Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Monika Křivonosková

Role metabolismu a imunitního systému v plicní hypertenzi
The role of metabolism and imunne system in pulmonary hypertension

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Lydie Plecitá, PhD.

Praha, 2020

Poděkování:

Poděkování patří mé školitelce RNDr. Lydii Plecité, PhD za její odborné rady, čas strávený nad mojí bakalářskou prací a za velkou trpělivost.

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, 12. 08. 2020

Podpis:

Abstrakt:

Plicní arteriální hypertenze je fatální onemocnění s nízkým výskytem, jež postihuje plicní cévy, které se remodelují, stěny cév tloustnou a postupně zmenšují svůj průsvit. Během toho dochází k výlevu některých látek z endoteliálních buněk, jež působí vazokonstrikčně a proliferativně na buňky hladkého svalstva. Taktéž dochází ke snížení produkce vazodilatačních látek, což má opět vazokonstrikční efekt. Akumulace imunitních buněk v adventicii podporuje proliferaci buněk hladkého svalstva, migraci a diferenciaci fibroblastů v myofibroblasty, jež působí změny ve složení extracelulární matrix. Změny metabolismu všech buněk plicní cévní stěny týkající se přechodu na glykolýzu a zvýšený příjem glukózy podporují proliferaci buněk a modifikují signalizaci vedoucí k postupu a aktivaci buněk imunitního systému, které provází remodelaci plicních cév.

Klíčová slova:

Plicní arteriální hypertenze, remodelace plicních cév, hypoxie, plicní arteriální endotelové buňky, plicní arteriální hladkosvalové buňky, plicní arteriální fibroblasty, metabolismus, mitochondrie, zánět

Abstract:

Pulmonary arterial hypertension is a low-incidence, fatal, disease that affects the pulmonary vessels, which remodel, thicken and gradually reduce lumen. During this signaling molecules are excreted from endothelial cells, which act vasoconstrictively and proliferatively on smooth muscle cells. There is also a reduction in the production of vaodilators, which again has a vasoconstrictive effect. Accumulation of immune cells in adventitia promotes smooth muscle cell proliferation, migration and differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, which causes changes in the composition of the extracellular matrix. Changes in metabolism within all artery layers related to the transition to glycolysis and increased glucose uptake promote cell proliferation and modulate signaling leading to infiltration and activation of immune cells resulting in artery remodeling.

Key words:

Pulmonary arterial hypertension, pulmonary vascular remodeling, hypoxia, pulmonary arterial endothelial cells, pulmonary arterial smooth muscle cells, pulmonary arterial fibroblasts, metabolism, mitochondria, inflammation

Seznam zkratek:

Název:	Anglicky:	Česky:
ActRIIa	Activin receptor protein 2 a	Spojené receptory aktivinu typu 2 a
ActRIIb	Activin receptor protein 2 b	Spojené receptory aktivinu typu 2 b
ADAM	Disintegrin and metalloproteinase	Dezintegrin a metaloproteináza
ALK	Activin receptor-like kinase	Kinázy podobné aktinovým receptorům
AMPK	AMP-activated protein kinase	AMP aktivovaná proteinová kináza
Arg1	Arginase 1	Argináza 1
ATF-6	Activating transcription factor 6	Aktivující transkripční faktor 6
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
BLT1	Leukotriene B4 receptor 1	Receptor 1 leukotrienu B4
BMP	Bone morphogenetic proteins	Kostní morfogenetický protein
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor type 2	Kostní morfogenetický protein typu 2
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyklický adenosinmonofosfát
CC	Citric acid cycle	Cyklus kyseliny citrónové
CD	Classification determinant	Klasifikační determinant
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	Cyklický guanosinmonofosfát
CTGF	Connective tissue growth factor	Růstový faktor pojivové tkáně
DC	Dendritic cells	Dendritické buňky
Drp1	Dynamin related protein 1	Protein 1 související s dynaminem
eIF2α	Eukaryotic Initiation Factor 2	Eukaryotický iniciační faktor 2
EndoMT	Endothelial to mesenchymal transition	Přechod endoteliálních buněk do mezenchymálních
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	Endoteliální NO syntáza
ER	Endoplasmic reticulum	Endoplazmatické retikulum
ERK	The extracellular-signal-regulated kinase	Kináza regulovaná extracelulárním signálem
ET-1	Endothelin 1	Endotelin-1
ETA	Endothelin receptor type B	Endotelinový receptor A
ETB	Endothelin receptor type B	Endotelinový receptor B
ETC	Electron transport chain	Elektronový transportní řetězec
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2	Fibroblastový růstový faktor 2

Fizz1	Resistin-like molecule alpha 1	Restlinu podobná molekula 1 alfa
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
GLUT	Glucose transporters	Glukózový přenašeč
HIF	Hypoxia-inducible factors	Faktor indukovaný hypoxií
HK-2	Hexokinase 2	Hexokináza 2
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule 1	Intracelulární adhezivní molekula 1
ID	Inhibitor of DNA-binding proteins	Inhibitory rodiny genů vázajících DNA
IL	Interleukin	Interleukin
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1	Enzym 1 vyžadující inositol
LTB4	Leukotriene B4	Leukotrien B4
MAC	Membrane attack complex	Membránu napadající komplex
MAPK	Mitogen-activated protein kinases	Mitogenem aktivované proteinkinázy
MiD	Mitochondrial dynamics protein	Protein mitochondriální dynamiky
MMP	Matrix metalloproteases	Matrixové metaloproteázy
MR	Mannose receptor	Manózový receptor
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NE	Neutrophil elastase	Neutrofilní elastáza
NET	Neutrophil extracellular traps	Neutrofilní extracelulární pasti
NO	Nitric oxide	Oxid dusnatý
NOX	NADPH oxidase	NADPH oxidáza
ODC	Ornithine decarboxylase	Ornitin dekarboxylázy
Orai	Calcium release-activated calcium channel protein	Vápníkový kanál aktivovaný vypuštěním vápníku
PAEC	Pulmonary arterial endothelial cells	Plicní arteriální endotelové buňky
PAH	Pulmonary arterial hypertension	Plicní arteriální hypertenze
PASMC	Pulmonary artery smooth muscle cells	Plicní arteriální hladkosvalové buňky
PDH	Pyruvate dehydrogenase	Pyruvát dehydrogenáza
PDE	Phosphodiesterase	Fosfodiestrázové enzymy
PDGF-AA	Platelet derived growth factor-AA	Růstový faktor AA odvozený z destiček
PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase	Kináza endoplazmatického retikula podobná R kináze
PGI2	Prostaglandin I2	Prostagladin I2

PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PK	Pyruvate kinase	Pyruvát kináza
PKM1/2	Pyruvate kinase muscle-1/2	Svalová pyruvát kináza 1/2
RELM-α	Resistin-like molecule-alpha	Resistinu podobná molekula alfa
ROS	Reactive oxygen species	Reaktivní kyslíkové druhy
SAM-DC	S-adenosylmethionine decarboxylase	S-adenosylmetionin dekarboxylázy
SERT	Serotonin transporter	Transportér serotoninu
SGLT	Sodium-dependent glucose transporters	Sodno-glukózový transportéry
SICE	Non-voltage-dependent store-Independent Ca2+ Entry	N/A
SOCC	Store-operated calcium channel	N/A
SOCE	Non-voltage-dependent store-operated	N/A
SP1	Specific protein 1	Specifický protein 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3
STIM	Stromal interacting molecule	Molekula stromální interakce
TGF-β	Transforming growth factor beta	Transformující růstový faktor beta
Th	T helper cells	T pomocné buňky
TLR	Toll-like receptory	Toll like receptory
TNF	Tumor necrosis factor	Tumor nekrotizující faktor
Treg	Regulatory T cells	Regulační T lymfocyty
TRPC	Transient receptor potential-channel	Potenciální kanál přechodného receptoru
TβR2	Transforming growth factor beta type two receptor	Receptor transformujícího růstového faktoru beta typu dva
VCAM	Vascular cell adhesion molecules	Adhezivní molekuly vaskulárních buněk
VDAC	Voltage-dependent anion-selective channel	Aniontový kanál řízený napěťově
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vaskulární endotelový růstový faktor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor	Receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru
VGCC	Voltage-gated calcium channels	Voltage dependentní vápníkový kanál
XBP1	X-box binding protein 1	X-box vázající protein
XO	Xanthine oxidase	Xantin oxidázy

Obsah

1. Úvod 1

2. Experimentální přístupy ve výzkumu PAH 2

2.1. Monokrotalin 2

2.2. Bleomycin 2

2.3. Hypoxie 2

3. Remodelace cév 3

3.1. Endotel 3

3.1.1. Vaskulární endoteliální růstový faktor 4

3.1.2. Tromboxan A2 4

3.1.3. Polyaminy 4

3.1.4. Xantin oxidáza 5

3.1.5. Oxid dusnatý 5

3.1.6. Prostacyklin 5

3.1.7. Endothelin-1 6

3.1.8. Serotonin 7

3.1.9. Fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2) 7

3.1.10. Kostní morfogenetický proteinový receptor typu 2 (BMPR2) 7

3.2. Hladká svalová vrstva 11

3.2.1. Iontové kanály 11

3.2.2. HIF a Src 13

3.3. Adventicie a extracelulární matrix 13

3.3.1. Fibroblasty 13

4. Hypotézy vzniku plicní arteriální hypertenze 15

4.1. Outide-in hypotéza 15

4.2. Inside-out hypotéza 15

5. Metabolické změny v PAH 17

4.1. Glukóza 18

4.1.1. Glykolýza 18
4.1.2. Pentózofosfátová dráha 19
4.2. Mitochondrie 19
4.2.1. Citrátový cyklus 20
4.2.2. Glutaminolýza 20
4.2.3. Hyperpolarizace mitochondriální membrány, NOX a ROS 21
4.3. Endoplazmatický stres 21
6. Role imunitních složek a zánětu 23
6.1. Cytokiny 23
6.1.1. Interleukin 1β 23
6.1.2. Interleukin 6 24
6.1.3. Interleukin 10 24
6.1.4. Fraktalkin 25
6.2. Buňky vrozené imunity 25
6.2.1. Makrofágy 25
6.2.2. Komplement 27
6.2.3. Neutrofilní granulocyty 28
6.2.4. NK buňky 29
4.2.5. Žírné buňky 29
6.3. Buňky adaptivní imunity 30
4.3.1. Regulační T-lymfocyty (Treg) 30
4.3.2. Th1, Th2 a Th17 30
7. Závěr 31
8. Reference 32

1. Úvod

Plicní hypertenze je souhrnné označení pro pět kategorií nemocí, které spojuje zvýšení tlaku v plicních cévách. Plicní arteriální hypertenze (PAH) je jednou z těchto pěti kategorií plicní hypertenze. Jedná se o onemocnění s prevalencí 15-50 případů na 1 000 000 (Lau *et al.*, 2017), které je charakterizováno zvýšením hodnoty středního tlaku v plicích nad 25mmHg. Charakteristickým rysem pro toho onemocnění je remodelace vedoucí ke zbytnění malých a středních plicních cév do 500 µm, což vede ke snížení průtoku krve plicními cévami, a to má v neřešeném případě za následek přetížení pravé srdeční komory a její selhání (Huertas *et al.*, 2020). Uvádí se, že střední míra přežití je 2,8 let u dospělých osob a u dětí 10 měsíců (Clapp and Gurung, 2015).

Příčiny PAH mohou být hypoxie, toxiny, hormonální vlivy nebo je PAH spojená s dalšími onemocněními. Klasifikuje se do pěti kategorií dle příčiny vzniku: ideopatická, dědičná, indukovaná drogami nebo toxiny, PAH související s jinými onemocněními a perzistentní plicní hypertenze novorozenců (Thenappan *et al.*, 2018).

Principem PAH je remodelace plicních cév, při nichž dochází ke změně fungování metabolismu vaskulárních buněk plicních cév, kdy dochází k upřednostňování anaerobního metabolismu před aerobním. Zvýhodnění glykolýzy před citrátovým cyklem a elektron-transportním řetězcem je známkou Warburgrova efektu, který je taktéž charakteristický pro rakovinné buňky. To umožňuje zvýšenou proliferaci buněk a změny v signálních kaskádách v místě přestavby plicní cévy. Změny v produkci cytokinů, akumulace leukocytů a lymfocytů naznačují, že PAH je aspoň z části autoimunitní a zánětlivé onemocnění. Tyto změny zapříčiní migraci cévních buněk jednotlivých cévních vrstev, které mají antiapoptický fenotyp, dále vaskulární fibrózu, zbytnění a ztuhnutí plicních cév a tvorbu nových cév.

Pochopení mechanismů, které se odehrávají na buněčné úrovni je klíčové, zejména porozumění interakce imunitního sytému s metabolicky změněnými buňkami plicních cév, neboť nynější léčba zaměřující se na vazokonstrikci není dostačující, protože pouze snižuje počet hospitalizovaných, ale nesnižují mortalitu.

2. Experimentální přístupy ve výzkumu PAH

Plicní (arteriální) hypertenze se dá v laboratorních podmínkách indukovat hypoxií či působením látek jako je monokrotalin nebo bleomycin. Jako modelové organismy se klasicky používají myši nebo krysy, protože jejich úsporná velikost a osekvenovaný genom z nich dělají dobré cíle pro experimenty. Další model, co se používá, ale ne tak často, je skot, protože se jedná o drahý model, ale oproti hlodavcům vyvinou plicní hypertenzi, jakou nacházíme u člověka.

2.1. Monokrotalin

Jedná se o rostlinný pyrolizidinový alkaloid ze semen *Crotalaria spectabilis*, používaný k indukování PAH u myší a krys. Nejčastější způsob podání je jednorázová subkutánní injekce. Obvyklá dávka je mezi 30-80 mg/kg (L. Sheng, M. Christopher, 2016). 60 mg/kg monokrotalinu způsobí do 2-3 týdnů akutní poškození plicních cév (Mathew and Lakshminrusimha, 2019). Podáním více než 300mg/kg vede ovšem ke smrti zvířecího modelu do pár hodin od podání, protože způsobí selhání jater. Po podání je monokrotalin metabolizován v játrech izoenzymem cytochromu P-450 3A4 na pyrol dehydromonokrotalin, který je toxický. V plicích indukuje apoptózu plicních arteriálních endotelových buněk (PAEC), způsobuje fibrózu plic či myokarditidu (L. Sheng, M. Christopher, 2016).

2.2. Bleomycin

Je antibiotikum izolované ze *Streptomyces verticillatus,* které je méně často používané při výzkumu PAH, protože nenapodobuje příznaky charakteristické pro PAH, ale pouze způsobuje fibrózu plicní tkáně. Poškození plic se projeví po 2 týdnech od podání bleomycinu a fibróza se začne objevovat mezi 3-4 týdny (Della Latta *et al.*, 2015).

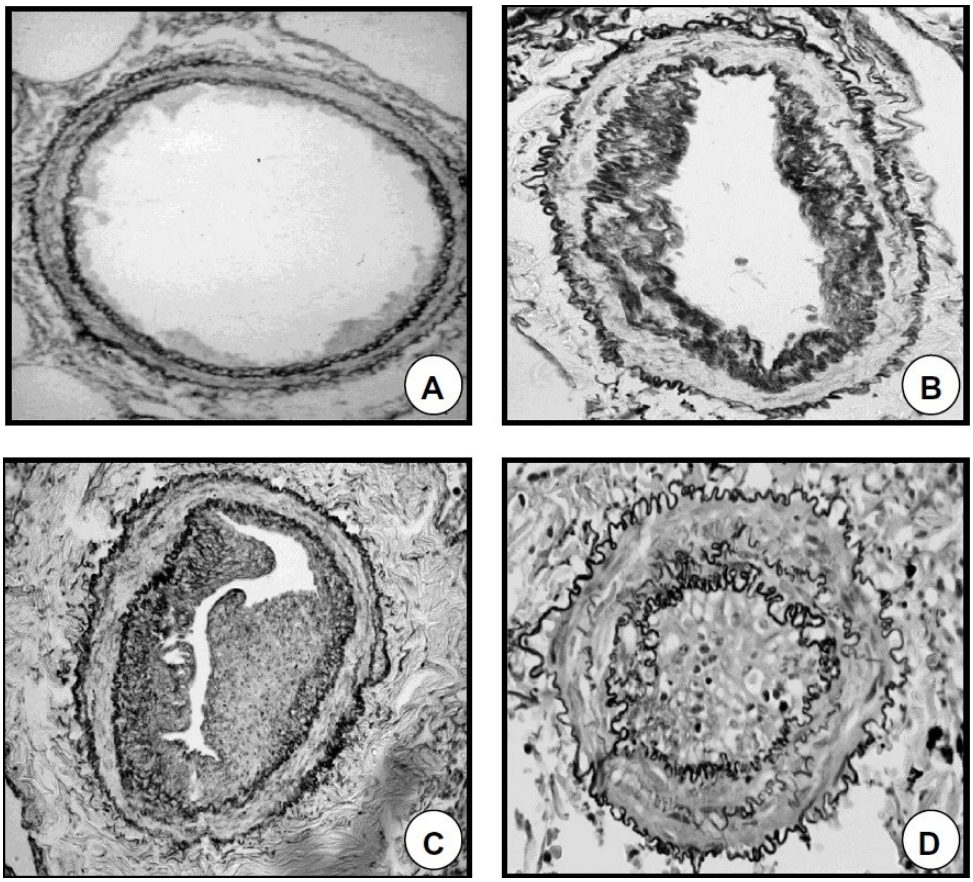
2.3. Hypoxie

Jsou tři způsoby, jak vytvořit hypoxické prostředí. První způsob představují hypobarické komory, což jsou speciálně upravené komory, kde se pomocí vakuových čerpadel sníží celkový tlak a tím se i sníží parciální tlak kyslíku, což simuluje vysoké nadmořské výšky přibližně 5 550 až 6 000 metrů nad mořem. Druhý způsob jsou normobarické komory kde se do částečně uzavřené komory pouští dusík z láhve s tekutým dusíkem, a to způsobí parciální snížení kyslíku oproti dusíku. Poslední způsob představuje snížení kyslíku na 10-12% pomocí filtrace kyslíku (West and Hemnes, 2011).

Hlavní účinek hypoxie je stabilizující vliv na faktory indukované hypoxií (HIF), které v nepřítomnosti kyslíku nejsou degradovány a mohou dimerizovat do jádra, kde slouží jako transkripční faktory pro široké spektrum genů, které se poté podílejí na patologii PAH (viz. podrobněji dále; Kaelin and Ratcliffe 2008).

3. Remodelace cév

Plicní arteriální hypertenze (PAH) se vyznačuje remodelací všech vrstev malých a středních plicních cév. Dochází k proliferaci, migraci, neoangiogenezi, antiapoptickému stavu a celkové změně buněk tvořící endotel, hladkou svalovou tkáň a adventicii. Tvoří se plexiformní léze nebo neointima. Kvůli zvětšení vrstev dochází ke zmenšení průsvitu v cévách, ke zvýšení tlaku a nízkému průtoku krve cévou.



Obrázek 1 – Časový vývoj PAH. *A) Zdravá céva. B) Mírně zvětšená vrstva adventicie. C) Velmi zvětšená adventicie a rozvinutá PAH. D) Hypertrofující PASMC. Převzato z* (Blanco *et al.*, 2020).

3.1. Endotel

Endotel je jednovrstevný epitel, který vystýlá vnitřní část cévy. Za fyziologických podmínek endotel zabraňuje srážení krve, účastní se angiogeneze, řídí vazokonstrikci a vazodilataci, interaguje s buňkami imunitního systému a zabraňuje proliferaci dalších vrstev cévy (Rajendran *et al.*, 2013).

Během PAH dochází k proliferaci a migraci buněk endotelu (plicní arteriální endoteliální buňky/PAEC), zvýšené koagulaci na jejich stěnách a vazokonstrikci. Z proliferujících PAEC se ve většině případů tvoří plexiformní léze (Humbert *et al.*, 2004). Dochází ke zvýšení produkce látek jako je tromboxan A2, vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), serotonin, polyaminy či entohelin-1 (ET-1). Na druhou stranu dochází ke snížení prostacyklinu (PGI2) a oxidu dusnatého (NO). (Wilkins, 2012). Prostřednictvím xantin oxidázy (XO) dochází ke zvyšování oxidačního stresu. Dále produkují

fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2), který napomáhá proliferaci PASMC. Je zde i zvýšená exprese adhezivních molekul na membránách PAEC. Všechny změny v endotelu se projevují v dalších vrstvách cévy.

3.1.1. Vaskulární endoteliální růstový faktor

VEGF je buněčně specifický mitogen, který produkují krevní destičky. Jeho úlohou je oprava endotelu a hojení ran ve spolupráci s růstovým faktorem odvozeným z destiček (PDFG). Hladiny VEGF krevních destiček jsou zvýšeny u všech forem PAH (Eddahibi *et al.*, 2000).

Endoteliální buňky za normálních okolností nesyntetizují VEGF, ale při hypoxii jej začnou syntetizovat. VEGF po uvolnění se váže na VEGF receptor (VEGFR) a spouští signalizační kaskády, které vedou k proliferaci, antiapoptickému stavu a angiogenezi. Velká koncentrace VEGF a VEGFR byla nalezena v plexiformních lézích. Přes toto zjištění mají buňky v plexiformních lézích nízkou toleranci k poranění i přes to, že exprimují VEGF (Ranchoux *et al.*, 2018).

3.1.2. Tromboxan A2

Jedná se o metabolit kyseliny arachidonové, jenž je produkován PAEC a destičkami. Podporuje vazokonstrikci, zúžení různých typů hladkých svalů, včetně PASMC a agregaci destiček. Působí jako mitogen, prozánětlivý a fibrotický činitel. Produkce tromboxanu A2 při PAH se zvyšuje a tím se podílí na patologii PAH. Tromboxan A2 se váže na tromboxanový protenoidní receptor (TP), čímž reguluje signální kaskádu zahrnující kinázu regulovanou extracelulárním signálem (ERK) a signální kaskádu zprostředkovanou RhoA, které zvyšují proliferaci (Mulvaney *et al.*, 2020).

Nedávný výzkum poukázal na nový antagonistický receptor TP NTP42, který se zkouší jako nové léčivo pro PAH. Prokázalo se snížení středního arteriálního tlaku a systolického tlaku pravé komory, snížení remodelace plicních cév a pronikání žírných buněk do plicní cévy po jeho podání u myší, kterým byla PAH indukována monokrotalinem (Mulvaney *et al.*, 2020).

3.1.3. Polyaminy

Jedná se o skupinu biologicky aktivních aminů zahrnující putrescin, který je diamin a spermidin a spermin, které jsou polyaminy. Jejich zvýšená syntéza napomáhá patologii PAH (Budhiraja, Tuder and Hassoun, 2004).

Putrescin je v buňce syntetizován z ornitinu pomocí ornitin dekarboxylázy (ODC), poté je převeden na spermidin a spermin prostřednictvím S-adenosylmetionin dekarboxylázy (SAM-DC) a spermidin/spermin syntázy. Činnost ODC a SAM-DC stoupá při PAH indukované monokrotalinem, ale u PAH indukované hypoxií se zvedá činnost jen u SAM-DC a aktivita ODC je snížena (Gillespie and Olson, 2010).

Aktivita polyaminů byla pozorována v PAEC a PASMC. Transport při hypoxii do PAEC se zvýší pro všechny aminy, což ale neplatí pro PASMC, tam dojde ke zvýšení transportu pouze u putrescinu.

Zvýšená hladina těchto polyaminů pak přispívá k růstu a proliferaci vaskulárních buněk (Gillespie and Olson, 2010).

3.1.4. Xantin oxidáza

XO je enzym nacházející se v PAEC, jenž je hlavní přispěvatel oxidačního stresu, protože tvoří superoxidový aniont a peroxynitrity. Nachází se na povrchové membráně PAEC, kde je její aktivita zvýšená u pacientů s PAH, což napomáhá dysfunkci PAEC (Spiekermann, Schenk and Hoeper, 2009).

3.1.5. Oxid dusnatý

NO je syntetizován v PAEC pomocí enzymu endoteliální NO syntázy (eNOS), která využívá L-arginin jako základní substrát pro syntézu NO (Wilkins *et al.*, 2008). Uplatňuje se jako vazodilatátor plicních cév a inhibuje aktivaci destiček a proliferaci PASMC. Také snižuje produkci endotelinu-1 navozujícího vazkonstrikci (viz. níže). Při PAH dochází ke snížení produkce NO, a to napomáhá vazokonstrikci cév, kvůli přerušení jeho signální dráhy. Snížení NO je způsobeno volnými radikály, které se tvoří při oxidativním stresu a reagují s NO a tvoří peroxinitrit ($ONOO^-$) (Wilkins, 2012). Pokud naopak dojde ke zvýšení hladiny NO tak dochází k rychlé oxidaci na dusitany (NO_2^-) a dusičany (NO_3^-), které v těchto formách nemůžou zajišťovat potřebnou signalizaci. Dále NO_2^- a NO_3^- sami o sobě mohou poškozovat buňky podobně jako reaktivní formy kyslíku (ROS). Zánět má vliv na snížení aktivity eNOS a tím na produkci NO (Sim, 2010). Může také přímo dojít k inhibici eNOS, pomocí asymetrického dimethylargininu (Wilkins, 2012).

NO je z endotelu difundován do buněk hladkého svalstva plicních arterií (PASMC) kde se ochotně váže na sulfátové a železné ionty čímž aktivuje hemovou skupinu guanylátcyklázy, která zvyšuje koncentraci cGMP. Zvýšená koncentrace cGMP v buňce vede k aktivaci protein kinázy závislé na cGMP, která snižuje intracelulární koncentraci Ca^{2+} a také aktivuje fosfatázu lehkého myozinového řetězce, která snižuje fosforylaci myosinu (Sim, 2010). Obě reakce vedou k vazodilataci cév.

Vazodilatační účinky NO jsou jedním z cílů při léčbě PAH. Účinky léků se zaměřují na fosfodiesterázové enzymy, které rozkládají cGMP. Konkrétně je léčba zaměřena na fosfodiestrázové enzymy typu 5 (PDE5), které inhibují. Jako příklad schváleného léčiva se používá Slidenafil nebo Tadalafil, které se liší chemickou strukturou a poločasem rozpadu (Lau *et al.*, 2017).

3.1.6. Prostacyklin

PGI2 je dvaceti uhlíkatá sloučenina syntetizovaná z kyseliny arachidonové v PAEC enzymem prostacyklin syntázy. Mezi účinky PGI2 patří vazodilatace, antiproliferační, protizánětlivé a antitrombotické účinky (Clapp and Gurung, 2015). Opět je během PAH snížena jeho produkce, což má za následek podíl na vazokonstrikci cév. PGI2 má v buňkách krátkou dobu života a to jen pár minut (Ruan *et al.*, 2010).

Po syntéze v PAEC dojde k navázání PGI2 na prostacyklinový receptor na membráně PASMC, který aktivuje adenylátcyklázu, která přeměňuje ATP na cAMP, které pak slouží jako druhý posel a stimuluje relaxaci PASMC (Vachiéry, 2011).

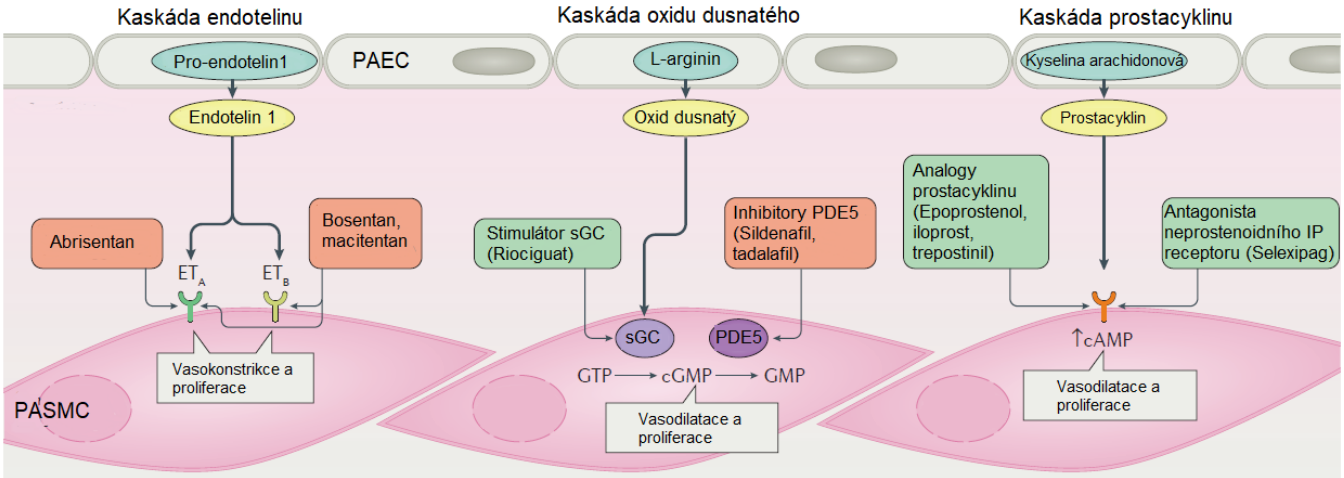
Analogy prostacyklinu, stejně jako NO, se využívají v léčbě pacientů s PAH. Nyní je využíváno čtyř hlavních analogů: Epoprostenol, Iloprost, Terpostilin, Beraprost. Využití analogů je dáno krátkou životností PGI2 a náročnou syntézou. Analogy se liší jak chemickou strukturou, životností tak i způsobem podání (Vachiéry, 2011).

3.1.7. Endothelin-1

ET-1 je produkován v PAEC a sekretován do extracelulárního prostoru, kde se naváže na jeden ze dvou receptorů na PASMC. Těmito receptory jsou endotelinový receptor A (ETA) a endotelinový receptor B (ETB). Na který receptor se ET-1 naváže záleží na anatomickém umístněné PASMC. ETA se nachází hlavně v hlavní plicní tepně a oba typy v rezistenčních cévách (Humbert *et al.*, 2004). Během PAH je jeho koncentrace značně zvýšená a důvod zvýšení je zatím nejasný.

ET-1 po navázání na receptor způsobí aktivaci fosofolipázy C, která produkuje z fosfatidylinositolu-4,5-bifosfátu (PIP2) inositol trifosfát, který uvolňuje Ca^{2+}. Ca^{2+} se váže na kalmodulin a vzniká komplex kalmodulin-Ca^{2+}, který je schopen aktivovat kinázu lehkého řetězce myosinu, což vede k fosforylaci lehkého myozinového řetězce a k vazokonstrikci (Wilson *et al.*, 2018).

ETA a ETB jsou cílem léčiv. Bosentan se zaměřuje na oba receptory, zlepšuje dušnost a snižuje plicní arteriální resistenci. Ovšem po jeho podání dochází ke zvýšení jaterních aminotransferáz, které se po vysazení bosentanu vrátí do normálních koncentrací. Abmrisentan se zaměřuje pouze na ETA a jeho výhoda je relativně dlouhá životnost, která umožní dávkování jednou denně (Sahni *et al.*, 2016).



Obrázek 2 – Molekulární cíle povolených léčiv. *Seznam zkratek: sGC (Soubilní guanylát cykláza), ETA (Endotelinový receptor A), ETB (Endotelinový receptor B), PDE5 (fosfodiesteráza 5). Převzato a upraveno podle předlohy:* (Lau *et al.*, 2017).

3.1.8. Serotonin

Serotonin je produkován v PAEC a je transportován přes transportér serotoninu (SERT) ven z buňky, kde se váže na receptor serotoinu, který se nachází na PASMC. Tam způsobuje vazokonstrikci a má proliferační účinky. Zdá se, že serotonin způsobuje proliferaci přes ovlivnění NADPH oxidázy, která tvoří ROS a způsobuje v buňkách oxidační stres. Zároveň potlačuje NrF-2, což je jaderný faktor řídící koncentrace ROS (Hood *et al.*, 2017). Právě při PAH je jeho koncentrace nadměrně zvýšená z neznámých důvodů.

Tabulka 1 – Dysregulace vaskulárních efektorů v PAEC. (Mhatre V. Ho, Ji-Ann Lee, 2012)

Vaskulární efektor	Změna aktivity v PAH	Účinek na vazokonstrikci	Účinek na buněčnou proliferaci	Účinek na trombózu
VEGF	Zvýšený	N/A	Zvýšený	N/A
Tromboxan A2	Zvýšený	Zvýšený	Zvýšený	Zvýšený
Oxid dusnatý	Snížený (Zvýšený v plexiformních lézí)	Zvýšený	Zvýšený v plexiformních lézí	Zvýšený
Prostacyklin	Snížený	Zvýšený	Zvýšený	Zvýšený
Endothelin-1	Zvýšený	Zvýšený	Zvýšený	N/A
Serotonin	Zvýšený	Zvýšený	Zvýšený	Zvýšený

3.1.9. Fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2)

FGF2 je mitogen, který je velmi aktivně produkován PAEC do svého okolí, kde ovlivňují proliferaci a antiapoptický stav PASMC, ale též autokrinně působí na PAEC. Po navázání na jeho receptor, který taktéž vykazuje zvýšenou expresi, dojde k aktivaci ERK 1/2 dráhy, která spouští dělení buněk. Zvýšení FGF2 koreluje se zvýšením BCL-2 a BCL-xL, které indukují antiapoptický stav buňky (Tu *et al.*, 2011). BCL-2 a BCL-xL jsou regulátory apoptózy, protože potlačují uvolňování apoptózu indukujícího faktoru.

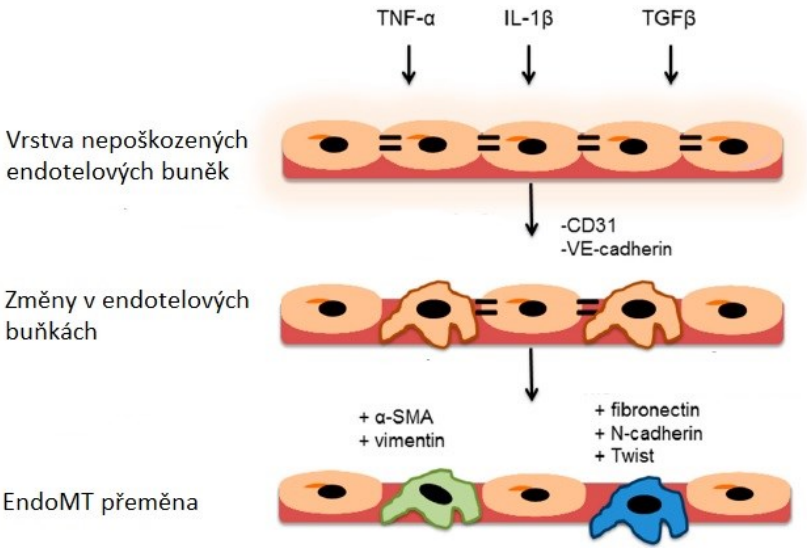
3.1.10. Kostní morfogenetický proteinový receptor typu 2 (BMPR2)

BMPR2 je receptor ze skupiny receptorů transformujících růstových faktorů β (TGF-β), který se podílí na signalizaci regulující diferenciaci, migraci, proliferaci a apoptózu. Nachází se jak na PAEC, tak i na PASMC. Výzkumy ukázaly, že až 75% postižených s dědičnou PAH má mutaci v genu pro BMPR2 a 10-20% se sporadickou PAH má též mutaci v tomto receptoru, což značně zvyšuje šanci na vznik PAH. Mutací v genu BMPR2 bylo objeveno více než 300 (Evans *et al.*, 2016). Ovšem pokud nedochází k mutaci genu pro BMPR2, tak může být jeho exprese snížená. (Rabinovitch and Rabinovitch, 2012).

BMP je rodina signálních molekul spadající do skupiny TGF-β, který se podílí jako ligand na signalizaci přes kinázu BMPR2 a s ním spojené receptory aktivinu typu II A/B (ActRIIa a ActRIIb). Například BMP4 zvyšuje proliferaci a migraci PASMC, což je dáno jeho zvýšenou expresí, jež je

zapříčiněná HIF-1α, který při hypoxii sedá na promotor genu pro BMP4 a zvyšuje jeho transkripci. Dále HIF-1α aktivuje dráhu ERK 1/2 a p38 mitogenem aktivovanou proteinovou kinázu (p38MAPK), které spolu s BMP4 zvyšují expresi komponentů SOCC (z anglického store-operated calcium channel) jimiž jsou TRPC1 a TRPC6 (z anglického transient receptor potential-channel), kvůli kterým se zvyšuje intracelulárně vápník, který proniká do buňky přes cytoplazmatickou membránu (Yang, Wang and Lu, 2017). Naopak BMP7 má protizánětlivé a protinádorové účinky. Je exprimován v mnoha tkáních včetně plic. Při vystavení hypoxii dojde ke snížení exprese BMP7. Experiment s myší vystavené hypoxii a se zvýšením exprese BMP7 ukázal na výrazně nižší systolický tlak v pravé komoře a zmírnění remodelace cév. Přítomnost BMP7 v PAEC snižuje přechod endoteliálních buněk do mezenchymálních (EndoMT), kvůli inhibici transkripčních faktorů jako je Snail, Slug a Twist, které se spouštějí hypoxií a mají vazbu na EndoMT přechod (Zhang *et al.*, 2018). BMP9 je cirkulující klidový faktor, který má ochranné účinky na plicní cévy a pokud dojde k mutaci v něm nebo v jeho receptoru, tak to má za následek apoptózu a narušení homeostáze PAEC. Váže se na komplex BMPR2, kinázy podobné aktinovým receptorům 1 (ALK1) a koreceptor endoglinu. Jeho exprese je při PAH snížená (Nikolic *et al.*, 2019).

EndoMT přechod je charakterizován ztrátou fenotypu PAEC, kdy získávají fenotyp mezenchymálních nebo myofibroblastových buněk. Mezenchymální typ buněk může pak diferencovat do jiných fenotypů jako jsou fibroblasty, chondrocyty nebo osteoblasty. Dochází ke ztrátě těsných spojů mezi PAEC, které zajišťovaly proteiny CD31, VE-kadheriny či p120-katenin, čímž dojde k jejich rozvolnění a migraci do hlubších vrstev cévy, kde působí invazivně a tím podporují hypertrofickou remodelaci. Taktéž dojde k změně složení povrchových molekul. Ztrácí se typické PAEC proteiny jako CD34, CD31, VE-kadheriny a začnou se objevovat nové protein jako jsou α-SMA či vimentin, které jsou charakteristické pro mezenchymální nebo myofibroblastové buňky. Snížení exprese p120-kateninu způsobí zvýšení Twist-1 a buňky exprimující Twist-1 tvoří základ plexiformních lézí (Ranchoux *et al.*, 2015). Plexiformní léze jsou komplexní plicní cévní léze, které vytváří sítě nebo kanálky tvořené endoteliálními buňkami a jádrovými buňkami, jejichž původ je nejasný. Plexiformní léze mají za následek uzavření průsvitu cévy, což způsobí zvýšení tlaku v plicních cévách (Leopold and Maron, 2016).

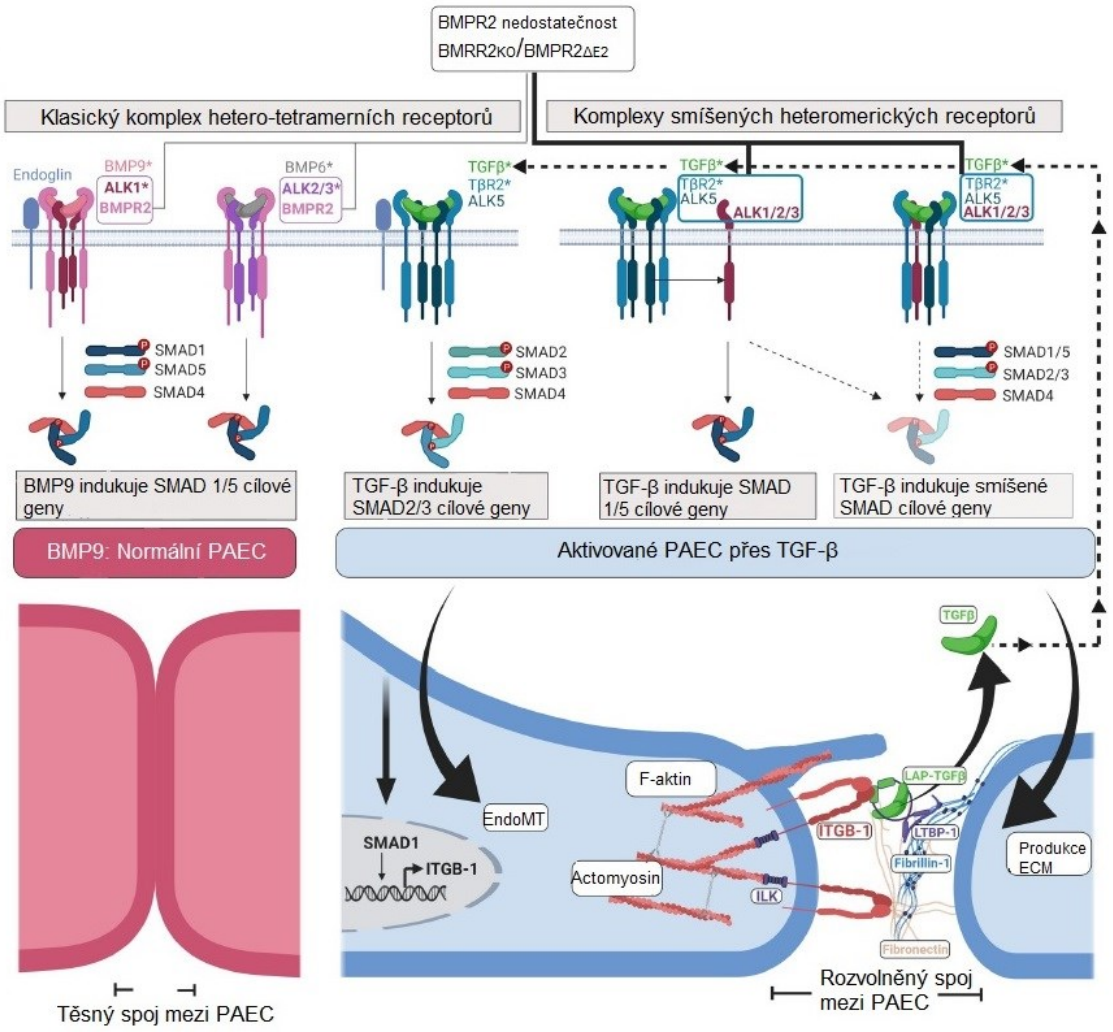


Obrázek 3 – Přeměna endoteliálních buněk do mezenchymálních nebo myofibroblastových. *Seznam zkratek: TNF-α (tumor nekrotizující faktor alfa), TGF-β (transformující růstový faktor), α-SMA (aktin hladkého svalstva). Převzato a upraveno podle předlohy:* (Leopold and Maron, 2016).

Signalizace přes BMP probíhá skrze komplexy receptorů, kde BMPR2 spolu s ALK3 zajišťují signalizaci pro BMP 2/4/6. BMPR2 a ALK1 zajišťují signalizaci pro BMP 9/10. Po navázání se spustí buď kanonická dráha zahrnující fosforylaci SMAD 1/5/8, jenž zapříčiní transkripci genů zahrnující inhibitory rodiny genů vázajících DNA (ID) a drah NOTCH, nebo přes nekanonickou dráhu zahrnující signalizaci přes MAPK a fosforylovaný protoonkogen tyrosin-protein kinázy Src. Pokud je v buňce mutace pro BMPR2, tak tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-α) snižuje jeho expresi, protože podporuje jeho štěpení ADAM10/17 (zkratka pro dizintegrin a metaloproteinázu). Ale pokud není BMPR2 mutován, tak i přes to je jeho exprese snižována ADAM. Toto snížení pak přepne signalizaci na ActRIIa a ALK2, což má potencionálně patogenní následky (Hurst *et al.*, 2017). Snížená exprese BMPR2 také způsobí vznik smíšených komplexů z BMPR1/TβR1/TβR2, které umožní zesílené buněčné odpovědi na TGF-β. Dysbalancovaná signalizace mezi BMP a TGF-β působí na PAEC akumulací proteinů v extracelulární matrix (ECM) jako je fibronektin, tensacin c nebo fibrilin 1 a podporuje EndoMT přechod (Hiepen *et al.*, 2019).

Zacílení na zvýšení exprese BMPR2 je možnou terapií PAH. Experimenty se zvýšením exprese BMPR2 pomocí adenovirového vektoru, který nesl příslušný gen, vedly k jeho zvýšení a následné tvorbě komplexů s ALK 1/2/3. Tím se zabrání tvorbě smíšených komplexů, na které se váže TGF-β. Tyto jevy vyústí ve zvýšení signalizace přes SMAD 1/5/8 a ke snížení signalizace přes SMAD 2/3, což vede k balancované signalizaci mezi BMP a TGF-β. U myší, kterým byla PAH indukovaná monokrotalinem, tato terapie vedla ke zlepšení stavu a srovnání systolického a arteriálního tlaku na normální úroveň (Harper *et al.*, 2016). Klinické studie používající trakolim prokázaly zlepšení u omezeného počtu pacientů, kterým se zlepšily pohybové kapacity a funkce pravé komory. Trakolim cílí na změnu dysfunkční signalizace BMPR2 a zvyšuje signalizaci přes SMAD 1/5/8. Dále chlorochin, který inhibuje

autofágii, brání lysosomální degradaci BMPR2, což vede k obnovení proapoptického a antiproliferativního fenotypu PASMC (Tielemans *et al.*, 2019).



Obrázek 4 – Signalizace pomocí receptorů BMPR2 a TβR2. *Ve zdravých PAEC se k nim krví dostávají BMP, v tomto případě BMP6/9. BMP9 se váže na komplex receptorů BMPR2 a ALK1, ke kterým se připojí koreceptor endoglin. Navázání BMP9 způsobí fosforylaci SMAD1 a SMAD5, které tvoří komplex se SMAD4 a společně dimerizují do jádra, kde se váží na promotory cílových genů. Stejně působí i BMP6 jen s rozdílem, že jeho receptor tvoří BMPR2 a ALK2/3 a dochází k fosforylaci SMAD2 a SMAD3. Jeho funkce se zdá podpora angiogeneze. Pokud běží tyto signalizace tak PAEC prosperuje a udržuje si normální charakter. TGF-β se váže na komplex receptorů TβR2 a ALK5, což způsobí fosforylaci SMAD 2 a SMAD3, který tvoří se SMAD4 komplex, který dimerizuje do jádra. Popřípadě se může vázat na smíšené receptory, který se účastní ALK1/2/3. Pokud dojde k mutaci nebo nedostatku BMPR2, tak dojde ke zvýšení tvorby receptorů pro TGF-β a tím pádem k signalizaci, která má za následek EndoMT přechod. V tomto případě je zde* $BMPR2^{KO}$*, kdy v buňce došlo ke ztrátě jedné kopie genu pro BMPR2 a mutace* $BMPR2^{\Delta E2}$*, u které došlo k vystřižení exonu 2. Tyto experimentálně připravené mutace dokazují důležitost BMPR2 pro zachování homeostáze PAEC. Seznam zkratek: BMPR2 (kostní morfogenetický proteinový receptor typu 2), BMP (kostní morfogenetický protein), ALK (kináza podobná aktinovým receptorům), TGF-β (transformující růstový faktor beta), TβR2 (receptor transformujícího růstového faktoru beta typu dva). Převzato a upraveno podle předlohy:* (Hiepen *et al.*, 2019).

3.2. Hladká svalová vrstva

Změna hladké svalové vrstvy je dramatická. Dochází ke zhušťování a proliferaci PASMC. Impulzy k tomu přicházejí jak z měnící se PAEC a adventicie, tak i z akumulujících se imunitních buněk, které produkují široké spektrum cytokinů. Mění se exprese molekul a kanálů, jenž udržují normální stav PASMC. Naopak dochází ke zvýšení transkripčního faktoru HIF, jenž se podílí na expresi proteinů zhoršující patologii PAH.

3.2.1. Iontové kanály

Iontové kanály hrají důležitou roli v patologii PAH. Bylo objeveno šest různých mutací v draslíkových kanálech, u kterých byla prokázána souvislost s PAH. Další dysfunkce byly objeveny u vápníkových kanálů, které vykazují ve většině případů zvýšenou expresi. Draslíkové a vápenné kanály spolu se signalizací založenou na fosfodiesterázách (PDE) ovlivňují proliferaci PASMC.

3.2.1.1. Draslíkové kanály

Draslíkové kanály jsou iontové kanály, které se nacházejí v cytoplazmatické membráně, jenž selektivně propouští draselné ionty a účastní se tvorby klidového potenciálu membrány, tvorbě a udržování akčních potenciálů či na buněčném dělení a proliferaci. Během PAH dochází ke snížení počtu napěťově řízených kanálů (K_V), které vedou k porušení napětí PASMC. Snížená exprese vede ke sníženému průtoku draselných iontů, což vede k depolarizaci membrány, která má za následek aktivaci kanálů Ca^{2+} závislých na napětí, což vede k dlouhodobému zvýšení Ca^{2+} v PASMC. Vzestup intracelulárního Ca^{2+} vede k vazbě vápníku na kinázy závislé na vápníku jako jsou MAPK nebo protein vázající element odpovědi na cAMP (z anglického cAMP response element binding protein), což vede buňku vstoupit do buněčného cyklu a tím proliferovat (Hayabuchi, 2017).

Jedním z těchto kanálů je K_V kanál KCNK3, který byl objeven v roce 2013, jenž má čtyři transmembránové domény a obsahuje dvě pórové domény na podjednotku. Nachází se v cytoplazmatické membráně a je ho možné inhibovat extracelulárním okyselením. U 3 z 230 pacientů se sporadickou PAH, byla objevena mutace stejnojmenného genu pro kanál KCNK3. Během PAH jsou jeho funkce výrazně sníženy, což koreluje s depolarizací cytoplazmatické membrány. Zdá se, že úbytek KCNK3 není projevem PAH, ale že se na její patologii podílí. Nedostatek KCNK3 způsobuje vazokonstrikci a dysfunkci PASMC a PAEC. Dlouhodobá inhibice zapříčiní zvýšení exprese alfa-1 antitrypsinu, který se může účastnit hyperproliferačního fenotypu fibroblastů, což podporují výzkumy in vitro, kdy alfa-1 antitrypsin má na fibroblasty proliferační účinky a naopak jeho snížená koncentrace brání migraci a invazi buněk (Antigny *et al.*, 2016).

3.2.1.2. Vápníkové kanály

Jak je již výše uvedeno, dochází k depolarizaci membrány, kvůli snížení exprese draselných kanálů, což spouští vtok Ca^{2+} do buňky. Existují tři hlavní typy vstupu Ca^{2+} do savčích buněk: voltage dependentní vápníkový kanál (VGCC), SOCE (z anglického Non-voltage-dependent store-operated Ca^{2+} entry) a SICE (z anglického non-voltage-dependent store-Independent Ca2+ Entry) (Lambert *et al.*, 2018).

VGCC jsou jediným těchto tří typů, které jsou řízeny napěťově. Nacházejí se na cytoplazmatické membráně v šesti různých podtypech, kdy na PASMC jsou exprimovány pouze dva typy: L-typ, jenž je ovládán vysokým napětím a T-typ, který je ovládán nízkým napětím. Jsou aktivovány depolarizací cytoplazmatické membrány, která vede k výtoku Ca^{2+} do intracelulárního prostředí buňky. Při PAH je zvýšená hlavně exprese L-typu kanálu, ale i T-typu. ET-1 zvyšuje intracelulární koncentraci Ca^{2+} prostřednictvím kanálu L-typu. Takto narušená signalizace má vliv na proliferaci, přežití a apoptózu PASMC (Lambert *et al.*, 2018).

SOCE je komplex kanálů, který se nacházejí jak na cytoplazmatické membráně, tak na membráně endoplazmatického retikula (ER). Jednou z těchto podjednotek SOCE je molekula 1 stromální interakce (STIM), která je umístěna na membráně ER a snímá koncentrace Ca^{2+} v ER. Protein vápníkového kanálu aktivovaný uvolňováním vápníku 1 (Orai1) umožňuje vstup vápníku do ER přes kanál aktivovaný uvolňováním vápníku (CRAC), čímž se doplňují zásoby Ca^{2+} v buňce. Na tom se účastní i kanály přechodového receptorového potenciálu (TRP), které podporují vtok Ca^{2+} do ER nebo se nepřímo podílejí na vstupu tím, že poskytnou klidový membránový potenciál. STIM2 a Orai2 mají zvýšenou expresi během PAH a působí proliferačně na PASMC. TRPC6 (podtyp TRP) má zvýšenou expresi při PAH a byla objevena mutace v jeho promotoru, která vede ke zvýšenému riziku rozvoje PAH. Během hypoxie se zvýší AMP aktivovaná proteinová kináza (AMPK), která zvýší TRPC6, jenž skrze VGCC způsobí depolarizaci membrány ER, čímž zvýší přenos Ca^{2+} do ER. Zvýšená exprese TRPC3 zvyšuje expresi SOCE, což opět přispívá proliferaci PASMC. TRPC1 se uplatňuje v neointimálním růstu cévy a proliferace PASMC. Pokusy se specifickými protilátkami proti TRPC3 ukázaly, na redukci negativních vlivů TRPC3 a poukázaly na možnost jich uplatnění v léčbě PAH (Lambert *et al.*, 2018).

SICE jsou kanály, které nejsou řízeny napěťově, jenž se skládají z izotypů Orai1 a Orai3, které aktivuje kyselina arachidonová a prostřednictvím STIM1 proudí Ca^{2+} do buňky. Tímto se podílí SICE na udržování vysoké koncentrace vápníku v buňce, což podporuje proliferaci PASMC (Lambert *et al.*, 2018).

Signalizace přes Ca^{2+} se účastní PDE1, která má tři podtypy: PDE1A, PDE1B, PDE1C a hydrolyzuje cAMP či cGMP, což jsou druzí posli, kteří se účastní regulace napětí PASMC přes kalmodulin-Ca^{2+} komplex. U pacientu s PAH jsou PDE1A a PDE1C více exprimovány, a to vede k strukturní remodelací

PASMC. Při výzkumu byly podávány inhibitory zaměřující se na PDE1 a bylo pozorováno značné zlepšení stavu cév (Schermuly *et al.*, 2007).

3.2.2. HIF a Src

HIF je transkripční faktor, který se skládá ze dvou podjednotek: HIF-1α a HIF-1β. HIF-1 α je výkonná podjednotka, která reguluje proliferaci, stav přežití buňky, angiogenezi, zánět, energetický metabolismus či fibrózu. HIF-1β je stabilní podjednotka HIF. Aktivace HIF-1α je podmíněna nízkou koncentrací kyslíku v buňce. HIF se nevyskytuje pouze v PASMC, jeho aktivita s uplatňuje u mnoha buněčných typů včetně buněk adventicie a PAEC (Liu *et al.*, 2019).

Pokud je v buňce dostatek kyslíku, tak HIF-1α je hydroxylován a to umožní vazbu VHL, která je součásti ubiqutin ligázy. Po vazbě VHL dojde k polyubiquitinaci a následnému zničení v proteazomu. Když buňka nemá dostatek kyslíku, tak nemůže dojít k jeho hydroxylaci, protože PDE, která hydroxyluje prolin na HIF-1α je aktivována kyslíkem. Dochází k hromadění HIF-1α a jeho dimerizaci s HIF-1β a společně se přesouvají do jádra, kde slouží jako transkripční faktory pro značné množství genů (Kaelin and Ratcliffe, 2008). Aktivní Src stabilizuje HIF-1α a zvyšuje jeho množství mRNA v buňkách. Také svou aktivitou inhibuje PDE2, který hydroxyluje HIF-1α (Lee *et al.*, 2011).

PAH může být aktivována hypoxií, při které se obecně spouští výše popsaná dráha. Proliferace PASMC je závislá na regulaci Src/HIF-1α a inhibice Src vede k snížení proliferace (Liu *et al.*, 2019).

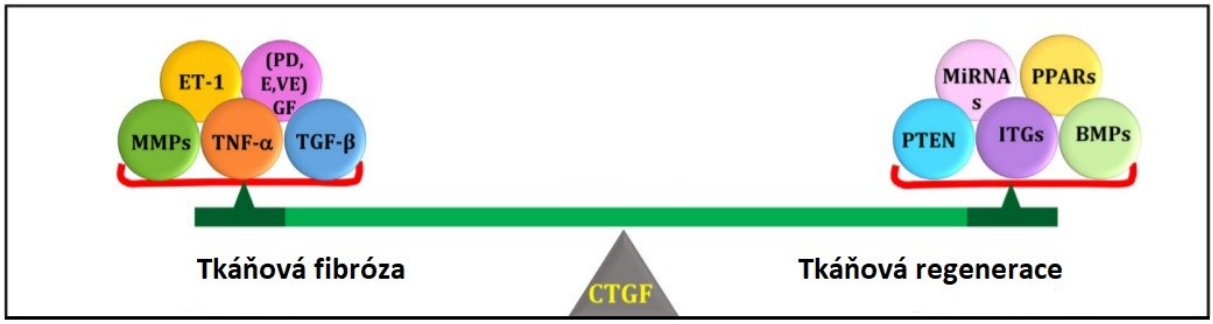
3.3. Adventicie a extracelulární matrix

Jedná se o třetí vrstvu cévy, která má široké složení, co se týče buněčných typů. Mezi její složky se řadí fibroblasty, makrofágy, dendritické buňky či progenitorové buňky. Okolo těchto buněčných typů je ECM, která je patologicky pozměněna. Adventicie je schopna regulovat zbytek cévních vrstev přes produkované látky jako cytokiny či růstové faktory. Během PAH se mění její buněčné složení a složení ECM.

3.3.1. Fibroblasty

Funkcí fibroblastů je vylučovat ECM, komunikovat se PASMC, PAEC i imunologickými buňkami, produkcí cytokinů, chemokinů či růstových faktorů. Jedná se o nejčastější buněčný typ adventicie, který jako první reaguje na vnější podněty. Dochází k jejich značné proliferaci, ještě než začnou proliferovat PAEC a PASMC. Fibroblasty se v plicní cévě mohou dělit podle navázání Thy-1 na buňku přes GPI, budou tedy Thy-1+ nebo Thy-1-, přičemž během PAH je zvýšená exprese Thy-1- (El Kasmi *et al.*, 2014). Thy-1 je povrchový antigen, jehož exprese odlišuje funkčně fibroblasty (Kawka *et al.*, 2017). Thy-1- vykazují oproti Thy-1+ fibrogenní fenotyp a proliferativní odezvy na růstový faktor AA odvozený z destiček (PDGF-AA) a růstový faktor pojivové tkáně (CTGF). Dále Thy-1- exprimují pětkrát více α-SMA a dvakrát více TGF-β (El Kasmi *et al.*, 2014). PDGF-AA je mitogen, který působí na mezenchymální buňky včetně fibroblastů na něž má proliferační a migrační účinky (Jasińska-Stroschein *et al.*, 2014). CTGF je faktor

bohatý na cystein, který se účastní buněčné proliferace, diferenciace, adheze a angiogeneze (Ramazani *et al.*, 2018).



Obrázek 5 – Vliv CTGF na fibrózu. *CTGF zprostředkovává fibrózu interakcí s molekulami v levé části obrázku, které již byly popsány výše. Pokud dochází k převládání molekul na pravé straně, tak dochází k regeneraci tkáně. Koncentrace látek interagujících s CTGF určuje, co z toho se bude dít. Seznam zkratek: ET-1 (Endotelin-1), MMP (Matrixové metaloproteázy), TNF-α (Tumor nekrotizující faktor alfa), TGF-β (Transformující růstový faktor beta), PDE (Fosfodiesteráza), VEGF (Vaskulární endoteliální růstový faktor), BMP (Kostní morfogenetický protein), PTEN (Fosfatáza a homolog napětí), MiRNA (Mikro RNA), ITG (Integriny), PPAR (Receptory aktivované proliferátorem peroxisomu). Převzato a upraveno podle předlohy: (Ramazani et al., 2018).*

Fibroblasty se mohou měnit na myofibroblasty, které značně exprimují α-SMA a velice se podílejí na přestavbě cévy, protože jsou schopny migrovat do všech vrstev cév. Jako podnět pro diferenciaci může sloužit ET-1, TGF-β, interleukin-6 či trombin. Ovšem původ myofibroblastů může být problematický, poněvadž se do nich mohou diferencovat PASMC, PAEC i progenitorové buňky (El Kasmi *et al.*, 2014). Přeměně fibroblastů do myofibroblastů může bránit například interferon γ (IFN-γ), který je produkován T lymfocyty, který potlačuje produkci α-SMA, ukládání kolagenu a tlumí zánět (Hinz, 2015).

Dochází ke změnám ECM z normálního složení, které obsahuje kolageny I a III typu, elastiny, laminy, fibronektiny, tenascin c a proteoglykany na patologický, kdy dochází k většímu ukládání kolagenů a k jejich zasíťování, značnému rozkladu elastinu a hromadění fibronektinů, osteopoetinu a tenascinů c. To vede ke změně z pružného charakteru cévy na zatuhlý fibrotický typ. Fibronektin, tenascin c a osteopoetinu mají vliv na proliferaci fibroblastů. Nahromadění těchto proteinů koreluje se zvýšením matrixových metaloproteáz (MMP), které degradují ostatní složky ECM (Thenappan, Chan and Weir, 2018).

Mononukleární buňky monocytální/makrofágní linie, které pocházejí z kostní dřeně a cirkulují v krevním oběhu se mohou na základě hypoxie akumulovat v adventicii. Tam přispívají k zahušťování adventicie produkcí kolagenu a pravděpodobně diferenciací do myofibroblsatů (Frid *et al.*, 2006).

Výživu adventicie i PASMC zajišťuje ,,vasa vasorum“, což je malá céva, jejíž síť se během PAH rozšiřuje. Fibroblasty narušené hypoxií produkují látky jako ET-1, VEGF, PDGF, fironektin či trombin, který se podílí na neoangiogenezi (El Kasmi *et al.*, 2014).

4. Hypotézy vzniku plicní arteriální hypertenze

Ať je příčnou PAH hypoxie, genetická predispozice či toxiny tak mechanismus vzniku je podobný. Ovšem neví se přesně co dá první impulz k rozvoji. Navrhuje se, že první impulz by mohl pocházet z adventicie, což zastává hypotéza ouside-in nebo by mohl pocházet z PAEC, což zastává hypotéza inside-out.

4.1. Outide-in hypotéza

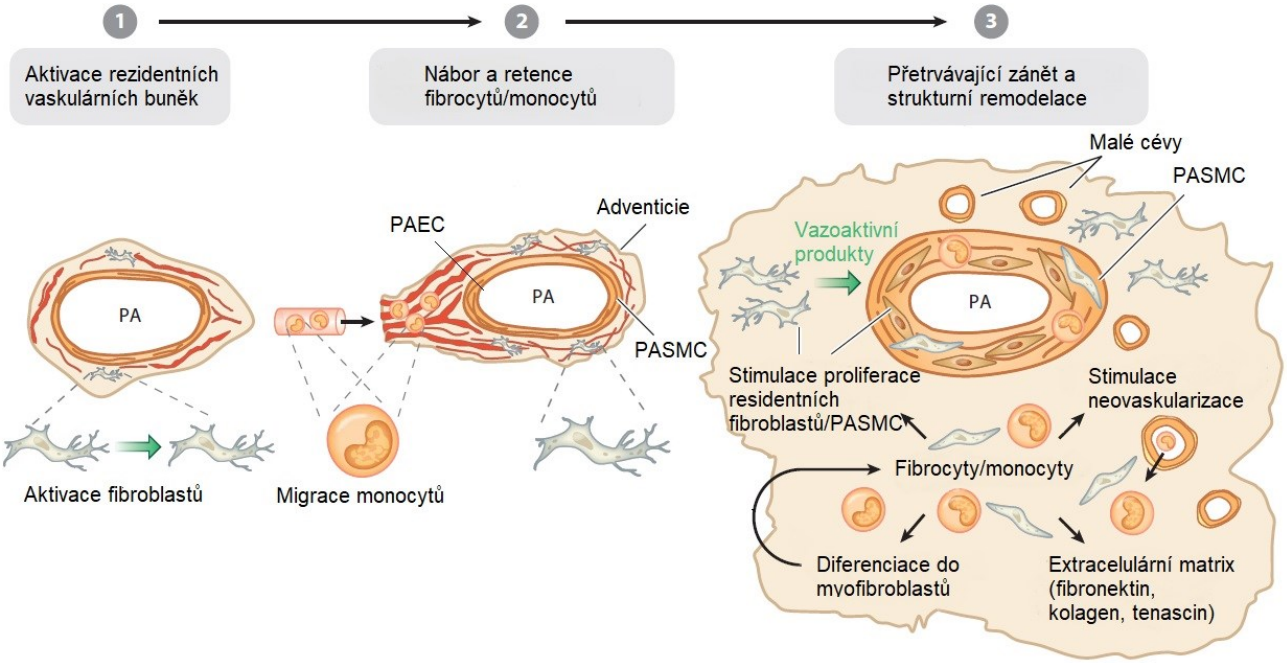
Tato hypotéza říká, že adventicie iniciuje a udržuje zánět a tím přispívá k remodelaci zbytku cévy. To podporuje skutečnost, že se v ní nachází značné množství rozdílných buněk, které jsou schopny produkovat cytokiny a jiné signalizační molekuly. Během PAH leukocyty pronikají do adventicie a to má důsledek jak na ní, tak později i na další vrstvy cév (El Kasmi *et al.*, 2014).

Vaskulární zánět se objevuje v adventicii spolu se zvýšenou migrací makrofágů a dendritických buněk (DC). Makrofágy a DC produkují cytokiny (především prozánětlivé), chemokiny a ROS, které se podílejí na přestavbě adventicie jako je fibróza. Na její přestavbě se podílejí i fibroblasty, které když se aktivují, připomínají makrofágy a DC, tím že produkují prozánětlivé cytokiny a vytvářejí molekuly pro prezentaci antigenu, čímž mohou stimulovat T lymfocyty, čemuž i napomáhá zvýšená exprese adhezivních molekul jako intracelulární adhezivní molekuly 1 (ICAM-1) a adhezivní molekuly vaskulárních buněk 1 (VCAM-1) (El Kasmi *et al.*, 2014).

Jako důkaz toho, že adventicie je schopná okamžitě reagovat byly provedeny pokusy s drátem nebo balónkem, které poškodily adventicii a v ní způsobily rychlou proliferaci buněk, která přesahovala proliferaci PASMC (Shi *et al.*, 1996) (Scott *et al.*, 1996). Další důkaz pochází z experimentů, které použily metodu LacZ s expresí β-galaktosidázy ve fibroblastech. Pomocí transdukce byly do fibroblastů vneseny retrovirové částice, jež nesly kódující β-galaktosidázu. Fibroblasty, které exprimovaly β-galaktosidázu byly nejdříve v adventicii a po indukovaném poranění se diferencovaly do myofibroblastů, které mohly migrovat do PAEC (Li *et al.*, 2000).

4.2. Inside-out hypotéza

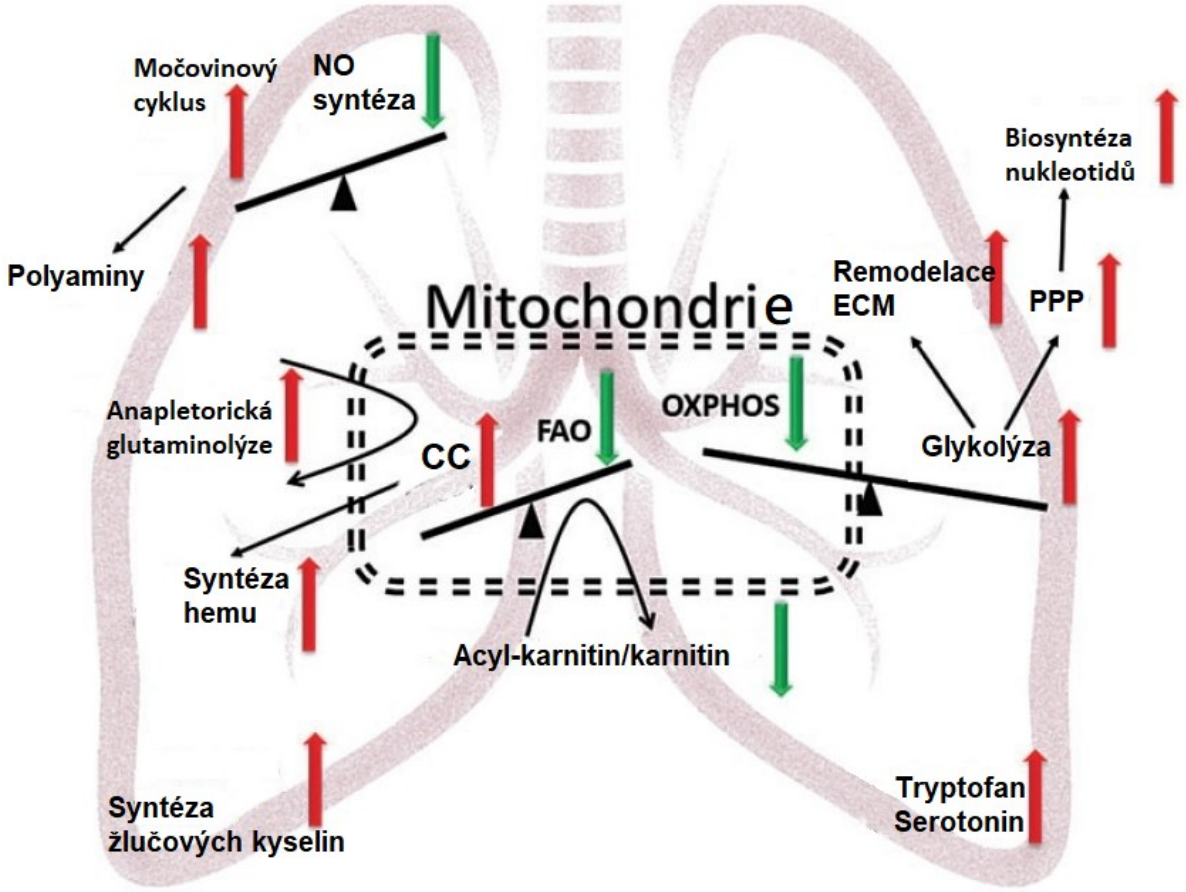
Tato hypotéza předpokládá, že vaskulární remodelace začíná poškozením PAEC, jehož změny způsobí proliferaci PASMC, EndoMT přechod, diferenciaci fibroblastů v myofibroblasty a migraci buněk do adventicie. Tuto hypotézu podporovalo zjištění, že poškozené PAEC produkují látky (viz. kapitola 3.1.), které podporují proliferaci PASMC a z uvolněných PAEC se tvoří plexiformní léze a neointima. Aktuálně uznávanou hypotézou je ovšem outside-in, protože adventicie je komplexní vrstva, která je připravena okamžitě reagovat na změny a tím remodelovat zbytek cévy (Spiekerkoetter *et al.*, 2019).



***Obrázek 6 – Outside in hypotéza**. Adventicie jako první reaguje na vnější podněty jako je hypoxie, toxiny, hormonální změny a mění charakter cévní stěny. Nejdříve dojde k aktivaci fibroblastů, následně k migraci monocytů do adventicie. Exprese cytokinů a adhezivních molekul ovlivňuje diferenciaci fibrocytů a monocytů do myofibroblastů. Dochází ke změně složení extracelulární matrix, ve které se začnou objevovat kolageny I a III typu, fibronektiny a tenasciny. Adventicie velmi změní svojí tloušťku. Změna adventicie působí na buňky hladké svalové vrstvy, které proliferují a migrují. Seznam zkratek: PA (plicní arterie), PAEC (endotelové buňky plicní arterie), PASMC (buňky hladké svaloviny plicní arterie). Převzato a upraveno podle předlohy:* (El Kasmi *et al.*, 2014).

5. Metabolické změny v PAH

Aby fibroblasty, PAEC a PASMC mohly proliferovat, jsou nutné změny v metabolismu, které zahrnují přechod na anaerobní metabolismus, jež poskytuje energii a substráty potřebné pro proliferaci buněk. Tyto změny zahrnují neúplnou oxidaci glukózy a její zvýšený příjem. Upřednostnění glykolýzy a odstoupení od citrátového cyklu (CC) a elektron-transportního řetězce (ETC) vede ke změnám v mitochondriích, které jsou hyperpolarizované, což vede k inhibici apoptózy, na které mají mitochondrie majoritní podíl. Taktéž dochází k aktivaci pentózofosfátového cyklu (PPP), který zásobí buňku stavebním materiálem nezbytným pro proliferaci. Dále dochází ke zvýšení syntézy polyaminů a ke snížení oxidačních drah karnitinu a mastných kyselin. Tyto změny jsou podobné těm, které se nacházejí v rakovinných buňkách. Jak PAH, tak i rakovinná onemocnění provází výše popsaný Walburgův efekt.



Obrázek 7 – Metabolické poruchy v buňkách plicních cév postižených PAH. *Při metabolických poruchách v PAH hraje ústřední roli mitochondrie. Dochází ke zvýšení glykolýzy a ke snížení oxidace glukózy. Dále je zvýšena aktivita pentózofosfátové dráhy, která podporuje zvýšenou syntézu nukleotidů. Zvýšená glykosylace proteinů extracelulárního matrix vede k jeho změnám. Snížení oxidu dusnatého a zvýšená aktivita močovinového cyklu vedou k vazokonstrikci. Všechny tyto změny vedou k dysfunkci a proliferaci všech vrstev cévy. Seznam zkratek: CC (citrátový cyklus), NO (oxid dusnatý), PPP (pentózofosfátová dráha), FAO (oxidace mastných kyselin), OXPHOS (oxidativní fosforylace). Převzato a upraveno podle předlohy:* (Rafikova, Al Ghouleh and Rafikov, 2019).

4.1. Glukóza

Jedná se o monosacharid složený z šesti uhlíků, který se vyskytuje v buňkách v D formě. Glukóza je základní zdroj energie pro buňku a jak ona samotná, tak její produkty se účastní mnoha energetických drah v buňce.

K buňkám tvořícím stěnu cévy se dostává krevním řečištěm a do buňky vstupuje přes glukózový transportér (GLUT) nebo přes sodno-glukózové transportéry (SGLT). GLUT je transmembránový protein složený ze 12 helixů, který se dá rozdělit do tří tříd, které se ještě dále dělí (Navale and Paranjape, 2016). Exprese GLUT-1 je zvýšena v buňkách, ve kterých probíhá nadměrně glykolýza. Na zvýšené expresi se podílí hypoxie nebo mutace v onkogenech jako je Ras. Hypoxie aktivuje HIF-1, který se váže na promotor genu pro GLUT-1 a spouští jeho transkripci (Chen *et al.*, 2001).

4.1.1. Glykolýza

Glykolýza je základní dráha, kdy dochází k přeměně glukózy na pyruvát během deseti chemických reakcí. Probíhá anaerobně v cytoplazmě. Metabolické změny v PAH charakterizuje zvýšený příjem glukózy a počtu glykolytických enzymů, a tedy i upřednostňování glykolýzy.

Hexokináza je enzym z rodiny kináz, který přidává na glukózu fosfátovou skupinu a vzniká glukóza-6-fosfát. Izoenzym hexokinázy (HK-2) se může vázat na vnější membránu mitochondrie a kvůli tomu nedochází k její inhibici vlastním produktem a může neustále zpracovávat glukózu. Na membráně interaguje s VDAC kanálem (aniontový kanál řízený napěťově), kterým nemůže procházet cytochrom c, jenž indikuje apoptózu (Pedersen, 2008).

Pyruvátkináza (PK) je enzym, který se účastní poslední reakce v glykolýze, ve které dochází k odštěpení fosfátu z fosfoenolpyruvátu a přeměně na enolpyruvát, který je nestabilní a mění se na pyruvát. PK se v lidském těle vyskytuje ve čtyřech izoformách: jaterní PK, PK červených krvinek a PK svalů, který má dvě formy M1 a M2. Svalová izoforma 1 PK (PKM1) se vyskytuje v diferenciovaných tkáních, zato svalová izoforma 2 PK (PKM2) se vyskytuje v proliferujících a rakovinných buňkách. PKM1 a PKM2 pocházejí ze stejného genu, kdy alternativním sestřihem vzniká příslušná izoforma (Dong *et al.*, 2016). PKM2 se ještě může vyskytovat ve dvou formách, a to v dimerické formě, která má nízkou aktivitu nebo v tetramerní, jenž má naopak vysokou aktivitu. Dimerní forma PKM2 se vyskytuje v rakovinných buňkách a v rychle proliferujících buňkách PAH (Zhang *et al.*, 2020). V PASMC dochází ke zvýšené fosforylaci PKM2, kvůli zvýšení ROS indukované hypoxií, což vede k posunu metabolismu z citrátového cyklu na PPP, což podporuje proliferaci PASMC (Zhang *et al.*, 2020). I ve fibroblastech a PAEC dochází prostřednictví zvýšené exprese PKM2 k upřednostňování glykolýzy před CC a ETC (Zhang *et al.*, 2020). V PASMC, dochází při hypoxii ke zvýšené fosforylaci tyrosinu 105 na PKM2, což jak se zdá ovlivňuje aktivaci STAT3. Zvýšená fosforylace by mohla souviset s toll-like receptory (TLR), což je rodina receptorů vrozené imunity, které by mohly zvyšovat fosforylaci. To potvrzuje experiment,

jenž pomocí interferujících RNA, snížil počet TLR a tím se snížila i fosforylace tyrosinu 105. PKM2 má vliv na proliferaci a migraci PASMC, protože buňky opatřené interferující RNA specifickou pro PKM2, která snižuje fosforylaci, které byly následně vystaveny hypoxii, tak došlo k inhibici proliferace a migrace (Zhang *et al.*, 2020). U myší, kterým byl podáván TEPP-46, což je antagonista PKM2, po 30 mg na kilogram váhy jednou denně po dobou tří týdnů, bylo docíleno výrazně nižší remodelaci cév než u myší, které byly taktéž vystaveny hypoxii. TEPP-46 zmírnil proliferaci a migraci snížení fosforylace tyrosinu 105 na PKM2 (Zhang *et al.*, 2020).

4.1.2. Pentózofosfátová dráha

PPP je dráha, která těsně souvisí s glykolýzou, protože glukóza-6-fosfát, který vzniká v první reakci glykolýzy, může sloužit jako substrát pro PPP, ve které vzniká NADPH a ribóza-5-fosfát, který může být použit jako stavební blok pro DNA nebo RNA, což je u proliferujících buněk nutností. NAPDH může sloužit jako zdroj pro rodinu enzymů NADPH oxidáz (NOX), které kvůli tomu mohou produkovat ROS.

Při PAH dochází ke zvýšenému využití PPP a zvýšené expresi enzymů v ní zapojené. Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (G6PD) je regulující enzym PPP, jehož exprese je zvýšená při PAH a hraje důležitou roli při změně fenotypu a proliferaci PASMC. Během hypoxie dochází ke zvýšení G6DP, pravděpodobně kvůli zvýšení H_2O_2, který indukuje translaci G6PD. U hypoxie vystaveným buňkám, kterým byla podána interferující RNA specifická pro G6PD, tak došlo ke snížení počtu buněk ve srovnání s kontrolu, které nebyla podána interferující RNA. Taktéž se podílí na snížení kontraktilních proteinů při hypoxii jako je myokardin či transgelinu, které se vyskytují ve funkčních PASMC. Podporuje zvýšení specifického proteinu 1 (SP1) a HIF-1, které snižují expresi kontraktilních proteinů a přispívají k produkci cyklinu A a fosforylovanému H3 histonu, což podporuje proliferaci PASMC (Chettimada *et al.*, 2015).

4.2. Mitochondrie

Mitochondrie jsou organely, které se vyskytují téměř ve všech eukaryotických buňkách a mají velké množství funkcí. Je předávána po maternální linii a obsahuje vlastní DNA. V jejich matrix probíhá CC a na membráně ETC, které slouží k tvorbě ATP. Také reguluje buněčnou proliferaci či apoptózu (Chinnery and Hudson, 2013).

Při normálním stavu buňky jsou mitochondrie v podobě vláknitých sítí, ale při PAH se mění jejich vzhled do rozděleného, což naznačuje, že je porušen proces štěpení a splývání mitochondrií, ve prospěch štěpení. K tomu, aby bylo možné více štěpit mitochondrie do menších kousků je zapotřebí protein 1 související s dynaminem (Drp1), společně s jeho vazebnými partnery, proteiny mitochondriální dynamiky 49 a 51 (MiD49 a MiD51), jejichž exprese je při PAH zvýšená. Kromě toho je snížena exprese proteinu mitofusinu-2, který propojuje ER s mitochondrií (Dasgupta *et al.*, 2020).

Mitochondrie se podílejí na snímání kyslíku v buňce, a to přes komplex IV, jenž v ETC předává na molekulu O_2 elektrony a tvoří se voda. Pokud dojde k hypoxii, tak dojde k hyperpolarizaci mitochondriální membrány, která vede ke zvýšenému uvolňování superoxidu z mitochondriálních komplexů I nebo III. To vede k inhibici buněčných draselných kanálů (K_V) a k depolarizaci buněčné membrány, což vede k aktivaci napěťově řízených vápníkových kanálů a tím ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} (Sommer *et al.*, 2020). Změny ROS, na jehož výrobě se podílejí mitochondrie, se podílejí na oxidaci nebo redukci NADP/NADPH a NAD/NADH, které fungují jako signální molekuly, jež regulují iontové kanály a kinázy (Dasgupta *et al.*, 2020).

4.2.1. Citrátový cyklus

Jedná se o aerobní metabolickou dráhu, která z acetylkoenzymu A získává NADP a GTP, jenž NADP se dále využívá pro tvorbu energie pro buňku. Pro to, aby mohl vstoupit pyruvátu vytvořený v glykolýze do buňky, je potřeba enzym pyruvát dehydrogenáza (PDH), který jej přemění na zmíněný acetylkoenzym A.

Během PAH dochází ke snížení PDH a změně CC. Za snížení PDH je zodpovědný HIF-1α, který zvyšuje pyruvát dehydrogenázy kinázy, jenž inhibuje PDH. To vede ke snížení aktivity CC, jenž se týká dráhy pyruvát-acetylkoenzym A (Paulin and Michelakis, 2014). Ovšem dochází ke zvýšení aktivity CC v plicních postižených PAH, který zahrnuje nárust meziproduktů citrátu a cis-akonitázu. Citrát je přeměněn na cis-akonitát enzymem akonitázou, jejíž izoforma na železo reagující element vázající protein 1 (z anglického iron-responsive element binding protein 1) má zvýšenou expresi (Zhao *et al.*, 2014). Citrát se může podílet na acetylaci histonů a další meziprodukt CC α-ketoglutarát může metylovat histony (Paulin and Michelakis, 2014). Dále bylo pozorováno zvýšení sukcinátu, sukcinylkoenzymu A a sukcinylkarnitinu a taktéž zvýšení enzymů fumarázy a izocitrátdehydrogenázy (Zhao *et al.*, 2014) . Zvýšení izocitrát dehydrogenázy taktéž bylo pozorováno u pacientů, již měli mutaci v genu pro BMPR2 (Fessel *et al.*, 2012). Zdá se, že tyto zvýšené metabolity CC mohou ovlivňovat funkce mitochondrie. Dále je zřejmé, že meziprodukty CC jsou transportovány do cytoplazmy, kde slouží pro zvýšenou syntézu mastných kyselin (Zhao *et al.*, 2014).

4.2.2. Glutaminolýza

Glutaminolýza je proces, při kterém se přeměňuje aminokyselina glutamin na metabolity CC. Glutamin je nejhojnější cirkulující aminokyselina v krvi, která je rozhodující pro mnoho základních funkcí buňky při PAH nebo v rakovinných buňkách. Glutamináza je enzym, který přemění glutamin na glutamát, jenž je následovně přeměněn na α-ketoglutarát buď enzymem glutamát dehydrogenázy nebo glutamát-oxaloacetát transaminázy a následně fosfoserin-transaminázou (Yang, Venneti and Nagrath, 2017).

Během PAH se aktivuje glutaminolýza v PAEC, PASMC a fibroblastech, což zahrnuje zvýšení exprese glutaminázy, laktát dehydrogenázy a pyruvát karboxylázy. V PAEC je zvýšený příjem glutaminu u pacientů, kteří měli mutace v genu pro BMPR2. U mutantních BMPR2 byl nárust příjmu glutaminu způsoben ztrátou aktivity sirtuinu-3, který v buňkách zvyšuje dýchání a snižuje produkci ROS, a následné aktivace HIF-1α (Dasgupta *et al.*, 2020).

4.2.3. Hyperpolarizace mitochondriální membrány, NOX a ROS

Při PAH dochází ke zvýšení potenciálu mitochondriální membrány, jež je zapojena do remodelace cév. Zvýšení potenciálu vede ke zvýšení produkce ROS.

ROS jsou vysoce reaktivní molekuly odvozené od kyslíku, jež zahrnují O_2^-, H_2O_2, OH^- či HO_2. Jsou produkovány NADPH oxidázami (NOX), komplexy ETC jako jsou komplex I a komplex III, XO či cytochromem P450. Při PAH dochází ke zvýšení hladin ROS a rodiny NOX. V PAEC, PASMC a adventicii se vykytují NOX 1,2 a 4 a všechny se zapojují do patologie PAH. Krom toho, že ROS můžou reagovat se všemi biomolekulami v buňce a poškozovat je, tak se podílejí i na signalizaci. Například H_2O_2 může aktivovat dráhy MAPK 38 nebo ERK 1/2, jenž jsou zapojeny do proliferace buněk. Bylo zjištěno, že ROS ovlivňují intracelulární koncentrace vápníku a tím i vápníkové kanály. V tom případě se konkrétně jedná o $Ca_V1.2$, který snižuje expresi PKM2 (Rafikova, Al Ghouleh and Rafikov, 2019).

NOX jsou membránové komplexy, které produkují ROS a dle typu NOX produkují různé typy. Například NOX4 produkuje primárně H_2O_2 a vyskytuje se ve všech vrstvách plicní cévy. NOX2 se vyskytuje v PAEC a PASMC a může způsobit snížení biologické dostupnosti NO, protože NO může reagovat s ROS odvozených od NOX2. NOX1 se vyskytuje v PAEC a PASMC. Při PAH dochází k jeho zvýšené expresi, kterou ovlivňují látky jako IL-1β, TNF-α, angiotensin II či trombin. Experimentálním snížením exprese NOX1 byla snížena proliferace PASMC (Lambeth, 2007). Exprese NOX4 při hypoxii výrazně roste a v adventicii se podílí na proliferaci a antiapoptózovém stavu fibroblastů. Interferující RNA zaměřenou na NOX4 došlo ke snížení produkce ROS ve fibroblastech a snížení jejich proliferace, a naopak ke zvýšení apoptózy. Dále se NOX4 podílí na proliferaci PASMC a PAEC (Li *et al.*, 2008).

4.3. Endoplazmatický stres

ER je organela, která je uložištěm velkého množství Ca^{2+} v buňce a stará se o intracelulární sekreci, posttranslační úpravy proteinů nebo syntézu lipidů. Endoplazmatický stres nastává, pokud dojde ke zvýšení obsah glukózy v buňce, přetížení Ca^{2+}, hypoxii nebo oxidační stres. Při těchto situacích se začnou syntetizovat proteiny, které se mají vypořádat se stresem, zatímco proteinům pro normální chod buňky se sníží exprese. Pokud dojde k nadměrné translaci proteinů, jejichž nápor ER nemusí zvládnout, tak může dojít k hromadění špatně sbalených proteinů, což může způsobit odpověď zvanou

reakce nesbalených proteinů (anglicky unfolded protein response), která má v takovém případě spustit apoptózu (Hu *et al.*, 2020).

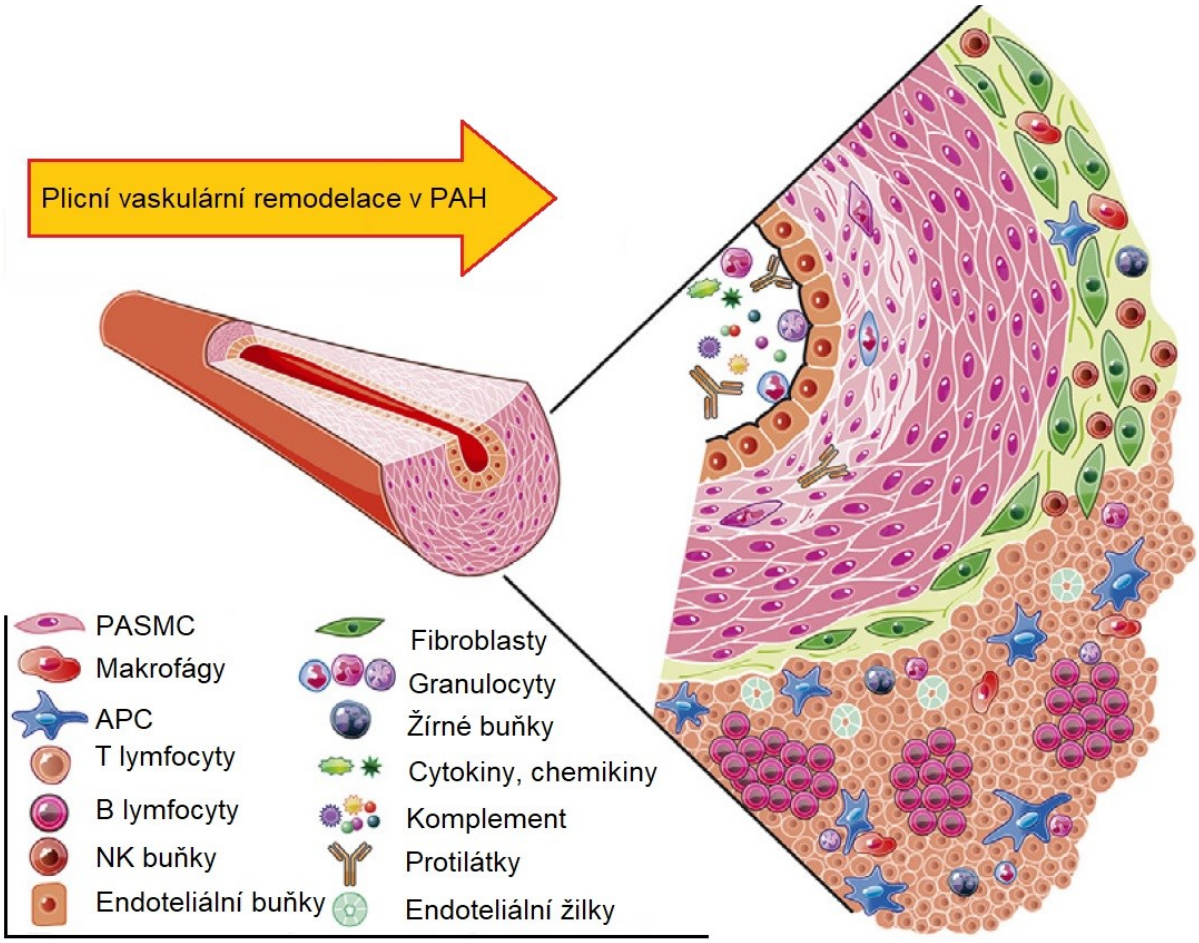
Zdá se, že endoplazmatický stres je zapojen do proliferace a antiapoptózového stavu PASMC. V ER je chaperon BiP/GRP78, který je kombinovaný se senzory pro nesložené proteiny. Kináza endoplazmatického retikula podobná R kináze (PERK), aktivující transkripční faktor 6 (ATF-6) a enzym 1 vyžadující inositol (IRE1) jsou transmembránové proteiny, které slouží jako senzory pro nesložené proteiny. Nadměrná akumulace nesbalených proteinů vede k oddělení senzorů od chaperonu BiP/GRP78 a aktivaci signální dráhy jednotlivých senzorů. IRE1 a PERK mají sice různé mechanismy působení, ale v konečné fázi oba spouští expresi genů pro apoptózu a blokují antiapoptické geny. ATF-6 se naopak přemístí do Golgiho aparátu kde je štěpen proteázami až na fragment p50, který zamíří do jádra, kde zvyšuje transkripci proteinů jako jsou chaperony, proteiny regulované glukózou či proteiny asociované s ER (Pan *et al.*, 2020).

Pokud dojde v PAEC k endoplazmatickému stresu a k přetrvávající reakci nesbalených proteinů, tak může dojít ke zvýšení oxidačního stresu a zánětu. V PAEC u myších, kterým je vyvolána PAH, byly nacházeny známky endoplazmatického stresu v podobě zvýšení GRP78, ATF-6 a X-box vázajícího proteinu (XBP1) a snížení eukaryotického iniciačního faktoru 2 alfa (eIF2α), který je součástí signální dráhy PERK. Endoplazmatický stres má vliv na proliferaci a antiapoptický stav PASMC, protože pokusy, během kterých byly podávány látky (například intermedin) na utlumení endoplazmatického stresu, ukázaly zlepšení a normalizaci funkce PASMC (Pan *et al.*, 2020).

Během PAH dochází v PASMC k nárustu proteinu Nogo-B, který je členem rodiny retikulárních proteinů, jenž se podílejí tubulární přestavbě ER. Jeho zvýšená hladina při PAH a endoplazmatickém stresu vede k přestavbě ER a narušení spojení mezi ER a mitochondrií, čímž se ovlivní funkce mitochondrií. Myši, kterým chyběl Nogo-B i jeho izoforma Nogo-A, tak byly plně chráněny před rozvojem PAH (Pan *et al.*, 2020). ER a mitochondrie jsou spolu v kontaktu přes membrány a z ER může do ní proudit Ca^{2+}, což působí na enzymy závislé na vápníku jako je PDH a samotný vstup Ca^{2+} může způsobit depolarizaci a apoptózu, která je dána otevřením přechodového kanálu, jímž procházejí proapotické mediátory a aktivují apoptózu závislou na mitochondrii. Přerušení spoje mezi ER a mitochondrií je kritické pro normální funkci buňky a pokud je toto spojení přerušeno dojde k hyperpolarizaci mitochondriální membrány a uzavření přechodového kanálu, což vede k antiapoptickému stavu. Taktéž to má negativní vliv na mitochondriální funkci a ETC (Sutendra *et al.*, 2013).

6. Role imunitních složek a zánětu

Charakteristickým rysem je perivaskulární zánět, který je jak systematický, tak i lokální, spolu se zvýšením perivaskulárních imunitních buněk. Zánětlivé prostředí při vývoji PAH napomáhá remodelaci všech vrstev cévy. Dochází ke zvýšení hladiny cytokinů zahrnující interleukiny (IL) IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, 10, IL-18 a TNF-α, které jsou hlavně prozánětlivé a chemokiny jako fraktalin, MCP-1 a CCL5.



Obrázek 8 – Složky imunitního systému uplatňující se v patologii PAH. *Seznam zkratek: NK (přirození zabíječi), APC (buňky prezentující antigen). Převzato a upraveno podle předlohy* (Rabinovitch *et al.*, 2014).

6.1. Cytokiny

Cytokiny jsou extracelulární signální peptidy, které působí na různé vzdálenosti v těle. Jejich velikost se obvykle vyskytuje mezi 8 až 30 kDa. Jsou exprimovány mnoha buněčnými populacemi. Pojem cytokiny zahrnuje přes 120 typů peptidů (Cannon, 2000). V patologii PAH se účastní mnoho typů cytokinů, zde si představíme ty nejdůležitější a nejvíce prozkoumané.

6.1.1. Interleukin 1β

Jedná se o prozánětlivý cytokin, který je exprimovaný makrofágy a monocyty. Jak jeho exprese, tak exprese jeho receptoru IL-1R1, vyskytující se na PASMC, makrofázích a PAEC, jsou při PAH zvýšeny

a podílejí se na proliferaci PASMC. Na makrofázích je receptor IL-1R1, na který se váže IL-1β, přičemž dojde k aktivaci MyD88, což je adaptorový protein, který aktivuje NF-κB a tento transkripční faktor ovlivňuje expresi IL-1β, TNF-α a IL-6 nasednutím na promotory příslušných genů. V důsledku hypoxie je zvýšené množství makrofágů v tkáni plicních cév a indukcí dráhy přes IL-1β dojde k proliferaci PASMC. Pokusy s odstraněním genu pro MyD88 v myších, poukázaly na to, že dráha IL-1β/MyD88 je důležitá pro vznik PAH, protože myši s odstraněným genem byly chráněny před rozvojem PAH, poněvadž nedošlo k migraci makrofágů a proliferaci PASMC (Parpaleix *et al.*, 2016).

Anakinra je antagonista IL-1R, jenž může výrazně zvrátit vývoj u monokrotalinem indukované PAH, tím že snižuje aktivaci NF-κB a tím se sníží IL-1R a IL-6. Zaměření na dráhu IL-1β/IL-1R by mohl být slibný cíl v léčbě PAH (Parpaleix *et al.*, 2016).

6.1.2. Interleukin 6

V PASMC, PAEC i fibroblastech se na základě hypoxie, respektive aktivací HIF aktivovaného promotoru (HRE), začne tvořit IL-6, který indukuje přeměnu nezralých T-lymfocytů na Th-17. K čemuž přispívá i TGF-β. Th-17 pak produkují IL-21, který je zodpovědný za přeměnu makrofágů na M2 typ (alternativně aktivovaný), který se hromadí v cévách. M2 makrofágy produkují CXCL12, který působí na PASMC proliferačními účinky. Výzkumy, které zkoušely blokovat IL-6 a IL-21 protilátkami, dokázaly pozastavit vývoj PAH přerušením kaskády, kterou tyto interleukiny spouští. Nedošlo k hromadění Th-17 ani přeměně makrofágů v M2 typ. Zato cílení protilátek proti IL-17 nemělo žádný efekt (Berghausen *et al.*, 2019).

Dále k rozvoji PAH může přispívat mononukleotidový polymorfismus promotoru pro gen IL-6, který ovlivňuje jeho expresi. Lidé s genotypy CG nebo GG v pozici -572 mají nižší hladinu IL-6 v krvi a nižší šanci na rozvoj PAH, zato genotyp CC má vyšší expresi IL-6 a může tedy s dalšími faktory přispívat k rozvoji PAH (viz. podrobněji ve studii: Fang et al. 2017).

IL-6 spolu s FGF-2 přispívají k migraci pericytů a hlavně FGF-2 má na ně proliferační účinky. Pericyty jsou buňky, které jsou podlouhlé s četnými výběžky, vyskytující se v cévních stěnách a svými výběžky zasahují až k PASMC a PAEC. Jejich role je v udržení homeostázy, kontrakci PASMC, pomocí cGMP dependentní protein kinázy, regulují růst, proliferaci a migraci PAEC (Ricard *et al.*, 2014). Při PAH bylo pozorováno trojnásobné až šestinásobné zvýšení počtu pericytů (Ricard *et al.*, 2014). TGF-β, IL-6 a FGF-2 vykazují význam při dediferenciaci pericytů na kontraktilní buňky podobné buňkám hladké svaloviny, což ukázala exprese α-SMA a to přispívá k remodelaci cév.

6.1.3. Interleukin 10

Jedná se o cytokin produkovaný hlavně monocyty a v menší míře žírnými buňkami, Th2 či Treg, který má protizánětlivé účinky. Jeho zvýšením je možné indukovat zlepšení PAH. Zvýšení IL-10 je přisuzováno snaze o působení protizánětlivé odpovědi, která má zabránit migraci zánětlivých buněk,

produkci prozánětlivých cytokinů a proliferaci PASMC (Soon *et al.*, 2010). Jeho podání myším modelům způsobilo snížení proliferace cévních buněk a inhibovalo migraci makrofágů do tkáně plicních cév. Krom toho došlo k potlačení exprese IL-6 a TGF-β. Naopak jeho zvýšením se taktéž zvýšila exprese hemoxygenázy 1 (HO-1), která blokuje proliferaci PASMC pomocí oxidu uhelnatého, jenž zvyšuje expresi transkripčního faktoru, který inhibuje buněčný cyklus a nepřímo inhibuje signalizaci mitogenu (Ito *et al.*, 2007).

Studie provedené na myších modelech poukázaly na skutečnost, že zvýšením exprese HO-1 vede ke snížení akumulace makrofágů v plicních cévách a přeměnila jejich fenotyp na protizánětlivý (Vergadi *et al.*, 2011).

6.1.4. Fraktalkin

Fraktalkin (CXC3L1) je chemokin, který indukuje migraci a aktivuje makrofágy CD68+ a T lymfocyty CD3+. Exprese CXC3L1 se zvedá stejně jako exprese jeho receptoru CXC3R1. CXC3R1 je hojně exprimován na plazmatické membráně PASMC, se kterým mohou interagovat s makrofágy CD68+ a T lymfocyty CD3+, jež způsobí proliferaci PASMC. Zdá se, že dysfunkční PAEC může produkovat CX3L1, který ovlivňuje proliferaci PASMC a migraci makrofágů a T lymfocytů (Perros *et al.*, 2007).

6.2. Buňky vrozené imunity

Buňky vrozené imunity zahrnují monocyty, makrofágy, granulocyty, žírné buňky, které pocházejí z myeloidní linie a NK buňky pocházející z lymfoidní linie. Součástí vrozené imunity je komplement, který má lytické a opsonické vlastnosti, což znamená že dojde k označení částice nebo buňky opsoniny, které mohou být imunoglobuliny nebo částice komplementu (viz. níže). Všechny buňky vrozené imunity se účastní patologie PAH.

6.2.1. Makrofágy

Hypoxií indukovaná PAH vede ke zvýšení M2 makrofágů v cévách a ty tvoří základ zánětu. Hypoxie v nich indukuje prozánětlivý fenotyp, který nadměrně produkuje resistinu podobnou molekulu alfa 1 (Fizz1), arginázu 1 (Arg1), protein 3 podobný chitináse 3 (YM1) nebo manózový receptor (MR) (Vergadi *et al.*, 2011). Fizz1 je protein bohatý na cystein, jehož hladina stoupá během zánětu. Podílí se na reakci na poškození a je specifickým markerem M2 makrofágů (Holcomb *et al.*, 2000). Arg1 je enzym jehož zvýšená exprese je charakteristická pro M2 typ makrofágů, který mění arginin na močovinu a ornitin (Orecchioni *et al.*, 2019). Zvýšená exprese YM1 je v makrofázích závislá na IL-4, produkovaným Th2 lymfocyty, a na aktivátorech transkripce typu 6. Váže se na uhlovodíky jako heparin nebo heparansulfát a podporuje migraci buněk, proliferaci a zánět (Shuhui, Mok and Wong, 2009). MR se převážně vyskytuje na makrofázích a jedná se o lektin typu C, jenž je nezbytný pro produkci prozánětlivých cytokinů (Gazi and Martinez-Pomares, 2009).

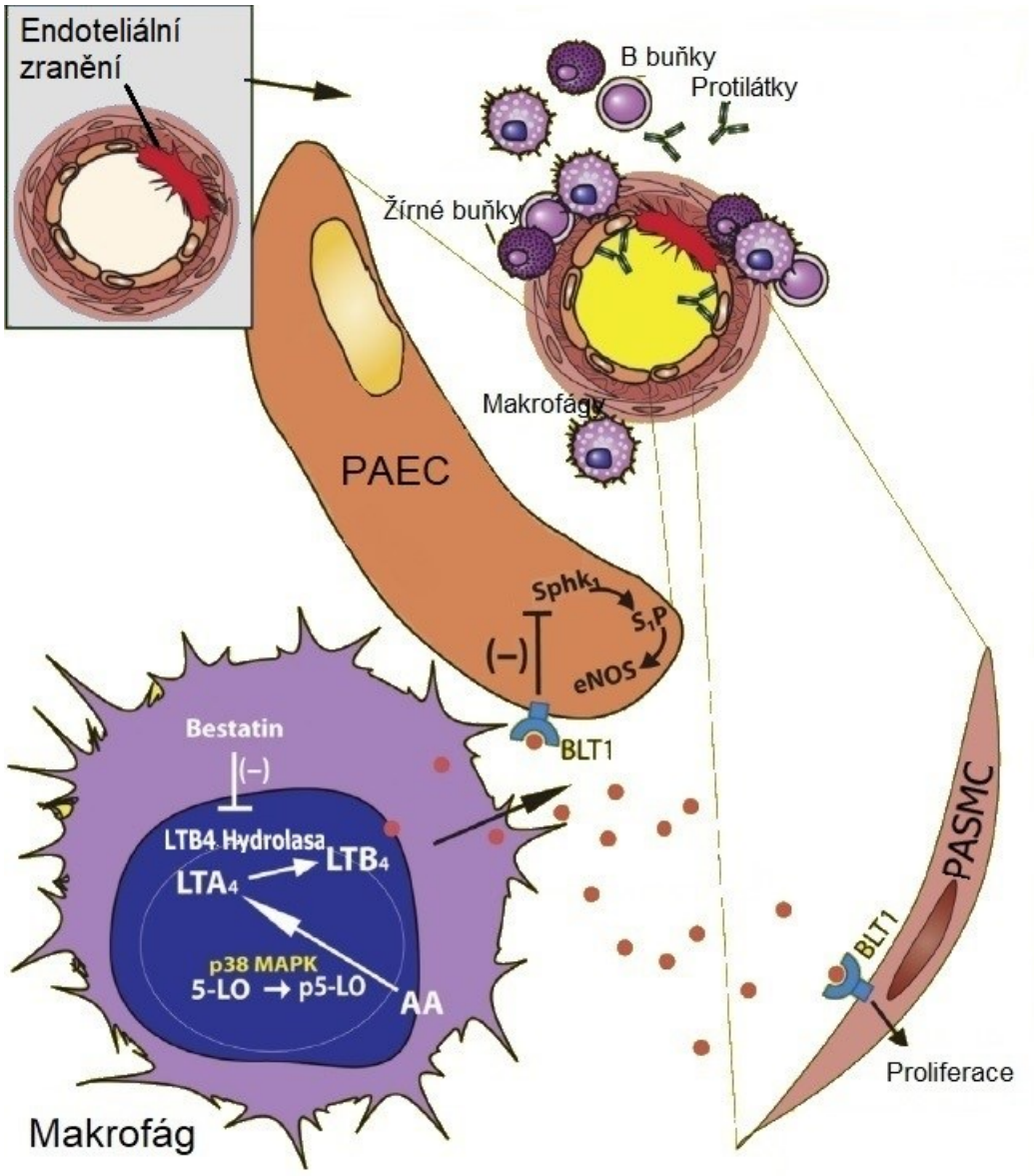
Hypoxie společně s dalšími faktory akumulují makrofágy v adventicii a přímo adventicie se podílí na změně jejich fenotypu. Takto ovlivněné makrofágy exprimují CD206 a CD163. To se děje, kvůli parakrinní sekreci IL-6 z fibroblastů, který aktivuje v makrofázích STAT3 (přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3) dráhu. Tyto makrofágy produkují mimo jiných látek i Arg1, která se podílí na fibróze a tedy remodelaci cévy, ale i na buněčném dělení a produkci kolagenu. Na expresi arginázy 1 se podílí HIF1α (El Kasmi *et al.*, 2014).

Počet makrofágů stoupá kolem plicních arterií a podílejí se na zánětlivých stavech při vývoji PAH. U aktivovaných makrofágů je zvýšená tvorba leukotrienu B4 (LTB4), který je syntetizován pomocí 5-lypoxygenázy, jenž využívá kyselinu arachidonovou jako substrát, který převede na leukotrien A4 (LTA4). Leukotrien A4 hydroláza přemění LTA4 na LTB4. Produkcí LTB4 makrofágy indukují apoptózu v PAEC, což působí poškození cévy. V PASMC ovšem způsobí proliferaci a hypertrofii. Zdá se, že nadměrná produkce LTB4 makrofágy je zapříčiněna jejich dysregulací, kvůli sníženému počtu Treg.

LTB4 se na PAEC váže pomocí receptoru BLT1 (receptor 1 leukotrienu B4) a způsobí apoptózu PAEC zablokováním enzymu sfingosin kinázy 1, který fosforyluje sfingosin na sfingosin-1-fosfát. Sfingosin-1-P aktivuje eNOS a zároveň slouží jako základní faktor pro přežití PAEC. V PAEC vystavené LTB4 byla snížená koncentrace sfingosinu-1-P a eNOS. Zablokováním LTB4 nebo BTL1 bylo dosaženo zvrácení PAH (Tian *et al.*, 2014).

Výše popsané děje vedou k snížení produkce NO v PAEC, a to napomáhá proliferaci a hyperplázii PASMC (viz. kapitola 2.1.5.).

Faktor simulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) je růstový faktor, který je vylučován epitelovými, endotelovými, fibroblastovými, stromálními a hematopoetickými buňkami (Becher, Tugues and Greter, 2016). Snížená exprese BMPR2 způsobí zvýšenou tvorbu GM-CSF v PAEC a PCSMC, přes zvýšenou expresi TNF. GM-CSF způsobí nábor perivaskulárních makrofágů, a zdá se že v nich indukuje tvorbu LTB4 (Sawada *et al.*, 2014).



Obrázek 9 – Vaskulární remodelace podporovaná leukotrienem B4. *Seznam zkratek: LTA4 (Leukotrien A4), LTB4 (Leukotrien B4), p38 MAPK (p38 mitogenem aktivovaná proteinová kináza), 5-LO (5-lipoxygenáza), p5-LO (fosforylovaná 5-lipoxygenáza). Převzato a upraveno podle předlohy* (Tian *et al.*, 2014).

6.2.2. Komplement

Komplement je základní nástroj vrozené imunity, který se skládá z více než 30 proteinů. K jeho aktivaci může dojít třemi cestami: alternativní, klasickou a lektinem závislou. Alternativní cesta zahrnuje samovolné štěpení C3 na C3a a C3b. C3a působí chemotakticky na fagocyty a C3b se může vázat na povrch v jeho blízkosti, což zahajuje kaskádu, kde se z C3b stane C3 alternativní konvertáza, která štěpí C3 na jmenované produkty. Z C3 konvertázy po navázání dalšího fragmentu C3b vzniká C5 alternativní konvertáza, která štěpí C5 na C5a a C5b. C5a působí chemotakticky a C5b se podílí na terminální fázi, která zahrnuje přidání C6, C7, C8 k C5b a k tomuto komplexu se připojí 10-18 C9, jež vytvoří komplex zvaný komplex útoku na membránu (MAC). Klasická cesta zahrnuje navázání C1 na

protilátku, kdy C1 změní svojí konformaci a štěpí C2 a C4 na C2a a C4b, které se navážou na povrch a tvoří C3 konverátu. Poté se děje proces popsaný výše. Poslední cesta je závislá na lektinu a je skoro stejná jako ta klasická, jen s tím rozdílem, že C1 se namísto protilátky váže na lektin vážící manózu. Krom této lytické funkce má komplement i další funkce jako aktivace B lymfocytů, opsonizaci, což je označení částice molekulami komplementu, a chemotaxe fagocytujících buněk do místa zánětu (Hořejší *et al.*, 2017).

Při hypoxii dochází k aktivaci komplementu. Na perivaskulárních buňkách dochází ke zvýšení počtu receptorů pro C3a a C5a, což naznačuje aktivaci alternativní cesty komplementu. Jako spouštěč aktivace komplementu, může být IgG, vylučovaný plazmatickými B lymfocyty, jehož exprese koreluje s expresí C3, ve všech vrstvách cévy. IgG může tvořit komplex s C3b, který je mnohem stabilnější než samotný C3b a tento komplex až 11x více zesílí štěpení C3. Dále je v pozdních fázích pozorovaný výskyt C3d, což je fragment vznikající při degradaci C3. Na druhou stranu byla zjištěna exprese IgM v adventicii a PASMC indukcí hypoxie, která korelovala s expresí C4, který se účastní aktivace komplementu klasickou cestou přes lektiny (Frid *et al.*, 2020).

Proliferace PASMC může být zapříčiněná aktivací C5a, který vede k vytvoření MAC, jež při sublytických koncentrací (tj. koncentrace MAC, které nezapříčiní lýzi buňky) zapříčiní proliferaci (Frid *et al.*, 2020).

6.2.3. Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty představují nejhojnější buněčnou populaci leukocytů v krvi. Působí jako fagocyty, produkují cytokiny a chemokiny. Název granulocyty používáme, protože tyto buňky mají v cytoplazmě obsaženy váčky, které se pod mikroskopem jeví jako granule. V nich jsou obsaženy enzymy jako je myeloperoxidáza, neutrofilní elastáza (NE) či katepsin G. Jednou ze zajímavých schopností je tvorba neutrofilních extracelulárních pastí (NET), jenž se skládají z vláknitých struktur DNA (De Bondt *et al.*, 2020).

Stejně tak jako makrofágy, tak i neutrofilní granulocyty se akumulují jako makrofágy v perivaskulárním prostoru cév a podílejí se na vzniku zánětu, a to svými produkty. Jedním z nich je myeloperoxidáza, která produkuje ROS a může se podílet na snížení koncentrace NO. Její aktivita může způsobit fibrotickou přestavbu cévy. Dalším produktem neutrofilních granulocytů je NE, která se do okolí uvolňuje při degranulaci spolu s NET. NE mohou produkovat makrofágy i PASMC, ale v menší míře. NET mohou způsobit neoangiogenezi, zvýšit produkci ET-1, či podporovat proliferaci PASMC. Taktéž působí na PAEC NET proliferačními účinky a působí rozvolnění jejich spojů, čímž jim umožní migraci. NE degraduje ECM, což zapříčiní uvolňování růstových faktorů jako je epidermální růstový faktor či FGF, jež oba mají mitogenní účinky na PASMC. NE vede ke zvýšení MMP, které indukují tvorbu tensacinu C a fibronektinu, jenž mohou působit chemotakticky na PASMC a tím způsobovat jejich

migraci. Dále může ovlivnit signalizaci přes BMPR2, protože NE dokáže štěpit BMP9 a tím se upřednostní signalizace přes TGF-β (Aldabbous *et al.*, 2016).

6.2.4. NK buňky

Představují buňky vrozené imunity podílející se na odstranění nádorových a virem napadených buněk, krom těchto známých funkcí se také podílejí na regulaci angiogeneze a vaskulární remodelace. NK buňky se dají rozdělit do dvou subpopulací, a to na $CD56^{dim}/CD16^{+}$ a $CD56^{bright}/CD16^{-}$, které se liší expresí klasifikačního determinatu (CD), který může být povrchová molekula nebo receptor.' (Ormiston *et al.*, 2012).

Analýza krve pacientů prokázala snížení populace $CD56^{dim}/CD16^{+}$, které vykazují cytotoxický potenciál, což způsobí poměrný nárust $CD56^{bright}/CD16^{-}$, které produkují prozánětlivé cytokiny. Dále se ukázalo snížení receptoru NKp46, KIR2DL1 a KIR2DS1, což značí změněnou funkci NK buněk při PAH. Zdá se, že za narušený fenotyp NK buněk může TGF-β, protože snižuje počet receptorů rodiny KIR (z anglického killer cell immunoglobulin-like receptors), které rozlišují hlavní histokompatibilní komplex I (MHC I) (Ormiston *et al.*, 2012).

Pokusy na geneticky upravených myších, prokázaly důležitost NK buněk ve vývoji PAH. Myši s absencí transkripčního faktoru nukleárního faktoru regulujícího IL-3 (NFIL3) nebo s absencí receptoru NKp46, vykazovaly po devíti měsících od narození spontánní vývoj PAH, zahrnující zvýšení systolického tlaku a zbytnění plicních cév. Oba typy myší vykazovaly zvýšené hladiny IL-23, což je prozánětlivý cytokin, ale jen myš s absencí NKp46 vykazovala ztrátu angiopoetinu-2, což je růstový faktor podílející se na angiogenezi. U myší s úplnou absencí NK buněk nedošlo ke vzniku žádné formy PH, ale došlo ke snížení oběhového tlaku. To ukazuje na důležitost role signalizace NK buňkami ve vývoji PAH (Rätsep *et al.*, 2018).

4.2.5. Žírné buňky

V hypoxickém prostředí žírné buňky začnou proliferovat, akumulovat se v plicní tkáni a sekretovat IL-1β, IL-6 a TNF-α. Žírné buňky podporují proliferaci a migraci fibroblastů, kvůli produkovaným látkám, které vylučují do okolí. To působí na firbroblasty tak, že začnou produkovat kolagen typu I a III a MMP-9 a MMP-13, které aktivují metabolismus kolagenu a podílejí se na remodelaci cév. Dále podporují přechod z fibroblastů na myofibroblasty. In vitro pokusy ukázaly, že přítomnost žírných buněk vyvolá ve fibroblastech zvýšení exprese 2 077 mRNA a snížení exprese 2 418 mRNA, jež se různě podílejí na přeměně ECM, proliferaci a migraci, oproti kontrolním vzorkům, které se nacházejí v normoxii (Wang *et al.*, 2020). Tryptáza je serinová proteáza, která je produkovaná žírnými buňkami a podílí se na proliferaci fibroblastů a PASMC (Xu *et al.*, 2018).

6.3. Buňky adaptivní imunity

Role adaptivní imunity na vývoj PAH je, jak se zdá, značná. Jsou zde zvýšené koncentrace T pomocných lymfocytů (Th) Th1, Th2 a Th17. Toto tvrzení podporuje zjištění, že athymické zvířecí modely jsou značně citlivé k vývoji PAH. T regulační buňky (Treg) jsou dysregulovány a přispívají k patologii PAH.

4.3.1. Regulační T-lymfocyty (Treg)

Jedná se o CD4+ buňky, které regulují zánětlivá poškození a udržují autotoleranci, protože regulují ostatní buňky imunitního systému. Absence normální aktivity Treg vede k hromadění makrofágů v plicní cévě a jejímu poškození. Mohou též produkovat TGF-β, kterým ovlivňují sebe i další buňky v plicní tkáni. Dalším produktem je IL-10, který inhibuje sekreci prozánětlivých cytokinů (Tamosiuniene *et al.*, 2011). Dají se rozdělit do tři fenotypově odlišných populací podle exprese povrchových molekul. $CD4^{+}CD45RA^{+}FoxP3^{low}$ a $CD4^{+}CD45RA^{-}FoxP3^{high}$ Treg si zachovávají stejné počty při PAH, zato $CD4^{+}CD45RA^{-}FoxP3^{low}$ Treg byly zvýšeny, což může podporovat zánět prostřednictvím prozánětlivých cytokinů jako je IL-2 nebo INFγ (Sada *et al.*, 2016).

Treg jsou ovlivňovány leptinem, protože jejich funkce byla snížena v závislosti na leptinu. Leptin je hormon blízký cytokinům, který je produkován adipocyty, ale ukazuje se, že dysregulované PAEC jsou ho schopné taktéž produkovat. Měření koncentrace leptinu u pacientů s PAH potvrdilo jeho zvýšení nehledě na jejich BMI. Počet receptoru leptinu byl zvýšen na membráně Treg a tím byla snížena aktivita STAT3, což je hlavní signalizační cesta v Treg (Huertas *et al.*, 2012).

4.3.2. Th1, Th2 a Th17

Jedná se o CD4+ lymfocyty odvozené z pomocných Th lymfocytů, které se podle působení cytokinů mění na příslušné typy. Th1 vzniká působením IL-12 a IFNγ, které sám produkuje spolu s IL-2. Produkcí IFNγ inhibují přeměnu na Th2. Th2 vznikají pod účinky IL-4 a IL-10, jež naopak inhibují vývoj Th1. Th2 produkují IL-4, IL-5, IL-6 a IL10. TGF-β podporuje vznik Th17. Th17 produkuje IL-1, IL-6, IL-8 a TNF (Hořejší *et al.*, 2017). Jejich buněčné odpovědi jsou při PAH zvýšené a podílejí se na její patologii. Ze zde vyjmenovaných cytokinů se podílejí na patologii PAH IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 a IFNγ.

Th2 buněčná odpověď je důležitá pro vnik PAH, protože Th2 produkují IL-4 a IL-13, které způsobí muskularizaci plicní cévy. To dokazuje pokus s inhibitorem IL-13, kdy při jeho podání dojde k mírnému průběhu PAH. Naopak pokud inhibitor IL-13 nebyl aplikován, tak došlo k vážné remodelaci plicních cév. Th2 buněčná odpověď také zvyšuje výskyt resistinu podobné molekule α (RELM-α) na buňkách plicní cévy a jeho nadměrný výskyt ohraničuje místo remodelace (Daley *et al.*, 2008).

Th17 přispívají k tvorbě zánětu přes produkci cytokinů jako jsou IL-6, IL-17, IL-21 a IL-22. Produkce IL-17 je zvýšená, protože promotor pro jeho gen je hypometylován (Hautefort *et al.*, 2015). Aktivita Th17 přispívá k stimulaci makrofágů, které pak produkují LTB4 (viz. Kapitola 4.2.1.).

7. Závěr

Plicní arteriální hypertenze je fatální onemocnění, jež provází remodelace všech vrstev cévy v malých a středních cévách. Na vzniku se podílí buňky imunitního systému, dysregulovaný metabolismus, jež zahrnuje přechod k anaerobnímu metabolismu od aerobního. To zahrnuje nutně zvýšený příjem glukózy z krve a jeho transportérů. Glukóza se může odklonit do pentózofosátové dráhy, kde probíhá syntéza ribózy a NADPH, jež jsou nezbytné pro proliferující buňky. Imunitní systém podporuje zánět a proliferaci prostřednictvím produkce prozánětlivých cytokinů. To působí na buňky hladkého svalstva proliferativními a migračními účinky, jež masivně zvětšují cévní stěnu a vykazují antiapoptický fenotyp. V adventicii se akumulují buňky imunitního systému, dochází ke změnám extracelulární matrix a fibroblasty mohou diferencovat do myofibroblastů a migrovat v cévní stěně. Endotelové buňky produkují široké spektrum látek, jež působí na hladké svalstvo, čímž napomáhají k vazokonstrikci cévy a dávají vznik plexiformním lézím nebo neointimě.

Jako léky se v nynější době používají analogy prostacyklinu, látky blokující receptory endothelinu-1, inhibitory fosfodiesterázy typu 5, jež sice zlepšují stav pacienta, ale nezabrání selhání pravé srdeční komory. Jedinou možnou účinnou léčbou doposud zůstává transplantace plic.

Je nadále nutný intenzivní výzkum v oblasti imunitního sytému a metabolismu v nichž stále chybí důležité poznatky, které by bylo možno využít v léčbě.

8. Reference

Aldabbous, L. *et al.* (2016) 'Neutrophil extracellular traps promote angiogenesis', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(10), pp. 2078–2087. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307634.

Antigny, F. *et al.* (2016) 'Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension', *Circulation*, 133(14), pp. 1371–1385. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951.

Becher, B., Tugues, S. and Greter, M. (2016) 'GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation', *Immunity*. Elsevier Inc., 45(5), pp. 963–973. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.026.

Berghausen, E. M. *et al.* (2019) 'Key inflammatory pathways underlying vascular remodeling in pulmonary hypertension', *Herz*, 44(2), pp. 130–137. doi: 10.1007/s00059-019-4795-6.

Blanco, I. *et al.* (2020) 'Updated perspectives on pulmonary hypertension in COPD', *International Journal of COPD*, 15, pp. 1315–1324. doi: 10.2147/COPD.S211841.

De Bondt, M. *et al.* (2020) 'Neutrophils: Underestimated Players in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis (MS)', *International journal of molecular sciences*, 21(12). doi: 10.3390/ijms21124558.

Budhiraja, R., Tuder, R. M. and Hassoun, P. M. (2004) 'Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension', *Circulation*, 109(2), pp. 159–165. doi: 10.1161/01.CIR.0000102381.57477.50.

Cannon, J. G. (2000) 'Inflammatory cytokines in nonpathological states', *News in Physiological Sciences*, 15(6), pp. 298–303. doi: 10.1152/physiologyonline.2000.15.6.298.

Chen, C. *et al.* (2001) 'Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1: Interaction between H-ras and hypoxia', *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), pp. 9519–9525. doi: 10.1074/jbc.M010144200.

Chettimada, S. *et al.* (2015) 'Hypoxia-induced glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression and -activation in pulmonary artery smooth muscle cells: Implication in pulmonary hypertension', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(3), pp. L287–L300. doi: 10.1152/ajplung.00229.2014.

Chinnery, P. F. and Hudson, G. (2013) 'Mitochondrial genetics', *British Medical Bulletin*, 106(1), pp. 135–159. doi: 10.1093/bmb/ldt017.

Clapp, L. H. and Gurung, R. (2015) 'The mechanistic basis of prostacyclin and its stable analogues in pulmonary arterial hypertension: Role of membrane versus nuclear receptors', *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. Elsevier Inc., 120, pp. 56–71. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.04.007.

Daley, E. *et al.* (2008) 'Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response', *Journal of Experimental Medicine*, 205(2), pp. 361–372. doi: 10.1084/jem.20071008.

Dasgupta, A. *et al.* (2020) 'Mitochondria in the pulmonary vasculature in health and disease: Oxygen-sensing, metabolism, and dynamics', *Comprehensive Physiology*, 10(2), pp. 713–765. doi:

10.1002/cphy.c190027.

Dong, G. *et al.* (2016) 'PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis (Review)', *Oncology Letters*, 11(3), pp. 1980–1986. doi: 10.3892/ol.2016.4168.

Eddahibi, S. *et al.* (2000) 'Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension: Effect of prostacyclin therapy', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162(4 I), pp. 1493–1499. doi: 10.1164/ajrccm.162.4.2003124.

Evans, J. D. W. *et al.* (2016) 'BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: An individual participant data meta-analysis', *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(2), pp. 129–137. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00544-5.

Fessel, J. P. *et al.* (2012) 'Metabolomic analysis of bone morphogenetic protein receptor type 2 mutations in human pulmonary endothelium reveals widespread metabolic reprogramming', *Pulmonary Circulation*, 2(2), pp. 201–213. doi: 10.4103/2045-8932.97606.

Frid, M. G. *et al.* (2006) 'Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 168(2), pp. 659–669. doi: 10.2353/ajpath.2006.050599.

Frid, M. G. *et al.* (2020) 'Immunoglobulin-driven complement activation regulates proinflammatory remodeling in pulmonary hypertension', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(2), pp. 224–239. doi: 10.1164/rccm.201903-0591OC.

Gazi, U. and Martinez-Pomares, L. (2009) 'Influence of the mannose receptor in host immune responses', *Immunobiology*. Elsevier, 214(7), pp. 554–561. doi: 10.1016/j.imbio.2008.11.004.

Gillespie, M. N. and Olson, J. W. (2010) 'Polyamine Regulatory Pathways as Pharmacologic Targets in Pulmonary A rterial Hypertension', 661, pp. 57–76. doi: 10.1007/978-1-60761-500-2.

Harper, R. L. *et al.* (2016) 'BMPR2 gene therapy for PAH acts via Smad and non-Smad signalling', *Respirology*, 21(4), pp. 727–733. doi: 10.1111/resp.12729.

Hautefort, A. *et al.* (2015) 'T-helper 17 cell polarization in pulmonary arterial hypertension', *Chest*. The American College of Chest Physicians, 147(6), pp. 1610–1620. doi: 10.1378/chest.14-1678.

Hayabuchi, Y. (2017) 'The Action of Smooth Muscle Cell Potassium Channels in the Pathology of Pulmonary Arterial Hypertension', *Pediatric Cardiology*. Springer US, 38(1), pp. 1–14. doi: 10.1007/s00246-016-1491-7.

Hiepen, C. *et al.* (2019) *BMPR2 acts as a gatekeeper to protect endothelial cells from increased TGFβ responses and altered cell mechanics*, *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.3000557.

Hinz, B. (2015) 'Myofibroblasts', *Experimental Eye Research*, 142, pp. 56–70. doi: 10.1016/j.exer.2015.07.009.

Holcomb, I. N. *et al.* (2000) 'FIZZ1 , a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary

in ¯ ammation , de ® nes a new gene family', 19(15).

Hood, K. Y. *et al.* (2017) 'Serotonin Signaling Through the 5-HT1B Receptor and NADPH Oxidase 1 in Pulmonary Arterial Hypertension', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(7), pp. 1361–1370. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308929.

Hořejší, V. et al., 2017. *Základy imunologie* 6., aktualizované vydání., V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton

Hu, Y. *et al.* (2020) 'Endoplasmic reticulum stress and pulmonary hypertension', *Pulmonary Circulation*, 10(1). doi: 10.1177/2045894019900121.

Huertas, A. *et al.* (2012) 'Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension', *European Respiratory Journal*, 40(4), pp. 895–904. doi: 10.1183/09031936.00159911.

Huertas, A. *et al.* (2020) 'Chronic inflammation within the vascular wall in pulmonary arterial hypertension: More than a spectator', *Cardiovascular Research*, 116(5), pp. 885–893. doi: 10.1093/cvr/cvz308.

Humbert, M. *et al.* (2004) 'Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension', *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier Masson SAS, 43(12 SUPPL.), pp. S13–S24. doi: 10.1016/j.jacc.2004.02.029.

Hurst, L. A. *et al.* (2017) 'TNFα drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8. doi: 10.1038/ncomms14079.

Ito, T. *et al.* (2007) 'Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats', *Circulation Research*, 101(7), pp. 734–741. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.153023.

Jasińska-Stroschein, M. *et al.* (2014) 'Concurrent rho-kinase and tyrosine kinase platelet-derived growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension', *Pharmacology*, 93(3–4), pp. 145–150. doi: 10.1159/000360182.

Kaelin, W. G. and Ratcliffe, P. J. (2008) 'Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway', *Molecular Cell*, 30(4), pp. 393–402. doi: 10.1016/j.molcel.2008.04.009.

El Kasmi, K. C. *et al.* (2014) 'Adventitial Fibroblasts Induce a Distinct Proinflammatory/Profibrotic Macrophage Phenotype in Pulmonary Hypertension', *The Journal of Immunology*, 193(2), pp. 597–609. doi: 10.4049/jimmunol.1303048.

Kawka, E. *et al.* (2017) 'Thy-1+/- fibroblast subsets in the human peritoneum', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 313(5), pp. F1116–F1123. doi: 10.1152/ajprenal.00274.2017.

L. Sheng, M. Christopher, A. M. (2016) 'Low dose monocrotaline causes a selective pulmonary vascular lesion in male and female pneumonectomized rats', *Physiology & behavior*, 176(1), pp. 100–106. doi: 10.1016/j.gde.2016.03.011.

Lambert, M. *et al.* (2018) 'Ion channels in pulmonary hypertension: A therapeutic interest?', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). doi: 10.3390/ijms19103162.

Lambeth, J. D. (2007) 'Nox Enzymes, ROS, and Chronic Disease: An Example of Antagonistic Pleiotropy', *Free Radic Biol Med.*, 47(6), pp. 332–347. doi: 10.1007/s11094-013-0953-y.

Della Latta, V. *et al.* (2015) 'Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions', *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 97, pp. 122–130. doi: 10.1016/j.phrs.2015.04.012.

Lau, E. M. T. *et al.* (2017) 'Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension', *Nature Reviews Cardiology*. Nature Publishing Group, 14(10), pp. 603–614. doi: 10.1038/nrcardio.2017.84.

Lee, H. Y. *et al.* (2011) 'Src activates HIF-1α not through direct phosphorylation of HIF-1α-specific prolyl-4 hydroxylase 2 but through activation of the NADPH oxidase/Rac pathway', *Carcinogenesis*, 32(5), pp. 703–712. doi: 10.1093/carcin/bgr034.

Leopold, J. A. and Maron, B. A. (2016) 'Molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), pp. 1–14. doi: 10.3390/ijms17050761.

Li, G. *et al.* (2000) 'Direct In Vivo Evidence Demonstrating Neointimal Migration of Adventitial Fibroblasts After Balloon Injury of', pp. 1362–1365.

Li, S. *et al.* (2008) 'NOX4 regulates ROS levels under normoxic and hypoxic conditions, triggers proliferation, and inhibits apoptosis in pulmonary artery adventitial fibroblasts', *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(10), pp. 1687–1697. doi: 10.1089/ars.2008.2035.

Liu, P. *et al.* (2019) 'Inhibition of Src activation reverses pulmonary vascular remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension via Akt/mTOR/HIF-1<alpha> signaling pathway', *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., 380(1), pp. 36–46. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.02.022.

Mathew, B. and Lakshminrusimha, S. (2019) *Chapter 8 - Pathophysiology of Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn—Cellular Basis and Lessons from Animal Studies*. Third Edit, *Hemodynamics and Cardiology (Third Edition)*. Third Edit. Elsevier. doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-323-53366-9.00008-9.

Mhatre V. Ho, Ji-Ann Lee, and K. C. M. (2012) 'Pathogenic Mechanisms of Pulmonary Arterial Hypertension', *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.

Mulvaney, E. P. *et al.* (2020) 'NTP42, a novel antagonist of the thromboxane receptor, attenuates experimentally induced pulmonary arterial hypertension', *BMC Pulmonary Medicine*. BMC Pulmonary Medicine, 20(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12890-020-1113-2.

Navale, A. M. and Paranjape, A. N. (2016) 'Glucose transporters: physiological and pathological roles', *Biophysical Reviews*, 8(1), pp. 5–9. doi: 10.1007/s12551-015-0186-2.

Nikolic, I. *et al.* (2019) 'Bone morphogenetic protein 9 is a mechanistic biomarker of portopulmonary

hypertension', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 199(7), pp. 891–902. doi: 10.1164/rccm.201807-1236OC.

Orecchioni, M. *et al.* (2019) 'Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages', *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), pp. 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084.

Ormiston, M. L. *et al.* (2012) 'Impaired natural killer cell phenotype and function in idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension', *Circulation*, 126(9), pp. 1099–1109. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.110619.

Pan, T. *et al.* (2020) 'A crucial role of endoplasmic reticulum stress in cellular responses during pulmonary arterial hypertension', *American Journal of Translational Research*, 12(5), pp. 1481–1490.

Parpaleix, A. *et al.* (2016) 'Role of interleukin-1 receptor 1/MyD88 signalling in the development and progression of pulmonary hypertension', *European Respiratory Journal*, 48(2), pp. 470–483. doi: 10.1183/13993003.01448-2015.

Paulin, R. and Michelakis, E. D. (2014) 'The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension', *Circulation Research*, 115(1), pp. 148–164. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.301130.

Pedersen, P. L. (2008) 'Voltage dependent anion channels (VDACs): A brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the "Warburg effect" in cancer', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(3), pp. 123–126. doi: 10.1007/s10863-008-9165-7.

Perros, F. *et al.* (2007) 'Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension', *European Respiratory Journal*, 29(5), pp. 937–943. doi: 10.1183/09031936.00104706.

Rabinovitch, M. *et al.* (2014) 'Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension', *Circulation Research*, 115(1), pp. 165–175. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301141.

Rabinovitch, M. and Rabinovitch, M. (2012) 'Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension Find the latest version : Science in medicine Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension', *J Clin Invest*, 122(12), pp. 4306–4313. doi: 10.1172/JCI60658DS1.

Rafikova, O., Al Ghouleh, I. and Rafikov, R. (2019) 'Focus on Early Events: Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension Development', *Antioxidants and Redox Signaling*, 31(13), pp. 933–953. doi: 10.1089/ars.2018.7673.

Rajendran, P. *et al.* (2013) 'The vascular endothelium and human diseases', *International Journal of Biological Sciences*, 9(10), pp. 1057–1069. doi: 10.7150/ijbs.7502.

Ramazani, Y. *et al.* (2018) 'Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics', *Matrix Biology*. Elsevier B.V., 68–69, pp. 44–66. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.007.

Ranchoux, B. *et al.* (2015) 'Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension', *Circulation*, 131(11), pp. 1006–1018. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008750.

Ranchoux, B. *et al.* (2018) 'Endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: An evolving landscape (2017 Grover Conference Series)', *Pulmonary Circulation*, 8(1). doi: 10.1177/2045893217752912.

Rätsep, M. T. *et al.* (2018) 'Spontaneous pulmonary hypertension in genetic mouse models of natural killer cell deficiency', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 315(6), pp. L977–L990. doi: 10.1152/ajplung.00477.2017.

Ricard, N. *et al.* (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), pp. 1586–1597. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007469.

Ruan, C. H. *et al.* (2010) 'Prostacyclin therapy for pulmonary arterial hypertension', *Texas Heart Institute Journal*, 37(4), pp. 391–399. doi: 10.1007/978-1-60327-075-5_12.

Sada, Y. *et al.* (2016) 'Non-suppressive regulatory T cell subset expansion in pulmonary arterial hypertension', *Heart and Vessels*. Springer Japan, 31(8), pp. 1319–1326. doi: 10.1007/s00380-015-0727-4.

Sahni, S. *et al.* (2016) 'Pulmonary arterial hypertension: A current review of pharmacological management', *Advances in Respiratory Medicine*, 85(1), pp. 47–61. doi: 10.5603/PiAP.a2015.0084.

Sawada, H. *et al.* (2014) 'Reduced BMPR2 expression induces GM-CSF translation and macrophage recruitment in humans and mice to exacerbate pulmonary hypertension', *Journal of Experimental Medicine*, 211(2), pp. 263–280. doi: 10.1084/jem.20111741.

Schermuly, R. T. *et al.* (2007) 'Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: Target for reverse-remodeling therapy', *Circulation*, 115(17), pp. 2331–2339. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676809.

Scott, N. A. *et al.* (1996) 'Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries', *Circulation*, 93(12), pp. 2178–2187. doi: 10.1161/01.CIR.93.12.2178.

Shi, Y. *et al.* (1996) 'Adventitial remodeling after coronary arterial injury', *Circulation*, 93(2), pp. 340–348. doi: 10.1161/01.CIR.93.2.340.

Shuhui, L., Mok, Y. K. and Wong, W. S. F. (2009) 'Role of mammalian chitinases in asthma', *International Archives of Allergy and Immunology*, 149(4), pp. 369–377. doi: 10.1159/000205583.

Sim, J. Y. (2010) 'Nitric oxide and pulmonary hypertension', *Korean Journal of Anesthesiology*, 58(1), pp. 4–14. doi: 10.4097/kjae.2010.58.1.4.

Sommer, N. *et al.* (2020) 'Bypassing mitochondrial complex III using alternative oxidase inhibits acute pulmonary oxygen sensing', *Science Advances*, 6(16). doi: 10.1126/sciadv.aba0694.

Soon, E. *et al.* (2010) 'Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension', *Circulation*, 122(9), pp. 920–927. doi:

10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762.

Spiekerkoetter, E. *et al.* (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), pp. 1–15. doi: 10.1177/2045894019889775.

Spiekermann, S., Schenk, K. and Hoeper, M. M. (2009) 'Increased xanthine oxidase activity in idiopathic pulmonary arterial hypertension', *European Respiratory Journal*, 34(1), p. 276. doi: 10.1183/09031936.00013309.

Sutendra, G. *et al.* (2013) 'The Role of Nogo and the Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Unit in Pulmonary Hypertension', 3(88). doi: 10.1126/scitranslmed.3002194.The.

Tamosiuniene, R. *et al.* (2011) 'Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension', *Circulation Research*, 109(8), pp. 867–879. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.236927.

Thenappan, T. *et al.* (2018) 'Pulmonary arterial hypertension: Pathogenesis and clinical management', *BMJ (Online)*, 360(fig 1). doi: 10.1136/bmj.j5492.

Thenappan, T., Chan, S. Y. and Weir, E. K. (2018) 'Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 315(5), pp. H1322–H1331. doi: 10.1152/ajpheart.00136.2018.

Tian, W. *et al.* (2014) 'NIH Public Access and Reverses Pulmonary Hypertension', 5(200). doi: 10.1126/scitranslmed.3006674.Blocking.

Tielemans, B. *et al.* (2019) 'TGFβ and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension', *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 24(3), pp. 703–716. doi: 10.1016/j.drudis.2018.12.001.

Tu, L. *et al.* (2011) 'Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(2), pp. 311–322. doi: 10.1165/rcmb.2010-0317OC.

Vachiéry, J. L. (2011) 'Prostacyclins in pulmonary arterial hypertension: The need for earlier therapy', *Advances in Therapy*, 28(4), pp. 251–269. doi: 10.1007/s12325-011-0005-5.

Vergadi, E. *et al.* (2011) 'Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension', *Circulation*, 123(18), pp. 1986–1995. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.978627.

Wang, X. *et al.* (2020) 'Hypoxic mast cells accelerate the proliferation, collagen accumulation and phenotypic alteration of human lung fibroblasts', *International Journal of Molecular Medicine*, 45(1), pp. 175–185. doi: 10.3892/ijmm.2019.4400.

West, J. and Hemnes, A. (2011) 'Experimental and transgenic models of pulmonary hypertension', *Comprehensive Physiology*, 1(2), pp. 769–782. doi: 10.1002/cphy.c100003.

Wilkins, M. R. *et al.* (2008) 'Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension', *European Respiratory Journal*, 32(1), pp. 198–209. doi: 10.1183/09031936.00124007.

Wilkins, M. R. (2012) 'Pulmonary hypertension: The science behind the disease spectrum', *European Respiratory Review*, 21(123), pp. 19–26. doi: 10.1183/09059180.00008411.

Wilson, J. L. *et al.* (2018) 'Unraveling endothelin-1 induced hypercontractility of human pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension', *PLoS ONE*, 13(4), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0195780.

Xu, J. *et al.* (2018) 'New dynamic viewing of mast cells in pulmonary arterial hypertension (PAH): Contributors or outsiders to cardiovascular remodeling', *Journal of Thoracic Disease*, 10(5), pp. 3016–3026. doi: 10.21037/jtd.2018.05.59.

Yang, K., Wang, J. and Lu, W. (2017) 'Bone morphogenetic protein signalling in pulmonary hypertension: advances and therapeutic implications', *Experimental Physiology*, 102(9), pp. 1083–1089. doi: 10.1113/EP086041.

Yang, L., Venneti, S. and Nagrath, D. (2017) 'Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism', *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19, pp. 163–194. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044546.

Zhang, A. *et al.* (2020) 'Pyruvate kinase M2 activation protects against the proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells'. Cell and Tissue Research, 2.

Zhang, H. *et al.* (2018) 'Bone morphogenetic protein-7 inhibits endothelial-mesenchymal transition in pulmonary artery endothelial cell under hypoxia', *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), pp. 4077–4090. doi: 10.1002/jcp.26195.

Zhao, Y. *et al.* (2014) 'Metabolomic heterogeneity of pulmonary arterial hypertension', *PLoS ONE*, 9(2), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0088727.