

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie (navazující magisterské studium)

Studijní obor: Imunologie



**Bc. Monika Křivonosková**

Úloha metabolismu fibroblastů plicní adventicie v aktivaci imunitního systému během vývoje  
plicní arteriální hypertenze

The metabolic role of pulmonary arterial fibroblasts in the activation of immune system  
during development of pulmonary arterial hypertension

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lydie Plecítá, PhD.

Praha, 2022

**Poděkování:**

Touto formou bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lydii Plecité, PhD. za vedení této práce, uvedení do vědecké problematiky, trpělivost při sepisování této práce a cenné rady. Další, komu bych ráda poděkovala je Ing. Jan Tauber, PhD., který mi velmi pomáhal nejen při začátcích v laboratoři. Samozřejmě velké díky patří i ostatním členům laboratoře Mitochondriální fyziologie, kteří mi nikdy neváhali pomoci.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 04. 2022

Podpis:

## Abstrakt:

Vznik zánětu v malých distálních plicních cévách je důležitý pro rozvoj plicní arteriální hypertenze (PAH). Jedním z buněčných typů, které se vyskytují v plicní cévě, jsou fibroblasty, jež podle teorie „outside-in“ mohou jako první reagovat na podněty v cévě, modulovat přestavbu v plicní cévě směrem k vnitřním vrstvám cévy a lákat do místa další imunitní buňky. Kromě zánětu se v buňkách cév postižených PAH uplatňuje tzv. Warburgův efekt, během kterého dochází ke změnám metabolismu směrem ke glykolýze a laktátové produkci. Mimo jiné dochází k navození prooxidačního stavu uvnitř buňky díky mitochondriálnímu metabolismu a NADPH oxidáze zahrnující nerovnováhu v produkci reaktivních kyslíkových forem. Proto jsme se rozhodli ověřit, zda plicní fibroblasty z telat nemocných hypoxií navozenou PAH mají aktivní inflamazóm, pomocí kterého by produkovaly zralý interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) a jaký vliv na tuto expresi má prooxidační prostředí. V našem in vitro modelu jsme potvrdili expresi mRNA IL-1 $\beta$ , ale nebyli jsme schopni detekovat jeho expresi na úrovni proteinu. To odpovídalo i nemožnosti detekce aktivity inflamazómu. Myslíme si, že neschopnost detekce IL-1 $\beta$  proteinu a aktivity inflamazómu je dána citlivostí detekčních metod nebo neschopností plicních fibroblastů z PAH telat aktivovat inflamazóm v in vitro kultivačních podmínkách.

## **Klíčová slova:**

Plicní hypertenze, zánět, interleukin 6, interleukin 1 $\beta$ , reaktivní kyslíkové formy, inflamazóm

Abstract:

The development of inflammation in the small distal pulmonary vessels plays an important role in the development of pulmonary arterial hypertension (PAH). One of the cell types found in the pulmonary vessels are fibroblasts, which, according to the "outside-in" theory, may be the first to respond to stimuli in the vessel, modulating remodeling of the pulmonary vessels toward the inner layers of the vessel and attracting other immune cells to the site. In addition to inflammation, the so-called Warburg effect also occurs in vessels affected by PAH, in which metabolism shifts toward glycolysis and lactate production. Among other changes, a pro-oxidative state is induced within the cell by mitochondrial metabolism and NADPH oxidase, leading to an imbalance in reactive oxygen species production. We therefore wanted to test whether calf lung fibroblasts with hypoxia-induced PAH have an active inflammasome, with which they would produce mature interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and to clarify the effect of a pro-oxidant environment on this expression. In our in vitro model we have confirmed IL-1 $\beta$  mRNA expression, but we were unable to detect its expression at the protein level. This was consistent with the inability to detect inflammasome activity. We believe that the inability to detect the protein form of IL-1 $\beta$  and inflammasome activity is due to the sensitivity of detection methods or to the inability of lung fibroblasts to activate their inflammasomes under in vitro cultivation conditions.

**Key words:**

Pulmonary hypertension, inflammation, interleukin 6, interleukin 1 $\beta$ , reactive oxygen species, inflammasome

### Seznam užitečných zkratk:

|                |   |
|----------------|---|
| AIM2           | Chybí u melanomu 2 (Absent in melanoma 2)   |
| ASC            | Protein podobný skvrnám spojený s apoptózou obsahující CARD (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) |
| BMP            | Kostní morfogenetický protein (Bone morphogenetic protein)  |
| BMPR2          | Kostní morfogenetický proteinový receptor typu 2 (Bone morphogenetic protein receptor type II)                          |
| BSA            | Hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin)  |
| CO Fibs        | Kontrolní fibroblasty z plicní cévy zdravých telat (Control fibroblasts from pulmonary vessels of healthy calves)       |
| EndoMT         | Přechod endotelu do mezenchymu (Endothelial to mesenchymal transition)  |
| eNOS           | Endoteliální syntáza oxidu dusnatého (Endothelial nitric oxide synthase)  |
| ET-1           | Endotelin 1 (Endothelin 1)  |
| EV             | Extracelulární váčky (Extracellular vesicles)   |
| FGF-2          | Fibroblastový růstový faktor 2 (Fibroblast growth factor 2)   |
| FOXM1          | Forkhead box protein M1 (Forkhead box protein M1)   |
| HIF-1 $\alpha$ | Hypoxií indukovaný faktor 1 $\alpha$ (Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ )   |
| HIF-2 $\alpha$ | Hypoxií indukovaný faktor 2 $\alpha$ (Hypoxia-inducible factor 2 $\beta$ )  |
| IFI16          | Protein indukovatelný interferonem gama 16 (Gamma-interferon-inducible protein 16)                                      |
| IL             | Interleukin (Interleukin)   |
| IL-1 $\beta$   | Interleukin 1 $\beta$ (Interleukin 1 $\beta$ )  |
| IL-6           | Interleukin 6 (Interleukin 6)   |
| LB4            | Leukotrien B4 (Leukotriene B4)  |
| MyD88          | Primární odpověď myeloidní diferenciace 88 (Myeloid differentiation primary response 88)                                |
| NE             | Neutrofilní elastáza (Neutrophil elastase)  |
| NLR            | Receptory podobné oligomerizační doméně vázající nukleotidy (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors)  |
| NOX            | NADPH oxidáza (NADPH oxidase)   |
| PAEC           | Plicní arteriální endoteliální buňky (Pulmonary arterial endothelial cells)   |
| PAH            | Plicní arteriální hypertenze (Pulmonary arterial hypertension)  |
| PASMC          | Plicní arteriální hladko-svalová buňka (Pulmonary arterial smooth muscle cell)  |
| PCSK9          | Proprotein konvertáza subtilisin/kexin typu 9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)                           |

|              |   |
|--------------|---|
| PDH          | Pyruvátdehydrogenáza (Pyruvate dehydrogenase)   |
| PDK          | Pyruvátdehydrogenáza kináza (Pyruvate dehydrogenase kinase)   |
| PH           | Plicní hypertenze (Pulmonary hypertension)  |
| PH Fibs      | Plicní fibroblasty z telat nemocných hypoxií navozenou plicní hypertenzí<br>(Pulmonary fibroblasts from calves with hypoxia-induced pulmonary hypertension) |
| PPP          | Pentózofosfátová dráha (Pentose phosphate pathway)  |
| ROS          | Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species)   |
| RT-PCR       | Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-time polymerase chain reaction)   |
| SOD2         | Superoxiddismutáza 2 (Superoxide dismutase 2)   |
| TGF- $\beta$ | Transformující růstový faktor $\beta$ (Transforming growth factor $\beta$ )   |
| Th buňky     | T pomocné buňky (T helper cells)  |
| TNF $\alpha$ | Faktor nekrózy nádorů $\alpha$ (Tumor necrosis factor $\alpha$ )  |
| VEGF         | Cévní endoteliální růstový faktor (Vascular endothelial growth factor)  |
| VEGF-R       | Receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (Vascular endothelial growth factor receptor)  |
| $\alpha$ SMA | $\alpha$ -Aktin hladkého svalstva ( $\alpha$ -Smooth muscle actin)  |

## Obsah

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 1.       | Úvod .....  | 1  |
| 2.       | Literární přehled.....                            | 2  |
| 2.1.     | Struktura plicní cévy .....                       | 2  |
| 2.1.1.   | Endoteliální buňky plicní cévy (PAEC) .....       | 3  |
| 2.1.2.   | Pericyty.....                                     | 4  |
| 2.1.3.   | Hladko-svalové buňky plicních cév.....            | 5  |
| 2.1.4.   | R buňky .....                                     | 6  |
| 2.1.5.   | Fibroblasty.....                                  | 6  |
| 2.2.     | Zapojení imunitního systému do patologie PAH..... | 9  |
| 2.2.1.   | Cytokiny podílející se patologii PAH.....         | 9  |
| 2.2.1.1. | Interleukin 6 .....                               | 9  |
| 2.2.1.2. | Interleukin IL-1 $\beta$ .....                    | 11 |
| 2.2.1.3. | Transformující růstový faktor beta.....           | 12 |
| 2.2.1.4. | Další cytokiny zapojené do patologie PAH .....    | 13 |
| 2.2.2.   | Imunitní buňky zapojené do patogeneze PAH .....   | 13 |
| 2.2.2.1. | Makrofágy .....                                   | 13 |
| 2.2.2.2. | Neutrofilní granulocyty .....                     | 14 |
| 2.2.2.3. | Žírné buňky.....                                  | 15 |
| 2.2.2.4. | Dendritické buňky (DC) .....                      | 15 |
| 2.2.2.5. | T buňky .....                                     | 16 |
| 2.2.2.6. | B buňky.....                                      | 16 |
| 2.2.2.7. | Komplement.....                                   | 17 |
| 2.2.3.   | Imunitní systém tura domácího .....               | 17 |
| 2.3.     | Metabolické změny během PAH .....                 | 18 |
| 2.3.1.   | Mitochondriální změny při PAH .....               | 20 |
| 2.3.2.   | Produkce ROS v buňkách postižených PAH.....       | 21 |
| 3.       | Cíl práce.....                                    | 22 |
| 4.       | Materiály a metody .....                          | 23 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.1.   | Použité chemikálie a roztoky.....   | 23 |
| 4.2.   | Použité přístroje a technické vybavení.....   | 26 |
| 4.3.   | Experimentální buňky.....   | 26 |
| 4.4.   | Metody .....  | 28 |
| 4.4.1. | Izolace RNA.....  | 28 |
| 4.4.2. | Přepis RNA do cDNA.....   | 28 |
| 4.4.3. | Real-time PCR .....   | 28 |
| 4.4.4. | Izolace proteinů a měření jeho koncentrace.....   | 29 |
| 4.4.5. | Precipitace proteinů pomocí síranu amonného.....  | 29 |
| 4.4.6. | ELISA IL-1 $\beta$ /IL-6.....   | 29 |
| 4.4.7. | Stanovení aktivity kaspázy.....   | 30 |
| 4.4.8. | Detekce ROS .....   | 30 |
| 4.4.9. | Respirometrie .....   | 30 |
| 4.5.   | Použitý software a statistická analýza .....  | 31 |
| 5.     | Výsledky.....   | 32 |
| 5.1.   | Analýza energetického metabolismu u kontrolních a PAH telecích plicních fibroblastů .....                     | 32 |
| 5.2.   | Produkce reaktivních kyslíkových forem (ROS) v telecích plicních fibroblastech kontrolních a PAH zvířat ..... | 33 |
| 5.3.   | Porovnání exprese mRNA interleukinu 1 $\beta$ a interleukinu 6 v plicních fibroblastech<br>34                 |    |
| 5.4.   | Ověření prozánětlivého fenotypu PH a CO fibroblastů .....   | 35 |
| 5.5.   | Vliv oxidačních činidel na expresi mRNA IL-1 $\beta$ a IL-6 .....   | 36 |
| 5.6.   | Kvantifikace exprese proteinu IL-1 $\beta$ a IL-6 u plicních fibroblastů .....                                | 38 |
| 5.7.   | Měření aktivity inflamazómu u plicních fibroblastů.....   | 40 |
| 5.8.   | Porovnání exprese mRNA komponent inflamazómu v plicních fibroblastech.....                                    | 41 |
| 6.     | Diskuse .....   | 42 |
| 7.     | Závěr .....   | 47 |
| 8.     | Seznam použité literatury .....   | 48 |

## 1. Úvod

Plicní hypertenze (PH) je závažný stav, který je definovaný jako zvýšení plicního tepenného tlaku nad 25 mmHg. Podle Světové zdravotnické organizace se rozlišuje pět kategorií PH, které odrážejí mechanismus vzniku:

1. Plicní arteriální hypertenze
2. Plicní hypertenze při onemocnění levé části srdce
3. Plicní hypertenze při onemocnění plic nebo hypoxii
4. Chronická tromboembolická plicní hypertenze
5. Plicní hypertenze spojená s jinými nemocemi

Tyto kategorie se dále ještě dělí do dalších podtypů, jež jsou k nahlédnutí zde (Simonneau et al., 2013). Tato práce se bude zaměřovat zejména na typ plicní arteriální hypertenze (PAH).

PAH je charakterizována přeměnou malých distálních plicních cév. Tyto změny postihují cévu skrze celou její šířku a vedou ke zbytnění cévy, které může vyústit v její úplné uzavření. Přeměna cévy zahrnuje dysfunkci endoteliálních buněk, antiapoptotický stav buněk plicní cévy, hypertrofii hladko-svalových buněk a proliferaci a dediferenciaci fibroblastů. Postupně tyto změny v cévách zvyšují nápor na srdce, ve kterém dochází ke zbytnění pravé srdeční komory, což po čase vyústí v selhání srdce a ke smrti. Udává se, že na milion jedinců připadá 15 případů PAH (Peacock et al., 2007). Jiné zdroje uvádí prevalenci 6,6 případů na milion jedinců (Ling et al., 2012). Rozdílné údaje jsou dány rokem publikace práce a geografickými rozdíly. Průměrné dožití je nízké, medián dožití od diagnostikování PAH je 2,8 let (Humbert et al., 2010).

Je známo, že chronický perivaskulární zánět se uplatňuje v PAH a podílí se na přestavbě plicních cév. V cévě i v krvi jedince se nachází velké množství cytokinů, chemokinů a zánětlivých mediátorů. Pravděpodobně jedním z nejdůležitějších zánětlivých cytokinů je interleukin (IL) 6 (IL-6) (Maston et al., 2018). Typicky dochází k akumulaci imunitních buněk v plicní cévě, jako jsou neutrofilů, makrofágů, dendritické buňky, žírné buňky, T lymfocyty a B lymfocyty. Bylo dokázáno, že zánět koreluje s přestavbou tunica intima (vnitřní vrstva cévy), tunica media (střední vrstva cévy) a tunica externa (vnější vrstva cévy), což dokazuje jeho přímou roli ve vzniku a vývoji PAH (Stacher et al., 2012).

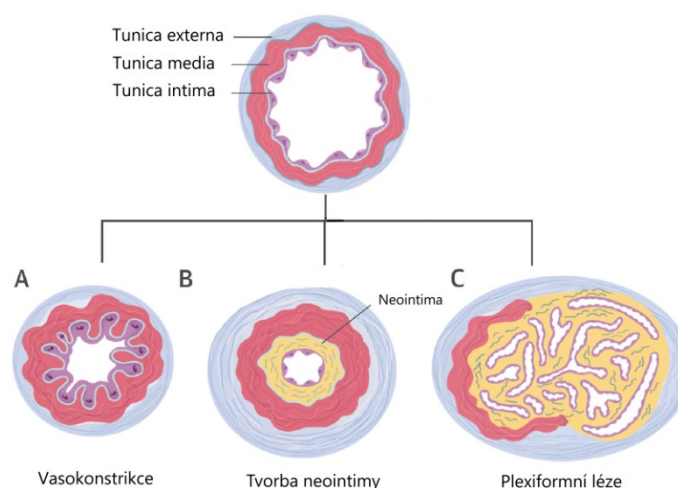
V buňkách postižených PAH dochází kromě zvýšení glykolýzy a laktátové produkce, také ke zvýšení exprese hypoxií indukovaného faktoru (HIF-1 $\alpha$ ) a ke snížení mitochondriální oxidativní fosforylace. Tyto metabolické změny umožní buňkám produkovat dostatek stavebního materiálu pro rychlé dělení. Pseudohypoxický stav vyvolaný HIF-1 je doprovázen změnami v redoxním prostředí buňky, na kterém se podílejí i mitochondrie. Charakteristickým rysem postižených buněk v cévě je hyperpolarizace membrány mitochondrie, což vede k již zmíněné resistenci buněk na

apoptózu. Tyto změny v energetickém metabolismu buněk lze nazvat Warburgův efekt, který je přítomný též například u rakovinných buněk, se kterými mají buňky postižené PAH některé společné rysy.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Struktura plicní cévy

Pro PAH je typická změna malých distálních plicních cév, jež zahrnuje změny ve všech vrstvách (tunica intima, tunica media a tunica externa) cévy. Obecně se tyto změny projevují jak morfologicky, tak na molekulární úrovni všech typů buněk vyskytujících se ve vrstvách cévy, jak je ukázáno na obrázku 1. Pozměněné buňky plicní cévy během PAH zahrnují endoteliální buňky (PAEC – z anglického pulmonary arterial endothelial cells), pericyty, hladko-svalové buňky (PASMC – z anglického pulmonary arterial smooth muscle cells), fibroblasty a buňky imunitního systému s převahou makrofágů. Kromě typických vrstev můžeme v cévách postižených PAH najít i další vrstvy jako je neointima (jinak nazývaná neoitimální léze), která se nachází v nejdál položené vrstvě vnitřní elastické laminy tunica intima. Pro tvorbu neointimy je zapotřebí vysoký průtok krve cévou (Okada et al., 1997). V této vrstvě se nacházejí buňky, jež exprimují  $\alpha$ -hladko-svalový aktin ( $\alpha$ SMA), vimentin ale už neexprimují CD34 a CD31. Jedná se o buňky podobné myofibroblastům, které mají znaky mezenchymálních buněk (Yi et al., 2000). Kromě neointimy se v nemocné cévě tvoří i plexiformní léze, které se podílejí na jejím zbytnění a uzavírání průsvitu cévy. Na tvorbě těchto lézí se podílí také takzvaná endoteliální-mezenchymální tranzice (EndoMT) PAEC.



**Obrázek 1 – Schéma přestavby cévy.** Nahoře je vyobrazena zdravá céva se všemi třemi vrstvami, ze kterých se skládá. A. Představuje cévu postiženou PAH, kde je vidět značná vasokonstrikce. B. V této cévě už dochází k tvorbě nové vrstvy, neointimy. C. Značně uzavřená céva, ve které došlo ke vzniku plexiformních lézí. Převzato a upraveno: (McLaughlin et al., 2015)

### 2.1.1. Endoteliální buňky plicní cévy (PAEC)

PAEC vytváří za normálních podmínek jednovrstvý epitel, který je styčnou plochou cévy s krví. Tento epitel tvoří základ tunica intima a je pevně spojen k sobě pomocí buněčných spojů. Funkcí PAEC je udržování homeostáze, přenos leukocytů, přenos signálů do hlubších vrstev cévy či prostá bariérová funkce. Pokud u PAEC dojde při patologickém stavu k jejich aktivaci, začnou exprimovat specifické signální molekuly jako jsou ICAM-1 (Malik et al., 1999), E-selektin či vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a jeho receptor (VEGF-R). Kromě toho produkují různé růstové faktory a cytokiny, které se podílejí na přilákávání imunitních buněk a na proliferaci a apoptóze PAEC a PSMC. Dlouhodobý aktivovaný stav PAEC vede k dalším patologickým změnám a rozvoji onemocnění (Halcox et al., 2002). K podobným změnám, které budou popsány dále dochází i v případě PAH. Důležitost PAEC při vývoji PAH plyne i z tzv. teorie „inside-out“, která tvrdí, že poškození PAEC iniciuje další patologické změny v cévě ve směru k tunica intima, media a externa, jež zahrnují proliferaci a antiapoptotický stav buněk a navození lokálního zánětu (Spiekerkoetter et al., 2019).

Během PAH dochází k narušení a ztrátě soudržnosti PAEC, kvůli ztrátě povrchových proteinů jako je cévní endoteliální kadherin, CD31 a cytoplazmatického proteinu p-120 kateninu (Frid et al., 2002). Toto rozrušení bariérové funkce má za následek migraci imunitních buněk do cévy a dává možnost buňkám PAEC migrovat v cévě a zakládat plexiformní léze, které jsou charakterizovány proliferací PAEC a změnou fenotypu do myofibroblastů/mezenchymálního typu buněk.

Výše zmíněný EndoMT je název pro mechanismus, při kterém se mění PAEC v buňky s mezenchymálním fenotypem. Při tomto procesu dochází ke ztrátě endoteliálních znaků a objevují se znaky mezenchymálních buněk. Jako klíčový rys pro zjištění, že daná buňka prošla EndoMT se používá transkripční faktor Twist-1, jež je hojně exprimován v plicích postižených PAH (Ranchoux et al., 2015). Kromě Twist-1, se též aktivují další transkripční faktory jako Zeb1 (Chakraborty et al., 2015), Snail (Medici et al., 2011) či Slug (Cooley et al., 2014), které se pak dále podílejí na přeměně do mezenchymálního fenotypu. Ztrácejí se endoteliální znaky a přibývají znaky mezenchymálních buněk jako je  $\alpha$ SMA, kalponin, N-kadherin, vimentin, fibronektin, protein specifický pro fibroblasty či hladko-svalový protein 22 alfa (Cooley et al., 2014). Buňky během EndoMT získávají tvar podobný fibroblastům – jsou podlouhlé s vícero výběžky (Arciniegas E. et al., 1992). Na této přeměně se podílejí molekuly, které buď přímo anebo nepřímo ovlivňují PAEC. Jako první by bylo vhodné zmínit kombinaci cytokinů interleukinu 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), jejichž kombinace u lidských PAEC vyvolala in vitro EndoMT zahrnující morfologickou změnu a změnu povrchových znaků přibližující buňky k mezenchymálnímu fenotypu (Good et al., 2015). Během PAH je zvýšená exprese endothelinu-1 (ET-1), který mimo jiné

působí jako vazokonstriktor a podílí se na regulaci produkce NO (oxid dusnatý) přes endoteliální NO syntázu (eNOS) v PAEC. Právě tato zvýšená aktivita eNOS, vede ke zvýšení výše uvedených transkripčních faktorů a EndoMT (Nikitopoulou et al., 2016). Jako poslední faktor přispívající k EndoMT lze zmínit hypoxii, u které je známo, že dokáže vyvolat PAH (Stenmark et al., 1987). Hypoxie typicky působí indukci exprese faktorů indukovaných hypoxií alfa 1/2 (HIF-1 $\alpha$ /HIF-2 $\alpha$ ). Oba tyto faktory jsou zvýšené při PAH, ale v PAEC je především zvýšená exprese HIF-2 $\alpha$  (Lei et al., 2016) (Dai et al., 2018). HIF-1 $\alpha$  se může vázat na promotor transkripčního faktoru Twist1 a tím pomáhá jeho zvýšené expresi (B. Zhang et al., 2018).

Nerovnováha mezi vasokonstriktčními a vasodilatačními molekulami v PAEC přispívá k rozvoji PAH. Mezi tyto molekuly patří NO, prostacyklin a výše zmíněný ET-1. Kromě účinku ET-1 na eNOS, jeho zvýšená exprese koreluje se zvýšením plicní vaskulární resistance (Giaid et al., 1993). Antagonisté receptorů pro ET-1, ETA/ETB, jsou využíváni v léčbě pacientů s PAH. Bosentan je léčivý přípravek, který je smíšeným antagonistou ETA/ETB, jež se silněji váže na ETA, než na ETB (Gardiner et al., 1994). Prostacyklin slouží jako vasodilatátor cév, který dále slouží jako inhibitor agregace krevních destiček a buněčného růstu. Je produkován pomocí prostacyklinové syntázy, která se majoritně vyskytuje v tunica intima, konkrétně v PAEC. U pacientů s PAH je pozorováno snížení produkce prostacyklinu, protože dochází ke snížení exprese jeho syntázy (Tuder et al., 1999). Za výrazným snížením produkce prostacyklinu může zastavení dráhy výroby druhého posla – cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v PASMC, který za běžných podmínek spouští kaskádu, jejíž efektem je regulace proliferace a relaxace. Syntetická náhrada prostacyklinu je využívána jako léčivo pro pacienty s PAH. NO je další molekula ze skupiny vasodilatátorů, jehož dostupnost je během PAH snížena. Za běžných okolností se produkuje v PAEC a skrz membránu difunduje k PASMC, kde působí přes sekundárního posla, cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), inhibičně na proliferaci a relaxaci. Ovšem není snížena aktivita eNOS, právě naopak, dochází k její konstantní aktivitě. Tento paradox by se dal vysvětlit tím, že funkce eNOS je poškozena reaktivními kyslíkovými formami (ROS) (Alp & Channon, 2004).

### 2.1.2. Pericyty

Pericyty jsou buňky mezenchymálního původu nacházející se mimo jiné v cévách, kde leží v blízkosti PAEC. Jejich funkcí je kontrola cévního napětí, produkování složek extracelulární matrice a produkce cytokinů k udržení cévní homeostázy (Kapanci et al., 1992). Obecně pokud dojde k patologickému stavu jsou schopné se přeměnit do buněk podobných myofibroblastům, produkovat prozánětlivé cytokiny a přispívat k fibróze.

Ukazuje se, že pericyty se během PAH mění. Dochází k jejich disociaci od PAEC a jsou schopny migrovat do tunica media a tunica externa (Ricard et al., 2014). Též se vyskytují ve větší hustotě v distálních cévách plic oproti zdravé kontrole. In vitro výzkumy ukázaly, že IL-6 (jeho exprese je vysoce zvýšená u pacientů s PAH; v dalších částech práce bude podrobněji popsán) a fibroblastový růstový faktor 2 (FGF-2) přispívají k migraci pericytů a FGF-2 působí na pericyty jako mitogen (Ricard et al., 2014). Zdá se, že za zvýšenou proliferací pericytů, jejich migrací a sníženou interakcí mezi pericyty a PAEC může být zvýšená exprese enzymu pyruvát dehydrogenázy kinázy 4 (PDK4) v pericytech, která má za následek přechod metabolismu směrem k vyššímu využití glykolýzy a produkci laktátu na úkor oxidační fosforylace v mitochondriích (Yuan et al., 2016).

### 2.1.3. Hladko-svalové buňky plicních cév

PASMC tvoří spolu s elastinem a kolagenem tunica media a jsou obklopeny bazální laminou. Vrstvy PASMC se skládají ze skupin, které jsou stejně orientované.

Jak už bylo výše řečeno, tak tunica media při PAH hypertrofuje a PASMC proliferují a získávají antiapoptotický charakter. Díky PASMC se stává z tunica media největší vrstva, která se velmi podílí na uzávěru průsvitu cévy. U kravského modelu byly popsány čtyři morfologicky odlišné subpopulace PASMC v rámci celé tunica media (Frid et al., 1994). Odlišit PASMC od ostatních typů buněk v cévě je trochu obtížné, protože použití typického znaku  $\alpha$ -SMC je ošemetné, kvůli různým dediferenciacím buněk, které jsou a budou zde popsány. Jako vhodný znak PASMC by mohl být těžký řetězec hladko-svalového myosinu, vysokomolekulární kaldesmon či metavinculin (Stevens et al., 2008).

Kromě látek produkovaných PAEC má vliv na proliferaci PASMC transkripční faktor forkhead box M1 (FOXM1), který se za normálních okolností podílí na pozitivní regulaci genů, jež jsou nezbytné pro opravu DNA a buněčné přežití. Ukázalo se, že jeho exprese je u lidí i potkanů zvýšená v distálních cévách postižených PAH (Bourgeois et al., 2018). Jeho zvýšená exprese tedy vedla k proliferaci a antiapoptotickému stavu PASMC. miRNA-204, jejíž exprese je snížena během PAH reguluje expresi FOXM1. Kvůli jejímu snížení v PASMC se může více exprimovat FOXM1 a podílet se na proliferaci PASMC. Pokusy s in vitro transfekcí miRNA-204 do PASMC postižených PAH ukázaly, že přidání této miRNA způsobí snížení exprese FOXM1, a to vede i ke snížení proliferace (Bourgeois et al., 2018). Další důležitou složkou potřebnou pro proliferaci je transkripční faktor p53, jež je opět zapojený do regulace buněčného cyklu. V plicích postižených PAH je jeho exprese snížena (Wakasugi et al., 2019). V PASMC jeho omezená aktivita vede ke změnám metabolismu, který zahrnuje snížení oxidativní fosforylace. Tato změna v metabolismu je obecně důležitá pro rychle proliferující buňky. I přes význam p53 pro proliferaci PASMC není p53 hlavním faktorem pro vývoj

a udržení PAH, neboť genetické potlačení p53 nemělo vliv na vývoj hypoxií vyvolané PAH u myši (Wakasugi et al., 2019). Oba výše popsané faktory jsou důležité i v rakovinných buňkách, s nimiž obecně buňky distálních cév postižené PAH mají společné znaky.

#### 2.1.4. R buňky

R buňky pojmenovali jejich objevitelé podle jejich kosodélníkového (z anglického rhomboidal) tvaru (Frid et al., 2009). Tento typ buněk byl objeven v tunica media telat, kde se vyskytoval spolu s PSMC. Od PSMC se liší morfologicky – mají kosodélníkový tvar a oproti PSMC jsou menší. V kontrolních zdravých telatech se tyto buňky nenacházely. Byť se tyto buňky nacházely v tunica media, tak neexprimovaly těsně po izolaci  $\alpha$ -SMA, ale po pasáži na kultivační lánvi už ztrácely původní fenotyp a začal se objevovat  $\alpha$ -SMA. Kromě deficitu  $\alpha$ -SMA se od PSMC lišily expresí CD34, CD73, CD11b a CD45. Mimo jiné na úrovni mRNA produkovaly prozánětlivé mediátory IL-6 a MCP-1 (CCL-2) (Frid et al., 2009).

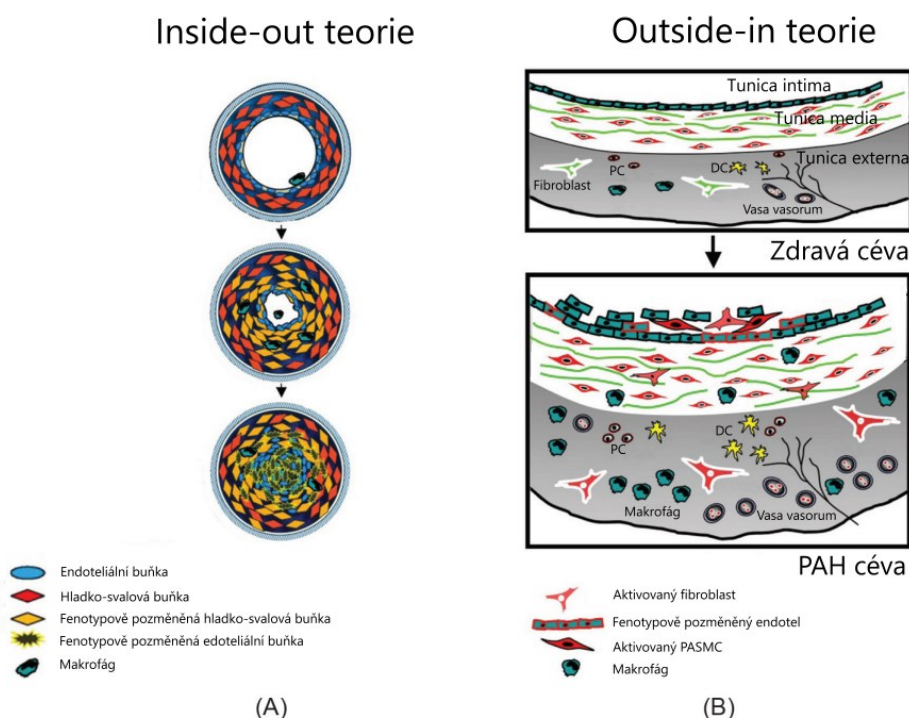
#### 2.1.5. Fibroblasty

Fibroblasty jsou hlavní buněčný typ vyskytující se v tunica externa (adventicie). Kromě fibroblastů se zde vyskytují buňky imunitního systému (převážně dendritické buňky a makrofágy), progenitorové buňky, buňky tvořící vasa vasorum – endoteliální buňky a jako poslední se zde vyskytují buňky adrenergních nervových vláken. Tunica externa je tedy nejkomplexnější vrstva cévy. Mimo jiné jako první reaguje na vnější podněty jako stres, zranění, hypoxie či ischemie. Proto byla i navržena opačná teorie k „inside-out“, „outside-in“ teorie, která říká že jako první na podněty reaguje tunica externa a přenáší je směrem dále do vnitřku cévy (Spiekerkoetter et al., 2019), což je schematicky znázorněno na obrázku 2.

Vasa vasorum je soustava malých cév (menších než 0,5 mm), které vyživují tunica media a externa. Jejich úloha je výživa, okysličování a odvod odpadních látek. Během PAH dochází k jejich značnému nárůstu a výskytu v tunica media (Montani et al., 2011), (Davie et al., 2004). To podporuje teorii „outside-in“, protože přísun a aktivace imunitních buněk do cévy podporuje patogenezi PAH.

Fibroblasty, nejen v cévách, vykazují značnou heterogenitu, což je znázorněno na obrázku 3. Odlišují se například expresí povrchových znaků, svou velikostí a profilem sekretovaných molekul. Příkladem může být heterogenita mezi plicními fibroblasty, u kterých se vyskytuje/nevyskytuje povrchový znak Thy-1. Pokud je jeho exprese snižena, tak tyto fibroblasty vykazují fibrogenní potenciál schopný fibrózy plic (Hagood et al., 2005). Toto vede i k potížím s odlišením fibroblastů

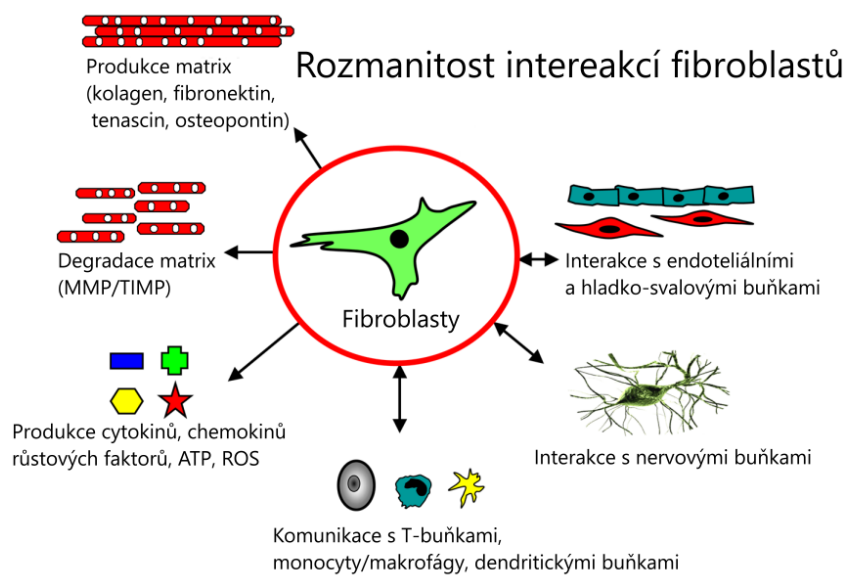
od jiných typů buněk. Jejich povrchové znaky mají i jiné buňky, proto se vždy testují pro odlišení znaky typické pro jiné buněčné typy, a pak znaky typické pro fibroblasty.



**Obrázek 2 – Teorie vzniku PAH.** A) „Inside-out“ teorie, kde dojde k endoteliálnímu zranění, díky kterému se z endotelu dále do cévy přenáší signál z poškozených buněk, které následně na tyto signály reagují. Dochází k infiltraci cévy imunitními buňkami skrze endotel. B) „Outside-in“ teorie, která říká že počáteční signál k přestavbě přichází z tunica externa. Hlavními buňkami zde jsou fibroblasty, které slouží jako „strážné“ buňky, jež se obratem na signály aktivují a mohou řídit další přestavbu. Přes vasa vasorum je do vrstev cévy dodáváno značné množství imunitních buněk. Seznam zkratk: DC (dendritická buňka), PC (progenitorová buňka). Převzato a upraveno: (Stenmark et al., 2012)

Na kravském modelu PAH byla zjištěna odlišná míra exprese prozánětlivých mediátorů, které, produkovaly fibroblasty (Li et al., 2011). Těmito prozánětlivými mediátory byly IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2, CXCL12, CCL5, CXCR4, GM-CSF a VCAM-1. Tento fenotyp se udržel stabilní i do desáté pasáže v in vitro inkubaci plicních fibroblastů. Je tedy zřejmé, že fibroblasty produkují značné spektrum prozánětlivých mediátorů, které mohou v cévě minimálně udržovat chronický zánět a přilákat cirkulující imunitní buňky. Například PSMC tento prozánětlivý stav nevykazují (Li et al., 2011). Dále se ukázalo, že PAH fibroblasty produkují extracelulární váčky nano velikosti (EV – z anglické Extracellular Vesicles). Tyto EV jsou produkovány v mnohem větším množství než u fibroblastů ze zdravé kontroly. Po in vitro vystavení makrofágů EV u nich došlo k aktivaci prozánětlivého stavu zahrnujícího zvýšení exprese genů IL-1 $\beta$ , IL-6 a Thbs1 (S. Kumar et al., 2021). Mimo jiné došlo ke zvýšení exprese dalších cytokinů oproti makrofágům vystavených EV ze zdravých kontrol. Mezi těmito cytokiny byly: IL-4, G-CSF, BLC (CXCL13), MCP-5, I-TAC (CXCL11), IL-17, MIP-1 $\beta$ , RANTES, I-309 (CCL1), MIG, IL-10, IL-23, TNF- $\alpha$ , IL-27, IFN- $\gamma$ , IL-13, MIP-2, sICAM-1, IL-3, TIMP-1 a CXCL1.

Mimoto i EV z PAH modelu ovlivňovaly metabolismus makrofágů, který se projevoval glykolytickým posunem energetického metabolismu a hromaděním vnitrobuněčného sukcinátu (S. Kumar et al., 2021). Leukotrien B4 (LB4) je molekula odvozená od kyseliny arachidonové, jež se účastní zánětlivých procesů. Na myším modelu athymické nahé myši bylo dokázáno, že aktivace p38 MAPK a zvýšení exprese NADPAH oxidázy 4 (NOX4) vede k proliferaci, migraci a dediferenciaci fibroblastů. Zdrojem LB4 jsou v plicní cévě většinou CD68+ makrofágy, které jsou v blízkosti fibroblastů (Qian et al., 2015).



**Obrázek 3 – Interakce fibroblastů s okolím.** Fibroblasty se podílejí na produkci proteinů extracelulární matrix, vylučují enzymy schopné ji přeměňovat. S okolními buňkami interagují kontaktem, produkcí cytokinů a dalších mediátorů. Kvůli rozmanitosti interakcí mají centrální roli v cévní homeostáze. Seznam zkratk: MMP (metaloproteináza), TIMP (tkáňový inhibitor matrixových metaloproteináz). Převzato a upraveno: (Stenmark et al., 2011)

Nejen v tunica externa, ale i v ostatních vrstvách cévy dochází během PAH ke zvětšování objemu cévní vrstvy a ke změnám složení extracelulární matrix. Normální složení extracelulární matrix v lidské cévě zahrnuje kolagen I, elastiny, laminin, fibronektin a tenascin C (Jones et al., 1997). Na jejím udržování se podílejí enzymy, jako jsou matrixové metaloproteinázy, ADAM metaloproteinázy a jejich inhibitory. Tato rovnováha se při PAH mění a dochází k akumulaci kolagenu, neutrofilní elastázy a metaloproteináz (Lepetit et al., 2005). Fibroblasty se v tunica externa podílejí na přestavbě extracelulární matrix. Patologicky zvýšený galektin-3 u PAH působí na fibroblasty zvýšením produkce kolagenu I a způsobuje fibrózu spolu s TGF- $\beta$ . Jak galektin-3, tak i TGF- $\beta$  se vyskytují ve zvýšené míře v krvi krys vystavených hypoxii (Luo et al., 2017).

## 2.2. Zapojení imunitního systému do patologie PAH

Pro PAH u zvířecích modelů a lidských pacientů je charakteristický perivaskulární zánět, akumulace imunitních buněk v cévní stěně plicních cév a zvýšené hodnoty některých cytokinů/molekul imunitního systému v krevním séru oproti zdravým jedincům, jejichž hodnoty korelují se závažností onemocnění. Samotné buňky plicní cévy podporují tento zánětlivý stav produkcí cytokinů, chemokinů a dalších molekul, které přilákávají makrofágy, NK buňky, neutrofilní buňky, dendritické buňky (DC), žírné buňky a T a B lymfocyty.

U lidských pacientů byla naměřena zvýšená hodnota sérových cytokinů a chemokinů oproti zdravým kontrolám (Soon et al., 2010). Tyto cytokiny byly signifikantně zvýšeny: prozánětlivé (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12p70, TNF- $\alpha$ ) a protizánětlivé (IL-4, IL-10). IL-8 a TNF- $\alpha$  negativně korelovaly se srdečním indexem, který udává množství krve přečerpané komorou za jednotku času a přepočtené v závislosti na tělesném povrchu (Soon et al., 2010). Mimo jiné zvýšená hladina IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 a IL-12p70 signifikantně korelovala s dobou přežití pacientů s PAH (Soon et al., 2010). Dále je u lidí s PAH zvýšená hladina kyseliny močové, která je finálním produktem metabolismu purinů (Savale et al., 2021). Kyselina močová je schopná v podobě krystalů aktivovat vrozenou imunitu. Funguje jako takzvaný „danger“ signál a spouští expresi IL-1 přes zvýšenou aktivaci NLRP3 (Kimura et al., 2019). Jiný výzkumný tým našel zvýšené hodnoty CCL2 a proproteinu konvertázy subtilisin/kexin typu 9 (PCSK9) (Zhong et al., 2021). PCSK9 je enzym, jež se účastní metabolismu nízkodenzitního lipoproteinu cholesterolu (LDL) a je též zapojen do zánětlivých stavů. Jako jediný enzym nalezený v séru pacientů s PAH pozitivně koreluje s hemodynamickými a echokardiografickými parametry. Jeho zdroj v těle je ovšem neznámý (Zhong et al., 2021).

Ke zvýšení hladin cytokinů, chemokinů a imunitních buněk dochází v perivaskulární oblasti malých distálních cév. Bylo prokázáno hromadění makrofágů (Pinto et al., 2004), DC (W. Wang et al., 2009), žírných buněk (Hoffmann et al., 2011), CD4<sup>+</sup> T buněk (Cuttica et al., 2011) a B buněk (Mansueto et al., 2021). Kromě toho byly v plicích postižených pacientů detekovány lymfoidní agregáty (autory nazývané terciální lymfoidní tkáň) různých velikostí a stupně složitosti, které nebyly vázány jen na okolí malých distálních cév, ale byly pozorovány i u velkých cév. Tyto lymfoidní agregáty obsahovaly CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T buněčné oblasti, které obklopovaly B buněčné folikuly a DC (Perros et al., 2012).

### 2.2.1. Cytokiny podílející se patologii PAH

#### 2.2.1.1. Interleukin 6

IL-6 je ve většině případů prozánětlivý cytokin, který se účastní zánětu, imunitní regulace, hematopoézy a onkogeneze. Jeho receptor se skládá z vlastního receptoru pro cytokin, který může

být v membráně nebo volně rozpustný a přenašeče signálu gp-130. Membránová forma se nachází jen na pár typech buněk (leukocyty a hepatocyty), ale volně rozpustná forma se může vyskytovat téměř kdekoli a může se vázat na gp-130, který se nachází na celé řadě buněčných typů. Volný gp-130 slouží jako přirozený inhibitor IL-6 v komplexu s rozpustným receptorem. Jedná se o důležitý cytokin zapojený do patogeneze PAH. Jak již bylo výše zmíněno, jeho zvýšená koncentrace se vyskytuje v krevním séru, ale i lokálně v distální plicní cévě.

Pokusy s transgenními myši, které byly deficientní v genu pro IL-6 ukázaly, že pokud se tyto myši vystaví hypoxii, jsou z velké části chráněny před vývojem PAH (Savale et al., 2009). U deficitních myší oproti kontrolním došlo též k nižší akumulaci imunitních buněk v plicní cévě, bylo pozorováno méně cév se zvětšenou tunica media a pravá srdeční komora byla méně hypertrofovaná. Ovšem u obou typů myší došlo ke zvýšení systolického tlaku pravé komory (Savale et al., 2009). Též byly dělány pokusy na myších, které zahrnovaly myši s nadměrnou produkcí IL-6 (Steiner et al., 2009). V normoxii tyto myši vykazovaly vyšší tlak v pravé srdeční komoře oproti kontrole a pokud byly navíc vystaveny hypoxii, tak došlo ještě k jeho většímu zvýšení. Dále se u těchto myší vyskytlo zbytnění cévy, infiltrace imunitních buněk v cévě a vznikaly plexiformní léze. Z toho vyplývá, že IL-6 přímo podporuje proliferaci a podílí se na patologii PAH (Steiner et al., 2009).

Zdroj sérového IL-6 se nedá s jistotou určit, ale je jasné, že IL-6 v plicních cévách pochází z buněk v nich. Kromě imunitních buněk, jako jsou například plicní makrofágy, je IL-6 více produkován v PSMC z PAH modelů v porovnání se zdravými kontrolami. Naopak PAEC neprodukuje více IL-6 při PAH než ve zdravých kontrolách (Simpson et al., 2020). Ukázalo se, že i fibroblasty v plicní cévě postižené PAH produkují IL-6 (Li et al., 2011).

PAH pacienti mají oproti zdravým jedincům v séru zvýšený rozpustný receptor pro IL-6, ale už ne rozpustný gp-130 (Jasiewicz et al., 2015). Zároveň na PSMC byla zjištěna zvýšená exprese membránového receptoru pro IL-6 (Tamura et al., 2018). Tato zvýšená exprese vedla k antiapoptickému fenotypu PSMC u pacientů s PAH. Experiment s myši, které neměly expresi membránového receptoru pro IL-6 v buňkách, jež exprimovaly  $\alpha$ -SM22A, ukázal, že tyto myši byly chráněny proti vzniku PAH indukované hypoxií (Tamura et al., 2018).

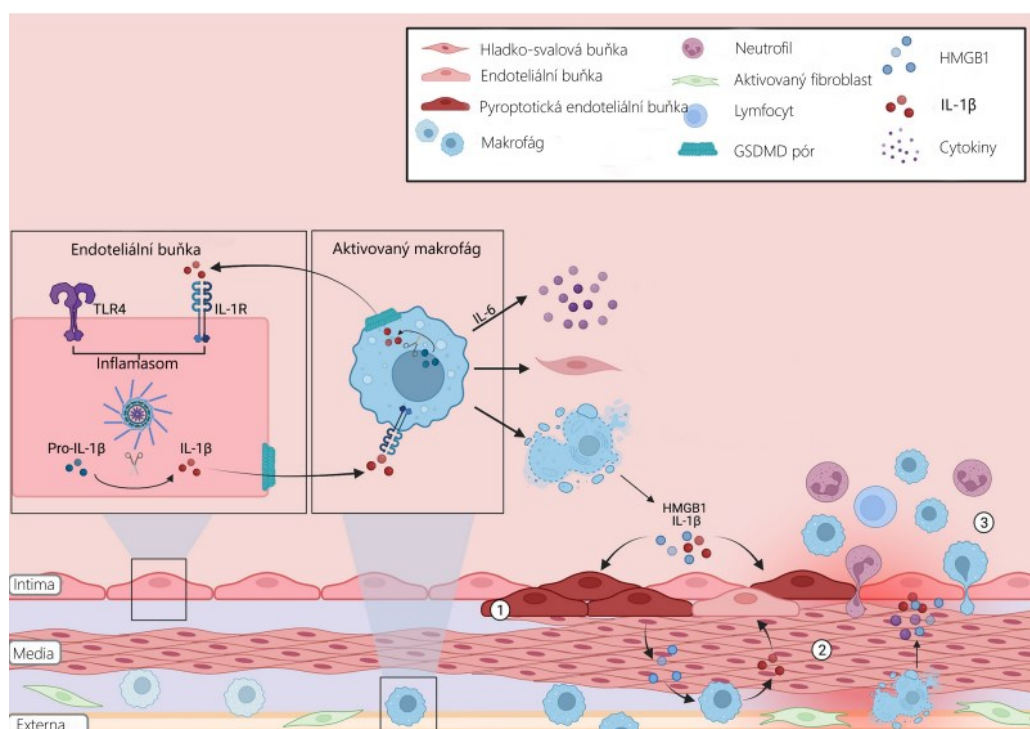
Dále bylo zjištěno, že polymorfismus v promotoru pro gen IL-6 zvyšuje šanci na vznik PAH u lidí. Pacienti, kteří mají v -572 pozici CG nebo GG, mají méně IL-6 v séru oproti CC genotypu. CG genotyp se uplatňuje i u jiných onemocnění jako například u obstrukční spánkové apnoe (Fang et al., 2017).

### 2.2.1.2. Interleukin IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  je další cytokin, který je zvýšený v séru pacientů. Jedná se o prozánětlivý cytokin, který se syntetizuje v buňce jako proforma a k její aktivaci je nutné sestřížení. To se děje typicky pomocí multiproteinového komplexu inflamazómu. Inflamazóm obecně v buňkách odpovídá na molekulární vzory asociované s patogeny (PAMP) nebo na molekulární vzory spojené s poškozením (DAMP). Jeho složkami jsou receptory ze skupiny NLR (z anglického NOD-like receptor), AIM2 (z anglického Absent in melanoma 2) či IFI16 (z anglického Gamma-interferon-inducible protein), které rozeznávají PAMP. Při oligomerizaci inflamazómu dochází k přidání adaptorového proteinu ASC (z anglického Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) k některému z receptorů (obvykle se jedná o kanonický NLRP3) po rozeznání PAMP. Tato oligomerizace způsobuje aktivaci pro-kaspázy (většinou kanonickou kaspázu 1, ale též u lidí se může aktivovat nekanonická kaspáza 4 nebo 5) (Casson et al., 2015), jež se autokatalyticky štěpí a stává se aktivní formou, která může štěpit prozánětlivé proteiny IL-1 $\beta$  a IL-18 do aktivní formy. Začlenění inflamazómu do patogeneze PAH není zcela pochopeno, ale jeho možné zapojení do mechanismu patogeneze PAH je naznačeno na obrázku 4. Jeho značná variabilita v podjednotkách výzkumné snahy zpomaluje. Jeho význam v rozvoji PAH dokumentuje například výzkum na myším modelu, který má odstraněný gen pro ASC a oproti kontrolní myši vystavené hypoxii vykazuje nižší systolický tlak pravé komory, sníženou remodelaci pravé komory, mírnější fibrotizaci tunica externa a muskularizaci plicních cév (Telarevic Cero et al., 2015). Zajímavé ale je, že myš, která měla odstraněný gen pro NLRP3, nevykazovala stejné snížené parametry přestavby jako myš s odstraněným ASC. Hypoxie tedy měla stejný efekt jak na kontrolní myš, tak na myš s delecí NLRP3 (Telarevic Cero et al., 2015), což naznačuje možnou nekanonickou aktivaci inflamazómu. Experiment prováděný na myším modelu s vyřazenými geny pro kaspázu 1/11 (kaspáza 11 byla využita, protože je schopná se u myši účastnit nekanonického štěpení IL-1 $\beta$ ) ukázal, že tyto myši vyvinou při hypoxii slabší formu PAH zahrnující snížení remodelace plicní cévy a nižší systolický tlak pravé komory (J. Zhang et al., 2020).

V tuto chvíli neexistuje mnoho prací na téma vlivu IL-1 $\beta$  na patogenezi PAH, ale je zřejmé, že v ní hraje důležitou roli. V séru PAH pacientů se vyskytuje signifikantně zvýšeně (Soon et al., 2010). Plicní cévní fibroblasty u PAH jedinců mají oproti zdravým kontrolám zvýšenou expresi mRNA a proteinu (Li et al., 2011). Zdá se, že IL-1 $\beta$  v PASMC může podporovat vasokonstrikční efekt a antiapoptický stav buňky, kvůli snižování konverze ATP na cAMP (tento jev byl popsán v práci (Itoh et al., 2003), kapitola o PAEC). Pokusy s lidským rekombinantním antagonistou IL-1 receptoru ukázaly, že po podání monokrotalinu (rostlinný alkaloid schopný vyvolat přestavbu cévy) došlo k redukci plicní hypertenze a hypertrofie pravé části srdce (Voelkel et al., 1994). Později byl tento antagonist receptoru IL-1 pojmenován jako anakinra a dále byly zkoumány jeho účinky. V jedné

studii zjistili, že receptor IL-1 a jeho adaptorový protein, který se účastní nejen signalizace přes receptor IL-1, primární odpověď myeloidní diferenciace 88 (MyD88), jsou vysoce exprimovány v plicních cévách postižených PAH. Myši, které mají vyřazený gen pro MyD88 a receptor pro IL-1 byly chráněny proti vzniku PAH. To vedlo ke zjištění, že receptor pro IL-1 pomáhá proliferaci PSMC a způsobuje nábor makrofágů do cévy (Parpaleix et al., 2016). Tyto poznatky naznačují, že anakinra by mohla být v budoucnu potencionální terapie pro pacienty s PAH.



**Obrázek 4 – aktivace inflamazómu a produkce IL-1β v patologii PAH.** Při porušení homostáze nebo nadměrném stresu v PAEC (v PAH nebyla potvrzena produkce IL-1β PAEC, ale po stimulaci jsou schopny lidské plicní epiteliální buňky produkovat IL-1β (Peeters et al., 2013)) či v makrofázích může dojít k aktivaci inflamazómu, přes který je štěpen IL-1β. Pokud je makrofág vystaven IL-1β může dojít k jeho aktivaci, začne produkovat proinflamační cytokiny jako IL-1β, IL-6 či HMGB1 (z anglického High mobility group box 1 protein). Tyto cytokiny mohou způsobit v počátečních fázích PAH pyróptózu PAEC (1), stimulovat PSMC k proliferaci (2) a přispívat k migraci ostatních buněk imunitního systému do plicní cévy (3). Převzato a upraveno: (Foley et al., 2022)

### 2.2.1.3. Transformující růstový faktor beta

TGF-β, receptor kostního morfogenetického proteinu 2 (BMPR2) a signalizace spouštěná těmito proteiny vede k antiapoptotickému stavu PAEC a k proliferaci a hypertrofii PSMC. Porušená signalizace přes BMPR2 a zvýšená aktivita TGF-β způsobuje vaskulární přeměnu (Zabini et al., 2018). Signalizace přes BMPR2 je složitá. TGF-β a kostní morfogenetický protein (BMP) mohou sloužit jako ligandy pro BMPR2, který se spojuje s dalšími koreceptory, jako jsou kináza podobná aktivinu 1 (ALK1), ALK2, ALK3 a ALK6. Navázání ligandu na komplex receptorů spustí fosforylací signalizaci přes SMAD 1, 5 a 8, jež reaguje se SMAD 4 a to vede k transkripci specifických genů v jádře PSMC.

BMPR2 je u pacientů s PAH mutován a v některých případech vede k dědičné formě PAH. Samotný TGF- $\beta$ , který je dodán do oběhu v nadbytku je schopný způsobit fibrózu a přeměnu plicních cév (Farkas et al., 2009). Ale ukázalo se, že v systému PAH dochází ke snížení signalizace přes BMPR2 (Richter et al., 2004). Ta je však snížena z důsledku nadbytku stimulů. Tento nadbytek vede ke snížení SMAD 3 a to působí na proliferaci a migraci PAEC a PASC (Zabini et al., 2018).

#### 2.2.1.4. Další cytokiny zapojené do patologie PAH

Kromě tří výše zmíněných cytokinů se do patologie PAH zapojují další cytokiny anebo alespoň dochází k jejich nerovnováze. Většinou je jejich přesné zapojení do PAH neznámé. Jedním z nich je IL-18, který je zvýšený v séru pacientů a jeho receptor se exprimuje v PASC a PAEC. Jedním ze zdrojů IL-18 můžou být samotné PASC (Ross et al., 2012). Obecně IL-18 hojně produkuje makrofágy. IL-4 je dalším cytokinem zvýšeným u PAH pacientů. V modelu PH spojeném se *Schistosomou* (jedná se jeden z podtypů PH vedle PAH) je důležitá interakce IL-4 a IL-13, která vede k Th2 imunitní odpovědi. Signalizace IL-4 a IL-13 byla v tomto modelu PH zvýšená a myš s těmito vyřazenými cytokiny byla chráněna před PH vyvolanou *Schistosomou* (R. Kumar et al., 2015). Ale u lidského modelu PAH je signifikantně zvýšená pouze hladina IL-4 a nikoliv IL-13 oproti zdravým kontrolám (Soon et al., 2010). Pravděpodobně hraje roli nerovnováha více cytokinů. Protein vysoce mobilního boxu 1 (z anglického high mobility group box 1) je další protein ze skupiny cytokinů, který je zvýšený u pacientů s PAH. Jeho hladina dokonce koreluje s plicním arteriálním tlakem. Krom toho se jeho extracelulární forma nachází v tunica externa a tunica intima (Goldenberg et al., 2019). Dále se potvrdilo, že tento protein má proliferační a migrační účinky na PASC a PAEC (Zabini et al., 2015). Více informací o dalších typech cytokinů zapojených do PAH je uvedeno například v uvedeném review – Rabinovitch et al., (2014).

### 2.2.2. Imunitní buňky zapojené do patogeneze PAH

#### 2.2.2.1. Makrofágy

Makrofágy jsou buňky vrozené imunity, které jsou hlavním fagocytujícím systémem těla. Kromě fagocytózy produkuje různé typy cytokinů, kterými ovlivňuje zánětlivé reakce a mohou fungovat jako buňky prezentující antigen. Typicky se dělí do dvou podtypů: M1 (prozánětlivý typ) a M2 (protizánětlivý typ) makrofágy. M1 makrofágy jsou aktivovány IFN- $\gamma$  a produkuje hodně IL-12 a málo IL-10. Oproti tomu M2 makrofágy jsou aktivovány IL-10 a produkuje IL-10, TGF- $\beta$  a neprodukuje IL-12. M2 makrofágy jsou zapojeny do reparačních procesů.

V kravském a krysím modelu PAH vyvolané hypoxií se ukázala akumulace makrofágů a monocytů v plicní cévě postižené PAH. Tyto buňky pocházely z cirkulujícího zdroje, nebyly

rezidentní (Frid et al., 2006). Pokusy s deplecí těchto makrofágů vedly k tomu, že nedošlo k přestavbě tunica externa, protože se neakumulovaly molekuly jako tenascin c, kolagen, fibronektin a myofibroblasty (Frid et al., 2006). U pacientů s PAH též byla nalezena akumulace makrofágů v tunica externa (Pinto et al., 2004). V další studii prováděné na myších též zjistili, že dochází k brzké akumulaci makrofágů při vývoji PAH indukované hypoxií. Tyto makrofágy byly alternativně aktivované, tedy M2 typ makrofágů. Tyto M2 makrofágy vykazovaly expresi arginázy 1, Fizz 1 (found in inflammatory zone 1), proteinu 1 podobného chitináze 3, jež jsou charakteristické pro M2 fenotyp (Vergadi et al., 2011). V nedávno vydané studii zaměřené na vývoj PAH a účast makrofágů zjistili, že deplece makrofágů bez hypoxie vede ke zvýšení plicního tlaku a vývoji PAH pouze u myších samečků. Autoři poukázali na změnu poměru M1/M2 makrofágů, která může být důležitá pro vývoj PAH. Proč došlo ke spontánnímu vzniku PAH pouze u samečků je nejasné, ale ukazuje to důležitou a nevysvětlitelnou roli pohlaví ve vývoji PAH (Zawia et al., 2021). V další práci došli k závěru, že makrofágy, které jsou aktivovány fibroblasty v tunica externa mají alternativní fenotyp od klasických M1/M2 makrofágů. Tento alternativní typ makrofágů se aktivoval po navázání IL-6 a spustil signalizaci přes STAT3, C/EBP $\beta$  a HIF-1 $\alpha$  v nich. Měřili expresi arginázy 1 a proteinu 1 podobného chitináze 3. U arginázy 1 byla zvětšená exprese, ale nikoliv u proteinu 1 podobného chitináze 3 (el Kasmi et al., 2014), což neodpovídá výsledkům skupiny Vergadiho, která u makrofágů našla protein 1 podobný chitináze 3. Možné rozdíly v aktivaci makrofágů by mohly pramenit z jejich původu, kde makrofágy pocházely z různých zvířecích modelů PAH, které lze těžko porovnat i co se týče rozvoje PAH v době odběru vzorků na analýzu. Rozhodující je, že akumulace makrofágů v místě přestavby cévy byla přítomna vždy.

Jak již bylo výše zmíněno, tak LB4 je zvýšen během PAH a jeho hlavní zdroj jsou makrofágy. Makrofágy akumulované při PAH v plicních cévách mají zvýšenou expresi hydrolázy leukotreinu A4, která převádí leukotrein na LB4. Bylo zjištěno, že LB4 má vliv na PASMC a PAEC. V PASMC vyvolává proliferaci a hypertrofii. Na PAEC působí přes jejich receptor BLT1, na který se váže a tím působí apoptózu. Pokusy s antagonistickým receptorem BLT1 a snížením LT4 vedly ke snížení apoptózy PAEC a k snížení zbytnění cévy (Tian et al., 2013). Zvýšená exprese LB4, mutace v BMPR2 a náhlé poranění PAEC může vést k apoptóze PAEC a to může přejít v počáteční stádium PAH (Teichert-Kuliszewska et al., 2006).

#### 2.2.2.2. Neutrofilní granulocyty

I když 95 % buněk izolovaných z bronchoalveolární laváže myších plic bylo CD45+ a z nich mělo více jak 98 % povrchové znaky specifické pro makrofágy, tak i jiné buňky jsou zapojeny do patologie PAH (Vergadi et al., 2011).

Neutrofilní buňky jsou buňky vrozené imunity schopné fagocytovat, mají schopnost degranulace, která je důležitá jako antimikrobiální ochrana a mají speciální schopnost, takzvanou netózu, která neutralizuje extracelulární patogeny.

V některých pracích byla dokázána akumulace neutrofilů v plicní cévě postižené PAH (Schultze et al., 1991), ale v jiných nebyli autoři schopni detekovat signifikantní nárůst (Frid et al., 2006). Ovšem je zřejmé, že v postižených plicních cévách je zvýšená exprese neutrofilní elastázy (NE), jejíž zdroj jsou hlavně neutrofilové a myeloperoxidázy.

Pacienti s PAH mají v séru zvýšené znaky netózy. Tyto znaky zahrnují NE, myeloperoxidázu či cirkulující DNA. Tyto znaky se vyskytovaly v některých oblastech plic a plexiformních lézích. Myeloperoxidáza produkuje ROS ( $H_2O_2$ ) a je schopná indukovat v buňkách NF $\kappa$ B. Produkty netózy jsou schopny zvyšovat rychlost endoteliální angiogeneze pomocí proangiogenních mediátů. Kromě proangiogenního výlevu má netóza na PAEC proliferační vliv (Aldabbous et al., 2016). Bylo dokázáno, že zvýšená exprese NE v séru pacientů pozitivně koreluje se závažností onemocnění. Zvýšení NE souviselo se snížením elafinu, který je inhibitor NE. Elafin je slibný kandidát na léčbu PAH (Sweatt et al., 2021).

#### 2.2.2.3. Žírné buňky

Žírné buňky jsou buňky vrozené imunity, které jsou schopné degranulace, pomocí které vylučují do okolí histamin, proteázy, cytokiny či chemokiny.

Akumulace žírných buněk byla zjištěna v perivaskulární oblasti pacientů s PAH a bylo prokázáno, že se podílí na remodelaci cévy. Obecně jsou totiž žírné buňky schopny podporovat proliferaci hladko-svalových buněk a endoteliálních buněk (Hoffmann et al., 2011). Pokud došlo k blokaci výlevu granulí žírných buněk, tak byla přerušena vaskulární remodelace, ale to nemělo vliv na hemodynamické parametry (Bartelds et al., 2012). Během vystavení žírných buněk hypoxii u nich dochází k výlevu IL-6, který je kritický ve vývoji PAH a k výlevu TNF- $\alpha$ . In vitro pokusy ukázaly, že kondiciované médium ze žírných buněk vystavených hypoxii je schopné u vaskulárních fibroblastů vyvolat přechod do myofibroblastů a zvýšit jejich proliferační a migrační vlastnosti (X. Wang et al., 2020).

#### 2.2.2.4. Dendritické buňky (DC)

DC jsou buňky vrozené imunity, které se dělí do čtyř podtypů: konvenční cDC1 a cDC2, plazmocytoidní pDC2 a DC derivované z monocytů MoDC. Jednou z jejich hlavních funkcí je předkládat antigen T buňkám.

U pacientů s PAH jsou sníženy hladiny konvenčních DC oproti zdravým kontrolám, ale zároveň došlo k jejich zvýšení v plexiformních lézích. DC pravděpodobně migrují za signály, které signalizují poškození tkáně (W. Wang et al., 2009).

#### 2.2.2.5. T buňky

Všechny základní typy T buněk jsou během PAH nějakým způsobem ovlivněny. T buňky se rozdělují do dvou základních kategorií: CD4+ (T pomocné buňky – Th1, Th2, Th17 a regulační Treg buňky) a cytotoxické CD8+ T buňky.

Pacienti s PAH mají v periferní krvi snížený počet CD8+ buněk a zvýšený počet CD25High FoxP3+ CD4+ Treg buněk oproti zdravým kontrolám (Ulrich et al., 2008). Monokrotalinem vyvolaná PAH vede u myši k akumulaci CD4+ T buněk po poškození PAEC. Tato akumulace má za následek muskularizaci malých plicních cév (Cuttica et al., 2011). Jeden výzkum prováděný na myším modelu spojil zvýšenou muskularizaci cév s Th2 buněčnou odpovědí a jejich produkcí IL-4 a IL-13 (Daley et al., 2008). Nepoměr mezi výskytem Th17 a Treg buněk a jejich aktivitou nastává u PAH pacientů. To přímo koreluje s vážností onemocnění (Gaowa et al., 2014). Mezi cirkulujícími buňkami u pacientů s PAH bylo nalezeno zvýšení počtu Th17 buněk. Pokud se myším podal specifický inhibitor pro Th17 buněčnou populaci, tak tyto myši byly chráněny před PAH vyvolanou hypoxií (Maston et al., 2017). Pokud by došlo ke snížení aktivity Treg buněk, může to vést k zánětu poškozující cévu. Na myším modelu se potvrdilo, že ztráta autotolerance vede k vývoji PAH, pokud dojde k poranění PAEC (Tamosiuniene et al., 2011). Jedním ze způsobů, jak by mohly Treg buňky snížit aktivitu je přes zvýšenou expresi ObR receptoru pro leptin, který je u PAH pacientů na povrchu Treg buněk. Výsledky tohoto výzkumu naznačují, že leptin může inhibovat funkci Treg buněk (Huertas et al., 2012). Myši, které jsou deficientní v ObR receptoru vyvinou méně závažnou formu PAH a zároveň jsou při hypoxii chráněny před poklesem množství Treg buněk. U lidských pacientů je leptin důležitý mechanismus, který vede k dysfunkci Treg buněk (Huertas et al., 2016).

#### 2.2.2.6. B buňky

Posledním buněčným typem zapojeným do patogeneze PAH, který bude v této práci popsán jsou B buňky. Jedná se o buňky adaptivní imunity, které především produkují protilátky.

Bylo dokázáno, že dochází k akumulaci B buněk, které mají povrchový CD20+, nacházejících se okolo cévy a v alveolárním septu (Mansueto et al., 2021). Ovšem nedochází k nárůstu ani poklesu B buněk v krvi (Blum et al., 2018). Důležitost B buněk v patogenezi PAH dokazuje experiment na myším modelu, kde používali protilátky anti-CD20 k vychytávání B buněk a JT-KO myši model, který je bez B buněk. Pomocí dvou výše zmíněných strategií dokázali, že B buňky jsou nezbytné pro vývoj

PAH. Po vychytání B buněk došlo k výraznému zmírnění PAH, redukcí zbytnění malých a středních cév a ke zlepšení hydrodynamických vlastností (Breitling et al., 2017). Pokusy na lidech s Rituximab protilátkou (anti-CD20) též ukazují slibné výsledky (Zamanian RT et al., 2021).

Plazmatické buňky jsou aktivované B buňky, které produkují velké množství protilátek. V oběhu pacientů s PAH byla oproti kontrolní skupině naměřena signifikantně zvýšená hladina plazmatických buněk. Tyto plazmatické buňky byly většinou IgA pozitivní. Tyto IgA protilátky byly schopné v endoteliálních buňkách in vitro spustit zvýšenou expresi povrchových znaků ICAM-1, ICAM-2 a ET-1 a expresi prozánětlivých molekul IL-8 a MCP-1 (Blum et al., 2018).

#### 2.2.2.7. Komplement

Komplement je základní složkou vrozené imunity, která hraje roli v homeostáze, zánětu a obraně proti patogenům. Systém komplementu se skládá z více než padesáti cirkulujících, membránově vázaných a intracelulárních proteinů. K jeho aktivaci může dojít klasickou, alternativní nebo lektinovou cestou (Frid, Thurman, et al., 2020).

Molekula C3, která je jednou z nejkritičtějších složek komplementu, je zvýšená v séru u pacientů s PAH (J. Zhang et al., 2009). Myši deficitní v C3 genu po vystavení hypoxii projevovaly menší přestavbu cévy než zdravé myši. C3d molekula, která je konečným produktem C3, byla objevena v plicních vzorcích pacientů s PAH i u myší vystavených hypoxii. Zdravá kontrola nevykazovala téměř žádnou depozici C3d (Bauer et al., 2011). Na otázku, jakou cestou se komplement aktivuje při PAH, odpověděl výzkum Marie Frid a jejích kolegů, kteří zjistili, že během hypoxie se zvyšuje Cfb, který je zásadní v aktivaci alternativní dráhy komplementu. Po hypoxii bylo u myší pozorováno zvýšení receptorů pro C5a a C3a u perivaskulárních buněk (Frid, Alexandre McKeon, et al., 2020).

#### 2.2.3. Imunitní systém tura domácího

Tur domácí (*bos taurus*) je užitkové zvíře s velkým hospodářským rozsahem. V této práci byl využit jako modelový organismus, neboť rozvojem PAH indukované hypoxií je přestavba cévy nejpodobnější přestavbě cévy lidí s PAH. Proto bude tento model v této části popsán s hlavním zaměřením na jeho imunitní systém a jeho odlišnosti od jiných modelových organismů.

Obecně se kravský imunitní systém sám o sobě nestuduje. Nejvíce poznatků přináší výzkum zaměřující se na vakcíny a nemoci, které mají vliv na poškození hospodářských cílů. Mezi patogeny napadající tury patří hovězí koronavirus, rotavirus, kryptosporidia, *Escherichia coli* E99 a jiné.

Vrozená imunita krav vykazuje velmi podobné mechanismy jako ostatní modely. V první linii obrany mají fyzikální bariéry a sliznice chránící organismus před vstupem patogenů do organismu.

Buněčné typy zasahující do imunitních reakcí jsou stejné. Zvláštní zastoupení mají ale  $\gamma\delta$ T buňky, jejichž zastoupení u telat je až 60 % všech cirkulujících buněk. Tyto  $\gamma\delta$ T buňky nesou na svém povrchu WC-1 molekulu, jejíž funkce je neznámá (Davis et al., 1996). Zdá se, že tyto  $\gamma\delta$ T buňky mohou mít u krávy hlavní regulační funkci v periferní krvi. Spontánně sekretují IL-10 a zároveň na IL-10, TGF- $\beta$  a na kontakt s buňkami prezentujícími antigen reagují proliferací (Guzman et al., 2014). Na kravské CD4+ a CD8+ buňky působí  $\gamma\delta$ T buňky in vitro inhibicí proliferace. Proto se zdá, že by  $\gamma\delta$ T buňky mohly být hlavní regulační buňky u krávy (Guzman et al., 2014). Protilátky vyskytující se u turů jsou děleny do pěti typických kategorií: IgA, IgG, IgD, IgE, IgM, přičemž IgG se vyskytuje ve třech podtypech a IgM ve dvou podtypech (Stanfield et al., 2018). Zdá se, že polarizace pomocných T buněk (Th buňky) je stejná jako u konvenčních modelů, ale samotná imunitní reakce bude složitější než u myšího modelu. Složení fekálního mikrobiomu se liší od myší/lidí. Vyskytuje se v něm pět základních kmenů (seřazeno sestupně): *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* a *Actinobacteria*. Změny složení mikrobiomu se odráží na výsledné schopnosti krávy bránit se vnějším patogenům (Oikonomou et al., 2013).

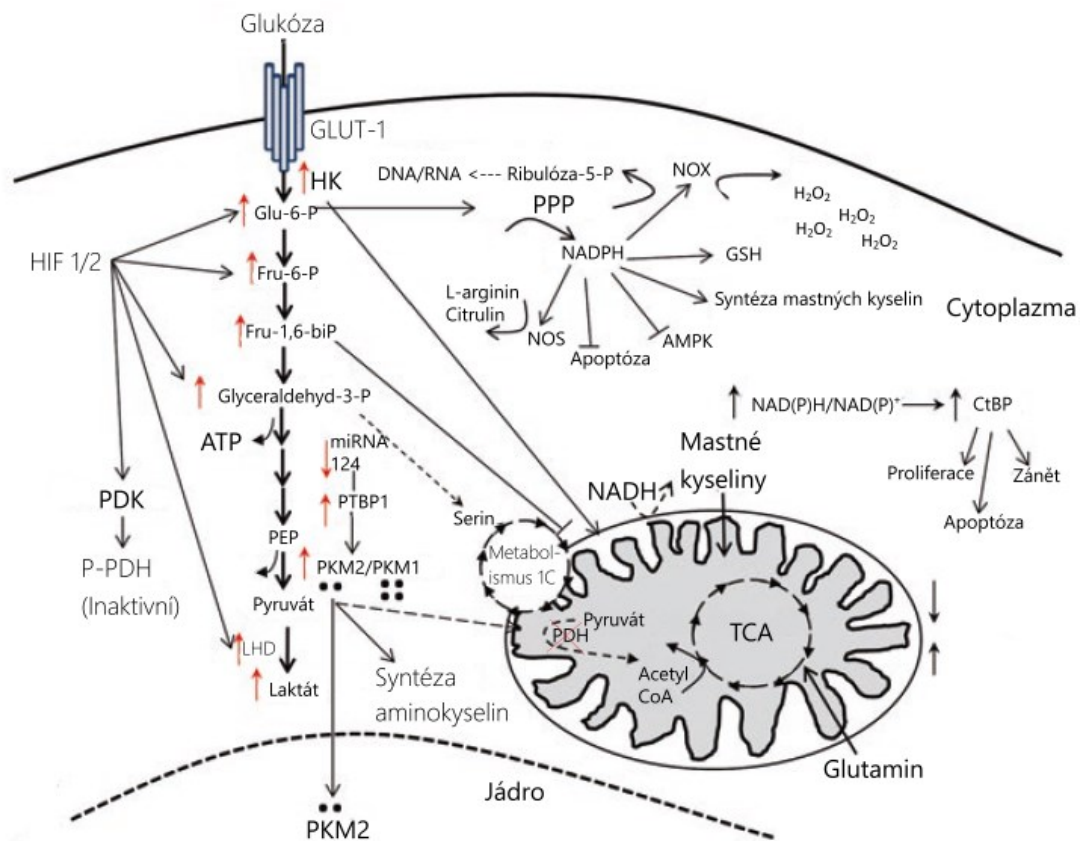
### 2.3. Metabolické změny během PAH

Jak již bylo výše popsáno, základní typy buněk cévy (PAEC, PSMC, fibroblasty) značně proliferují a odolávají apoptóze. Obecně buňky, které rychle proliferují, potřebují nasměrovat metabolismus na glykolýzu (známo jako Warburgův efekt), která jim umožní produkovat dostatek stavebního materiálu pro nové buňky (Obrázek 5). K tomu napomáhá i stres z chronického perivaskulárního zánětu, značného množství prozánětlivých cytokinů a pseudohypoxický stav vyvolaný aktivovaným HIF.

První věc, kterou buňka potřebuje pro metabolický posun ke glykolýze je přísun dostatečného množství glukózy. U PSMC a PAEC byla proto zjištěna zvýšená exprese glukózového přenašeče GLUT-1 a enzymu hexokinázy, který fosforyluje glukózu na glukózu-6-fosfát a tím ji udržuje v buňce. Zdá se, že tento fakt by mohl pomoci v jinak obtížné diagnostice PAH, protože analog glukózy  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglukóza může být detekována pomocí pozitronové emisní tomografie (Marsboom, Wietholt, et al., 2012). Enzym, jehož aktivita rozhoduje, jestli glukóza bude využita pouze glykolýzou nebo půjde dál do Krebsova cyklu a následně se podrobí oxidační fosforylaci, je pyruvát dehydrogenázový komplex (PDH), který přeměňuje pyruvát na acetyl-CoA. PDH je inhibován enzym pyruvát dehydrogenáza kináza (PDK) mechanismem fosforylace. U pacientů s PAH bylo pozorováno zvýšení PDK v buňkách přestavěných cév. Nejvíce zvýšená exprese PDK byla v PSMC, ale byla zvýšena i v ostatních buňkách cévní stěny. Toto zvýšení bylo u izoformy PDK 1 a 2 (Michelakis et al., 2017). Dichloroacetát je inhibitor PDK. Pokud se podal myším

spolu s monokrotalinem, tak nedošlo k přestavbě cévy a zlepšily se oproti kontrolám hydrodynamické vlastnosti. Efekt dichloroacetátu je takový, že zvrátí účinky inhibice PDH, které zahrnují depolarizaci mitochondriální membrány, zvýšení koncentrace  $[K^+]$ , jež inhibuje kaspázy, což brání apoptóze buňky (McMurtry et al., 2004). Zvýšení aktivity PDK bylo taktéž pozorováno u telecího modelu PAH, avšak dichloroacetát nebyl schopen potlačit všechny fenotypy nalezené u buněk PAH fibroblastů (Plecitá-Hlavatá et al., 2016). Ke zvýšení přispívá zvýšení HIF-1 exprese, které dále stimuluje přepis genu pro PDK (Kim et al., 2006).

Jak již bylo zmíněno, tak buňky během PAH prolifерují, ale důležité molekuly pro proliferaci se vyrábějí v Krebsově cyklu, který však nemůže brát vstupní molekulu acetyl-CoA vyráběnou PDH. Tento deficit je kompenzován oxidací mastných kyselin a glutaminem (Egnatchik et al., 2017), který může být metabolizován v buňce a vstoupit po úpravě do Krebsova cyklu (Sutendra et al., 2010). Bylo pozorováno, že metabolismus glutaminu je v PAH zvýšený (Egnatchik et al., 2017). Další komponenty pro stavbu buněk se produkují v pentózo-fosfátové dráze (PPP), která je hlavním zdrojem ribózy-5-fosfátu. Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza je enzym PPP, který mění glukózu-6-fosfát na 6-fosfo-glukolakton. A právě exprese a aktivita tohoto enzymu je během PAH zvýšená (alespoň u PASMC) (Chettimada et al., 2015). Když se in vitro k buňkám přidal inhibitor pro tento enzym, tak došlo k menší proliferaci, než u buněk s PAH (Chettimada et al., 2015). Na kravském a lidském modelu PAH byla dokázáno, že plicní fibroblasty mají zvýšený volný NADH a poměr  $NADH/NAD^+$ , které jsou nezbytné pro katabolické děje v buňkách (Li et al., 2016). Toto zvýšení vede ke zvýšení exprese senzoru metabolického stavu buňky C-terminální vazebného proteinu (CtBP). Zvýšení CtBP v buňkách PAH má přímé spojení s metabolickým posunem ke glykolýze a farmakologické snížení exprese CtBP vede ke snížení proliferace buněk i ke snížení zánětlivých a antiapoptotických znaků (Li et al., 2016).



**Obrázek 5 – souhrn metabolických dějů buněk plicní cévy uplatňujících se během PAH.** Dochází ke přechodu na anaerobní glykolýzu, což vede ke zvyšování meziproductů glykolýzy a některých jejích enzymů. Zvýšení exprese dimerní pyruvát kinázy vede ke snížení přeměny pyruvátu na acetyl CoA, což se projeví zvýšenou produkcí laktátu (to vede k oxyselování okolí buňky) a využití alternativních meziproductů pro Krebsův cyklus (TCA cyklus). Převzato a upraveno z review zaměřeného na metabolismus PAH buněk: (Plecitá-Hlavatá et al., 2017)

### 2.3.1. Mitochondriální změny při PAH

Mitochondrie jsou endosymbiotické orgány, které se v buňkách neustále spojují a rozpadají. V PASMČ PAH je tento proces narušen. Oproti zdravým buňkám jsou mitochondrie více fragmentované. Tato fragmentace je způsobena nepoměrem mezi proteiny řídícími fúzi a rozpadání. Konkrétně jsou zvýšeny protein 1 příbuzný dynaminu (z anglického dynamin-related protein-1 – DRP-1) a protein mitochondriálního štěpení 1 (z anglického Fission-1 – Fiss-1) a je snížen mitofusin-2 (Marsboom, Toth, et al., 2012). DRP-1 a Fiss-1 regulují mitochondriální rozpad a mitofusin-1 reguluje fúzi. Na regulaci mitochondriální fúze a štěpení má vliv HIF-1 $\alpha$ . Aktivace HIF-1 $\alpha$  pomocí jeho aktivátorů (prováděno v normoxii) ve zdravých PASMČ buňkách in vitro vedla ke štěpení mitochondrií. Mimo jiné tato aktivace vedla k depolarizaci mitochondriální membrány, snížení počtu Kv kanálů (K<sup>+</sup> kanály) a zvýšení cytosolického vápníku (Marsboom, Toth, et al., 2012). U telecích fibroblastů se též ukázalo snížení exprese mitofusinu-2 a zvýšení fragmentace mitochondrií (Plecitá-Hlavatá et al., 2016).

Snížení mitochondriální oxidativní fosforylace korelovalo se snížením exprese nebo aktivity komplexů dýchacího řetězce (Plecitá-Hlavatá et al., 2016). U lidských PAEC postižených PAH se konkrétně našla snížená exprese komplexu IV (Xu et al., 2007). Snížená aktivita komplexu I se potvrdila u lidských a kravských fibroblastů. Se sníženou aktivitou komplexu se pojí snížená exprese její podjednotky NDUFS4 (Plecitá-Hlavatá et al., 2016). Takto inhibované komplexy elektron transportního řetězce pak mohou dát vznik kyslíkovým radikálům v mitochondriích. Kromě komplexů dýchacího řetězce je snížena i exprese antioxidačního enzymu mitochondriální superoxid dismutázy 2 (SOD2), která konvertuje superoxid kyslíku na  $H_2O_2$ . To působí nepoměr/zvýšení ROS v buňce. Zvýšení ROS může způsobit normoxickou aktivaci HIF-1 $\alpha$  (Bonnet et al., 2006).

### 2.3.2. Produkce ROS v buňkách postižených PAH

Mitochondrie a NADPH oxidázy (NOX) jsou hlavními zdroji superoxidu kyslíku a  $H_2O_2$  v buňkách plicní cévy. Zdá se, že během PAH vyvolané hypoxií se ROS na úrovni celé buňky zvyšuje, ale v jednotlivých částech může dojít ke snížení/zvýšení ROS oproti zdravým kontrolám. Například v mezimembránovém prostoru mitochondrií v PASMCM dochází ke zvyšování úrovně ROS, ale v matrix mitochondrie dochází ke snižování úrovně ROS (Waypa et al., 2010). V další studii zjistili, že hladina mitochondriálních ROS (mitochondriálního superoxidu kyslíku a  $H_2O_2$ ) se po hypoxii zvyšuje. A tato zvýšená exprese mitochondriálního  $H_2O_2$  vede k zvýšené expresi NOX2 a NOX4 (Adesina et al., 2015).

NOX je kategorie transmembránových oxidáz, které redukují kyslík na superoxid kyslíku, případně  $H_2O_2$ . Existují v těchto formách: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, DUOX1 a DUOX2. V plicních cévách se vyskytují NOX1, NOX2, NOX4 a NOX5, přičemž v každé buňce je jiný zastupující poměr. PAEC mají NOX1, NOX2, NOX5 a nejvíce NOX4, PASMCM mají NOX1, NOX5 a NOX4 a v plicních fibroblastech je NOX4 (Plecitá-Hlavatá et al., 2017). NOX4 hraje pravděpodobně největší roli v patogenezi PAH. Ukázalo se, že exprese NOX4 je v malých distálních cévách zvýšená, a to hlavně v tunica media PAH jedinců. Na PASMCM má její zvýšená exprese mRNA a proteinu vliv na proliferaci. NOX4 byla u PASMCM lokalizována hlavně v perinukleárním prostoru. In vitro pokus s interferující RNA namířenou na NOX4 ukázal snížení proliferace a produkce ROS oproti PASMCM s PAH (Mittal et al., 2007). Plicní fibroblasty z plic postižených plicní fibrózou mají též zvýšenou expresi NOX4. Zajímavé je, že exprese NOX4 v lidských fibroblastech korelovala s expresí  $\alpha$ -SMA a kolagenu I. Pokud se fibroblasty in vitro inkubovaly s TGF- $\beta$ , tak došlo ke zvýšení exprese NOX4 (Amara et al., 2010).

### 3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo určit, zda jsou kravské plicní fibroblasty schopny tvořit inflamazóm, který by vedl k produkci aktivního prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$ . Je známo, že plicní fibroblasty ve velkém množství produkují jiný prozánětlivý cytokin – IL-6, který nám sloužil jako kontrola ke studovanému IL1- $\beta$ . Role ROS ve spouštění signálních drah zapojených do zánětlivých procesů je již známa. Proto jsme předpokládali, že ROS, které jsou zvýšené během PAH, budou mít vliv na aktivitu inflamazómu a expresi IL-1 $\beta$ . Pro přehlednost jsou zde uvedeny dva hlavní cíle a jejich dílčí části v bodech:

- Hlavní cílem bylo určit, zda plicní fibroblasty tunica externa aktivují inflamazóm:
  - Detekce hladiny exprese IL-1 $\beta$  mRNA a IL-6 mRNA (kontrola).
  - Stanovení proteinové exprese těchto cytokinů.
  - Stanovení aktivity inflamazómu (kaspázy 1).
- Určení vlivu nadprodukce kyslíkových radikálů/ROS na tvorbu inflamazómu u plicních fibroblastů.

## 4. Materiály a metody

### 4.1. Použité chemikálie a roztoky

#### Seznam použitých chemikálií a roztoků:

| Název   | Výrobce       | Používané koncentrace |
|---|---------------|-----------------------|
| Antimycin A z <i>Streptomyces sp.</i>                     | Sigma-Aldrich | 2,5 nM                |
| Bovine serum albumin (BSA)                                | Sigma-Aldrich | 4 %                   |
| DCF (CM-H2DCFDA)  | Invitrogen    | 5 $\mu$ M             |
| FCCP  | Abcam         | 500 $\mu$ M*          |
| Glucose Oxidase from <i>Aspergillus niger</i>             | Sigma-Aldrich | 50 $\mu$ U            |
| Lipopolysacharid** z <i>Escherichia coli O55:B5</i>       | Sigma-Aldrich | 2 ng/mL               |
| Menadion  | Abcam         | 0,5 $\mu$ M           |
| Nigericin, Sodium Salt, <i>Streptomyces hygroscopicus</i> | Calbiochem®   | 10 $\mu$ M            |
| Oligomycin  | Abcam         | 5 nM                  |
| Pan caspase inhibitor Z-VKD-FMK biotinylated              | Sigma-Aldrich | 0,01 mM               |
| Sacharóza   | Lachner       | 5 %                   |
| Síran amonný  | Sigma-Aldrich | 100 % nasycený roztok |
| Tween® 20   | Sigma-Aldrich | 0,05 %                |

\*Jedná se o koncentraci zásobního FCCP. Při pokusech docházelo k titrování buněk různým objemem FCCP, proto se finální koncentrace pohybovaly od 0,5 nM do 1,25 nM.

\*\*Ve výsledcích dále je uváděn pojem LPS, který značí přidání lipopolysacharidu spolu s nigericinem.

#### Seznam používaných souprav na analýzy:

| Název                                 | Výrobce                      |
|---------------------------------------|------------------------------|
| Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay     | Promega                      |
| EvaGreen® Dye                         | Biotium                      |
| FAM FLICA® Caspase-1 (WEHD) Assay Kit | Immunochemistry technologies |
| Forget-Me-Not 40X Template Buffer     | Biotium                      |
| IL-1 beta Bovine Uncoated ELISA Kit   | Invitrogen                   |
| IL-6 Bovine Uncoated ELISA Kit        | Invitrogen                   |
| Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A   | Thermo Fisher Scientific     |
| RNeasy Mini Kit                       | Qiagen                       |
| TATAA GrandScript cDNA Synthesis Kit  | TATAA Biocenter              |

Seznam primerů používaných pro analýzu exprese pomocí real-time PCR. Všechny uvedené primery jsou specifické pro *Bos taurus* (Tur domácí). Primery byly rozpuštěny dle doporučení výrobce a na pracovní koncentraci se ředily 1:10 v RNase a DNase free water.

| Název                 | Forward primer                 | Reverse primer               | Výrobce  |
|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|----------|
| IL-1 $\beta$          | 5'-GAATGGAAACCTCTCTCCC-3'      | 5'-GCTGCAGCTACATTCTTCCC-3'   | Metabion |
| HPRT                  | 5'-CTGGCTCGAGATGTGATGAA-3'     | 5'-CAACAGGTCGGCAAAGAACT-3'   | Metabion |
| IL-6                  | 5'-GTGAAAGCAGCAAGGAGACA-3'     | 5'-ATCCGTCCTTTCTCCATT-3'     | Metabion |
| Kaspáza 4<br>(Casp4)  | 5'-TTCTGTTCTCAACTCCACATAA-3'   | 5'-CAGTGGGCATCTGGGCTTTA-3'   | Metabion |
| Kaspáza 1<br>(Casp 1) | 5'- AATAAATGGCTTGCTGGATGAG -3' | 5'- CCTCCTGGTCCTGAAGATGC -3' | Metabion |
| NLRP3                 | 5'-CTTTCTGGACTCTGACCGGG-3'     | 5'-CTCCATTCTGGCTTTCCG-3'     | Metabion |
| ASC                   | 5'-ATGAAGCTGCTTTCAGTGCC-3'     | 5'-ACAAAGTGCAGTCTGGCTTG-3'   | Metabion |

#### Složení lyzačního pufru RIPA:

| Složení            | Koncentrace | Na 100 mL |
|--------------------|-------------|-----------|
| NaCl               | 150 mM      | 0,8766 g  |
| Tris base          | 50 mM       | 0,6057 g  |
| Triton             | 1 %         | 1 g/ 1 mL |
| SDS                | 0,1 %       | 0,1 g     |
| Sodium deoxycholát | 0,5 %       | 0,5 g     |

pH 8 bylo nastaveno pomocí HCl. Všechny složky lyzačního pufru se rozpustily v 10 % glycerolu.

#### Složení PBS pufru:

Takto složený PBS pufr byl připravován externí firmou. Byl dodán 10x koncentrovanější, v laboratoři se naředil sterilní vodou na 1x koncentrovaný.

| Složení                          | Koncentrace (g/l) |
|----------------------------------|-------------------|
| NaCl                             | 80                |
| KCl                              | 2                 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2                 |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 11,5              |

Složení médií používaných ke kultivaci buněk.

Médium pro fibroblasty:

Telecí fibroblasty se kultivovaly v médiu následujícího složení:

| Složení                    | Zásobní koncentrace | Finální koncentrace | Na 1 l: |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------|
| Destilovaná voda           | -                   | -                   | 176 mL  |
| DMEM 2x bez glukózy        | 2x                  | 1x                  | 500 mL  |
| Glutamin                   | 200 mM              | 4 mM                | 20 mL   |
| Na-pyruvát                 | 100 mM              | 1 mM                | 10 mL   |
| NaHCO <sub>3</sub>         | 7,5g/100 mL         | 3,7g/L              | 49 mL   |
| HEPES                      | 1M                  | 25 mM               | 25 mL   |
| FCS bovine calf            | 100 %               | 10 %                | 100 mL  |
| ATB                        | 100x                | 1x                  | 10 mL   |
| Glukóza                    | 250 mM              | 25 mM               | 100 mL  |
| Neesenciální aminokyseliny | 100x                | 1x                  | 10 mL   |

Médium pro monocyty:

Monocyty izolované z telat byly kultivovány následujícím médiu:

| Složení                                    | Zásobní koncentrace | Finální koncentrace | Na 0,5 l: |
|--|---------------------|---------------------|-----------|
| Destilovaná voda                           | -                   | -                   | 331,5 mL  |
| Na HCO <sub>3</sub>                        | 7,5g/100 mL         | 1,01g/500 mL        | 13,5 mL   |
| RPMI                                       | 5x                  | 1x                  | 100 mL    |
| Penicilin                                  | 100x                | 5x                  | 1 mL      |
| Fetal bovine serum (ošetřené gama zářením) | 100%                | 10%                 | 50 mL     |

Důležitými složkami RPMI je redukovaný L-glutation, hydrogenuhličitan sodný, sodná sůl fenolové červeně a bezvodá D-glukóza (2g/L).

KRH médium:

| Složení                     | Zásobní koncentrace | Finální koncentrace | Na 0,5 l:          |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Chlorid sodný               | -                   | 135 mM              | 3,9445g            |
| Chlorid draselný            | -                   | 3,6 Mm              | 134 mg             |
| HEPES                       | 1M                  | 10 mM               | 5 mL               |
| Chlorid hořečnatý           | -                   | 0,5 mM              | 23,8 mg            |
| Chlorid vápenatý            | -                   | 1,5 mM              | 110,5 mg           |
| Dihydrogenfosforečnan sodný | -                   | 0,5 mM              | 30 mg              |
| Destilovaná voda            | -                   | -                   | Doplnění do 500 mL |
| BSA*                        | -                   | 0,1 % (w/v)         | 0,5 g              |

\*BSA bylo přidáno do média až těsně před použitím

#### 4.2. Použité přístroje a technické vybavení

Zde jsou uvedeny přístroje a vybavení laboratoře používané při experimentech:

| Název   | Výrobce              |
|---|----------------------|
| Oxygraph-2k                                   | Oroboros instruments |
| RF-55301PC Spektrofluorofotometr              | Shimadzu             |
| Centrifuge 5417R                              | Eppendorf            |
| NanoDrop™ One                                 | Thermo Scientific    |
| C1000 Touch Thermal cycler                    | Bio-Rad              |
| CFX Connect™ Real-time system                 | Bio-Rad              |
| SW22 Shaking water bath                       | Julabo               |
| 321 Forma Direct Heat CO Incubator            | Thermo Scientific    |
| Vortex mixer                                  | Stuart               |
| AG204 analytická váha                         | Mettler toledo       |
| BioPhotometer Model #6131                     | Eppendorf            |
| Centrifuga Z 323 K                            | Hermle               |
| Centrifuga Z 306                              | Hermle               |
| Innova 4300 Incubator Shaker                  | New Brunswick        |
| DNA/RNA UV-dekontaminační box UVC/T-AR        | Biosan               |
| LUNA-II™ Automated Cell Counter               | Logos biosystems     |
| CPX 40 Ultrasonic homogenizer                 | Cole Parmer          |
| DM IL LED inverzní mikroskop                  | Leica                |
| HERAsafe KSP 12                               | Thermo electron      |
| Synergy™ HT Multi-detection microplate reader | Biotek instruments   |
| Automatická pipeta Xplorer                    | Eppendorf            |

#### 4.3. Experimentální buňky

Všechny experimenty byly prováděny na kravských/telecích fibroblastech darovaných od spolupracující laboratoře Developmental Lung Biology and CVP Research, Department of Pediatrics and Medicine, University of Colorado Denver. Dále byly používány monocyty získané z krve krav/telat Holštýnského plemene. Krev byla získána na statku České zemědělské univerzity v Novém Strašecí a Rudě. Kravský/telecí model byl vybrán z důvodu lepšího vyvinutí PAH, než je tomu u hlodavců.

Fibroblasty byly izolovány z telat Holštýnského plemene, která byla jeden den po narození umístěná do hypobarické komory, jež simulovala nadmořskou výšku 4 300 m.n.m. Po dvou týdnech v hypobarické komoře byla telata usmrcena. Dva týdny byly dostatečné, aby se u nich rozvinula plicní arteriální hypertenze. Jako kontrolní skupina sloužila telata, která byla chována mimo komoru v 1 500 m.n.m. Detailnější popis je k dispozici v (Stenmark et al., 1987).

Samotné fibroblasty byly izolovány z plic telat, kdy z plic byly vypreparovány pod mikroskopem cévy s maximálním průměrem 1,5 cm. Z těchto cév byla oddělena vrstva tunica externa, která byla přenesena na kultivační misky spolu s MEM médiem. Fibroblasty během 5-7 dní vycestovaly z kousků tkáně na kultivační misku do MEM média. Tkáň byla následně odstraněna. Pod mikroskopem fibroblasty mají charakteristický vzhled a imunocytochemická analýza ukázala malé množství  $\alpha$ -aktinu, což je odlišovalo od buněk hladkého svalstva. Kromě toho byly všechny izolace testovány na následující markery: proliferační (Ki67, CCND1/2, CCNE), antiapoptotické (Bcl2, Birc5), pro-apoptické (PERP) a zánětlivé (MCP1, SDF1, IL6, CSF2, CCL5, CXCR4 a VCAM-1). Podrobnější popis je k dispozici v (Li et al., 2011).

Monocyty byly získávány z krve jalovic Holštýnského dobytka, který byl starý nanejvýše půl roku. Tyto krávy/telata se později využívají jako dojnice, jsou chovány ve stájích a dostávají definovanou stravu a slámu. Krev, ze které se izolovaly monocyty, byla odebrána veterinářem. Po odebrání byla krev rychle dopravena do naší laboratoře, kde laborantka pomocí hustotního gradientu Ficoll-Paque dle protokolu izolovala mononukleární buňky periferní krve. Ty byly přeneseny na kultivační misky a kultivovány přes noc. Další den došlo k oddělení monocytů od ostatních buněk pomocí jejich adherence. V médiu pro monocyty bylo použito kraví/telecí sérum, jež bylo ozářeno gama zářením, aby se neutralizovaly patogeny (zejména viry), které by mohly způsobit aktivaci mononukleárních buněk krve. Monocyty byly ihned spotřebovány na pokusy z důvodu krátké životnosti.

Fibroblasty byly kultivovány na kultivačních lahvích a Petriho miskách o standardních velikostech (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 150 cm<sup>2</sup>) v 5 % CO<sub>2</sub> atmosféře při 37°C. Buňky dodané spolupracující laboratoří byly v pasážích 4-8. U nás byly dále pasážovány maximálně do 6. pasáže, tak aby nebyla překročena celková 10. pasáž, do které telecí fibroblasty mají stabilní prozánětlivý fenotyp. Fibroblasty z telat s PAH (dále jen PAH fibs), jež jsme používali, byly od čtyř různých telat s interním označením PH Fibs 141, PH Fibs 143, PH Fibs 212 a PH Fibs 213. Kontrolní fibroblasty (dále označovány jako CO Fibs) pocházející ze zdravých telat byly od dvou různých krav s označením CO Fibs 198 a CO Fibs 207. Pro pasážování a udržování kultury se používalo médium popsané výše. Pro oplach buněk se používal pufr PBS a pro oddělení buněk od kultivačních lahví/misek se aplikoval 0,5 % roztok trypsinu.

## 4.4. Metody

### 4.4.1. Izolace RNA

Pro izolaci RNA byly fibroblasty vysety na misky o velikosti 60 mm. Před samotnou izolací bylo odsáto médium a poté byl přidán lyzující pufr RLT ze soupravy RNeasy Mini Kit v objemu 350  $\mu$ L. Po důkladném oplachu mističky byla směs přendána do mikrozkušavky, kde byla smíchána se stejným objemem 70 % ethanolu. Poté následovalo přenesení roztoku na izolační kolonku a dále bylo postupováno dle návodu výrobce. Bezprostředně po izolaci se měřila celková koncentrace RNA na přístroji NanoDrop. RNA se poté uchovávala v  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Monocyty byly izolovány stejným principem. Jediný rozdíl spočíval v přípravě buněk před lýzí, neboť většinou byly vysety na velkém povrchu. Buňky byly zbaveny kultivačního média, opláchnuty PBS a po dobu pěti minut byly vystaveny působení trypsinu, jehož reakce byla poté zastavena přidáním média. Takto byly buňky přendány do falkony a následovalo stočení při 200 g na 5 minut v centrifuze při pokojové teplotě. Načež byl supernatant odsán a přidán lyzační pufr v objemu 350  $\mu$ L a dále bylo postupováno jako při izolaci RNA u fibroblastů.

### 4.4.2. Přepis RNA do cDNA

Před přepisem RNA do cDNA byla ustanovena koncentrace RNA na 200 ng/ $\mu$ L, čehož se dosáhlo pomocí ředění konkrétního objemu RNA RNase-free water. Poté byla připravena směs pro samotný přepis cDNA, která obsahovala 5  $\mu$ L RNA roztoku, 2,5  $\mu$ L RNase-free water, 2  $\mu$ L pufru a 0,5  $\mu$ L reverzní transkriptázy. Takto hotová směs v celkovém objemu 10  $\mu$ L byla vložena do termocykleru dle protokolu:  $22^{\circ}\text{C}/5$  minut,  $42^{\circ}\text{C}/45$  minut,  $85^{\circ}\text{C}/5$  minut a  $6^{\circ}\text{C}/\infty$ . Před použitím byla cDNA naředěna 30  $\mu$ L roztoku vody a pufru Forget-me-not™ 40X template v poměru 5:1. cDNA byla takto skladována v mrazáku při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 4.4.3. Real-time PCR

Real-time PCR (RT-PCR) metoda byla použita pro ověřování a stanovení relativního množství RNA v buňkách. Pro měření se používaly 96 jamkové destičky. Každý sledovaný gen se analyzoval v duplikátu. Reakční směs pro RT-PCR se skládala z 5  $\mu$ L Eva Green® Dye, 2  $\mu$ L naředěné cDNA, 1,4  $\mu$ L RNase-free water, 0,8  $\mu$ L reverse primerů a 0,8  $\mu$ L forward primerů. V jedné jamce byl výsledný objem 10  $\mu$ L. Po nanesení všech vzorků na destičku byla destička přikryta ochranou folií a vložena do centrifugy na 1 minutu při 900 g. Poté byla destička se vzorky přesunuta do RT-cykleru a byl spuštěn následující protokol: preinkubace ( $95^{\circ}\text{C}/3$  minuty), 50x cyklus amplifikace dle schématu  $95^{\circ}\text{C}/7$  sekund,  $59,5^{\circ}\text{C}$  10 sekund,  $72^{\circ}\text{C}$  15 sekund a jeden cyklus tání (melting curve) ( $95^{\circ}\text{C}/10$  sekund, snížení na  $65^{\circ}\text{C}$  a postupné zvyšování o  $0,5^{\circ}\text{C}$  po dobu 4 sekund až na  $95^{\circ}\text{C}$ ). Výsledky byly zpracovány v programu Bio-Rad CFX Maestro a relativní genová exprese byla vyhodnocena pomocí  $\Delta\Delta\text{Ct}$  metody. Jako referenční gen byl použit HPRT (Hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferáza).

#### 4.4.4. Izolace proteinů a měření jeho koncentrace

Od buněk určených k izolaci proteinu se odsálo médium a byly opláchnuty dostatečným množstvím PBS. Poté byly přidány 4 mL PBS a celá miska se seškrabe. Vzniklá suspenze se přenesse do falkony a stočí se 5 minut na 400 g, 4°C. Supernatant se odsaje a peleta se rozpustí v 0,5 mL PBS. Výsledná směs se přenesse do mikrozkušavky. Ta se opět stočí ve vychlazené centrifuze na 5 minut. Supernatant se odsaje a peleta se rozpustí v 150 µL lyzačního pufru RIPA s přidavkem 1 mM PMSF, jež inhibuje serinové proteázy. Buňky se nechají lyzovat 30 minut na ledu. Naposledy dojde ke stočení na 10 minut při 11 000 g, 4°C. Následně se odebere supernatant, který obsahuje proteiny. Z tohoto se odebere 10 µL do další mikrozkušavky a naředí se 2-3krát RIPA. Tento naředěný roztok poslouží k zjištění celkové koncentrace proteinu. Takto připravený lyzát se uchovává při -20°C.

Celková koncentrace proteinu byla stanovována pomocí metody BCA. Metoda je založena na reakci sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA) s měděnými ionty ( $\text{Cu}^+$ ), které se tvoří po reakci peptidové vazby s  $\text{Cu}^{2+}$ . Při reakci BCA s  $\text{Cu}^+$  dochází ke vzniku barevené sraženiny. Jako standard pro vytvoření kalibrační křivky byl použit BSA (bovinní sérový albumin). Standardy a vzorky byly měřeny na spektrofotometru při 562 nm. Pro měření byl použit 1 mL roztoku obsahující 880 µL roztoku BCA, 10 µL roztoku proteinu, 20 µL 4% roztoku  $\text{CuSO}_4$  a 90 µL destilované vody.

#### 4.4.5. Precipitace proteinů pomocí síranu amonného

K zahuštění médií vystavených buňkám byla použita metoda vysolování pomocí síranu amonného. Nasycený roztok síranu amonného byl připraven (pro 25 mL se použije 20 mL  $\text{H}_2\text{O}$  a 15,12 g  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ) ve 4°C. Samotné srážení média probíhalo dvakrát. Poprvé se k 10 mL média za stálého míchání přiléal nasycený roztok, aby výsledná saturace byla 40 %. 40% roztok se nechal 1 hodinu na ledu srážet. Poté se stočil 30 minut, 4 °C. Odebral se supernatant, ke kterému se přidal opět nasycený roztok. Tentokrát byla výsledná saturace 75 %. Takto se nechal roztok přes noc v lednici při 4 °C a další den došlo ke stočení 30 minut, 4 °C. Tentokrát se supernatant odebral a peleta se rozpustila v 0,5 mL pufru pro ELISU. Výsledná saturace 75 % byla zvolena podle doporučení článku (Wingfield, 1998).

#### 4.4.6. ELISA IL-1 $\beta$ /IL-6

Vzorky pro měření byly naředěny na stejnou koncentraci pomocí RIPA lyzačního pufru. Poté byly ředěny ještě 3x pomocí ředícího pufru, který byl vyroben dle protokolu od výrobce. Dále bylo postupováno krok za krokem podle protokolu. Vyhodnocení probíhalo na destičkovém spektrofotometru při vlnové délce 450 nm a 550 nm. Pro vyhodnocení dat byl použit program

CurveExpert 1.4 pro nalezení nejvhodnějšího modelu funkční závislosti. Postup při měření IL-1 $\beta$  a IL-6 byl stejný, kromě koncentrace standardů. Nejvyšší koncentrace pro IL-1- $\beta$  byla 2 000 pg/mL a pro IL-6 5 000 pg/mL. Kalibrace pobíhala podle dělicí řady 1:1, kdy bylo provedeno sedm ředění.

#### 4.4.7. Stanovení aktivity kaspázy

Měření aktivity kaspázy 1 probíhalo pomocí kitu Caspase-Glo<sup>®</sup> 1 Inflammasome Assay. Tento kit je založen na principu štěpení specifické sekvence enzymem kaspázou 1. Jako substrát je v tomto kitu použit Z-WEHD-aminoluciferin, jež se váže do aktivního místa kaspázy 1 a je štěpen za vzniku aminoluciferinu, který je substrátem pro luciferin a dochází ke vzniku luminiscence. Nespecifickému štěpení substrátu je zabráněno přidáním inhibitoru MG-132, jež eliminuje štěpení pomocí proteasomů. Aby bylo zcela zřejmé, že substrát štěpí kaspáza 1, používá se k ověření její inhibitor Ac-YVAD-CHO. K soupravě byl přikoupen PAN inhibitor kaspázy, který inhibuje všechny savčí kaspázy. Vlastní příprava a měření byly prováděny podle protokolu dodaného výrobcem (konkrétně 4.A. – protokol pro měření aktivity kaspázy-1 v kultivovaných buňkách). Po optimalizaci jsme se rozhodli, že ideální počet buněk pro naše měření je 100 000 buněk na jamku. Pokus probíhal na 96 jamkové destičce a luminiscence byla měřena po 60 a 90 minutách.

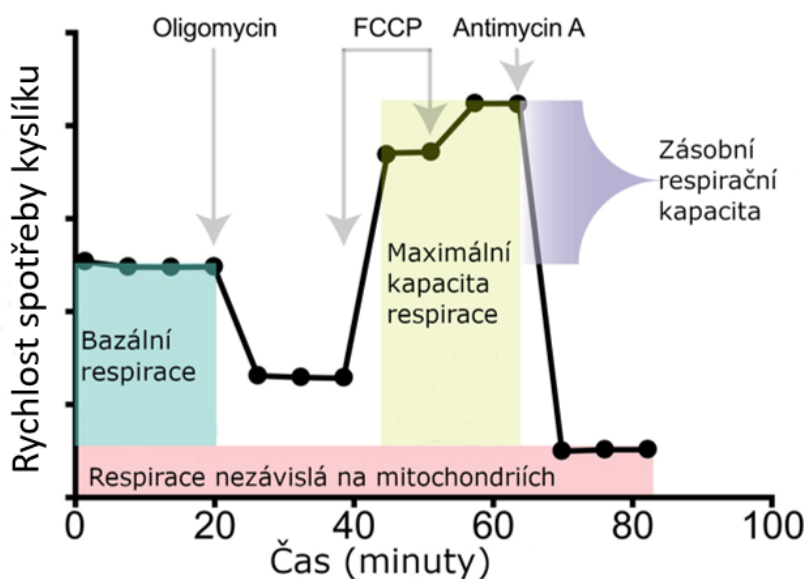
#### 4.4.8. Detekce ROS

Pro měření přítomnosti ROS v buňkách jsme zvolili fluorescenční indikátor DCF (2,7-dichlorodihydrofluorescein). DCF může být oxidován pomocí hydroxylových radikálů, peroxidáz a peroxynitritu na vysoce fluorescenční produkt. Buňky byly rozpuštěny v médiu KRH tak, aby koncentrace byla 1 milion buněk na 1 mL. K 1 mL KRH s buňkami bylo přidáno 1  $\mu$ L DCF a takto se to inkubovalo 15 minut při 37°C a tmě. Pak se buňky obarvené DFC stočily na 200 g po dobu 5 minut. Supernatant se odlil a buňky byly rozpuštěny v 700  $\mu$ L KRH. Takto byly buňky připraveny na měření v spektrofotometru (Ex = 490 nm, Em = 520 nm).

#### 4.4.9. Respirometrie

Oxygraf je přístroj s citlivým kyslíkovým senzorem, pomocí kterého je možné přesně sledovat v reálném čase stav oxidativního metabolismu. Pro pokus byly připraveny buňky s ideální koncentrací 1 milion buněk na 1 mililitr média pro fibroblasty. Do měřicí komůrky byly přidány 2 mL buněčné suspenze v médiu. Schéma pokusu s oxygrafem bylo stejné jako na obrázku 6, kdy se přidával oligomycin ve výsledné koncentraci 5 nM, jež inhibuje ATP syntázu a blokuje protonovou pumpu. Po ustálení se buňky titrovaly dostatečným množstvím FCCP, který působí jako iontofor a pomáhá přenášet protony přes vnitřní membránu mitochondrie do jejího matrix. Pokud už

spotřeba kyslíku nemohla dál růst, byl zastaven elektron-transportní řetězec pomocí antimycinu A ve výsledné koncentraci 2,5 nM, jež se váže na komplex III.



**Obrázek 6 – schéma měření mitochondriální respirace.** Při klidovém stavu odpovídá křivka vlevo bazální respiraci. Po přidání oligomycinu, který inhibuje ATP syntázu dochází k poklesu bazální respirace. Po titraci iontoforem (například FCCP) dochází ke zvyšování rychlosti spotřeby kyslíku. Když se dosáhne maximálního bodu titrace, tak to značí maximální možnou kapacitu respirace. Po zastavení dýchacího řetězce antimycinem A dochází k poklesu spotřeby kyslíku na úroveň značící respiraci, která není závislá na mitochondriích. Převzato a upraveno: (Sercel et al., 2021)

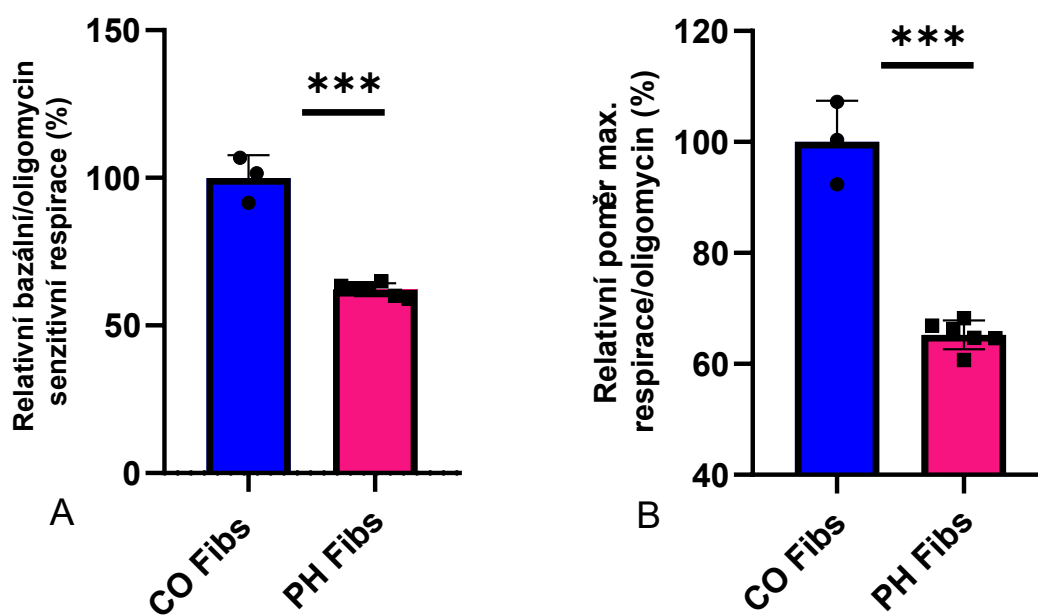
#### 4.5. Použitý software a statistická analýza

Výsledky byly zpracovány ve statistickém programu GraphPad Prism 8.0.1. K dílčím výpočtům byl používán Microsoft Excel 365. Pro hodnocení modelu funkční závislosti byl využit CurveExpert 1.4. K výpočtu statisticky významných rozdílů byl použit nepárový t-test, jež zpracoval GraphPad Prism. Měření byla považována za statisticky významná, pokud byla signifikance  $p < 0,05$ . Konkrétně značíme: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5. Výsledky

### 5.1. Analýza energetického metabolismu u kontrolních a PAH telecích plicních fibroblastů

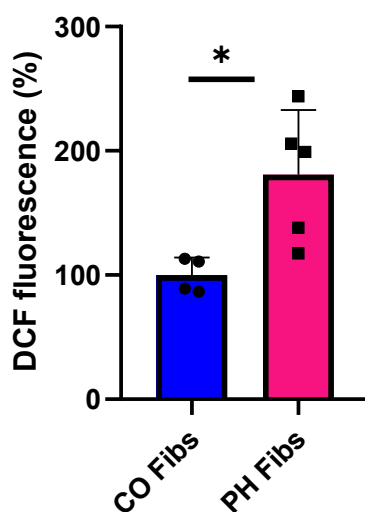
V rychle dělících se buňkách dochází k Warburgovu efektu, který zahrnuje přechod energetického metabolismu směrem k anaerobní glykolýze. Na řadě buněčných typů a v různých živočišných modelech PAH bylo dokázáno, že u nich dochází k Warburgovu efektu (Marsboom, Wietholt, et al., 2012). Toto pozorování jsme se rozhodli též ověřit u našeho modelu telecích fibroblastů, u kterých jsme předpokládali, že PH Fibs budou mít sníženou výkonnost mitochondriálního metabolismu. Poměr relativní bazální respirace ku oligomycin senzitivní respiraci byl u PH Fibs nižší o  $37,9 \pm 3,1$  % (Obrázek 7A) a maximální respirace byla o  $34,77 \pm 3,213$  % nižší (Obrázek 7B). Je tedy patrné, že PH Fibs využívají méně oxidativní fosforylaci.



**Obrázek 7 – Analýza mitochondriální respirace.** Obrázek A ukazuje analýzu aktivity mitochondriální oxidativní fosforylace, kde oligomycin inhibuje ATP syntázu. To se projevuje snížením endogenní respirace. Obrázek B ukazuje maximální kapacitu respirace, tedy poměr odpřažení (pomocí FCCP) u CO/PH Fibs ku inhibované ATP syntáze pomocí oligomycinu. Nemitochondriální respirace, stanovená inhibicí komplexu III (pomocí antimycinu A), byla nejprve odečtena. Pro CO Fibs  $n=3$ , pro PH fibs  $n=6$ . \*\*\* $p<0,001$

## 5.2. Produkce reaktivních kyslíkových forem (ROS) v telecích plicních fibroblastech kontrolních a PAH zvířat

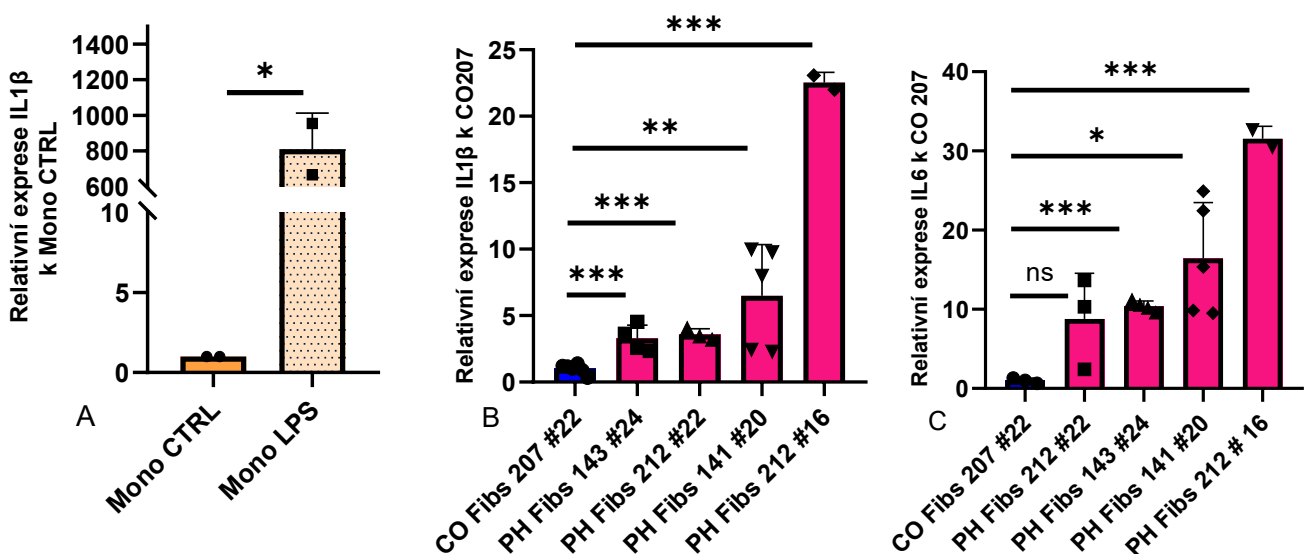
V důsledku inhibice některých komplexů respiračního řetězce mitochondrií a zvýšené aktivity NOX4 v cytosolu dochází ve fibroblastech postižených PAH ke zvýšení ROS (Plecitá-Hlavatá et al., 2016). Proto jsme chtěli ověřit, jestli to platí i v našich telecích fibroblastech. K měření byly použity CO a PH Fibs, které se obarvily DCF. Z obrázku 8 je patrné, že PH Fibs mají signifikantně zvýšenou hladinu ROS oproti zdravým CO Fibs. Konkrétně se jedná v průměru o  $80,89 \pm 27,05$  % více ROS než u CO Fibs.



**Obrázek 8 – Analýza hladiny ROS v telecích fibroblastech.** Na grafu je procentuální vyjádření směrnice přírůstku fluorescence pocházející z ROS v čase. Pro CO Fibs  $n=4$ , pro PH Fibs  $n=5$ . \* $p<0,05$ .

### 5.3. Porovnání exprese mRNA interleukinu 1 $\beta$ a interleukinu 6 v plicních fibroblastech

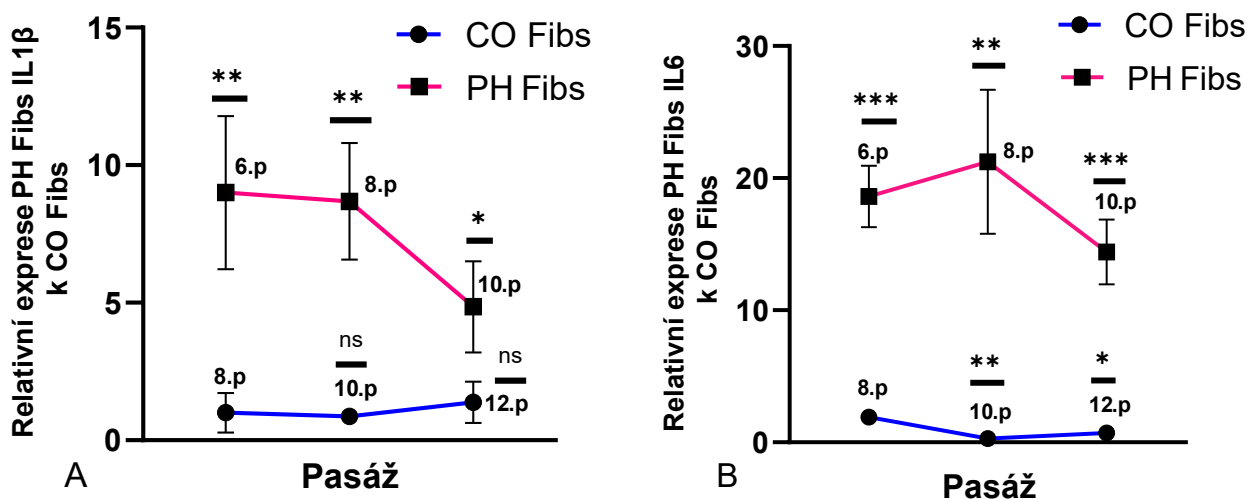
U buněk imunitního systému (například monocyty/makrofágy) je známo, že zvýšená úroveň ROS vede k aktivaci inflamazómu a produkci IL-1 $\beta$  (van de Veerdonk et al., 2010). Zajímalo nás, zdali zvýšená produkce ROS, kterou jsme pozorovali u PH Fibs taktéž povede k aktivaci cytokinu IL-1 $\beta$  u buněk neimunitního systému. Jako pozitivní kontrolu k IL-1 $\beta$  jsme si vybrali jiný prozánětlivý cytokin, IL-6, jehož exprese byla potvrzena v plicních fibroblastech nejen telat dříve (el Kasmí et al., 2014). Jelikož plicní fibroblasty jsou buňky neimunitní povahy a exprese případných cytokinů může být nízká, tak jsme do experimentů zařadili též telecí monocyty izolované z krve telat, které jsme aktivovali k zánětu pomocí lipopolysacharidu a nigericinu. To nám posloužilo jako pozitivní kontrola. Z výsledků vyplývá, že monocyty ošetřeny LPS s nigericinem mají vysoký nárůst exprese IL-1 $\beta$ , konkrétně  $809 \pm 144$ násobný (Obrázek 3A). Hodnoty jsou vztaženy vůči relativní expresi IL-1 $\beta$  kontrolních monocytů (vzhledem k referenčnímu genu HPRT). Používané šarže PH Fibs (pocházejících ze 3 různých PAH telat) mají na úrovni mRNA signifikantně zvýšenou expresi IL-1 $\beta$ , ale různou měrou (Obrázek 9B). Nejmenší nárůst exprese IL-1 $\beta$  u PH Fibs byl zaznamenán u šarže PH Fibs 143 #24 ( $3,5 \pm 0,3$ krát), zatímco nejvyšší nárůst exprese byl nalezen u PH Fibs 212 #16 ( $22,53 \pm 0,4$ krát). Pokud bychom porovnávali telecí monocyty ošetřené LPS s nigericinem (inkubováno 6h LPS, 3h nigericin) oproti neimunitním PH Fibs, tak bychom zjistili, že monocyty mají  $1746 \pm 311$ násobný nárůst exprese IL-1 $\beta$ . mRNA kvantifikace IL-6 ukázala signifikantní rozdíly (kromě jedné šarže buněk PH Fibs) mezi CO a PH Fibs (Obrázek 9C). Největší rozdíl vykazovala šarže PH Fibs 212 #16, která měla  $31,56 \pm 0,8$ násobný nárůst exprese a nejmenší signifikantní nárůst byl  $9,32 \pm 0,5$ krát.



**Obrázek 9 – Relativní exprese mRNA IL-1 $\beta$  a IL-6 u telecích buněk plicních fibroblastů a monocytů. A představuje relativní expresi mRNA IL-1 $\beta$  v monocytech, B expresi IL-1 $\beta$  v CO a PH Fibs, C expresi IL-6 v CO a PH Fibs. n=2-5, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,00**

#### 5.4. Ověření prozánětlivého fenotypu PH a CO fibroblastů

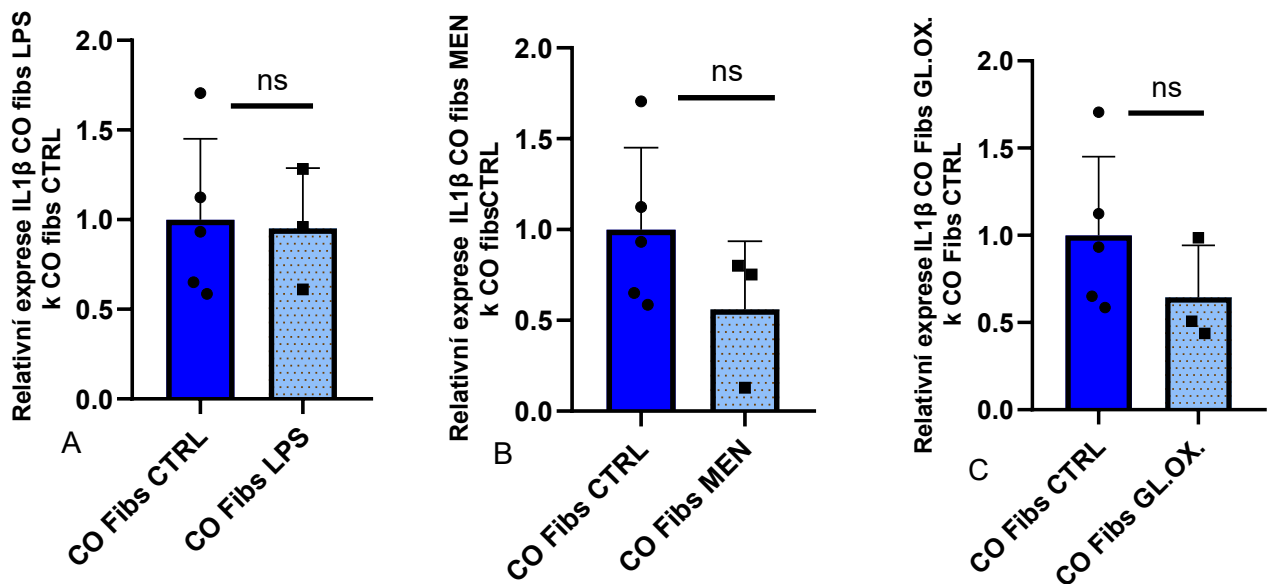
Jelikož jsme buňky plicních fibroblastů pěstovali in vitro několik pasáží v odlišných podmínkách od in vivo, analyzovali jsme jejich fenotyp z hlediska exprese vybraných cytokinů v čase in vitro kultivace. Pro ověření dlouhodobého prozánětlivého fenotypu PH Fibs jsme si náhodně vybrali PH Fibs 143 #24 v 5. pasáži. Jako kontrolu jsme vybrali CO 207 #22 v 7. pasáži, které byly v této práci používány nejvíce. Ověření probíhalo pomocí genů pro IL-1 $\beta$  (Obrázek 10A) a IL-6 (Obrázek 10B). Po rozmrazení buněk jsme provedli u 3 různých pasáží odběry vzorků na izolaci RNA. Buňky se kultivovaly celkem po dobu 23 dní ve výše popsanych podmínkách. Je vidět, že prozánětlivý fenotyp u PH Fibs telat se udržuje do deklarované maximální 10. pasáže (Li et al., 2011) u obou cytokinů, přičemž u CO Fibs je tento fenotyp stabilnější (Obrázek 10).

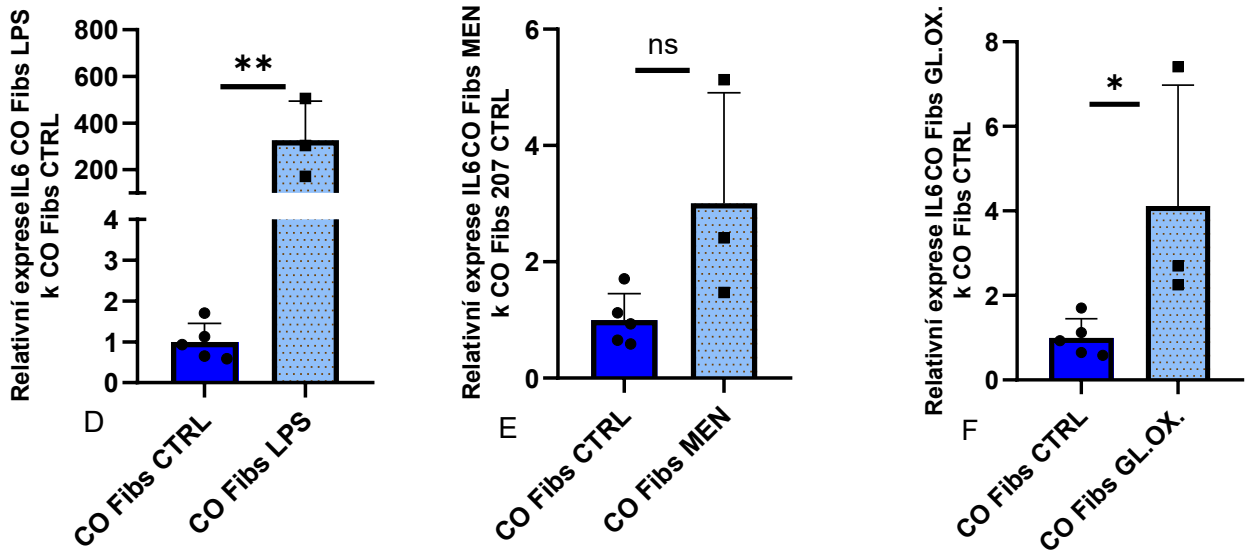


**Obrázek 10 – Ověření prozánětlivého fenotypu PH Fibs v in vitro podmínkách kultivace.** Graf A/B představuje zachycení exprese IL-1 $\beta$  (A) a IL-6 (B) v různých pasážích. Body jsou vztaheny na 8.p CO Fibs u jednotlivých cytokinů vzhledem k referenčnímu genu HPRT. n=3. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

### 5.5. Vliv oxidačních činidel na expresi mRNA IL-1 $\beta$ a IL-6

Jelikož v PH Fibs je signifikantně zvýšená hladina ROS a exprese mRNA IL-1 $\beta$  oproti CO Fibs, rozhodli jsme se napodobit oxidační prostředí v CO Fibs a sledovat vliv oxidačního prostředí na expresi prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-6. Pro simulaci mírného oxidačního stresu jsme si vybrali látku menadion a enzym glukóza-oxidázu, které jsou schopné tvořit superoxid/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pro výběr nejvhodnější koncentrace pro tvorbu oxidačního prostředí byl použit test viability buněk. Buňky byly vystaveny různým koncentracím oxidačních činidel po dobu 6h. Jako nejvhodnější koncentrace se ukázala 0,5  $\mu$ M koncentrace mednadionu při viabilitě 90 % a 50  $\mu$ U koncentrace glukóza-oxidázy při 81 % viabilitě buněk. Jako pozitivní kontrola nám sloužily CO Fibs ošetřené LPS a nigericinem. U buněk ošetřených LPS s nigericinem dochází též mimo jiné k aktivaci produkce ROS (Qin et al., 2005). K nárustu exprese došlo u IL-6 po aktivaci glukózo-oxidázy (Obrázek 11F) a LPS s nigericinem (Obrázek 11D), nesignifikantně u kultivace s menadionem (Obrázek 11E). Na IL-1 $\beta$  expresi neměla oxidační činidla vliv (Obrázek 11A,B,C).



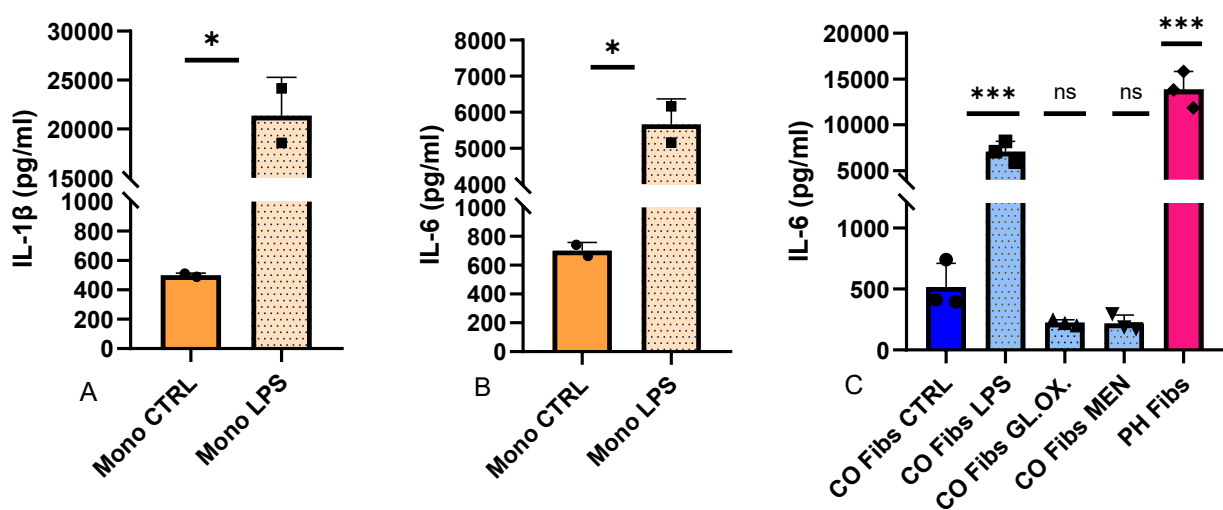


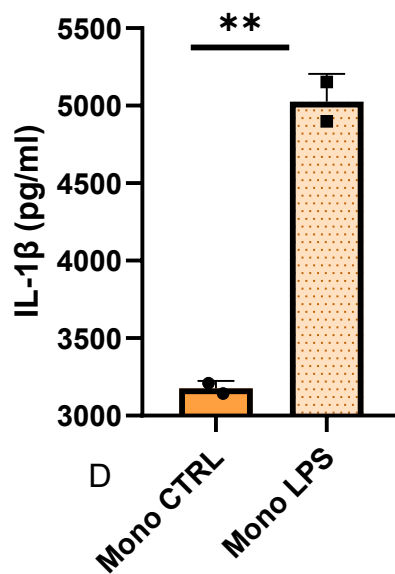
**Obrazek 11 – vliv prooxidačního prostředí na CO Fibs expresi IL-1 $\beta$  a IL-6.** A, B, C: Expresa mRNA IL-1 $\beta$  po vystavení: A LPS a nigericinu, B menadionu, C glukózo-oxidáze. D, E, F: Expresa mRNA IL-6 po vystavení: D LPS a nigericinu, E menadionu, F glukózo-oxidáze. LPS (lipopolysacharid + nigericin), MEN (menadion), GL.OX. (glukóza-oxidáza). n=3-5, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## 5.6. Kvantifikace exprese proteinu IL-1 $\beta$ a IL-6 u plicních fibroblastů

Signifikantní zvýšení hladiny mRNA u PH Fibs indikovalo možnost, že PH Fibs mohou produkovat IL-1 $\beta$  ve formě proteinu. Tento předpoklad jsme testovali pomocí ELISA testu, který váže jak pre-formu, tak maturovanou formu IL-1 $\beta$ . Bohužel jsme nemohli kvantifikovat protein imunochemicky pomocí proteinové elektroforézy, neboť nejsou dostupné vhodné komerční specifické protilátky proti telecímu IL-1 $\beta$  a IL-6 proteinu. U telecích monocytů jsme detekovali v průměru 36násobný nárůst produkce proteinu IL-1 $\beta$  (Obrázek 12A) a 9násobný nárůst u IL-6 po aplikaci LPS a nigericinu (Obrázek 12B). U CO a PH Fibs se nám nepodařilo detekovat IL-1 $\beta$ , pro který byly hodnoty měření pod detekční hranicí, a data tedy nejsou ukázána. U exprese IL-6 je signifikantní nárůst u PH Fibs a CO Fibs ošetřených LPS s nigericinem oproti CO Fibs (Obrázek 12C). Bohužel nesignifikantní efekt na expresi IL-6 měly oxidační činidla menadion a glukóza-oxidáza (Obrázek 12C).

Po zjištění, že nejsme schopni detekovat IL-1 $\beta$  v CO a PH Fibs v lyzátu buněk (ani po aplikaci inhibitoru vnitrobuněčného transportu), jsme se pokusili detekovat IL-1 $\beta$  v roztoku sražených proteinů ze zakoncentrovaného média, protože maturovaná forma IL-1 $\beta$  by mohla být rychle exportována z buňky ven a nezůstávala by v množství dostatečném pro detekci uvnitř buňky. U telecích monocytů jsme byli schopni detekovat protein IL-1 $\beta$  ze sražených proteinů z jejich zakoncentrovaného média a nárůst exprese IL-1 $\beta$  po přidání LPS s nigericinem (Obrázek 12D). Ovšem nepodařilo se nám detekovat protein v mediu, ve kterém jsme kultivovali PH Fibs (Data nejsou ukázána).

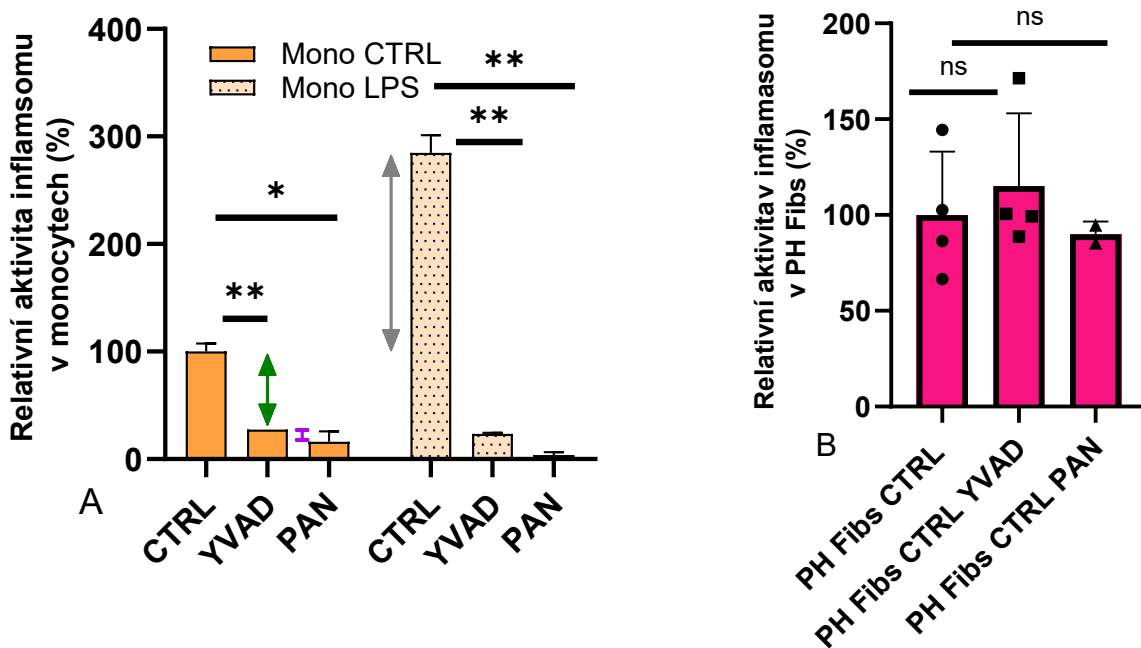




**Obrázek 12 – Kvantifikace proteinu IL-1β a IL-6.** A, B: Expres IL-1β a IL-6 v lyzátu u kontrolních a LPS s nigericinem ošetřených telecích monocytů. C: Expres IL-6 v lyzátu u CO Fibs ošetřených LPS s nigericinem, Menadionem a glukózo-oxidázou a PH Fibs. Všechny buněčné typy byly vystaveny LPS a oxidačním činidlům po dobu 16h. Hodnoty signifikance jsou vztaženy k CO Fibs CTRL. D: Expres IL-1β v roztoku proteinů ze zakoncentrovaného média z kontrolních monocytů a monocytů ošetřených LPS a nigericinem. Médium bylo vystaveno buňkám po dobu 24h. Výsledky jsou vztaženy na mg/mL proteinu. n=2-4, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

## 5.7. Měření aktivity inflamazómu u plicních fibroblastů

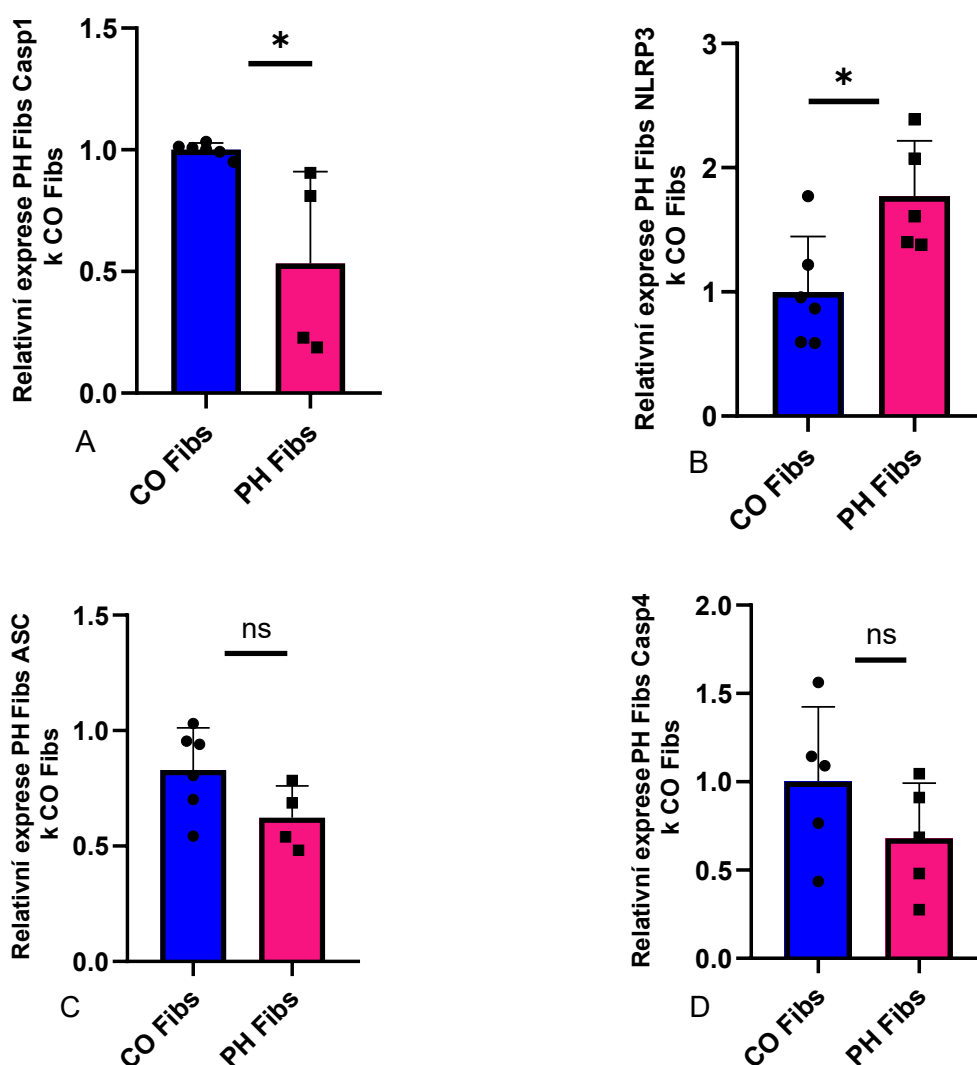
I když jsme nebyli schopni detekovat IL-1 $\beta$  protein v lyzátu ani v médiu telecích CO/PH Fibs, pokusili jsme se zjistit, zda PH Fibs mají aktivní inflamazóm, který by byl schopný štěpit proformu proteinu. Inflamazóm je po úspěšném složení schopný štěpit substrát (zde proformu IL-1 $\beta$  či IL-18), který tím aktivuje. Tohoto je možné využít v detekci jeho aktivity, kdy mu je podán specifický substrát, který po rozštěpení vyzařuje detekovatelné záření. Z výsledků na Obrázku 13A je patrné, že kontrolní telecí monocyty mají aktivní inflamazóm obsahující kaspázu 1. Míra aktivity inflamazómu obsahujícího kaspázu 1 je v průměru 72,44 %  $\pm$  5,2 (YVAD inhibitor v Obrázku 13A – znázorněno zelenou šipkou). Jiný typ/typy kaspázy štěpí 11,23 %  $\pm$  6,81 substrát (PAN inhibitor v Obrázku 13A – znázorněno fialovou šipkou). Po přidání LPS k telecím monocytům dochází k nárůstu aktivity inflamazómu v průměru o 268,5 %  $\pm$  13,37 (Obrázek 13A – znázorněno šedou šipkou). U PH Fibs je patrné štěpení produktu, tedy zdánlivá aktivita inflamazómu, ale jelikož nedojde k snížení štěpení po aplikaci inhibitorů, nelze tuto aktivitu považovat za aktivitu inflamazómu (Obrázek 13B).



**Obrázek 13 – Aktivita inflamazómu.** Obrázek A popisuje relativní aktivitu inflamazómu v monocytech. Kontrolní monocyty (CTRL) mají aktivitu inflamazómu, která je uvedena jako 100 % a k této hodnotě je vztažena hodnota aktivity po přidání YVAD (specifický inhibitor kaspázy 1) nebo PAN (nespecifický inhibitor kaspáz) kaspázového inhibitoru. Po těchto dvou inhibitech by měla aktivita inflamazómu klesnout buď specificky ke kaspáze 1 (YVAD) nebo nespecificky (PAN). Hodnota monocytů kultivovaných s LPS a nigericinem 6 hodin (Mono LPS CTRL) byla též vztažena ke kontrolním monocytům (Mono CTRL). Graf B představuje měření aktivity inflamazómu u PH Fibs.  $n=2-4$ , \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

## 5.8. Porovnání exprese mRNA komponent inflamazómu v plicních fibroblastech

Ačkoliv jsme nebyli schopni detekovat IL-1 $\beta$  protein v lyzátech ani v zakoncentrovaném médiu telecích CO/PH Fibs, pokusili jsme se ověřit přítomnost podjednotek inflamazómu u těchto buněk. Zaměřili jsme se na expresi komponent inflamazómu (kaspáza 1, kaspáza 4, ASC, NLRP3), jež jsou nezbytné k produkci aktivní formy IL-1 $\beta$ . Nekanonická kaspáza 4 byla vybrána jako alternativa ke kaspáze 1, protože bylo dokázáno, že kravské stromální fibroblasty pomocí ní produkují aktivní IL-1 $\beta$  (Kelly et al., 2019). U PH Fibs došlo k signifikantnímu nárůstu exprese NLRP3 (Obrázek 14B) avšak překvapivě k signifikantnímu poklesu kaspázy 1 (Obrázek 14A). Exprese ASC a kaspázy 4 nevykazovaly změnu oproti CO Fibs (Obrázek 14C,D).



**Obrázek 14 – exprese mRNA komponent inflamazómu.** Exprese mRNA je vždy vztažena k CO Fibs. Pro A, B, C  $n=2$  a pro D  $n=5$ .

## 6. Diskuse

V této práci jsme potvrdili, že fibroblasty postižené PAH mají změněný metabolismus, který se posouvá směrem ke glykolýze a laktátové produkci, a že oproti zdravým buňkám produkují více ROS. Jsou schopné na úrovni mRNA produkovat IL-1 $\beta$ , ale nezachytili jsme expresi na úrovni proteinu, ani se nám nepodařilo zachytit aktivitu inflamazómu.

V naší práci jsme se zaměřili na studium inflamazómu u neimunitních buněk – plicních fibroblastů. Inflamazóm je typicky spojován s imunitními buňkami vrozené imunity, které byly vystaveny patogenům a jejich toxinům. Ale nyní, přesně 20 let (Martinon et al., 2002) od jeho objevení, se postupně ukazuje, že exprese není vázána jen na imunitní buňky, ale i na buňky neimunitní povahy, ve kterých může být aktivován pomocí i nepatogenních stimulů. Produkce IL-1 $\beta$  byla potvrzena na modelu krysích a lidských  $\beta$  buněk postižených diabetem II typu, které jsou vystaveny buněčnému stresu (Oslowski et al., 2012). Částečně nekanonická exprese inflamazómu se potvrdila u řady buněčných typů v kravské děloze postižené endometriózou. Endometriální buňky exprimovaly NLRP3, ASC a kaspázu 4, což vedlo k produkci IL-1 $\beta$  (Kelly et al., 2019). Je zřejmé, že výskyt inflamazómu v neimunitních buňkách není závislý jen na živočišném druhu a buněčném typu, ale půjde při dostatečné stimulaci o „běžnou“ reakci buňky. Aktivace produkce IL-1 $\beta$  v neimunitních buňkách započne jejich pro-inflamatorní stav (Rider et al., 2011), který může vést k rozvoji lokálního zánětu a aktivování rezidentních imunitních buněk dané tkáně (v plicích cévách se jedná hlavně o makrofágy). Aktivace rezidentních buněk vede k dalšímu náboru cirkulujících imunitních buněk. Po aktivaci dochází k přechodu ke glykolýze a laktátové produkci, která zahrnuje i zvýšenou produkci ROS (S. Wang et al., 2019). Produkce ROS v imunitních a neimunitních buňkách se považuje za důležitý prvek v aktivaci NLRP3 inflamazómu, ale přesný zdroj ROS aktivující inflamazóm není znám (Long et al., 2020). Jako možný zdroj by se mohla nabízet rodina NOX. Po aktivaci lidských makrofágů patogenem nebo jejich produktem (například bakteriálním produktem LPS) dojde k již zmíněnému metabolickému posunu směrem ke glykolýze a aktivaci HIF1 $\alpha$  (Tannahill et al., 2013). Pokud se těmto aktivovaným makrofágům zablokuje glykolýza, tak dojde k zastavení produkce IL-1 $\beta$ , ale už ne ostatních prozánětlivých cytokinů (Tannahill et al., 2013). To naznačuje důležitost metabolického posunu v aktivaci inflamazómu a produkci IL-1 $\beta$ . V modelu PAH kravských fibroblastů bylo v předchozích studiích dokázáno, že produkují IL-1 $\beta$  na úrovni mRNA i proteinu (in situ na imunohistochemickém barvení IL-1 $\beta$  v cévním preparátu postižených plic) (Li et al., 2011), mají posunutý metabolismus směrem ke glykolýze (Plecitá-Hlavatá et al., 2016) a změněnou produkci ROS (Li et al., 2016), což by mohlo indikovat aktivní inflamazóm v kravských fibroblastech

postižených PAH. Tento předpoklad inicioval naši hypotézu o možném vlivu ROS na aktivaci inflamazómu u plicních fibroblastů z telat nemocných PAH.

Potvrdili jsme podle očekávání, že na úrovni mRNA mají PH plicní fibroblasty signifikantně zvýšenou expresi IL-1 $\beta$  ve srovnání s kontrolními CO plicními fibroblasty, což je minimální předpoklad pro detekci inflamazómu. Jak PH fibroblasty, tak CO fibroblasty si udržují stabilní fenotyp detekovaný na mRNA IL-1 $\beta$  a IL-6 in vitro. Konkrétně do 10. pasáže in vitro kultivace si PH fibroblasty udržovaly signifikantně vyšší expresi IL-1 $\beta$  a IL-6. Poté je již patrná jistá dediferenciace v ohledu na produkci vybraných cytokinů. Je pozoruhodné, že u CO fibroblastů došlo mezi 8. a 10. pasáží k signifikantnímu poklesu produkce mRNA IL-6, ačkoliv buňky udržovaly energetický metabolismus mitochondriální oxidativní fosforylace. Hypotézu o vlivu ROS na tvorbu inflamazómu jsme se pokoušeli ověřit indukci ROS v CO fibroblastech, kdy jsme předpokládali zvýšení exprese IL-1 $\beta$ . Nicméně se nám nepodařilo nasimulovat dostatečné inflamatorní podmínky pomocí přidání ROS pro expresi IL-1 $\beta$  v CO fibroblastech. Zdá se, že v in vitro podmínkách nestačí pouhé zvýšení ROS, ale je nutné přidat další signál/signály. Jedním z těchto signálů by mohla být hypoxie, pomocí které se PAH může vyvolat na modelových organismech. Ta indukuje metabolickou energetickou změnu buněk směrem ke glykolýze a produkci laktátu (Mucaj et al., 2012). Tedy v dalších experimentech by bylo vhodné iniciovat tuto metabolickou změnu částečnou inhibicí mitochondriální oxidativní fosforylace a spolu se zvýšenou produkcí ROS pak studovat expresi IL-1 $\beta$ . V jiných studiích bylo dokázáno, že hypoxie aplikovaná na primární neimunitní buňky při in vitro kultivaci mění produkci zánětlivých cytokinů (O'Rourke et al., 2011). Popřípadě může chybět vnější stimul, který se nenachází v kultivačním médiu. Tímto stimulem by mohla být kyselina močová, která je zvýšená v krvi pacientů s PAH (Savale et al., 2021). Je potvrzené, že kyselina močová je schopná stimulovat kanonický NLRP3 inflamazóm a tím spouštět produkci IL-1 $\beta$  (Gasse et al., 2009). Nám se ale nepodařilo pouhým přidáním kyseliny močové do média CO fibroblastů indukovat zvýšení exprese IL-1 $\beta$  (výsledky laboratoře). Další možný stimul, který spouští inflamazóm u imunitních buněk je ATP, které aktivuje AMP-aktivovanou kinázu, jež je zapojená do aktivace inflamazómu a produkce IL-1 $\beta$  (Zha et al., 2016). Na myším modelu PAH bylo dokázáno, že dochází ke zvýšení intravaskulárního poměru mezi ATP a adenosinem (Visovatti et al., 2016).

Po úspěšné detekci IL-1 $\beta$  na úrovni mRNA v PH fibroblastech jsme se rozhodli detekovat IL-1 $\beta$  na proteinové úrovni. Vybrali jsme pro to jedinou dostupnou ELISA soupravu schopnou detekovat kravský IL-1 $\beta$  protein. Jiné metody detekce proteinu jsme zamítli, protože například pro imunochemickou analýzu typu proteinová elektroforéza a western blot jsou potřeba protilátky proti hledanému proteinu, ale žádné specifické kravské protilátky se komerčně neprodávají. Byť existují polyklonální protilátky proti IL-1 $\beta$ , jejich použití se ukázalo být nespecifické. Pro ELISA test, který

jsme použili je nutné nejprve jej pokrýt potahovací protilátkou (z anglického coating antibody). Je schopná pracovat v detekčním rozmezí od 31,25 do 2000 pg/mL. Všechny hodnoty pod 31,25 pg/mL a nad 2000 pg/mL jsou mimo kalibrační křivku a tudíž je nelze použít. Při optimalizaci ELISA testu jsme využívali rekombinantní kravský IL-1 $\beta$  protein, který jsme přidávali do vzorku proteinu z CO fibroblastů se známou koncentrací celkového proteinu. Podle toho šlo učit, jaké ředění bude neoptimálnější. Došli jsme k závěru, že ředění vzorku o koncentraci 5 mg/mL je nejlepší třikrát ředícím pufrem popsaným v protokolu výrobce. Další postup už byl podle protokolu výrobce. Ať jsme zkusili aplikovat na destičku jakékoliv množství proteinu z lyzátu PH fibroblastů, byl výsledek vždy pod detekční hranicí a nedal se považovat za relevantní. To nás vedlo k myšlence, že maturovaný protein IL-1 $\beta$  může být exportován přes cytoplazmatickou membránu do média. Proto jsme se rozhodli médium vystavené buňkám po určitou dobu zahustit pomocí srážení. Jako první postup srážení jsme si vybrali srážení pomocí kyseliny trichloroctové. Tento postup se ale ukázal limitní v konečné rozpustnosti proteinu. V následujících pokusech se zahuštěním jsme začali používat síran amonný ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ten pracuje na principu vysolování proteinů. Po optimalizaci jsme rozhodli, že budeme používat jeho nasycený roztok před přidáváním práškové formy do média. 10 mL média vystaveného PH fibroblastům jsme zredukovali pomocí výše popsaného protokolu na peletu, která byla rozpuštěna v 0,5 mL ředícím roztoku pro ELISA test. Rozpuštěné vzorky jsme měřili na ELISA testu a zachytili jsme opět signál pouze pod detekční hranicí. Zajímavé je, že u ELISA testu telecích monocytů, kde se měřila hodnota proteinu IL-1 $\beta$  v lyzátu je ~36násobný nárůst po přidání LPS a nigericinu k monocytům, zatímco u měření hodnoty proteinu ze zahuštěného média dochází jen k ~1,6násobnému nárůstu. Tento rozdíl by mohl vznikat použitou metodou vysolování, kdy protein IL-1 $\beta$  mohl být zčásti ztracen v první části srážení. Poslední pokus, který by mohl zvýšit koncentraci IL-1 $\beta$  v buňce bylo přidávání brefeldinu A k buňkám. Brefeldin A je látka, která je schopná inhibovat transport proteinů z endoplazmatického retikula do golgiho aparátu. Pokud jsme ho přidali k PH fibroblastům, které jsme následně zlyzovali pomocí RIPA lyzačního pufru, tak jsme opět nedetekovali pomocí ELISA testu protein IL-1 $\beta$  v rozmezí citlivosti soupravy. Z těchto pokusů jsme usoudili, že PH fibroblasty buď neprodukují žádnou formu proteinu IL-1 $\beta$  nebo jeho proteinová produkce je nezachytitelná použitou detekční analýzou pomocí ELISA testu. Tvzení, že PH fibroblasty mají koncentraci proteinu pod detekční úrovní používaného ELISA testu podporuje hypotetický přepočít vztahu mezi expresí mRNA u monocytů indukovaných LPS s nigericinem a PH fibroblastů na kvantitu proteinu detekovaného ELISA analýzou. Konkrétně monocytů indukované LPS a nigericinem exprimují 11314  $\pm$  1234krát více mRNA pro IL-1 $\beta$  než PH fibroblasty. Pokud předpokládáme, že množství produkované mRNA odpovídá množství translatovaného IL-1 $\beta$  proteinu a množství proteinu IL-1 $\beta$  u monocytů indukovaných LPS a nigericinem je 18 574 pg/mL, je teoretické množství proteinu IL-1 $\beta$  u PH fibroblastů 1,64 pg/mL.

Naše experimentální hodnota (dopočítaná, neboť byla pod detekcí standardní křivky) byla ~5,7 pg/mL. Hodnota odvozená i experimentální jsou ve shodě, a tudíž mimo detekční možnosti používaného ELISA testu, kde nejnižší hodnota detekce je 31,25pg/mL.

Paralelně s odběry vzorků proteinů pro ELISA analýzu se provádělo měření detekce aktivity inflamazómu. Záměr podporoval nález zvýšení exprese mRNA NLRP3 u PH fibroblastů, hlavní podjednotky inflamazómu, která je indukována při tvorbě inflamazómu. U PH fibroblastů jsme sice detekovali aktivitu spojenou se štěpením produktu, ale nedetekovali jsme její pokles po přidání specifických inhibitorů (YVAD inhibitor a PAN inhibitor). Tato aktivita by mohla být vysvětlena povahou testu a buněčným typem. Při měření aktivity pomocí této soupravy dochází k lýzi buněk, která může způsobit uvolnění enzymů, jež se nevyskytují v cytoplazmě. Uvolnit se mohou jak enzymy z membrány, tak i z organel. Aby proteolytické enzymy mohly štěpit substrát specifický pro kaspázu, tak se musí jednat o cysteinové proteázy (Winkler & Rösen-Wolff, 2015). Velkou skupinou proteolytických enzymů jsou katepsiny, které se nacházejí v lysozomech a obsahují několik tříd cysteinových proteáz. Jejich aktivita u PAH fibroblastů sice nebyla potvrzena, ale bylo potvrzeno, že se uplatňují při přestavbě distálních cév během patogeneze PAH (Chang et al., 2019). Další kandidát, který by mohl štěpit substrát je rodina metaloproteináz, jejíž vliv na patogenezi PAH byl potvrzen (Thenappan et al., 2018), (Arvidsson et al., 2019). Jejich hlavní úloha je přestavba proteinů extracelulární matrix, ale zvládnou i přestavbu proteinů nematrixového původu. Po problémech s nespecifickým štěpením jsme vyzkoušeli jinou soupravu na detekci inflamazómu. Jednalo se FAM FLICA® Caspase-1 (WEHD) Assay Kit, který má substrát, jež se váže do aktivního štěpícího místa inflamazómu. Pokud dojde ke štěpení tohoto specifického substrátu, dojde k ireverzibilní inhibici a fluorescenci. Bohužel ani pomocí této soupravy jsme nebyli schopni detekovat aktivitu u plicních fibroblastů z PAH zvířat, ale pouze z telecích monocytu indukovaných pomocí LPS. Byť sice kravské plicní fibroblasty produkují na úrovni mRNA všechny komponenty nutné ke sestavení inflamazómu, tak v PH fibroblastech jsme jeho aktivitu nebyli schopni stanovit. Nejde ovšem říct, jestli produkují komponenty inflamazómu ve formě proteinu, protože opět nejsou k dostání specifické kravské protilátky.

Bohužel k jádru našeho výzkumu jsme se nedostali, protože detekce inflamazómu u PH fibroblastů selhala. U CO fibroblastů jsme chtěli inflamazóm indukovat pomocí různých látek generujících ROS, popřípadě ve spojení se změnami energetického metabolismu pomocí hypoxie. Těmi jsou například mitoparaquat, peroxid vodíku, menadion, glukóza-oxidáza či rotenon. Po zjištění, jak by CO fibroblasty reagovaly na tyto látky, bychom po ošetření buněk přidali inkubaci v hypoxii a inhibici podjednotky komplexu I dýchacího řetězce nikotinamid adenin dinukleotidem redukovanou dehydrogenázu Fe-S protein 4 (NDUFS4) pomocí interferující RNA. Umělá inhibice

NDUFS4 navazuje na přechodí práci naší laboratoře (Plecitá-Hlavatá et al., 2016), kde jsme navrhli, že tato podjednotka komplexu I je zodpovědná za sníženou expresi komplexu I dýchacího řetězce. Hypoxie, zvýšená úroveň ROS, změny v dýchacím řetězci a tím vyvolané mitochondriální a metabolické alterace měly dle nás být dostatečný podnět k indukci aktivního inflamazómu a produkci proteinu IL-1 $\beta$ , jež by byl srovnatelný s PH fibroblasty. Tato měření ale neměla význam, jelikož se nám toto nepodařilo detekovat IL-1 $\beta$  na úrovni proteinu, ani aktivovaný inflamazóm v PH fibroblastech

Důvodem, proč jsme selhali u detekce aktivity inflamazómu (i detekce proteinu IL-1 $\beta$ ) u PH fibroblastů může být to, že obecně buňky kultivované in vitro nedokážou takto dlouho produkovat protein IL-1 $\beta$  (chybí jim další signály), popřípadě že buňky obecně tak dlouho neprodukují IL-1 $\beta$ , protože je důležitý při raných fázích onemocnění (Rider et al., 2011). Pokud dojde k poškození cévy, tak reakce fibroblastů na poranění mohla být, mimo jiné, indukce aktivity inflamazómu a produkce proteinu IL-1 $\beta$ , který by mohl iniciovat zánětlivou reakci v místě přestavby plicní cévy. Ovšem s vývinem onemocnění (v našem případě hypoxie) by mohlo postupem času docházet ke snižování exprese IL-1 $\beta$ . Na krysím modelu hojení bylo dokázáno, že po poranění vazivové tkáně dochází k nárůstu IL-1 $\beta$ , ale po sedmi dnech od poranění klesá jeho exprese (Chamberlain et al., 2013). Spolupracující výzkumný tým zachytil expresi proteinu in situ na tkáňových vzorcích plicních cév z telat s rozvinutou PAH, tj. 14 dnů od vystavení hypoxii. My jsme měli možnost studovat PH fibroblasty až po dalších ~ 42 dní od vzniku poškození v cévě (tedy ~28 dní od usmrcení telete a vypreparování cév z plic a in vitro kultivaci plicních fibroblastů). Sice si po této době stále uchovávají glykolytický metabolismus s laktátovou produkcí a zvýšené prooxidační vnitřní prostředí, exprimují IL-1 $\beta$  i komponenty inflamazómu na úrovni mRNA, ale toto vše zřejmě není dostačující k produkci zralého proteinu IL-1 $\beta$ .

## 7. Závěr

Naše práce se zaměřila na hledání aktivního inflamazómu a vlivu redoxního prostředí na jeho vznik u neimunitních buněk – fibroblastů postižených plicní arteriální hypertenzí vyvolanou chronickou hypoxií. Tento předpoklad vznikl na základě výsledků zde zmíněných prací, které ukazují, že kravské fibroblasty postižené PAH mají pozměněný metabolismus upřednostňující glykolýzu na úkor mitochondriální oxidativní fosforylace, produkují více ROS a exprimují ve svých buňkách protein IL-1 $\beta$ .

Na základě předložených výsledků se dá usuzovat, že:

- Plicní fibroblasty postižené PAH produkují na úrovni mRNA více IL-1 $\beta$  než kontrolní plicní fibroblasty.
- Jak kontrolní fibroblasty, tak fibroblasty postižené plicní arteriální hypertenzí produkují srovnatelné množství mRNA ASC a kaspázy 4. Kontrolní fibroblasty produkují více mRNA kaspázy 1 a méně NLRP3.
- Nepodařilo se nám detekovat protein IL-1 $\beta$  v plicních fibroblastech.
- Nepodařilo se nám detekovat aktivitu inflamazómu v plicních fibroblastech.
- Na expresi mRNA IL-1 $\beta$  u kontrolních fibroblastů nemá vliv prooxidační prostředí.

## 8. Seznam použité literatury

- Adesina, S. E., Kang, B. Y., Bijli, K. M., Ma, J., Cheng, J., Murphy, T. C., Michael Hart, C., & Sutliff, R. L. (2015). Targeting mitochondrial reactive oxygen species to modulate hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*, *87*, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.042>
- Aldabbous, L., Abdul-Salam, V., Mckinnon, T., Duluc, L., Pepke-Zaba, J., Southwood, M., Ainscough, A. J., Hadinnapola, C., Wilkins, M. R., Toshner, M., & Wojciak-Stothard, B. (2016). Neutrophil extracellular traps promote angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *36*(10), 2078–2087. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307634>
- Alp, N. J., & Channon, K. M. (2004). Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 24, Issue 3, pp. 413–420). <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000110785.96039.f6>
- Amara, N., Goven, D., Prost, F., Muloway, R., Crestani, B., & Boczkowski, J. (2010). NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGF $\beta$ 1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax*, *65*(8), 733–738. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.113456>
- Arciniegas E., Sutton A.B., Allen T.D., & Schor A.M. (1992). Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *Journal of Cell Science*, *103*(2), 521–529.
- Arvidsson, M., Ahmed, A., Bouzina, H., & Rådegran, G. (2019). Matrix metalloproteinase 7 in diagnosis and differentiation of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*, *9*(4). <https://doi.org/10.1177/2045894019895414>
- Bartelds, B., van Loon, R. L. E., Mohaupt, S., Wijnberg, H., Dickinson, M. G., Boersma, B., Takens, J., van Albada, M., & Berger, R. M. F. (2012). Mast cell inhibition improves pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Chest*, *141*(3), 651–660. <https://doi.org/10.1378/chest.11-0663>
- Bauer, E. M., Zheng, H., Comhair, S., Erzurum, S., Billiar, T. R., & Bauer, P. M. (2011). Complement C3 deficiency attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *PLoS ONE*, *6*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028578>
- Blum, L. K., Cao, R. R. L., Sweatt, A. J., Bill, M., Lahey, L. J., Hsi, A. C., Lee, C. S., Kongpachith, S., Ju, C. H., Mao, R., Wong, H. H., Nicolls, M. R., Zamanian, R. T., & Robinson, W. H. (2018). Circulating plasmablasts are elevated and produce pathogenic anti-endothelial cell

autoantibodies in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European Journal of Immunology*, 48(5), 874–884. <https://doi.org/10.1002/eji.201747460>

Bonnet, S., Michelakis, E. D., Porter, C. J., Andrade-Navarro, M. A., Thébaud, B., Bonnet, S., Haromy, A., Harry, G., Moudgil, R., McMurtry, M. S., Weir, E. K., & Archer, S. L. (2006). An Abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: Similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 113(22), 2630–2641. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008>

Bourgeois, A., Lambert, C., Habbout, K., Ranchoux, B., Paquet-Marceau, S., Trinh, I., Breuils-Bonnet, S., Paradis, R., Nadeau, V., Paulin, R., Provencher, S., Bonnet, S., & Boucherat, O. (2018). FOXM1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Molecular Medicine*, 96(2), 223–235. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1619-0>

Breitling, S., Hui, Z., Zabini, D., Hu, Y., Hoffmann, J., Goldenberg, N. M., Tabuchi, A., Buelow, R., dos Santos, C., Kuebler, W. M., & Santos, D. C. (2017). The mast cell-B cell axis in lung vascular remodeling and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 312, 710–721. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00311.2016>.-Over

Casson, C. N., Yu, J., Reyes, V. M., Taschuk, F. O., Yadav, A., Copenhaver, A. M., Nguyen, H. T., Collman, R. G., & Shin, S. (2015). Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(21), 6688–6693. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421699112>

Chakraborty, S., Zawieja, D. C., Davis, M. J., & Muthuchamy, M. (2015). MicroRNA signature of inflamed lymphatic endothelium and role of miR-9 in lymphangiogenesis and inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 309, 680–692. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00122.2015>.-The

Chamberlain, C. S., Leiferman, E. M., Frisch, K. E., Brickson, S. L., Murphy, W. L., Baer, G. S., & Vanderby, R. (2013). Interleukin Expression after Injury and the Effects of Interleukin-1 Receptor Antagonist. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071631>

Chang, C.-J., Hsu, H.-C., Ho, W.-J., Chang, G.-J., Pang, J.-H. S., Chen, W.-J., Huang, C.-C., & Lai, Y.-J. (2019). Cathepsin S promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 317, 1–13. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00530.2018>.-Cysteine

Chettimada, S., Gupte, R., Rawat, D., Gebb, S. A., Mcmurtry, I. F., Gupte, S. A., & Gupte, S. A. (2015). Hypoxia-induced glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression and-activation

in pulmonary artery smooth muscle cells: implication in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308, 287–300. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00229.2014>.-  
Severe

- Cooley, B. C., Nevado, J., Mellad, J., Yang, D., st. Hilaire, C., Negro, A., Fang, F., Chen, G., San, H., Walts, A. D., Schwartzbeck, R. L., Taylor, B., Lanzer, J. D., Wragg, A., Elagha, A., Beltran, L. E., Berry, C., Feil, R., Virmani, R., ... Boehm, M. (2014). TGF- $\beta$  signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Science Translational Medicine*, 6(227). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006927>
- Cuttica, M. J., Langenickel, T., Noguchi, A., Machado, R. F., Gladwin, M. T., & Boehm, M. (2011). Perivascular T-cell infiltration leads to sustained pulmonary artery remodeling after endothelial cell damage. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(1), 62–71. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0365OC>
- Dai, Z., Zhu, M. M., Peng, Y., Machireddy, N., Evans, C. E., Machado, R., Zhang, X., & Zhao, Y. Y. (2018). Therapeutic targeting of vascular remodeling and right heart failure in pulmonary arterial hypertension with a HIF-2 $\alpha$  inhibitor. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 198(11), 1423–1434. <https://doi.org/10.1164/rccm.201710-2079OC>
- Daley, E., Emson, C., Guignabert, C., de Waal Malefyt, R., Louten, J., Kurup, V. P., Hogaboam, C., Taraseviciene-Stewart, L., Voelkel, N. F., Rabinovitch, M., Grunig, E., & Grunig, G. (2008). Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *Journal of Experimental Medicine*, 205(2), 361–372. <https://doi.org/10.1084/jem.20071008>
- Davie, N. J., Crossno, J. T., Frid, M. G., Hofmeister, S. E., Reeves, J. T., Hyde, D. M., Carpenter, T. C., Brunetti, J. A., Mcniece, I. K., Stenmark, K. R., Carpen-Ter, T. C., & Sten, K. R. (2004). Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells mark. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286, 668–678. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00108.2003>.-Information
- Davis, W. C., Brown, W. C., Hamilton, M. J., Wyatt, C. R., Orden, J. A., Khalid ', A. M., & Naessens, J. (1996). Analysis of monoclonal antibodies specific for the. In *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Vol. 52).
- Egnatchik, R. A., Brittain, E. L., Shah, A. T., Fares, W. H., Ford, H. J., Monahan, K., Kang, C. J., Kocurek, E. G., Zhu, S., Luong, T., Nguyen, T. T., Hysinger, E., Austin, E. D., Skala, M. C., Young, J. D., Jackson Roberts, L., Hemnes, A. R., West, J., & Fessel, J. P. (2017). Dysfunctional BMPR2 signaling drives an abnormal endothelial requirement for glutamine in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*, 7(1), 186–199. <https://doi.org/10.1177/2045893216685035>

- el Kasmi, K. C., Pugliese, S. C., Riddle, S. R., Poth, J. M., Anderson, A. L., Frid, M. G., Li, M., Pullamsetti, S. S., Savai, R., Nagel, M. A., Fini, M. A., Graham, B. B., Tuder, R. M., Friedman, J. E., Eltzschig, H. K., Sokol, R. J., & Stenmark, K. R. (2014). Adventitial Fibroblasts Induce a Distinct Proinflammatory/Profibrotic Macrophage Phenotype in Pulmonary Hypertension. *The Journal of Immunology*, *193*(2), 597–609. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303048>
- Fang, M., Huang, Y., Zhang, Y., Ning, Z., Zhu, L., & Li, X. (2017). Interleukin-6 -572C/G polymorphism is associated with serum interleukin-6 levels and risk of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*, *11*(3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2017.01.011>
- Farkas, L., Farkas, D., Ask, K., Möller, A., Gauldie, J., Margetts, P., Inman, M., & Kolb, M. (2009). VEGF ameliorates pulmonary hypertension through inhibition of endothelial apoptosis in experimental lung fibrosis in rats. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(5), 1298–1311. <https://doi.org/10.1172/JCI36136>
- Foley, A., Steinberg, B. E., & Goldenberg, N. M. (2022). Inflammasome Activation in Pulmonary Arterial Hypertension. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.826557>
- Frid, M. G., Alexandre McKeon, B., Thurman, J. M., Maron, B. A., Li, M., Zhang, H., Kumar, S., Sullivan, T., Laskowsky, J., Fini, M. A., Hu, S., Tuder, R. M., Gandjeva, A., Wilkins, M. R., Rhodes, C. J., Ghataorhe, P., Leopold, J. A., Wang, R. S., Michael Holers, V., & Stenmark, K. R. (2020). Immunoglobulin-driven complement activation regulates proinflammatory remodeling in pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *201*(2), 224–239. <https://doi.org/10.1164/rccm.201903-0591OC>
- Frid, M. G., Brunetti, J. A., Burke, D. L., Carpenter, T. C., Davie, N. J., Reeves, J. T., Roedersheimer, M. T., van Rooijen, N., & Stenmark, K. R. (2006a). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *American Journal of Pathology*, *168*(2), 659–669. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050599>
- Frid, M. G., Brunetti, J. A., Burke, D. L., Carpenter, T. C., Davie, N. J., Reeves, J. T., Roedersheimer, M. T., van Rooijen, N., & Stenmark, K. R. (2006b). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *American Journal of Pathology*, *168*(2), 659–669. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050599>
- Frid, M. G., Kale, V. A., & Stenmark, K. R. (2002). Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: In vitro analysis.

- Circulation Research*, 90(11), 1189–1196.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000021432.70309.28>
- Frid, M. G., Li, M., Gnanasekharan, M., Burke, D. L., Fragoso, M., Strassheim, D., Sylman, J. L., & Stenmark, K. R. (2009). Sustained hypoxia leads to the emergence of cells with enhanced growth, migratory, and promitogenic potentials within the distal pulmonary artery wall. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(6).  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.90611.2008>
- Frid, M. G., Moiseeva, E. P., & Stenmark, K. R. (1994). *Multiple Phenotypically Distinct Smooth Muscle Cell Populations Exist in the Adult and Developing Bovine Pulmonary Arterial Media In Vivo*. <http://ahajournals.org>
- Frid, M. G., Thurman, J. M., Hansen, K. C., Maron, B. A., & Stenmark, K. R. (2020). Inflammation, immunity, and vascular remodeling in pulmonary hypertension; Evidence for complement involvement? In *Global Cardiology Science and Practice* (Vol. 2020, Issue 1). HBKU Press.  
<https://doi.org/10.21542/GCSP.2020.1>
- Gaowa, S., Zhou, W., Yu, L., Zhou, X., Liao, K., Yang, K., Lu, Z., Jiang, H., & Chen, X. (2014). Effect of Th17 and Treg axis disorder on outcomes of pulmonary arterial hypertension in connective tissue diseases. *Mediators of Inflammation*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/247372>
- Gardiner, S. M., Kemp, P. A., March, J. E., & Bennett, T. (1994). Effects of bosentan (Ro 47–0203), an ETA-, ETB-receptor antagonist, on regional haemodynamic responses to endothelins in conscious rats. *British Journal of Pharmacology*, 112(3), 823–830.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb13153.x>
- Gasse, P., Riteau, N., Charron, S., Girre, S., Fick, L., Pétrilli, V., Tschopp, J., Lagente, V., Quesniaux, V. F. J., Ryffel, B., & Couillin, I. (2009). Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(10), 903–913. <https://doi.org/10.1164/rccm.200808-1274OC>
- Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R. P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W. P., & Stewart, D. J. (1993). Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *New England Journal of Medicine*, 328(24), 1732–1739.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199306173282402>
- Goldenberg, N. M., Hu, Y., Hu, X., Volchuk, A., Zhao, Y. D., Kucherenko, M. M., Knosalla, C., de Perrot, M., Tracey, K. J., Al-Abed, Y., Steinberg, B. E., & Kuebler, W. M. (2019). Therapeutic targeting of high-mobility group box-1 in pulmonary arterial hypertension. In *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Vol. 199, Issue 12, pp. 1566–1569). American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1164/rccm.201808-1597LE>

- Good, R. B., Gilbane, A. J., Trinder, S. L., Denton, C. P., Coghlan, G., Abraham, D. J., & Holmes, A. M. (2015). Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Pathology*, *185*(7), 1850–1858. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.019>
- Guzman, E., Hope, J., Taylor, G., Smith, A. L., Cubillos-Zapata, C., & Charleston, B. (2014). Bovine  $\gamma\delta$  T Cells Are a Major Regulatory T Cell Subset. *The Journal of Immunology*, *193*(1), 208–222. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303398>
- Hagood, J. S., Prabhakaran, P., Kumbla, P., Salazar, L., MacEwen, M. W., Barker, T. H., Ortiz, L. A., Schoeb, T., Siegal, G. P., Bruce Alexander, C., Pardo, A., & Selman, M. (2005). Loss of Fibroblast Thy-1 Expression Correlates with Lung Fibrogenesis. In *Epithelial and Mesenchymal Cell Biology*.
- Halcox, J. P. J., Schenke, W. H., Zalos, G., Mincemoyer, R., Prasad, A., Waclawiw, M. A., Nour, K. R. A., & Quyyumi, A. A. (2002). Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*, *106*(6), 653–658. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000025404.78001.D8>
- Hoffmann, J., Yin, J., Kukucka, M., Yin, N., Saarikko, I., Sterner-Kock, A., Fujii, H., Leong-Poi, H., Kuppe, H., Schermuly, R. T., & Kuebler, W. M. (2011). Mast cells promote lung vascular remodelling in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, *37*(6), 1400–1410. <https://doi.org/10.1183/09031936.00043310>
- Huertas, A., Phan, C., Bordenave, J., Tu, L., Thuillet, R., le Hires, M., Avouac, J., Tamura, Y., Allanore, Y., Jovan, R., Sitbon, O., Guignabert, C., & Humbert, M. (2016). Regulatory T Cell Dysfunction in Idiopathic, Heritable and Connective Tissue-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest*, *149*(6), 1482–1493. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.01.004>
- Huertas, A., Tu, L., Gambaryan, N., Girerd, B., Perros, F., Montani, D., Fabre, D., Fadel, E., Eddahibi, S., Cohen-Kaminsky, S., Guignabert, C., & Humbert, M. (2012). Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, *40*(4), 895–904. <https://doi.org/10.1183/09031936.00159911>
- Humbert, M., Sitbon, O., Yaïci, A., Montani, D., O’Callaghan, D. S., Jaïs, X., Parent, F., Savale, L., Natali, D., Günther, S., Chaouat, A., Chabot, F., Cordier, J. F., Habib, G., Gressin, V., Jing, Z. C., Souza, R., & Simonneau, G. (2010). Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, *36*(3), 549–555. <https://doi.org/10.1183/09031936.00057010>
- Itoh, A., Nishihira, J., Makita, H., Miyamoto, K., Yamaguchi, E., & Nishimura, M. (2003). Effects of IL-1 $\beta$   $\beta$   $\beta$ , TNF- $\alpha$   $\alpha$   $\alpha$ , and macrophage migration inhibitory factor on prostacyclin synthesis in rat pulmonary artery smooth muscle cells. In *Respirology* (Vol. 8).

- Jasiewicz, M., Knapp, M., Waszkiewicz, E., Ptaszynska-Kopczynska, K., Szpakowicz, A., Sobkowicz, B., Musial, W. J., & Kaminski, K. A. (2015). Enhanced IL-6 trans-signaling in pulmonary arterial hypertension and its potential role in disease-related systemic damage. *Cytokine*, *76*(2), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.06.018>
- Jones, P. L., Cowan, K. N., & Rabinovitch, M. (1997). Tenascin-C, Proliferation and Subendothelial Fibronectin in Progressive Pulmonary Vascular Disease. In *American Journal of Pathology* (Vol. 150, Issue 4).
- Kapanci, Y., Ribaux, C., Chaponnier, C., & Gabbiani, G. (1992). Cytoskeletal Features of Alveolar Myofibroblasts and Pericytes in Normal Human and Rat Lung'. In *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Original Article* (Vol. 40, Issue 12).
- Kelly, P., Meade, K. G., & O'Farrelly, C. (2019). Non-canonical inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  production by primary endometrial epithelial and stromal fibroblast cells is NLRP3 and caspase-4 dependent. *Frontiers in Immunology*, *10*(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00102>
- Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. v. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, *3*(3), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>
- Kimura, Y., Yanagida, T., Onda, A., Tsukui, D., Hosoyamada, M., & Kono, H. (2019). Soluble uric acid promotes atherosclerosis via AMPK (AMP-activated protein kinase)-mediated inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 570–582. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313224>
- Kumar, R., Mickael, C., Chabon, J., Gebreab, L., Rutebemberwa, A., Garcia, A. R., Koyanagi, D. E., Sanders, L., Gandjeva, A., Kearns, M. T., Barthel, L., Janssen, W. J., Mauad, T., Bandeira, A., Schmidt, E., Tuder, R. M., & Graham, B. B. (2015). The causal role of IL-4 and IL-13 in schistosoma mansoni pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *192*(8), 998–1008. <https://doi.org/10.1164/rccm.201410-1820OC>
- Kumar, S., Frid, M. G., Zhang, H., Li, M., Riddle, S., Dale Brown, R., Yadav, S. C., Roy, M. K., Dzieciatkowska, M. E., Alessandro, A. D. ', Hansen, K. C., & Stenmark, K. R. (2021). *Complement-containing small extracellular vesicles from adventitial fibroblasts induce proinflammatory and metabolic reprogramming in macrophages*. <https://doi.org/10.1172/jci>
- Lei, W., He, Y., Shui, X., Li, G., Yan, G., Zhang, Y., Huang, S., Chen, C., & Ding, Y. (2016). Expression and analyses of the HIF-1 pathway in the lungs of humans with pulmonary arterial hypertension. *Molecular Medicine Reports*, *14*(5), 4383–4390. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5752>

- Lepetit, H., Eddahibi, S., Fadel, E., Frisdal, E., Munaut, C., Noel, A., Humbert, M., Adnot, S., D'Ortho, M. P., & Lafuma, C. (2005). Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, *25*(5), 834–842. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00072504>
- Li, M., Riddle, S. R., Frid, M. G., el Kasmi, K. C., McKinsey, T. A., Sokol, R. J., Strassheim, D., Meyrick, B., Yeager, M. E., Flockton, A. R., McKeon, B. A., Lemon, D. D., Horn, T. R., Anwar, A., Barajas, C., & Stenmark, K. R. (2011). Emergence of Fibroblasts with a Proinflammatory Epigenetically Altered Phenotype in Severe Hypoxic Pulmonary Hypertension. *The Journal of Immunology*, *187*(5), 2711–2722. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100479>
- Li, M., Riddle, S., Zhang, H., D'Alessandro, A., Flockton, A., Serkova, N. J., Hansen, K. C., Moldvan, R., McKeon, B. A., Frid, M., Kumar, S., Li, H., Liu, H., Cánovas, A., Medrano, J. F., Thomas, M. G., Iloska, D., Plecítá-Hlavatá, L., Ježek, P., ... Stenmark, K. R. (2016). Metabolic Reprogramming Regulates the Proliferative and Inflammatory Phenotype of Adventitial Fibroblasts in Pulmonary Hypertension Through the Transcriptional Corepressor C-Terminal Binding Protein-1. *Circulation*, *134*(15), 1105–1121. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023171>
- Ling, Y., Johnson, M. K., Kiely, D. G., Condliffe, R., Elliot, C. A., Gibbs, J. S. R., Howard, L. S., Pepke-Zaba, J., Sheares, K. K. K., Corris, P. A., Fisher, A. J., Lordan, J. L., Gaine, S., Coghlan, J. G., Wort, S. J., Gatzoulis, M. A., & Peacock, A. J. (2012). Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: Results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *186*(8), 790–796. <https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0383OC>
- Long, Y., Liu, X., Tan, X. zhen, Jiang, C. xia, Chen, S. wei, Liang, G. nan, He, X. mei, Wu, J., Chen, T., & Xu, Y. (2020). ROS-induced NLRP3 inflammasome priming and activation mediate PCB 118-induced pyroptosis in endothelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *189*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109937>
- Luo, H., Liu, B., Zhao, L., He, J., Li, T., Zha, L., Li, X., Qi, Q., Liu, Y., & Yu, Z. (2017). Galectin-3 mediates pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*, *11*(10), 673-683.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2017.07.009>
- Malik, A. B., Rahman, A., Anwar, K. N., & True, A. L. (1999). *Neutrophil Adhesion and Mediates Endothelial ICAM-1 Expression B Site of the Promoter  $\kappa$  to Downstream NF-Thrombin-Induced p65 Homodimer Binding*. <http://www.jimmunol.org/content/162/9/5466>
- Mansueto, G., di Napoli, M., Campobasso, C. pietro, & Slevin, M. (2021). Pulmonary arterial hypertension (PAH) from autopsy study: T-cells, B-cells and mastocytes detection as

- morphological evidence of immunologically mediated pathogenesis. *Pathology Research and Practice*, 225. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153552>
- Marsboom, G., Toth, P. T., Ryan, J. J., Hong, Z., Wu, X., Fang, Y. H., Thenappan, T., Piao, L., Zhang, H. J., Pogoriler, J., Chen, Y., Morrow, E., Kenneth Weir, E., Rehman, J., & Archer, S. L. (2012). Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circulation Research*, 110(11), 1484–1497. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.263848>
- Marsboom, G., Wietholt, C., Haney, C. R., Toth, P. T., Ryan, J. J., Morrow, E., Thenappan, T., Bache-Wiig, P., Piao, L., Paul, J., Chen, C. T., & Archer, S. L. (2012). Lung 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for diagnosis and monitoring of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(6), 670–679. <https://doi.org/10.1164/rccm.201108-1562OC>
- Martinon, F., Burns, K., & Rg Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-1 $\beta$  that they possess several distinct protein/protein inter-action domains which are used to assemble large multi-component complexes. Apaf-1, for example, contains an N-terminal CARD followed by a NBS/self-oligomer-ization domain and a C-terminal WD-40 repeat (Jaro. In *Molecular Cell* (Vol. 10).
- Maston, L. D., Jones, D. T., Giermakowska, W., Howard, T. A., Cannon, J. L., Wang, W., Wei, Y., Xuan, W., Resta, T. C., Gonzalez Bosc, L. v., & Bosc, G. L. (2017). Central role of T helper 17 cells in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 312, 609–624. <https://doi.org/10.1152/ajplung>
- Maston, L. D., Jones, D. T., Giermakowska, W., Resta, T. C., Ramiro-Diaz, J., Howard, T. A., Jernigan, N. L., Herbert, L., Maurice, A. A., & Gonzalez Bosc, L. v. (2018). Interleukin-6 trans-signaling contributes to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Pulmonary Circulation*, 8(3). <https://doi.org/10.1177/2045894018780734>
- McLaughlin, V. v., Shah, S. J., Souza, R., & Humbert, M. (2015). Management of pulmonary arterial hypertension. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 65, Issue 18, pp. 1976–1997). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.03.540>
- McMurtry, M. S., Bonnet, S., Wu, X., Dyck, J. R. B., Haromy, A., Hashimoto, K., & Michelakis, E. D. (2004). Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circulation Research*, 95(8), 830–840. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000145360.16770.9f>

- Medici, D., Potenta, S., & Kalluri, R. (2011). Transforming growth factor- $\beta$ 2 promotes Snail-mediated endothelial - Mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochemical Journal*, *437*(3), 515–520.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20101500>
- Michelakis, E. D., Gurtu, V., Webster, L., Barnes, G., Watson, G., Howard, L., Cupitt, J., Paterson, I., Thompson, R. B., Chow, K., O'regan, D. P., Zhao, L., Wharton, J., Kiely, D. G., Kinnaird, A., Boukouris, A. E., White, C., Nagendran, J., Freed, D. H., ... Wilkins, M. R. (2017). *Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves pulmonary arterial hypertension in genetically susceptible patients*. <http://stm.sciencemag.org/>
- Mittal, M., Roth, M., König, P., Hofmann, S., Dony, E., Goyal, P., Selbitz, A. C., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Kwapiszewska, G., Kummer, W., Klepetko, W., Hoda, M. A. R., Fink, L., Hänze, J., Seeger, W., Grimminger, F., Schmidt, H. H. H. W., & Weissmann, N. (2007). Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circulation Research*, *101*(3), 258–267.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.148015>
- Montani, D., Perros, F., Gambaryan, N., Girerd, B., Dorfmueller, P., Price, L. C., Huertas, A., Hammad, H., Lambrecht, B., Simonneau, G., Launay, J. M., Cohen-Kaminsky, S., & Humbert, M. (2011). C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *184*(1), 116–123. <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0905OC>
- Mucanj, V., Shay, J. E. S., & Simon, M. C. (2012). Effects of hypoxia and HIFs on cancer metabolism. *International Journal of Hematology*, *95*(5), 464–470. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1070-5>
- Nikitopoulou, I., Orfanos, S. E., Kotanidou, A., Maltabe, V., Manitsopoulos, N., Karras, P., Kouklis, P., Armaganidis, A., & Maniatis, N. A. (2016). Vascular endothelial-cadherin downregulation as a feature of endothelial transdifferentiation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *311*, 352–363.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00156.2014>.-Increased
- Oikonomou, G., Teixeira, A. G. V., Foditsch, C., Bicalho, M. L., Machado, V. S., & Bicalho, R. C. (2013). Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063157>
- Okada, K., Tanaka, Y., Bernstein, M., Zhang, W., Patterson, G. A., & Botney, M. D. (1997). Pulmonary Hemodynamics Modify the Rat Pulmonary Artery Response to Injury A

- Neointimal Model of Pulmonary Hypertension. In *American Journal of Pathology* (Vol. 151, Issue 4).
- O'Rourke, R. W., White, A. E., Metcalf, M. D., Olivas, A. S., Mitra, P., Larison, W. G., Cheang, E. C., Varlamov, O., Corless, C. L., Roberts, C. T., & Marks, D. L. (2011). Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia*, *54*(6), 1480–1490. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2103-y>
- Oslowski, C. M., Hara, T., O'Sullivan-Murphy, B., Kanekura, K., Lu, S., Hara, M., Ishigaki, S., Zhu, L. J., Hayashi, E., Hui, S. T., Greiner, D., Kaufman, R. J., Bortell, R., & Urano, F. (2012). Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced  $\beta$  cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metabolism*, *16*(2), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.005>
- Parpaleix, A., Amsellem, V., Houssaini, A., Abid, S., Breau, M., Marcos, E., Sawaki, D., Delcroix, M., Quarck, R., Maillard, A., Couillin, I., Ryffel, B., & Adnot, S. (2016). Role of interleukin-1 receptor 1/MyD88 signalling in the development and progression of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, *48*(2), 470–483. <https://doi.org/10.1183/13993003.01448-2015>
- Peacock, A. J., Murphy, N. F., McMurrey, J. J. V., Caballero, L., & Stewart, S. (2007). An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, *30*(1), 104–109. <https://doi.org/10.1183/09031936.00092306>
- Peeters, P. M., Perkins, T. N., Wouters, E. F. M., Mossman, B. T., & Reynaert, N. L. (2013). *Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells*. <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/10/1/3>
- Perros, F., Dorfmueller, P., Montani, D., Hammad, H., Waelput, W., Girerd, B., Raymond, N., Mercier, O., Mussot, S., Cohen-Kaminsky, S., Humbert, M., & Lambrecht, B. N. (2012). Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *185*(3), 311–321. <https://doi.org/10.1164/rccm.201105-0927OC>
- Pinto, R. F. A., Higuchi, M. D. L., & Aiello, V. D. (2004). Decreased numbers of T-lymphocytes and predominance of recently recruited macrophages in the walls of peripheral pulmonary arteries from 26 patients with pulmonary hypertension secondary to congenital cardiac shunts. *Cardiovascular Pathology*, *13*(5), 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2004.06.003>
- Plecitá-Hlavatá, L., D'alessandro, A., el Kasmi, K., Li, M., Zhang, H., Ježek, P., & Stenmark, K. R. (2017). Metabolic reprogramming and redox signaling in pulmonary hypertension. In

- Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 967, pp. 241–260). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_14)
- Plecitá-Hlavatá, L., Tauber, J., Li, M., Zhang, H., Flockton, A. R., Pullamsetti, S. S., Chelladurai, P., D'Alessandro, A., el Kasmi, K. C., Ježek, P., & Stenmark, K. R. (2016). Constitutive reprogramming of fibroblast mitochondrial metabolism in pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *55*(1), 47–57. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0142OC>
- Qian, J., Tian, W., Jiang, X., Tamosiuniene, R., Sung, Y. K., Shuffle, E. M., Tu, A. B., Valenzuela, A., Jiang, S., Zamanian, R. T., Fiorentino, D. F., Voelkel, N. F., Peters-Golden, M., Stenmark, K. R., Chung, L., Rabinovitch, M., & Nicolls, M. R. (2015). Leukotriene B4 Activates Pulmonary Artery Adventitial Fibroblasts in Pulmonary Hypertension. *Hypertension*, *66*(6), 1227–1239. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06370>
- Qin, L., Li, G., Qian, X., Liu, Y., Wu, X., Liu, B., Hong, J. S., & Block, M. L. (2005). Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *GLIA*, *52*(1), 78–84. <https://doi.org/10.1002/glia.20225>
- Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M., & Nicolls, M. R. (2014). Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research*, *115*(1), 165–175. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301141>
- Ranchoux, B., Antigny, F., Rucker-Martin, C., Hautefort, A., Péchoux, C., Bogaard, H. J., Dorfmüller, P., Remy, S., Lecerf, F., Planté, S., Chat, S., Fadel, E., Houssaini, A., Anegon, I., Adnot, S., Simonneau, G., Humbert, M., Cohen-Kaminsky, S., & Perros, F. (2015). Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation*, *131*(11), 1006–1018. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008750>
- Ricard, N., Tu, L., le Hires, M., Huertas, A., Phan, C., Thuillet, R., Sattler, C., Fadel, E., Seferian, A., Montani, D., Dorfmüller, P., Humbert, M., & Guignabert, C. (2014). Increased pericyte coverage mediated by endothelial-derived fibroblast growth factor-2 and interleukin-6 is a source of smooth muscle-like cells in pulmonary hypertension. *Circulation*, *129*(15), 1586–1597. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007469>
- Richter, A., Yeager, M. E., Zaiman, A., Cool, C. D., Voelkel, N. F., & Tuder, R. M. (2004). Impaired transforming growth factor- $\beta$  signaling in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *170*(12), 1340–1348. <https://doi.org/10.1164/rccm.200311-1602OC>
- Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M. R., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2011). IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different

- Stages of Sterile Inflammation. *The Journal of Immunology*, 187(9), 4835–4843.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102048>
- Ross, D. J., Strieter, R. M., Fishbein, M. C., Ardehali, A., & Belperio, J. A. (2012). Type I immune response cytokine-chemokine cascade is associated with pulmonary arterial hypertension. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 31(8), 865–873.  
<https://doi.org/10.1016/j.healun.2012.04.008>
- Savale, L., Akagi, S., Tu, L., Cumont, A., Thuillet, R., Phan, C., le Vely, B., Berrebeh, N., Huertas, A., Jaïs, X., Cottin, V., Chaouat, A., Tromeur, C., Boucly, A., Jutant, E. M., Mercier, O., Fadel, E., Montani, D., Sitbon, O., ... Guignabert, C. (2021). Serum and pulmonary uric acid in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, 58(2).  
<https://doi.org/10.1183/13993003.00332-2020>
- Savale, L., Tu, L., Rideau, D., Izziki, M., Maitre, B., Adnot, S., & Eddahibi, S. (2009). Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respiratory Research*, 10. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-10-6>
- Schultze, A. E., Wagner, J. G., White, P. S. M., Roth, R. A., Schiltz, A. E., & Wagner, R. J. G. A. (1991). Early indications of Monocrotaline Pyrrole-Induced Lung Injury in Rats' Early Indications of Monocrotaline Pyrrole-Induced Lung Injury in Rats. In *Toxicol. Appl. Pharmacol* (Vol. 109).
- Sercel, A. J., Patananan, A. N., Man, T., Wu, T. H., Yu, A. K., Guyot, G. W., Rabizadeh, S., Niazi, K. R., Chiou, P. Y., & Teitell, M. A. (2021). Stable transplantation of human mitochondrial DNA by high-throughput, pressurized isolated mitochondrial delivery. *ELife*, 10, 1–45.  
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.63102>
- Simonneau, G., Gatzoulis, M. A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M. A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R. F., Olschewski, H., Robbins, I. M., & Souza, R. (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25 SUPPL.).  
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.029>
- Simpson, C. E., Chen, J. Y., Damico, R. L., Hassoun, P. M., Martin, L. J., Yang, J., Nies, M., Griffiths, M., Dhananjay Vaidya, R., Brandal, S., Pauciulo, M. W., Lutz, K. A., Coleman, A. W., Austin, E. D., Ivy, D. D., Nichols, W. C., & Everett, A. D. (2020). Cellular sources of IL-6 and associations with clinical phenotypes and outcomes in PAH. *European Respiratory Journal*, 55(4).  
<https://doi.org/10.1183/13993003.01761-2019>
- Soon, E., Holmes, A. M., Treacy, C. M., Doughty, N. J., Southgate, L., MacHado, R. D., Trembath, R. C., Jennings, S., Barker, L., Nicklin, P., Walker, C., Budd, D. C., Pepke-Zaba, J., & Morrell, N. W. (2010a). Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial

- pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 122(9), 920–927.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762>
- Soon, E., Holmes, A. M., Treacy, C. M., Doughty, N. J., Southgate, L., MacHado, R. D., Trembath, R. C., Jennings, S., Barker, L., Nicklin, P., Walker, C., Budd, D. C., Pepke-Zaba, J., & Morrell, N. W. (2010b). Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 122(9), 920–927.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762>
- Spiekerkoetter, E., Goncharova, E. A., Guignabert, C., Stenmark, K., Kwapiszewska, G., Rabinovitch, M., Voelkel, N., Bogaard, H. J., Graham, B., Pullamsetti, S. S., & Kuebler, W. M. (2019). Hot topics in the mechanisms of pulmonary arterial hypertension disease: cancer-like pathobiology, the role of the adventitia, systemic involvement, and right ventricular failure. *Pulmonary Circulation*, 9(4). <https://doi.org/10.1177/2045894019889775>
- Stacher, E., Graham, B. B., Hunt, J. M., Gandjeva, A., Groshong, S. D., McLaughlin, V. v., Jessup, M., Grizzle, W. E., Aldred, M. A., Cool, C. D., & Tuder, R. M. (2012). Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(3), 261–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0164OC>
- Stanfield, R. L., Haakenson, J., Deiss, T. C., Criscitiello, M. F., Wilson, I. A., & Smider, V. v. (2018). The Unusual Genetics and Biochemistry of Bovine Immunoglobulins. In *Advances in Immunology* (Vol. 137, pp. 135–164). Academic Press Inc.  
<https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.12.004>
- Steiner, M. K., Syrkina, O. L., Kolliputi, N., Mark, E. J., Hales, C. A., & Waxman, A. B. (2009). Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circulation Research*, 104(2), 236–244. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182014>
- Stenmark, K. R., Fasules, J., Hyde, D. M., Voelkel, N. F., Henson, J., Tucker, A., Wilson, H., & Reeves, J. T. (1987). Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4,300 m. *Journal of Applied Physiology*, 62(2), 821–830.  
<https://doi.org/10.1152/jappl.1987.62.2.821>
- Stenmark, K. R., Frid, M. G., Yeager, M., Li, M., Riddle, S., McKinsey, T., & el Kasmi, K. C. (2012). Targeting the adventitial microenvironment in pulmonary hypertension: A potential approach to therapy that considers epigenetic change. In *Pulmonary Circulation* (Vol. 2, Issue 1, pp. 3–14). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4103/2045-8932.94817>
- Stenmark, K. R., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E., Anwar, A., Li, M., Riddle, S., & Frid, M. (2011). The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*, 1(1), 141–161. <https://doi.org/10.1002/cphy.c090017>

- Stevens, T., Phan, S., Frid, M. G., Alvarez, D., Herzog, E., & Stenmark, K. R. (2008). Lung vascular cell heterogeneity: Endothelium, smooth muscle, and fibroblasts. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(7), 783–791. <https://doi.org/10.1513/pats.200803-027HR>
- Sutendra, G., Bonnet, S., Rochefort, G., Haromy, A., Folmes, K. D., Lopaschuk, G. D., Dyck, J. R. B., & Michelakis, E. D. (2010). Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med.*, 2(44), 44–58. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001327>
- Sweatt, A. J., Miyagawa, K., Rhodes, C. J., Taylor, S., del Rosario, P. A., Hsi, A., Haddad, F., Spiekerkoetter, E., Bental-Roof, M., Bland, R. D., Swietlik, E. M., Gräf, S., Wilkins, M. R., Morrell, N. W., Nicolls, M. R., Rabinovitch, M., & Zamanian, R. T. (2021). Severe Pulmonary Arterial Hypertension Is Characterized by Increased Neutrophil Elastase and Relative Elafin Deficiency. *Chest*, 160(4), 1442–1458. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.06.028>
- Tamosiuniene, R., Tian, W., Dhillon, G., Wang, L., Sung, Y. K., Gera, L., Patterson, A. J., Agrawal, R., Rabinovitch, M., Ambler, K., Long, C. S., Voelkel, N. F., & Nicolls, M. R. (2011). Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension. *Circulation Research*, 109(8), 867–879. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.236927>
- Tamura, Y., Phan, C., Tu, L., le Hiress, M., Thuillet, R., Jutant, E. M., Fadel, E., Savale, L., Huertas, A., Humbert, M., & Guignabert, C. (2018). Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, 128(5), 1956–1970. <https://doi.org/10.1172/JCI96462>
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-Mcdermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., ... O'Neill, L. A. J. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 496(7444), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11986>
- Teichert-Kuliszewska, K., Kutryk, M. J. B., Kuliszewski, M. A., Karoubi, G., Courtman, D. W., Zucco, L., Granton, J., & Stewart, D. J. (2006). Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: Implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circulation Research*, 98(2), 209–217. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000200180.01710.e6>
- Telarevic Cero, F., Hillestad, V., Sjaastad, I., Yndestad, A., Aukrust, P., Ranheim, T., Gjervold Lunde, I., Belland Olsen, M., Lien, E., Zhang, L., Bjaerum Haugstad, S., Marit Løberg, E., Christensen, G., Larsen, K.-O., & Henning Skjønberg, O. (2015). Absence of the inflammasome adaptor ASC reduces hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 309, 378–387. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00342.2014>.-Pulmonary

- Thenappan, T., Chan, S. Y., & Kenneth Weir, E. (2018). Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *REVIEW Extracellular Matrix in Cardiovascular Pathophysiology Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *315*, 1322–1331. <https://doi.org/10.1152/ajpheart>
- Tian, W., Jiang, X., Tamosiuniene, R., Sung, Y. K., Qian, J., Dhillon, G., Gera, L., Farkas, L., Rabinovitch, M., Zamanian, R. T., Inayathullah, M., Fridlib, M., Rajadas, J., Peters-Golden, M., Voelkel, N. F., & Nicolls, M. R. (2013). Blocking macrophage leukotriene B4 prevents endothelial injury and reverses pulmonary hypertension. In *Science Translational Medicine* (Vol. 5, Issue 200). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006674>
- Tuder, R. M., Cool, C. D., Geraci, M. W., Wang, J., Abman, S. H., Wright, L., Badesch, D., & Voelkel, N. F. (1999). Prostacyclin Synthase Expression Is Decreased in Lungs from Patients with Severe Pulmonary Hypertension. In *Am J Respir Crit Care Med* (Vol. 159). [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)
- Ulrich, S., Nicolls, M. R., Taraseviciene, L., Speich, R., & Voelkel, N. (2008). Increased regulatory and decreased CD8+ cytotoxic T cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration*, *75*(3), 272–280. <https://doi.org/10.1159/000111548>
- van de Veerdonk, F. L., Smeekens, S. P., Joosten, L. A. B., Kullberg, B. J., Dinarello, C. A., van der Meer, J. W. M., & Netea, M. G. (2010). Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1 $\beta$  inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(7), 3030–3033. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914795107>
- Vergadi, E., Chang, M. S., Lee, C., Liang, O. D., Liu, X., Fernandez-Gonzalez, A., Mitsialis, S. A., & Kourembanas, S. (2011). Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, *123*(18), 1986–1995. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.978627>
- Visovatti, S. H., Hyman, M. C., Goonewardena, S. N., Anyanwu, A. C., Kanthi, Y., Robichaud, P., Wang, J., Petrovic-Djergovic, D., Rattan, R., Burant, C. F., & Pinsky, D. J. (2016). Purinergic dysregulation in pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *311*(1), H286–H298. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00572.2015>
- Voelkel, N. F., Thder, R. M., Bridges, J., Arend, W. P., & Voelkel, N. F. (1994). Interleukin-1 Receptor Antagonist Treatment Reduces Pulmonary Hypertension Generated in Rats by Monocrotaline. In *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* (Vol. 11).
- Wakasugi, T., Shimizu, I., Yoshida, Y., Hayashi, Y., Ikegami, R., Suda, M., Katsuumi, G., Nakao, M., Hoyano, M., Kashimura, T., Nakamura, K., Ito, H., Nojiri, T., Soga, T., & Minamino, T. (2019).

- Role of smooth muscle cell p53 in pulmonary arterial hypertension. *PLoS ONE*, 14(2).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212889>
- Wang, S., Liu, R., Yu, Q., Dong, L., Bi, Y., & Liu, G. (2019). Metabolic reprogramming of macrophages during infections and cancer. In *Cancer Letters* (Vol. 452, pp. 14–22). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.015>
- Wang, W., Yan, H., Zhu, W., Cui, Y., Chen, J., Wang, X., Li, S., & Zhu, J. (2009). Impairment of monocyte-derived dendritic cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Journal of Clinical Immunology*, 29(6), 705–713. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9322-8>
- Wang, X., Lin, L., Chai, X., Wu, Y., Li, Y., & Liu, X. (2020). Hypoxic mast cells accelerate the proliferation, collagen accumulation and phenotypic alteration of human lung fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 45(1), 175–185.  
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4400>
- Waypa, G. B., Marks, J. D., Guzy, R., Mungai, P. T., Schriever, J., Dokic, D., & Schumacker, P. T. (2010). Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 106(3), 526–535.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206334>
- Wingfield, P. (1998). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. In *Current Protocols in Protein Science* (p. A.3F.1-A.3F.8). John Wiley & Sons, Inc.  
<https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>
- Winkler, S., & Rösen-Wolff, A. (2015). Caspase-1: An integral regulator of innate immunity. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 37, Issue 4, pp. 419–427). Springer Verlag.  
<https://doi.org/10.1007/s00281-015-0494-4>
- Xu, W., Koeck, T., Lara, A. R., Neumann, D., Difilippo, F. P., Koo, M., Janocha, A. J., Masri, F. A., Arroliga, A. C., Jennings, C., Dweik, R. A., Tuder, R. M., Stuehr, D. J., & Erzurum, S. C. (2007). *Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells*.  
[www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
- Yi, E. S., Kim, H., Ahn, H., Strother, J., Morris, T., Masliah, E., Hansen, L. A., Park, K., & Friedman, P. J. (2000). Distribution of Obstructive Intimal Lesions and Their Cellular Phenotypes in Chronic Pulmonary Hypertension A Morphometric and Immunohistochemical Study. In *Am J Respir Crit Care Med* (Vol. 162). [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)
- Yuan, K., Shao, N. Y., Hennigs, J. K., Discipulo, M., Orcholski, M. E., Shamskhov, E., Richter, A., Hu, X., Wu, J. C., & de Jesus Perez, V. A. (2016). Increased Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 Expression in Lung Pericytes Is Associated with Reduced Endothelial-Pericyte Interactions and Small Vessel Loss in Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Pathology*, 186(9), 2500–2514. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.05.016>

- Zabini, D., Crnkovic, S., Xu, H., Tscherner, M., Ghanim, B., Klepetko, W., Olschewski, A., Kwapiszewska, G., & Marsh, L. M. (2015). High-mobility group box-1 induces vascular remodelling processes via c-Jun activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *19*(5), 1151–1161. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12519>
- Zabini, D., Granton, E., Hu, Y., Miranda, M. Z., Weichelt, U., Bonnet, S. B., Bonnet, S., Morrell, N. W., Connelly, K. A., Provencher, S., Ghanim, B., Klepetko, W., Olschewski, A., Kapus, A., & Kuebler, W. M. (2018). Loss of SMAD3 Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension via MRTF Disinhibition. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *197*(2), 244–260. <https://doi.org/10.1164/rccm.201702-0386OC>
- Zamanian RT, Badesch D, & Chung L. (2021). Safety and Efficacy of B-Cell Depletion with Rituximab for the Treatment of Systemic Sclerosis-associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.*, *204* (02), 209–221.
- Zawia, A., Arnold, N. D., West, L., Pickworth, J. A., Turton, H., Iremonger, J., Braithwaite, A. T., Cañedo, J., Johnston, S. A., Thompson, A. A. R., Miller, G., & Lawrie, A. (2021). Altered Macrophage Polarization Induces Experimental Pulmonary Hypertension and Is Observed in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *41*(1), 430–445. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314639>
- Zha, Q. B., Wei, H. X., Li, C. G., Liang, Y. D., Xu, L. H., Bai, W. J., Pan, H., He, X. H., & Ouyang, D. Y. (2016). ATP-induced inflammasome activation and pyroptosis is regulated by AMP-activated protein kinase in macrophages. *Frontiers in Immunology*, *7*(DEC). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00597>
- Zhang, B., Niu, W., Dong, H. Y., Liu, M. L., Luo, Y., & Li, Z. C. (2018). Hypoxia induces endothelial-mesenchymal transition in pulmonary vascular remodeling. *International Journal of Molecular Medicine*, *42*(1), 270–278. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3584>
- Zhang, J., Lu, X., Liu, M., Fan, H., Zheng, H., Zhang, S., Rahman, N., Wołczyński, S., Kretowski, A., & Li, X. (2020). Melatonin inhibits inflammasome-associated activation of endothelium and macrophages attenuating pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular Research*, *116*(13), 2156–2169. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz312>
- Zhang, J., Zhang, Y., Li, N., Liu, Z., Xiong, C., Ni, X., Pu, Y., Hui, R., He, J., & Pu, J. (2009). Potential diagnostic biomarkers in serum of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Medicine*, *103*(12), 1801–1806. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.07.017>
- Zhong, D. X., Zhang, Y., Jin, Q., Zhang, X. C., Zhang, F., Chen, D. D., Guan, L. H., Zhou, D. X., & Ge, J. B. (2021). Increased serum PCSK9 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: insights from inflammatory cytokines. *Pulmonary Circulation*, *11*(4). <https://doi.org/10.1177/20458940211051292>

