glikoproteina) jak również fragmenty antygenów wirusowych lub bakteryjnych. Stwierdzono, iż za rozwój miażdżycy odpowiada typ komórkowy odpowiedzi immunologicznej- Th1 oraz jego mediatorzy: interleukiny(IL): 1,6,12,18; czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor - TNF- α), interferon gamma (IFN- γ). Zahamowanie procesu zapalnego następuje natomiast dzięki aktywowaniu drugiej drogi odpowiedzi immunologicznej Th2 i jej mediatorów: interleukin(IL): 4,5,10,13.

U osób dorosłych z reguły stwierdza się miażdżycę w stadium odkładania lipidów i komórek piankowatych w błonie wewnętrznej tętnic. Obecnie jako kluczowe w aterogenezie okazują się być znacznie subtelniejsze zmiany w obrębie ściany tętnicy tj. napływ komórek zapalnych oraz aktywacja szeregu cytokin. Postuluje się, że zmiany te mogą powstawać już w pierwszej dekadzie życia człowieka.

Nowym markerem procesu zapalnego i uszkodzenia śródbłonka jest ICAM-1-wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna należąca do rodziny immunoglobulin decydująca o adhezji i migracji komórek w procesie zapalenia. Stężenie jej rozpuszczalnej w surowicy formy wyraźnie koreluje z innymi parametrami stanu zapalenia takimi jak CRP, OB, poziomem homocysteiny oraz co ważne z powszechnie uznanym wczesnym markerem uszkodzenia naczyń - IMT.

Dotychczas nie udowodniono korelacji pomiędzy powyższymi parametrami, a poziomem przeciwciał przeciwko HCMV u dzieci. Powszechnie wiadomo, że podobnie do pozostałych wirusów z rodziny herpes, zakażenie HCMV wykazuje tendencję do przejścia w fazę latencji. Obniżenie odporności organizmu pacjenta może powodować reaktywację zakażenia. Zwykle dochodzi do reaktywacji miejscowej w obrębie ścian naczyń tętniczych. Dowodzą tego liczne badania biopsyjne narządów przeszczepionych u osób w trakcie leczenia immunosupresyjnego. Udowodniono, że wirus cytomegalii powoduje przewlekły stan zapalny

ściany wewnętrznej tętnic, przyczyniając się do zwiększenia wrażliwości naczynia na odkładanie komórek piankowatych, co w dłuższej perspektywie doprowadza do szybkiego powiększania się i niestabilności tworzącej się blaszki miażdżycowej. Prawdopodobnym mechanizmem indukcji aterogenezy wydaje się być modyfikacja odpowiedzi immunologicznej przez antygeny HCMV polegająca na zwiększeniu syntezy przez limfocyty Th1 i Th2 oraz makrofagi i komórki śródbłonka naczyń wymienionych powyżej cytokin prozapalnych

Celem prezentowanej pracy była ocena zależności między stężeniem wymienionych aterogennych cytokin we krwi pacjentów oraz wskaźnikiem IMT, a obecnością przeciwciał IgG (immunoglobulina G) przeciwko HCMV, co umożliwiło ocenę ryzyka rozwoju przedklinicznej formy miażdżycy u młodzieży.

Analizą objęto 80 pacjentów (n=80), w tym 40 dziewcząt (50%) oraz 40 chłopców (50%) zakwalifikowanych do diagnostyki neurologicznej w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2010-2012. Grupę badaną podzielono następnie na dwie grupy w zależności od stwierdzonej w dniu przyjęcia na podstawie badania ELISA, obecności w surowicy krwi swoistych przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG. Grupa 1 obejmowała 49 osób (61%), u których wykazano obecność przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG. Grupę 2 stanowiło 31 pacjentów (59%), u których na podstawie badań serologicznych wykluczono zakażenie HCMV. Analizę przeprowadzono na grupach całkowitych, a także na grupach podzielonych pod względem płci. Z badania wykluczono pacjentów z czynnikami ryzyka choroby niedokrwiennej serca.

Nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami pacjentów w badaniach laboratoryjnych poziomu leukocytów i płytek krwi krążącej, stężenia cholesterolu całkowitego oraz LDL, HDL, TAG, poziomu glukozy i fibrynogenu, jak również aktywności ALAT i ASPAT. W celu oceny nasilenia procesu zapalnego porównano stężenie CRP w badanych grupach. Średnie wartości CRP utrzymywały się w granicach normy, pomimo to stwierdzono istotnie statystyczną różnicę pomiędzy grupą z udowodnionym serologicznie zakażeniem HCMV w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,004$). W zakresie badanych cytokin stwierdzono wyższe stężenie IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ w grupie pacjentów, u których w surowicy krwi wykazano obecność przeciwciał przeciwko HCMV w klasie IgG w porównaniu z grupą kontrolną. Podobną zależność ustalono dla sICAM-1, nie stwierdzono jej natomiast w przypadku IL-4, GM-CSF oraz M-CSF. W grupie pacjentów z latentnym zakażeniem IgG HCMV obserwowano również niższy poziom IL-10 w porównaniu z grupą kontrolną. Z uwagi na

fakt, iż u żadnego z dzieci nie udowodniono obecności pozostałych czynników ryzyka miażdżycy, przewaga prozapalnego profilu cytokin w grupie dzieci z latentnym zakażeniem HCMV wynikała prawdopodobnie z permanentnej stymulacji antygenowej przez wirus.

W odniesieniu do stężeń IL-6, TNF α i IL-10 obserwowano statystycznie istotną różnicę w stosunku do grupy chłopców i dziewcząt z grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Istnieją co prawda doniesienia o wpływie przeciwzapalnym estrogenów na obniżenie poziomów CRP, IL-1 β , IL-6, TNF α , ale dotyczą one głównie badań przeprowadzanych w grupie kobiet w wieku okołomenopauzalnym, u których zastosowano hormonalną terapię zastępczą. Być może jednak w przypadku aktywacji procesów zapalnych przez HCMV, poziom niektórych cytokin prozapalnych u dziewcząt wzrasta w mniejszym stopniu niż u chłopców.

Ultrasonograficzny pomiar CCA IMT w grupie pacjentów pediatrycznych znalazł zastosowanie w ocenie subklinicznej postaci miażdżycy u dzieci i młodzieży. W badanym materiale wykazano wyższe średnie wartości IMT w grupie dzieci z latentnym zakażeniem HCMV w porównaniu z grupą kontrolną.

Z uwagi na stwierdzoną w grupie pacjentów z potwierdzonym serologicznie zakażeniem HCMV przewagę prozapalnego profilu cytokin, zbadano korelacje pomiędzy CRP, IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ , sICAM-1, a IMT. Najsilniejszą zależność uzyskano w odniesieniu do IL-6 i TNF α . Pacjenci, u których w surowicy krwi stwierdzano istotnie wyższe stężenie wspomnianych cytokin, charakteryzowali się najwyższym wskaźnikiem IMT. Podobną, choć nieco słabszą korelację wykazano w stosunku do IL-1 β oraz IFN γ . Ponadto wraz ze wzrostem sICAM-1, stwierdzano również wyższe wartości IMT. Równoległy wzrost wskaźnika IMT, stężeń powyższych cytokin prozapalnych oraz sICAM-1 w surowicy krwi u dzieci z latentnym zakażeniem HCMV może być przedklinicznym markerem rozwoju miażdżycy u tych pacjentów.

Wyniki powyższej pracy stanowią kolejny głos w dyskusji nad etiologią miażdżycy, jednocześnie uprawdopodobniając wpływ HCMV na rozwinięcie subklinicznej jej postaci. Wiemy już, że stopień rozwoju odpowiedzi immunologicznej przeciwko HCMV i zmiany w naczyniu zależą od stanu układu immunologicznego pacjenta i częstości okresowej reaktywacji HCMV. Rola HCMV w indukowaniu i podtrzymywaniu procesów miażdżycowych skłania do prowadzenia dalszych badań w celu zrozumienia mechanizmów immunologicznych wpływu HCMV na komórki ściany naczyniowej w organizmie człowieka i znalezieniu skutecznych metod przeciwdziałania reaktywacji wirusa.

12. SUMMARY:

For years, researchers have considered atherosclerosis a degenerative vascular disease. Now, however, it is known that a chronic inflammatory process is the main factor in atherosclerotic pathogenesis. The key stage of atherosclerotic plaque formation is antigen presentation by macrophages. The antigen may be a piece of an oxidized low density lipoprotein (oxLDL), of a heat shock protein (e.g. β -glycoprotein), or of a viral or bacterial antigen. It has been found that atherosclerosis develops due to Th1-type, cell-mediated immune response, and its mediators, including interleukins (IL) 1, 6, 12, and 18, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interferon gamma (IFN- γ). On the other hand, the inflammatory process is inhibited by the activation of another immune reaction type, Th2, and its mediators: IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13. In adults, atherosclerosis is typically diagnosed in the stage where lipid and foam cell deposits form in the arterial intima. Currently, much subtler changes in the arterial wall are considered key to atherogenesis, including the migration of inflammatory cells and the activation of a number of cytokines. It has been suggested that these changes may first occur as early as the first decade of a person's life.

A new marker of inflammation and endothelial damage is ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1), an immunoglobulin mediating cell adhesion and migration in an inflammatory process. The level of its plasma soluble form (sICAM-1) is distinctly correlated with other inflammation-related parameters, such as CRP, ESR, homocystein level, and, importantly, with a widely accepted early marker of vascular degeneration, IMT.

The correlation between these parameters and HCMV antibody levels in children has not yet been proven. It is a well-established fact that, like in the case of other herpes viruses, HCMV infections tend to become latent. The infection can reactivate when a patient's immune system is weakened. The reactivation is usually local and affects arterial walls, as shown by evidence from numerous biopsies from transplanted organs in patients undergoing immunosuppressive treatment. It has been proven that HCMV causes a chronic inflammation of the arterial intima, increasing the vessel's susceptibility to foam cell accumulation, which in the long term results in a quick enlargement and instability of the forming atherosclerotic plaque. The modification of the immune response by HCMV antigens, consisting in an increased synthesis of the above-mentioned proinflammatory cytokines in Th1 and Th2 cells, macrophages and vascular endothelial cells, seems to be a likely mechanism of atherogenesis induction.

The purpose of the present study was to assess the correlation between patients' blood levels of these atherogenic cytokines and IMT on the one hand, and the presence of IgG-type HCMV antibodies on the other. This allowed us to assess the risk of preclinical atherosclerosis development in adolescents.

The study included 80 patients (n=80), 40 female (50%) and 40 male (50%), referred to the Department of Infectious Diseases and Child Neurology of the University of Medical Science in Poznań for neurological assessment in the years 2010-2012. The patients were divided into two groups based on the occurrence of HCMV-specific IgG-class antibodies in blood plasma, in accordance with the results of an ELISA test performed on the day of admission. Group 1 included 49 patients (61%) in whom IgG-class HCMV antibodies were found. Group 2 included 31 patients (59%) in whom HCMV infection was ruled out via serological testing. The analysis was performed for each group as a whole, and then for each group broken down by patients' sex. Patients with risk factors for ischemic heart disease were excluded from the study.

No differences were found between the groups in laboratory tests for circulating blood platelet and leukocyte levels; total cholesterol, LDL, HDL, TAG, glucose and fibrinogen levels; as well as ALT and AST activity. To assess the intensity of inflammatory processes, CRP levels were compared between the groups. Mean CRP levels were within normal limits. However, a statistically significant difference was found between the group with serologically proven HCMV infection and the control group ($p=0.004$). With regard to the cytokines studied, higher levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ were found in patients having IgG-class HCMV antibodies in the blood serum, compared with controls. A similar correlation was established for sICAM-1, but not for IL-4, GM-CSF or M-CSF. Patients with latent HCMV infection (IgG antibodies) also had a lower level of IL-10, compared with controls. As none of the patients had any other proven risk factors for atherosclerosis, the dominance of the proinflammatory cytokine profile in patients with latent HCMV infection was likely due to the permanent antigen stimulation from the virus.

With regard to IL-6, TNF- α and IL-10 levels, a statistically significant difference was observed between male and female controls ($p<0.05$). Although there are reports of an anti-inflammatory effect of estrogens, lowering the levels of CRP, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , they mostly come from studies on post-menopausal women undergoing hormone replacement therapy. Perhaps, in the case of inflammatory processes activated by HCMV, the increase in the levels of some cytokines is less pronounced in girls than in boys.

An ultrasound measurement of CCA IMT in a group of pediatric patients was useful for the assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents. The studied data showed higher means of IMT in patients with latent HCMV infection, compared with controls.

Because patients with confirmed HCMV infections tended to have a proinflammatory cytokine profile, we also studied correlations between CRP, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , and sICAM-1 on the one hand, and IMT on the other. The strongest correlations were found with IL-6 and TNF- α . Patients with significantly higher levels of these cytokines also had the highest IMT values. A similar, albeit weaker, correlation was demonstrated with IL-1 β and IFN- γ . Increases in sICAM-1 levels were also correlated with higher IMT values. The simultaneous rise in IMT, the above-mentioned proinflammatory cytokines, and sICAM-1 in the blood serum of children or adolescents with latent HCMV infections may be a preclinical marker of atherosclerotic development.

The results of the present study contribute to the discussion on the etiology of atherosclerosis, and add to the body of evidence for the influence of HCMV on subclinical atherosclerosis development. We already know that the development of the immune response against HCMV and the vascular changes are dependent on the state of a patient's immune system, and on the frequency of HCMV reactivations. The role HCMV plays in inducing and maintaining atherogenesis warrants further investigation with the aim of understanding the immunological mechanisms of the virus's influence on human vascular wall cells, and finding effective methods of preventing viral reactivation.

13. Słowa kluczowe

Ludzki wirus cytomegalii, zakażenie latentne, reaktywacja zakażenia, miażdżycza tętnic, młodzież, kompleks intima-media (IMT), cytokiny, interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6), interleukina 10 (IL-10), rozpuszczalna międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (sICAM-1), czynnik martwicy guza α (TNF α), interferon γ (IFN γ)

14. Key words

Human cytomegalovirus, latent infection, viral reactivation, atherosclerosis, adolescent, intima-media thickness (IMT), cytokines, interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), soluble intracellular adhesion molecule 1 (sICAM-1), tumor necrosis factor α (TNF α), interferon γ (IFN γ)