

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Andrea Jakubíčková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Cytokiny v ateroskleróze

Andrea Jakubíčková

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Andrea Jakubičková**  
Osobní číslo: **C14275**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Cytokiny v ateroskleróze**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Seznamte se s úlohou cytokinů v rozvoji aterosklerózy. S cytokiny prozánětlivými, které urychlují rozvoj onemocnění, i protizánětlivými; v souvislosti s jednotlivými stadii aterosklerózy, především se stadiem endoteliální dysfunkce s upregulací adhezních molekul, vlivem na transformaci hladkých svalových buněk, s úlohou cytokinů v destabilizaci aterosklerotických plaků, se stadiem trvajících zánětů "unresolved inflammation". Proveďte literární rešerši k této problematice, při vyhledávání literárních údajů využijte databázi MEDLINE.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Popdle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce: **MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

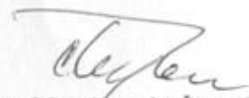
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2017

.....  
Andrea Jakubíčková

Na tomto místě bych ráda poděkovala MUDr. Vladimíře Novákové Mužákové, Ph.D. za odborné vedení a poskytování užitečných rad při tvorbě této práce.

## **ANOTACE**

Ateroskleróza je chronický zánětlivý proces postihující cévní stěnu. Proces rozvoje aterosklerózy je složitý a probíhá postupně od stadia endotelové dysfunkce, přes vstup monocytrů do subendotelového prostoru, transformaci hladkých svalových buněk, vznik aterosklerotických lézí, až po jejich destabilizaci a stádium trvajícího zánětu. Souhra imunitních mechanismů vedoucích k rozvoji aterosklerózy je umožněna řadou cytokinů. V počátečních fázích aterosklerózy hrají důležitou úlohu především chemokiny (např. MCP-1), které napomáhají vstupu monocytrů do cévní stěny. Diferenciace monocytrů na makrofágy je závislá na faktoru M-CSF. K expresi adhezních molekul na povrchu endotelových buněk a scavenger receptorů na povrchu makrofágů přispívá TNF- $\alpha$ , který tak podporuje vznik pěnových buněk. Hladké svalové buňky podléhají změnám fenotypu především vlivem některých růstových faktorů (např. PDGF). Z interleukinů jsou velmi důležité prozánětlivé IL-1 a IL-6, jejichž vysoká koncentrace v pozdějších stádiích podporuje destabilizaci aterosklerotických plaků. Podstatnou roli v ateroskleróze má také prozánětlivý IFN- $\gamma$ . Za antiaterogenní faktory jsou považovány např. TGF- $\beta$  a IL-10.

## **KLÍČOVÁ SLOVA:**

ateroskleróza, zánět, cytokiny, imunitní odpověď, pěnové buňky, interleukiny

## **TITLE**

Cytokines in atherosclerosis

## **ANNOTATION**

Atherosclerosis is a chronic inflammatory process which affects the vascular wall. The process of developing atherosclerosis is complex and progresses gradually from the stage of endothelial dysfunction, to monocyte penetration into the subendothelial area, from the transformation of smooth muscle cells, to the occurrence of atherosclerotic lesions and after their destabilization and the stage of unresolved inflammation. The interaction of immune mechanisms leads to the development of atherosclerosis and is facilitated by a number of cytokines. In the early stages of atherosclerosis primarily chemokines (for instance MCP-1) play a key role, they help the monocyte recruitment into the vascular wall. The differentiation of monocytes to macrophages depends on M-CSF. The expression of adhesion molecules on the surface of endothelial cells and scavenger receptors on the surface of macrophages, contribute to TNF- $\alpha$ , which supports the formation of foam cells. Smooth muscle cells are subjected to phenotypic changes, mainly due to some growth factors (for instance PDGF). Pro-inflammatory IL-1 and IL-6 are very important interleukins; their high concentration in later stages support the destabilization of atherosclerotic plaques. Pro-inflammatory IFN- $\gamma$  has also an essential role in atherosclerosis. For anti-atherogenic factors are considered for instance TGF- $\beta$  and IL-10.

## **KEYWORDS:**

atherosclerosis, inflammation, cytokines, immune response, foam cells, interleukins



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>1 CYTOKINY</b> .....	<b>13</b>
1.1 Působení cytokinů .....	13
1.2 Klasifikace cytokinů.....	13
1.2.1 Hlavní skupiny cytokinů.....	14
1.2.2 Klasifikace podle funkce .....	15
1.3 Cytokinové receptory .....	15
1.4 Přenos signálu do buňky .....	15
1.4.1 JAK-STAT signální dráha .....	16
1.4.2 G proteinová signální dráha.....	16
1.4.3 NF- $\kappa$ B.....	17
1.5 Způsoby studia cytokinů .....	17
<b>2 ATEROSKLERÓZA</b> .....	<b>18</b>
<b>3 ÚLOHA CYTOKINŮ V ATEROSKLEROTICKÉM PROCESU</b> .....	<b>20</b>
3.1 Dysfunkce endotelu.....	20
3.2 Upregulace adhezních molekul .....	22
3.2.1 Adhezní molekuly rodiny selektinů .....	22
3.2.2 Adhezní molekuly rodiny integrinů .....	22
3.2.3 Adhezní molekuly rodiny imunoglobulinů .....	22
3.2.4 Další adhezní molekuly.....	23
3.3 Prostup leukocytů do subendotelového prostoru .....	23
3.4 Diferenciace monocytů v intimě .....	24
3.5 Tvorba pěnových buněk .....	25
3.6 Úloha Th lymfocytů v ateroskleróze.....	27
3.6.1 Th1 lymfocyty.....	27
3.6.2 Th2 lymfocyty.....	28
3.6.3 Th17 lymfocyty.....	28
3.6.4 Regulační T lymfocyty.....	29
3.7 Hladké svalové buňky .....	29
3.7.1 Vliv cytokinů na akumulaci a proliferaci hladkých svalových buněk.....	30
3.7.2 Změna fenotypu hladkých svalových buněk.....	30
3.7.3 Tvorba pěnových buněk z hladkých svalových buněk.....	31

3.7.4	<i>Produkce extracelulární matrix</i> .....	32
3.7.5	<i>Zadržování monocytů a makrofágů hladkými svalovými buňkami</i> .....	33
3.7.6	<i>Cytokiny produkované buňkami hladké svaloviny</i> .....	33
3.8	Destabilizace aterosklerotických plaků .....	34
3.8.1	<i>Apoptóza makrofágů</i> .....	35
3.8.2	<i>Apoptóza hladkých svalových buněk</i> .....	35
3.8.3	<i>Toll-like receptory v destabilizaci plátu</i> .....	36
3.8.4	<i>Matrixové metaloproteinázy</i> .....	36
3.8.5	<i>Angiogeneze</i> .....	37
3.8.6	<i>Kalcifikace</i> .....	37
3.9	Stádium trvajícího zánětu .....	38
3.9.1	<i>Lipoxiny</i> .....	40
3.9.2	<i>Resolviny</i> .....	40
3.9.3	<i>Maresiny</i> .....	40
3.9.4	<i>Annexin A1</i> .....	41
<b>4</b>	<b>SOUHRN DŮLEŽITÝCH CYTOKINŮ OVLIVŇUJÍCÍCH ATEROSKLERÓZU</b>	<b>42</b>
4.1	Interleukiny .....	43
4.1.1	<i>IL-1</i> .....	43
4.1.2	<i>IL-6</i> .....	43
4.1.3	<i>IL-10</i> .....	43
4.2	Faktory stimulující kolonie .....	44
4.2.1	<i>M-CSF</i> .....	44
4.2.2	<i>GM-CSF</i> .....	44
4.3	Další důležité cytokiny .....	45
4.3.1	<i>IFN-<math>\gamma</math></i> .....	45
4.3.2	<i>TNF-<math>\alpha</math></i> .....	45
4.3.3	<i>TGF-<math>\beta</math></i> .....	46
4.4	Chemokiny .....	46
4.4.1	<i>IL-8</i> .....	47
4.4.2	<i>MCP-1</i> .....	47
4.4.3	<i>MIF</i> .....	48
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>49</b>
	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>50</b>

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>53</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>53</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>54</b>

## ÚVOD

Ateroskleróza je chronická zánětlivá porucha cévní stěny, která vede k řadě onemocnění, jako je ischemická choroba srdeční, cévní mozková příhoda, nebo ischemická choroba dolních končetin, v závislosti na tom, jaké tepny jsou postiženy. Protože se jedná o nejčastější příčinu úmrtí osob středního věku ve vyspělých zemích, je ateroskleróza v současnosti intenzivně studována.

Důležitou úlohu ve všech stádiích aterosklerózy zastávají cytokiny, nízkomolekulární látky modulující imunitní odpovědi. Cytokiny jsou považovány za hlavní regulátory zánětlivé reakce.

Cílem této práce je podat přehled o hlavních cytokinech ovlivňujících aterosklerózu a popsat jejich úlohu v rozvoji tohoto onemocnění.

# 1 CYTOKINY

Cytokiny jsou peptidy, proteiny, nebo glykoproteiny sloužící ke komunikaci mezi buňkami. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 15-20 kDa. Většinou jsou syntetizovány jako prekurzory, jejichž N konce obsahují tzv. signální peptidy, což jsou hydrofobní sekvence aminokyselin. Signální peptidy jsou nezbytné pro přestup cytokinů přes membránu cílové buňky. Po odštěpení signálního peptidu z prekurzoru vzniká biologicky aktivní forma cytokinu (Krejsek a Kopecký, 2004).

Cytokiny se mohou vyskytovat buď volně, nebo jako součást buněčných membrán. Představují různorodou skupinu molekul, která přenáší mezibuněčné signály (Leonard a Lin, 2000). Mají zásadní funkci v regulaci přirozené i získané imunity a významnou měrou regulují zánětlivé reakce, ale i další biologické procesy, včetně růstu těla, laktace, adipozity a krvetvorby (Tedgui a Mallat, 2006). Cytokiny jsou produkovány nejrůznějšími buňkami. Také buňky ateromového plátu jsou schopny produkovat cytokiny a reagovat na ně.

## 1.1 Působení cytokinů

Jeden cytokin, může působit na několik různých typů buněk, mít tedy tzv. pleiotropní účinek. Jednotlivé cytokiny mohou být nahrazeny jinými, jsou tzv. redundantní, a jeden cytokin může vyvolat tvorbu cytokinu jiného, tedy mohou působit v kaskádě.

V rámci působení na cílové buňky můžeme rozlišovat cytokiny působící autokrinně (daný cytokin působí na buňku, která jej produkuje), parakrinně (cytokin působí na buňky, které se nacházejí v těsné blízkosti buňky, jež ho vyprodukovala). Obě tyto situace mohou nastat současně (Leonard a Lin, 2000). Spíše výjimečně mohou cytokiny působit endokrinně, což znamená, že působí na vzdálené tkáně po transportu cévním řečištěm (Hořejší a Bartůňková, 2009).

## 1.2 Klasifikace cytokinů

Prozatím je známo více než 120 cytokinů, jejich počet se však neustále zvyšuje (Hořejší a Bartůňková, 2009). U známých cytokinů je popsána jejich primární, většinou i terciární struktura a umístění genu, který zodpovídá za produkci daného cytokinu. Dále jsou známy buňky, které daný cytokin produkují nebo na které daný cytokin působí, a také receptory pro daný cytokin (Krejsek a Kopecký, 2004).

Cytokiny lze členit podle různých hledisek, a to podle struktury, působení, funkce, která u nich převažuje, nebo i podle buňky, která je vyprodukovala.

### 1.2.1 Hlavní skupiny cytokinů

Postupem času, s objevováním nových cytokinů, začaly být rozdělovány do několika hlavních skupin:

- interleukiny (IL)
- chemokiny (IL-8 a řada příbuzných molekul s chemotaktickým účinkem)
- faktory nekrotizující nádory (TNF, tumor necrosis factor)
- interferony (IFN)
- transformující růstové faktory (TGF, transforming growth factor)
- faktory stimulující růst kolonií (CSF, colony stimulating factor)
- jiné růstové faktory, např. růstový faktor kmenových buněk (SCF, stem cell factor), růstový faktor fibroblastů (FGF, fibroblast growth factor), inzulínu podobný růstový faktor (IGF), erythropoetin, fosfolipidový aktivátor destiček atp. (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Přehled jednotlivých skupin a jejich základních funkcí viz tabulka 1.

**Tabulka 1:** Hlavní skupiny cytokinů a jejich funkce (vytvořeno podle: Hořejší a Bartůňková, 2009).

NÁZEV	PŘÍKLADY	FUNKCE
Interleukiny	IL-1 až IL-35	regulují imunitní reakce
Chemokiny	IL-8, CCL, CXCL	stimulují migraci buněk imunitního systému (tzv. chemotaxi)
faktory nekrotizující nádory	TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TNF- $\gamma$	regulují zánět; slouží jako obrana proti nádorům
Interferony	IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$	mají antivirový účinek; regulují imunitní reakce
transformující růstové faktory	TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$	regulují embryonální vývoj, imunitní reakce a nádorové přeměny buněk
faktory stimulující kolonie	M-CSF, G-CSF, GM-CSF	M-CSF stimulují diferenciaci monocytů; G-CSF stimulují diferenciaci granulocytů; GM-CSF stimulují diferenciaci myeloidních buněk

### 1.2.2 Klasifikace podle funkce

Na základě funkce jsou cytokiny často klasifikovány podle jejich prozánětlivých, např. TNF, IL-1, IL-12, IL-18 a IFN- $\gamma$ , nebo protizánětlivých účinků, např. IL-4, IL-10, IL-13 a TGF- $\beta$  (Tedgui a Mallat, 2006).

## 1.3 Cytokinové receptory

Cytokiny působí na cílové buňky pomocí receptorů v jejich membráně. Cytokinové receptory jsou složeny ze 2 až 3 podjednotek. Na jednu z podjednotek se může specificky vázat cytokin, ostatní podjednotky zajišťují spojení se signalizačními molekulami uvnitř buňky.

Receptory jsou klasifikovány do několika skupin na základě podobnosti ve své struktuře, resp. na základě signalizační podjednotky, kterou mají členové jedné rodiny společnou. Tyto skupiny se nazývají cytokinové rodiny (Hořejší a Bartůňková, 2009). Existuje 7 cytokinových rodin, a to: (1) cytokinové receptory typu I; (2) cytokinové receptory typu II; (3) receptory pro TNF; (4) receptory pro cytokiny, které patří do imunoglobulinové rodiny; (5) receptory pro chemokiny; (6) receptory pro TGF- $\beta$  a (7) receptory pro IL-17.

Cytokinové receptory typu I zahrnují receptory pro IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 a IL-21. Společnou podjednotkou této skupiny je řetězec  $\gamma$  (CD132). Dále do první rodiny receptorů patří receptory pro GM-CSF a IL-6, které sdílejí společnou podjednotku gp 130.

Pomocí cytokinových receptorů typu II je zprostředkován účinek IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  a IL-10.

Receptory patřící do imunoglobulinové rodiny obsahují extracelulární domény imunoglobulinů a zahrnují receptory pro IL-1, IL-18, CSF a SCF (Lee a Margolin, 2011).

Členění receptorů na rodiny je důležité, protože naznačuje, jakým způsobem budou cytokiny dále působit na buňku.

## 1.4 Přenos signálu do buňky

Pro přenos signálu do buňky využívají cytokiny několik signálních drah. Jednou z nejvýznamnějších je signální dráha JAK-STAT, tuto dráhu využívají například cytokiny I. a II. třídy (Tedgui a Mallat, 2006). Důležitou dráhou aktivovanou v odezvě na prozánětlivé cytokiny (např. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-18) je dráha vedoucí k aktivaci nukleárního faktoru- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Přes specifické skupiny receptorů působí chemokiny a uvnitř buňky aktivují G proteiny (viz G proteinová signální dráha) (Hořejší a Bartůňková, 2009). Mezi další dráhy patří

například supresor signalizace cytokinů (SOCS, supresor of cytokine signaling), proteinové inhibitory označované zkratkou PIAS (z anglického „protein inhibitors of activated STATs“), atp. (Rawlings et al., 2004).

#### ***1.4.1 JAK-STAT signální dráha***

Po navázání cytokinu na receptor v buněčné membráně dojde ke konformační změně struktury molekuly receptoru (Hořejší a Bartůňková, 2009). Receptory jsou poté uvnitř buněk nekovalentně vázány s proteinovými kinázami, označovanými jako Janusovy kinázy (JAK, Janus Activated Kinase) (Krejsek a Kopecký, 2004).

Existují celkem tři JAK, označované JAK-1, JAK-2, JAK-3 a jim příbuzná tyrosin kináza-2 (TYK-2) (Leonard a Lin, 2000). Jedná se o enzymy, které se v nestimulovaných buňkách vyskytují v inaktivní podobě. Konformační změna molekuly receptoru způsobí jejich aktivaci a následnou fosforylaci nitrobuněčných částí receptorů, resp. tyrosinových zbytků na receptorech.

Fosforylace tyrosinových zbytků umožní aktivaci přenašečů signálu a aktivátorů transkripce, označovaných zkratkou STAT (z anglického „signal transducer and activator of transcription protein“), které se nacházejí v cytoplazmě. Aktivované STAT dimerizují a přemísťují se do jádra buňky, kde vyvolávají transkripci některých sekvencí genů. Výsledkem je buněčná odpověď, která závisí na typu buňky, povaze receptoru a na dalších signálech, které na buňku působí (Rawlings et al., 2004).

#### ***1.4.2 G proteinová signální dráha***

Receptory G proteinů jsou nazývány jako tzv. receptory spřažené s G proteiny. Po navázání ligandu (chemokinu) na tento receptor dojde k výměně molekuly guanosindifosfátu (GDP), která je návázána na asociovaný G protein, za molekulu guanosintrifosfátu. G protein se tímto aktivuje a odpojí se od receptoru. Následně dojde k jeho disociaci na podjednotku  $\alpha$  a pevný dimer  $\beta\gamma$ . Ty se pak váží na cytoplazmatické proteiny a mění tak jejich aktivitu. Výsledkem může být vznik produktů (druhých posílů), které pak mohou aktivovat jiné enzymy nebo ovlivnit propustnost iontových kanálů. V konečném důsledku dochází ke změnám v expresi genů, metabolismu nebo sekreci.

Po určité době může být guanosintrifosfát, vázaný na  $\alpha$ -podjednotku, hydrolyzován na GDP, komplex  $\alpha$ -podjednotky s GDP je opět spojen s dimerem  $\beta\gamma$  i s původním receptorem a obnoví se původní stav (Satagopam et al., 2010; Hořejší a Bartůňková, 2009).



### 1.4.3 *NF-κB*

Některé cytokinové receptory a některé Toll-like receptory (TLR) po navázání ligandu aktivují kinázy, které způsobí fosforylaci proteinu IκB. Před fosforylací vytvářel IκB v cytoplasmě komplex s NF-κB. Po fosforylaci je IκB odstraňován v proteazomech a následně dochází k fosforylaci NF-κB uvolněného z komplexu. Takto aktivovaný NF-κB je přemístěn do jádra, kde vyvolává transkripci genů pro prozánětlivé cytokiny, chemokiny, adhezní molekuly a některé enzymy (např. cyklooxygenáza-2 a NO-syntáza). Aktivované NF-κB byly nalezeny v endotelových buňkách, makrofázích a hladkých svalových buňkách aterosklerotických lézí (Hořejší a Bartůňková, 2009; Tedgui a Mallat, 2006).

## 1.5 Způsoby studia cytokinů

Zkoumání funkcí jednotlivých cytokinů má nesporně velký praktický význam, je však značně obtížné. Funkce cytokinů mohou být studovány buď na zvířecích modelech, nebo na tkáňových kulturách. Ze zvířecích modelů se používají zejména dva myší modely, tzv. knock-out myši a myši transgenní. V knock-out myších modelech je vyrušen gen, který kóduje určitý cytokin. U myši transgenních se provádí vnesení genu pro určitý cytokin, ten je exprimován a následně dochází ke zvýšené produkci tohoto cytokinu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

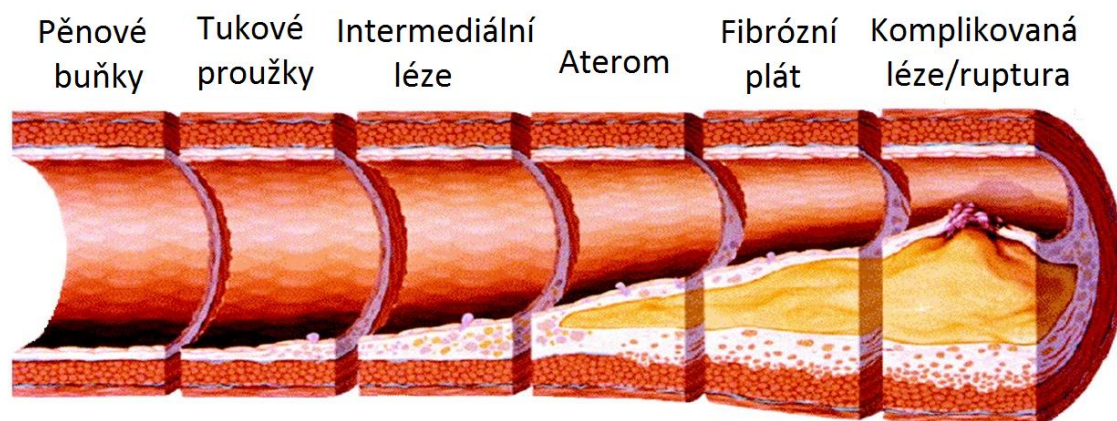
Nejčastěji používané zvířecí modely pro studium aterosklerózy jsou knock-out myši s vyrušeným genem pro apolipoprotein E (ApoE<sup>-/-</sup>) nebo s vyrušeným genem pro LDL receptor (LDLr<sup>-/-</sup>) (Fatkhullina et al., 2016). Tyto modely jsou zvláště užitečné při studiu molekulárního základu aterosklerózy a úloh jednotlivých cytokinů (Ramji a Davies, 2015).

## 2 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza (z řečtiny atharé = kaše, skléros = tvrdý) je komplexní progresivní porucha stěny velkých a středně velkých tepen (Viola et al., 2015). Zahrnuje komplex buněčných a metabolických interakcí, které postupně vedou k zúžení lumen cévy, rozvoji ateromového plátu, jeho následné ruptuře a vzniku trombózy (Sakamuri et al., 2016). Po dlouhá léta se na aterosklerózu pohlíželo jako na mechanický děj způsobený hromaděním tuku, dnes je vnímána jako imunitně chronický zánětlivý proces, který je odpovědí na poškození intimy (Svačina et al., 2010).

Aterosklerotické léze se rozvíjejí hlavně v místech větvení, rozdvojení nebo zakřivení cév (Brophy et al., 2017). Nejčastěji bývají postiženy koronární arterie, vnitřní karotické arterie, hrudní aorta, *arteria poplitea* a tepny Willisova okruhu (Svačina et al., 2010).

Rozlišováno je celkem 6 stádií aterosklerotických lézí označovaných jako **typy I-VI**. Počáteční léze, tedy **typ I**, je viditelná pouze mikroskopicky. Chemicky lze stanovit přítomnost lipidů v intimě. Do skupiny lézí **typu II** patří tzv. tukové proužky. Základní stavební jednotkou tukových proužků, jsou tzv. pěnové buňky, které se nahromadily v cévní stěně. Předstupněm plně vyvinutých lézí jsou léze **typu III**, které obsahují malá depozita tuků mezi vrstvami hladkých svalových buněk a tukové kapénky, které jsou uloženy extracelulárně a viditelné jsou pouze pod mikroskopem. U lézí **typu IV**, tzv. ateromů, se dále hromadí extracelulární lipidy a vyvíjí se lipidové jádro. Mezi lipidovým jádrem a endotelem se vyskytují pěnové buňky, makrofágy a hladké svalové buňky. Léze **typu V** obsahují pojivovou tkáň a dělí se na 3 typy, **typ Va** (tzv. fibroaterom), **Vb** (kalcifikovaná forma) a **Vc** (tzv. gelatinózní léze, která obsahuje velké množství a endematózní tekutiny). Komplikací lézí **typu IV a V** vznikají léze **typu VI**. V tomto stádiu může docházet ke krvácení do plátu, ruptuře plátu, vzniku trombu a ucpání cévy (Perušičová et al., 2009). Vývoj aterosklerotické léze je znázorněn na obrázku 1.



**Obrázek 1:** Vývoj aterosklerotické léze (upraveno podle: Koenig a Khuseyinova, 2007)

U pacientů s pokročilým onemocněním obvykle může být nalezeno více typů lézí na různých místech cévního řečiště (Bentzon et al., 2014). Podle místa vzniku se ateroskleróza projevuje jako ischemická choroba srdeční, cévní mozková příhoda nebo ischemická choroba dolních končetin (Perušičová et al., 2009).

## 3 ÚLOHA CYTOKINŮ V ATEROSKLEROTICKÉM PROCESU

### 3.1 Dysfunkce endotelu

Endotelová dysfunkce předchází vzniku aterosklerotických lézí a provází i pozdní stádia pokročilé aterosklerózy. Je charakterizována nerovnováhou mezi vazodilatačními a vazokonstrikčními, prokoagulačními a protikoagulačními faktory, a také mezi faktory inhibujícími a podporujícími růst (Hromadová, 2004; Vrablík et al., 2011).

Za fyziologických podmínek netvoří endotel pouze mechanickou bariéru, ale představuje také metabolicky aktivní tkáň tvořící substance, které ovlivňují napětí a propustnost cévní stěny, a také interferují se zánětlivými faktory a s koagulačním systémem (Vrablík et al., 2011; Forejtová, 2007).

Endotelové buňky secernují vazodilatační působky i látky vazokonstrikční. Vazodilatace v cévní stěně je řízena třemi navzájem propojenými systémy, mezi které patří endoteliální relaxační faktor, totožný s oxidem dusnatým, endoteliální hyperpolarizující faktor a prostacyklin. Nejdůležitějším relaxačním činidlem odvozeným od endotelu je oxid dusnatý. Mezi vazokonstrikční působky patří endoteliny a eikosanoidy (Hromadová, 2004).

V místech, kde krev proudí laminárně plynule, mají endotelové buňky elipsovité tvar, jsou orientovány ve směru toku krve a jsou relativně nepropustné pro lipoproteiny o nízké hustotě (LDL, low density lipoproteins). V místech odstupů cévy nebo zakřivení, kde je proudění krve narušeno, mají endotelové buňky vlivem smykového tření polygonální tvar a dochází k jejich aktivaci.

Poškozený endotel produkuje méně oxidu dusnatého a více endotelinu 1, malé tepny se více stahují a zvyšuje se jejich napětí. Vazorelaxaci, spojenou se zvýšenou tvorbou oxidu dusnatého, zhoršuje nedostatek IL-10, protizánětlivého cytokinu, který je produkován M2 makrofágy v aterosklerotické lézi. IL-10 indukuje NO-syntázu 3, která tlumí expresi prozánětlivého IL-12 (Raines a Ferri, 2005).

Aktivované endotelové buňky vykazují pro částice LDL zvýšenou propustnost (Chiu a Chien, 2011; Endemann a Schiffrin, 2004). Propustnost endotelových buněk je regulována pomocí IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , které způsobují reorganizaci aktinových vláken cytoskeletu endotelových buněk, tudíž v těsných spojích vznikají mezery, jimiž mohou LDL pasivně difundovat a hromadit se v subendotelovém prostoru (Ramji a Davies, 2015). Klíčové je

zachycení LDL v cévní stěně, umožněné vazbou mezi apolipoproteinem B (ApoB), který je součástí LDL, a proteoglykany mezibuněčné hmoty (Chiu a Chien, 2011; Endemann a Schiffrin, 2004).

Kromě LDL se v intimě mohou shromažďovat i další lipoproteiny, které obsahují ApoB, a to například lipoprotein (a) (Camaré et al., 2017). Lipoprotein (a) má silný proaterogenní efekt, ovlivňuje fibrinolýzu a růst hladkých svalových buněk.

V subendotelovém prostoru jsou LDL částice snadno chemicky modifikovány. Nejčastěji se jedná o oxidační modifikaci, částice LDL mohou být však i acetylovány nebo glykované. Mimořádně silným oxidantem je oxid dusnatý, který je produkován endotelovými buňkami a makrofágy. Z chemického hlediska se jedná o oxidaci nenasycených mastných kyselin. Produktem této oxidace je malonyl-dialdehyd, který modifikuje proteiny (ApoB<sub>100</sub>) a mění tak biologické vlastnosti LDL částic, u nichž výrazně stoupá afinita ke scavenger receptorům. LDL oxidaci, při níž vznikají oxidované LDL (oxLDL), podporují TNF- $\alpha$ , IL-4 a IL-13 (Ledvina et al., 2004; Ramji a Davies, 2015).

Oxidované lipidy jsou spouštěcími faktory produkce řady modulátorů zánětlivé reakce aktivovanými endotelovými buňkami, tedy cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, např. IL-1, IL-6, IL-8, IL-18B, M-CSF, GM-CSF a faktoru inhibujícího makrofágy (MIF, macrophage inhibiting factor) (Tedgui a Mallat, 2006; Tedgui et al., 2011). Látky produkované aktivovaným endotelem umožňují nábor imunitních buněk z cirkulace, zejména prostup leukocytů do subendoteliálních vrstev a ulpívání trombocytů na cévní stěně. Mezi látky produkované aktivovaným endotelem patří dále také monocytární chemoatraktantový protein 1 (MCP-1, dle novější nomenklatury označovaným také jako CCL2), vyvolávající nábor monocytů do cévní stěny, a růstový faktor produkovaný destičkami (PDGF, platelet-derived growth factor), který zvyšuje infiltraci hladkých svalových buněk do subendotelového prostoru (Chiu a Chien, 2011). Aktivace těchto buněk vyvolá další zvýšení exprese enzymů, cytokinů, chemokinů, eikosanoidů a růstových faktorů (Calder, 2012).

Reparativní potenciál překonávání dysfunkce endotelu a snížení kardiovaskulárního rizika mají endotelové progenitorové buňky. Zvýšené hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) a TNF- $\alpha$  pravděpodobně hrají klíčovou roli při vyčerpávání endotelových progenitorových buněk, tudíž tyto látky přispívají k endotelové dysfunkci (Verma et al., 2017).

## 3.2 Upregulace adhezních molekul

Působením prozánětlivých cytokinů exprimují endotelové buňky na svém povrchu adhezní molekuly. Jedná se o proteiny, které jsou nezbytné při přechodu leukocytárních elementů, zvláště monocytů a T-lymfocytů, do subendotelového prostoru. Rozlišují se čtyři základní rodiny adhezních molekul, rodina kadherinů, imunoglobulinů, integrinů a selektinů (Lydyard et al., 2011; Quagliari et al., 2005). Zvýšená exprese adhezních molekul aktivovaným endotelem je kritickým znakem aterosklerózy (Galkina a Ley, 2007).

### 3.2.1 Adhezní molekuly rodiny selektinů

Prvním krokem prostupu leukocytárních elementů přes endotel je exprese adhezních molekul rodiny selektinů (Lydyard et al., 2011). Mezi selektinové molekuly patří L-, P- a E-selektin. Selektiny zajišťují počáteční zachycování, usazování a tzv. kutálení (anglicky „rolling“) leukocytů podél endotelu. L-selektin je exprimován na povrchu většiny cirkulujících leukocytů a umožňuje jejich kutálení v místech chronického zánětu. E- a P-selektiny jsou exprimovány na povrchu endotelových buněk. Expresi P-selektinu vyvolávají oxLDL. E-selektin je stimulován prozánětlivými cytokiny, konkrétně TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , destičkovým faktorem 4 a destičkovým specifickým chemokinem uvolňovaným aktivovanými trombocyty. E-selektin rovněž vyvolává pomalé kutálení leukocytů podél endotelu (Galkina a Ley, 2007; Ulbrich et al., 2003).

### 3.2.2 Adhezní molekuly rodiny integrinů

Do rodiny integrinů patří 24 receptorů na povrchu buněk, které jsou složeny z 18  $\alpha$  a 8  $\beta$  podjednotek, jež vytvářejí  $\alpha\beta$  heterodimery. Integriny zajišťují kontakt mezi dvěma buňkami, mezi buňkou a extracelulární matrix, nebo mezi buňkou a patogenem. Všechny leukocyty exprimují adhezní molekuly leukocytů-1 (LFA-1, leukocyte-function-associated-antigen). LFA-1 se může vázat na dvě endoteliální molekuly, a to na mezibuněčné adhezní molekuly 1 a 2 (ICAM-1 a -2). Další důležitou molekulou rodiny integrinů je pozdní aktivační antigen (VLA-4, very late activation antigen), který se váže na cévní adhezní molekuly (VCAM-1) (Galkina a Ley, 2007).

### 3.2.3 Adhezní molekuly rodiny imunoglobulinů

Molekuly ICAM a VCAM patří do rodiny imunoglobulinových adhezních molekul. Ke zvýšené expresi adhezních molekul ICAM-1 dochází po stimulaci INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 a působením lipopolysacharidů. Expresi molekul VCAM-1 na povrchu endotelových buněk je výrazně zvýšena při působení lipopolysacharidů, IL-1, IL-4, INF- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . Další

významnou molekulou rodiny imunoglobulinů je adhezní molekula destiček a endotelií-1 (PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule), známá také jako CD31. Molekula PECAM-1 má významné signalizační vlastnosti (Krejsek a Kopecký, 2004; Galkina a Ley, 2007).

#### **3.2.4 Další adhezní molekuly**

Také endoteliální adhezní molekuly tvořící spoje (JAM, Junctional Adhesion Molecules) se účastní aterosklerózy a regulují procesy přestupu leukocytů přes endotel. JAM jsou exprimovány na leukocytech, trombocytech, endotelových a epitelových buňkách a podílejí se na prostupu leukocytů přes endotel.

Konexiny nejsou adhezní molekuly, ale účastní se vychytávání imunitních buněk z cirkulace. Exprese konexinů je řízena TNF- $\alpha$  (Galkina a Ley, 2007).

### **3.3 Prostup leukocytů do subendotelového prostoru**

Prostup monocytů a lymfocytů přes endotel je řízen chemotaktickými cytokiny (chemokiny), a to především MCP-1 (CCL2) a chemokinem RANTES (známým také jako CCL5) (Zernecke a Weber, 2005; Valledor et al., 2015). Regulační úlohu v adhezi, migraci a proliferaci makrofágů má MIF, fraktalkin (označován jako CX3CL1) a faktor růstově podobný onkogenu (GRO- $\alpha$ , CXCL1) (Valledor et al., 2015, Apostolakis et al., 2009).

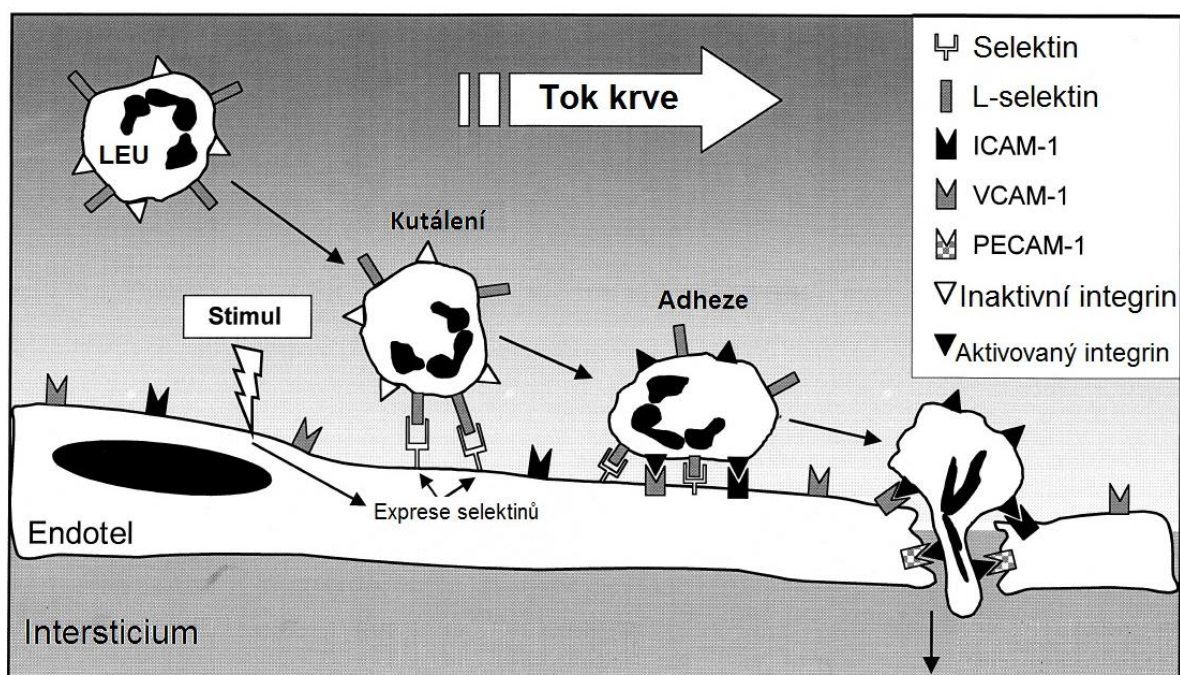
V lidských aterosklerotických lézích je MCP-1 produkován endotelovými a hladkými svalovými buňkami, v reakci na přítomnost oxLDL (ve zvířecích modelech monocyty a makrofágy). Může být produkován také destičkami, které adherují na poraněnou cévu (Zernecke a Weber, 2005).

V reakci na působení MCP-1 se leukocytární elementy z cirkulace začnou pohybovat od středové osy krevního řečiště směrem k endotelu, kde dojde ke kontaktu selektinových molekul. Leukocyty se kutálejí po povrchu endotelových buněk.

Interakce mezi selektiny a jejich ligandy nevede k pevnému přilnutí monocytů na lumenální povrch endotelu, způsobí však další aktivační změny v monocytech. Jednou z nich je aktivace integrinových heterodimerů LFA-1, které zajistí vazbu leukocytů na adhezní molekuly ICAM-1 (Bobryshev, 2006; Lydyard et al., 2011).

Vazba integrinů na molekuly ICAM-1 a VCAM-1 způsobí pevné přilnutí leukocytu na povrch endotelových buněk. K pevnému přilnutí přispívá vazba fraktalkinu, RANTES a GRO- $\alpha$  na receptory CX3CR1, CCR1 a CXCR2 (v uvedeném pořadí) (Apostolakis et al.,

2009). Po adhezi leukocytů se endotelové buňky od sebe oddělí, aby mohly leukocyty prostoupit skrze těsné spoje. Leukocytární elementy migrují do subendotelového prostoru. Transmembránovou diapedézu leukocytů usnadňuje zvýšená koncentrace adhezních molekul PECAM-1 a JAM (Bobryshev, 2006; Lydyard et al., 2011). Prostup leukocytů do subendotelového prostoru je znázorněn na obrázku 2.



**Obrázek 2:** Prostup leukocytů do subendotelového prostoru (upraveno podle: Kriegelstein a Granger, 2001)

### 3.4 Diferenciace monocytů v intimě

Kvůli neustálému zvyšování objemu cytoplasmy, nárůstu počtu váčků, vakuol, primárních i sekundárních lyzozomů, se monocyty po vstupu do intimy arterií přeměňují na makrofágy. Diferenciace monocytů na makrofágy je doprovázena neustále rostoucí expresí antigenu CD68, který se nachází převážně v lyzozomech makrofágů. *In vitro* je za tuto diferenciaci zodpovědný hlavně M-CSF, jehož přítomnost byla prokázána i v aterosklerotických lézích. Monocyty pronikající do intimy se nepřeměňují pouze na makrofágy, ale mohou z nich vznikat i dendritické buňky. Diferenciace monocytů na dendritické buňky závisí zejména na cytokinu GM-CSF (Zysset et al., 2016; Bobryshev, 2006).

Diferenciací monocytů mohou vznikat 2 typy makrofágů, které jsou označovány jako M1 a M2 makrofágy. M1 makrofágy se diferencují ze zánětlivých monocytů označovaných  $Ly6C^{high}$ . Tato přeměna je vyvolána v reakci na cytokiny, které jsou produkovány pomocnými



lymfocyty Th1, především IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  připravuje makrofágy na aktivaci. K úplné diferenciaci je potřeba druhého signálu, např. v podobě působení TNF. Druhý signál získává makrofág zejména vlastní produkcí TNF- $\alpha$  (Mosser, 2003). Tyto prozánětlivé makrofágy mohou být také indukovány působením lipopolysacharidů, lipoproteinů a struktur charakteristických pro patogenní mikroorganismy (PAMP, pathogen-associated molecular pattern). M1 makrofágy dále produkují cytokiny podporující zánětlivou reakci: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 a IL-23, a chemokiny CXCL9, CXCL10, CXCL11. Prozánětlivé makrofágy vylučují také vysoké hladiny reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého, které rovněž přispívají k rozvoji zánětlivé odpovědi (Bobryshev, 2006; Bobryshev et al., 2016; Linton et al., 2016).

Cytokiny Th2 lymfocytů (např. IL-4 a IL-13) jsou nezbytné pro aktivaci M2 makrofágů, které se diferencují ze subpopulace monocytů označovaných jako Ly6C<sup>low</sup>. M2 makrofágy produkují protizánětlivé cytokiny, např. IL-10 a TGF- $\beta$ 1, které mohou způsobit mimo jiné i přeměnu M1 makrofágů na M2 a zvýšit eferocytózu. Nerovnováha poměru M1:M2 v lézi může přispět k rozvoji aterosklerotického plátu (McLaren et al., 2011; Linton et al., 2016).

### 3.5 Tvorba pěnových buněk

Makrofágy, především prostřednictvím tzv. scavenger receptorů (ale také TLR a NOD-like receptorů), nekontrolovaně pohlcují cholesterol z modifikovaných lipoproteinů. V jejich cytoplasmě se shromažďují tukové kapénky, což dává za vznik tzv. pěnovým buňkám (Bobryshev, 2006).

Scavenger receptory mohou mít různé struktury, zahrnující například molekulu SR-A1; makrofágový receptor kolagenní struktury (MARCO, nebo SR-A2); molekuly CD36, SR-B1 a vyznačují se tím, že mohou vázat širokou škálu polyaniontových ligandů. Primárním zdrojem akumulovaného cholesterolu v pěnových buňkách jsou modifikované LDL. *In vitro* studie prokázaly, že vylučování modifikovaných (oxidovaných nebo acetylovaných) LDL makrofágy je zprostředkováno hlavně receptory SR-A1 a CD36. Scavenger receptor typu B (SR-B) je receptor pro HDL (Linton et al., 2017; Zysset et al., 2016; McLaren et al., 2011; Ramji a Davies, 2015).

Tvorba pěnových buněk je regulována velkým množstvím cytokinů, které se podílejí na procesu aterosklerogeneze (Michael et al., 2013). Vznik pěnových buněk podporuje INF- $\gamma$ , dříve byl však vnímán spíše jako inhibitor jejich vzniku. Dalším cytokinem ovlivňujícím vznik pěnových buněk je TNF- $\alpha$ , který zvyšuje expresi scavenger receptorů a vylučování oxLDL.

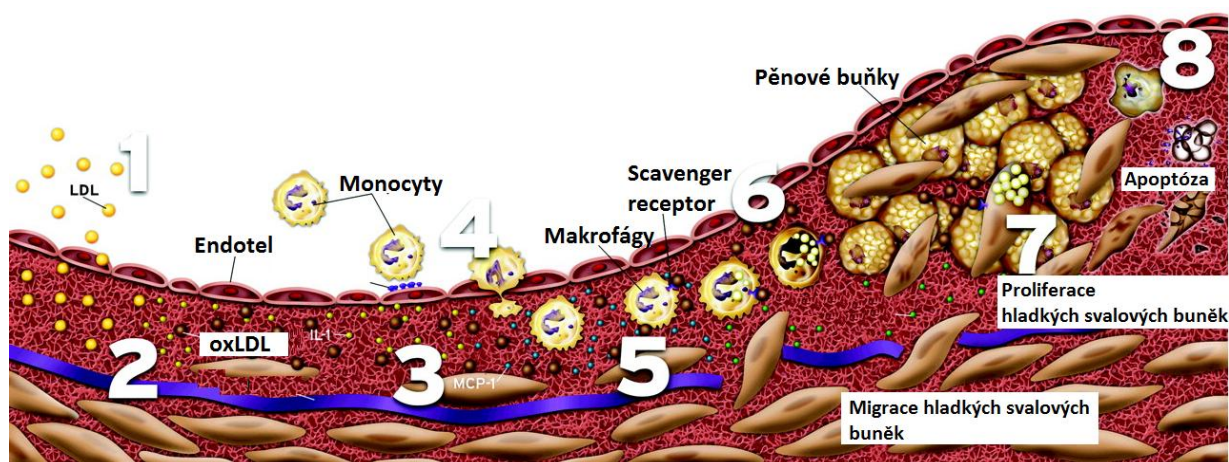
Vychytávání a ukládání modifikovaných LDL, hlavně prostřednictvím snížení efluxu cholesterolu makrofágy, podporuje tzv. slabý induktor apoptózy příbuzný TNF (TWEAK, TNF related weak inducer of apoptosis) a TNF-like protein 1 (Ramji a Davies, 2015). MIF redukuje shromažďování makrofágových pěnových buněk v lézi. Expresi molekuly CD36 zvyšuje IL-6.

Proti vzniku pěnových buněk působí například TGF- $\beta$ 1, který snižuje aktivitu scavenger receptorů a expresi molekul CD36 a SR-A (McLaren et al., 2011). Vznik pěnových buněk také inhibují cytokiny IL-10 a IL-33. IL-33 snižuje vychytávání a ukládání LDL a esterů cholesterolu v makrofázích a stimuluje eflux cholesterolu (McLaren et al., 2011; Ramji a Davies, 2015).

Ke tvorbě pěnových buněk významně přispívají i procesy nezávislé na scavenger receptorech, např. makropinocytóza. Makropinocytózu v makrofázích mohou vyvolávat například minimálně modifikované LDL částice (mmLDL), a to prostřednictvím TLR (Bobryshev, 2006). Dále makropinocytózu významně ovlivňují některé cytokiny, např. TGF- $\beta$ , IL-33, IFN- $\gamma$  a IL-17 $\alpha$  (Michael et al., 2013).

Pěnové buňky mohou vznikat také z hladkých svalových buněk, které pohlcují oxLDL po vstupu z medie cévy do subendotelového prostoru a obsahují též tukové kapénky.

Pěnové buňky nahromaděné v cévní stěně vytvářejí spolu s T-lymfocyty tukové proužky (viz obrázek 3) (George a Johnson, 2010). Tukové proužky se nacházejí v intimě velkých cév, mají žlutou barvu a nevyčnívají do cévního průsvitu, tudíž výrazně neovlivňují průtok krve, běžně se vyskytují už u dětí a během života se vyvíjejí (Perušičová et al., 2009).



**Obrázek 3:** Tvorba tukových proužků (upraveno podle: Faxon et al., 2004)

Pěnové buňky produkují řadu prozánětlivých cytokinů podílejících se na progresi lézí, např. TNF- $\alpha$ , IL-1 a IL-6, řadu chemokinů, růstových faktorů, jako je například PDGF, IGF a endoteliální růstový faktor. Také uvolňují matrixové metaloproteinázy (MMP), které podporují degradaci extracelulární matrix (Valledor et al., 2015).

Cholesterol je v nadměrném množství pro buňky toxický. Deriváty cholesterolu, kterými jsou např. oxysterol, aktivují jaterní X receptory (LXR, liver X receptor), které jsou nezbytné pro udržení homeostázy, protože stimulují eflux cholesterolu. Eflux cholesterolu je prvním krokem transportu cholesterolu z makrofágů. Aktivitu LXR ovlivňují některé cytokiny, např. IFN- $\gamma$  (Pascual-García et al., 2013).

Následkem toho však dochází k namáhání endoplazmatického retikula, což může vést k apoptóze nebo nekróze makrofágů. Poškozená clearance takových apoptických buněk (tzv. eferocytóza) má za následek další akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích.

Porušená lipidová homeostáza potencuje zánětlivou odpověď. Přijímání cholesterolu makropinocytózou aktivuje inflamazóm rodiny NOD-like receptorů. Tento proces vyvolá destabilizaci lysosomů a uvolnění reaktivních forem kyslíku. Aktivace tohoto inflamazómu vede rovněž k produkci IL-1 $\beta$ , IL-18 a dalšímu zvýraznění zánětlivé odpovědi. Množství cholesterolu v makrofázích se tak stále zvyšuje, což vede ke vzniku cholesterolových krystalů a aktivaci dalšího inflamazómu rodiny NOD-like receptorů. Také přijatý mmLDL a oxLDL způsobuje produkci prozánětlivých cytokinů (Ramji a Davies, 2015).

## **3.6 Úloha Th lymfocytů v ateroskleróze**

Jako odpověď na zánětlivou reakci jsou na povrchu T lymfocytů prezentovány antigeny spojené s hlavním histokompatibilním komplexem. Většina buněk s povrchovým znakem CD4<sup>+</sup> jsou prekurzory pomocných T lymfocytů (Th), které mají v ateroskleróze významnou úlohu (Ramji a Davies, 2015). Podle cytokinů, které Th lymfocyty produkují, je lze rozdělit na lymfocyty Th1, Th2 a Th17 (Hedrick, 2015).

### **3.6.1 Th1 lymfocyty**

Th1 lymfocyty jsou proaterogenní, v ateromových plátech nejčastější, secernují cytokiny IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-2 a mají schopnost proliferace *in situ*. Pro diferenciaci Th1 lymfocytů je nezbytný IL-12, který je produkován dendritickými buňkami.

### 3.6.2 *Th2 lymfocyty*

Diferenciaci Th2 lymfocytů rovněž vyvolávají cytokiny produkované dendritickými buňkami, IL-6 a IL-13. Th2 lymfocyty mají důležitou úlohu v humorálních odpovědích zprostředkovaných pomocí B lymfocytů, zejména proti extracelulárním patogenům. Th2 lymfocyty secernují IL-4, IL-5, IL-13. Také mohou produkovat IL-10, který však tvoří hlavně makrofágy a regulační B a T lymfocyty (Treg) (Ramji a Davies, 2015; Hedrick, 2015).

Úloha Th2 lymfocytů v ateroskleróze není zcela jasná. Zřejmě mají funkci ochrannou, protože inhibují produkci IFN- $\gamma$  lymfocyty Th1. Byly však objeveny potenciální proaterogenní účinky IL-4, které zahrnují aktivaci žírných buněk, což může vést k apoptóze hladkých svalových buněk. IL-4 také pravděpodobně snižuje produkci kolagenu a zvyšuje produkci proteáz, které destabilizují pláty, což může vést až k jejich ruptuře. Dalším pravděpodobným účinkem IL-4 je podpora produkce MMP-12.

IL-5 má v ateroskleróze pravděpodobně opačný efekt, než IL-4 a v průběhu aterogeneze má ochranné funkce. Nedostatek IL-5 v myších modelech vede ke většímu rozvoji léze. IL-5 chrání před rozvojem aterosklerózy tím, že podporuje rozvoj B1 lymfocytů, které produkují ochranné protilátky (Andersson et al., 2009).

### 3.6.3 *Th17 lymfocyty*

Pro diferenciaci lymfocytů Th17 je nezbytný TGF- $\beta$ , jehož účinek podporuje IL-6. Pro proliferaci Th17 lymfocytů jsou nezbytné cytokiny IL-21 a IL-23. IL-23 zde stabilizuje zánětlivý fenotyp Th17 lymfocytů. Naopak cytokiny Th1 a Th2 lymfocytů, IFN- $\gamma$  a IL-4, mohou diferenciaci lymfocytů Th17 potlačovat.

Lymfocyty Th17 vykazují efektorové funkce odlišné od Th1 a Th2 lymfocytů. Mezi cytokiny produkované těmito buňkami patří IL-17A, který je zde vylučován ve vysokém množství, IL-17F, IL-22 a IL-23. Důležitou úlohou Th17 lymfocytů je obrana proti bakteriím a houbám. Zapojují se do rozvoje široké škály autoimunitních chorob (Ait-Oufella et al., 2014).

Cytokin IL-17A nemá striktně pro- nebo proti-aterogenní úlohu. Nedávné studie prokázaly, že myší rekombinantní IL-17A snižuje expresi endotelových VCAM-1 a infiltraci Th lymfocytů. Podle jiných studií jsou homodimery IL-17A velmi účinné při vyvolání produkce chemokinů epiteliálními buňkami a jsou schopny aktivovat NF- $\kappa$ B (Tedgui et al., 2011).

### 3.6.4 Regulační T lymfocyty

Kromě Th lymfocytů jsou důležitými producenty cytokinů také regulační T lymfocyty (Treg). Pro Treg je charakteristická exprese povrchových znaků CD4 a CD25. Treg lymfocyty jsou rozdělovány na adaptivní a nativní. Adaptivní Treg se vyvíjejí z naivních T lymfocytů na periférii a produkují cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$ , které negativně regulují produkci cytokinů lymfocyty Th1 a Th2 a mají významný protiatrogenní efekt. Přírodní Treg lymfocyty se vyvíjejí v thymu a produkují převážně TGF- $\beta$  a transkripční faktor FoxP3, který je nezbytný pro vývoj dalších regulačních T lymfocytů (Zidek et al., 2009; Van Es et al., 2009).

## 3.7 Hladké svalové buňky

Jak se tukové proužky vyvíjejí do složitějších, pokročilých aterosklerotických lézí, vytvářejí se fibrózní čepičky, které jsou tvořeny hladkými svalovými buňkami. Tyto fibrózní čepičky, oddělují aterosklerotickou lézi od lumen cévy a slouží jako ochrana před prasknutím léze a následným vznikem trombózy.

Při vývoji pokročilých ateromových plátů dochází také k patologickému ztluštění intimy, které je spojeno s morfologickými a biochemickými změnami hladkých svalových buněk a mezibuněčné hmoty. Hladké svalové buňky migrují z medie do intimy, kde se shromažďují v mezibuněčné hmotě bohaté na proteoglykany, a procházejí změnou fenotypu z kontraktilního na syntetický, což vede k jejich diferenciaci.

Během vývoje léze dochází k hromadění oxLDL a jejich vychytávání hladkými svalovými buňkami, následné apoptóze hladkých svalových buněk, ke vzniku mikrokalciifikací, k infiltraci makrofágů a k produkci prozánětlivých cytokinů (např. IFN- $\gamma$ ), které způsobují apoptózu makrofágů, což vede k vytvoření nekrotického jádra.

Změna fenotypu hladkých svalových buněk a jejich akumulace v aterosklerotické lézi je podporována nejrůznějšími cytokiny. Tvorba fibrózní čepičky je stimulována růstovými faktory PDGF, FGF-2 a TGF- $\beta$ , které jsou uvolňovány z endotelových buněk, makrofágů, pěnových buněk, hladkých svalových buněk a při degranulaci destiček. Degradace extracelulární matrix a mezibuněčných spojení je zprostředkována proteázami, a to zejména MMP, které umožňují migraci hladkých svalových buněk z medie do intimy (George a Johnson, 2010; Johnson, 2014).

### **3.7.1 Vliv cytokinů na akumulaci a proliferaci hladkých svalových buněk**

Aby došlo k akumulaci hladkých svalových buněk, musejí nejprve vcestovat z medie do intimy, kde proliferují. Proliferace hladkých svalových buněk je klíčovým krokem v progresi aterosklerózy. Zvýšená buněčná proliferace je pozorována již během časně aterogeneze. Během proliferace jsou hladké svalové buňky zadržovány v G1 fázi buněčného cyklu. Toto zadržení je zprostředkováno významnými změnami v expresi různých regulátorů buněčného cyklu, a také je spojeno s reakcí na mitogeny, jako je např. IGF.

Historický pohled na proliferaci hladkých svalových buněk je takový, že proliferace pouze podporuje tvorbu ateromových plátů. Později se však ukázalo, že proliferace může být i prospěšná, například jako prevence ruptury fibrózní čepičky (Lim a Park, 2014; Bennett et al., 2016).

Za jeden z nejúčinnějších cytokinů podporujících šíření a proliferaci hladkých svalových buněk je považován MIF, jehož delece v myších modelech způsobuje 80% snížení proliferace hladkých svalových buněk. Na migraci má vliv i prozánětlivý cytokin MCP-1, jehož receptor, CCR2, může regulovat proliferaci hladkých svalových buněk. *In vitro* podporuje proliferaci i tzv. eotaxin (CCL11), který hladké svalové buňky samy produkují. *In vitro* proliferace je stimulována také růstovými faktory, jako jsou angiotenzin II, PDGF-BB, oxLDL, lipopolysacharidy, TGF- $\beta$  a fibroblastový růstový faktor. Tyto faktory na sebe mohou vzájemně působit, např. oxLDL způsobuje zvýšenou expresi TLR4 a působí synergicky s angiotenzinem II (LIM a PARK, 2014). K proliferaci pozitivně přispívá i IFN- $\gamma$ , ten zde působí synergicky s PDGF. Fraktalkin (CX3CL1) také s největší pravděpodobností podporuje akumulaci hladkých svalových buněk. Jejich akumulace v aterosklerotických lézích pravděpodobně není závislá na IL-1 $\beta$ , a TNF- $\alpha$ .

Některé cytokiny naopak zabraňují akumulaci hladkých svalových buněk a mají tedy protizánětlivé vlastnosti. Jedním z nich je IL-10. Překvapivě však akumulaci zabraňuje i prozánětlivý cytokin IL-18 (Raines a Ferri, 2005).

### **3.7.2 Změna fenotypu hladkých svalových buněk**

Buňky hladkého svalstva mohou mít kontraktilní i syntetické funkce. Intimální hladké svalové buňky se mohou diferencovat z mediálních a mají jedinečné aterogenní vlastnosti, díky kterým dochází k růstu ateromového plátu. Změna fenotypu hladkých svalových buněk byla poprvé popsána v roce 1970 pomocí elektronové mikroskopie.

Důležitými proteinovými markery, které se běžně používají k rozlišení fenotypů, jsou povrchové molekuly  $\alpha$ -SMA, SM-MHC, Smoothelin-A/B, CRBP-1. Mnoho z těchto proteinů se podílí na kontrakci buněk hladké svaloviny.

Zdravé hladké svalové buňky se nacházejí převážně v medii a je pro ně typický kontraktilní fenotyp. Buňky arterií vyznačující se tímto fenotypem obsahují velké množství mikrofilament. Mezi proteiny, které tyto buňky převážně exprimují patří povrchové molekuly SM-MHC nebo SM-A.

Hladké svalové buňky nacházející se v intimě produkují výrazně nižší hladiny těchto proteinových markerů, mají vyšší tendenci proliferovat, produkují více extracelulární matrix, proteáz a cytokinů. Syntetický fenotyp je typický pro tepny, u nichž dochází k přestavbě stěny. Buňky s tímto fenotypem mají charakteristickou cytoplazmu, v níž převažuje drsné endoplazmatické retikulum a dobře rozvinutý Golgiho aparát. Syntetické hladké svalové buňky mohou migrovat a proliferovat rychleji než kontraktilní a mohou syntetizovat až 25-46krát více kolagenu. Kromě toho exprimují větší množství receptorů pro VLDL, LDL a scavenger receptorů, což umožňuje efektivnější příjem lipidů a tvorbu pěnových buněk (Rensen et al., 2007; Doran et al., 2008).

Mezi faktory, které ovlivňují přeměnu kontraktilního fenotypu na fenotyp syntetický, patří aktivin A, retinoidy, angiotenzin II. Z cytokinů jsou to PDGF, TGF- $\beta$  a TNF- $\alpha$ .

Dvě molekuly, PDGF-A a PDGF-B jsou důležité při počátečních fázích diferenciaci hladkých svalových buněk, kdy dochází k přijímání mezenchymových buněk a k následné proliferaci. V plně vyvinutých hladkých svalových buňkách vyvolávají tyto molekuly přeměnu fenotypu na syntetický. V myších modelech snižuje PDGF-B expresi proteinu  $\alpha$ -SMA. Další studie prokázaly, že PDGF-A i PDGF-B snižují proliferaci hladkých svalových buněk při poranění cévy.

Izoformy cytokinu TGF- $\beta$  naopak podporují kontraktilní fenotyp. TGF- $\beta$ 1 zvyšuje hladiny proteinů  $\alpha$ -SMA a SM-MHC. TGF- $\beta$ 2 pozitivně působí na proteiny buněčného cyklu, které potlačují buněčné dělení, nedokáže však ovlivňovat expresi pokročilejších kontraktilních fenotypových markerů, jakými jsou SM-MHC a Smoothelin (Rensen et al., 2007).

### **3.7.3 Tvorba pěnových buněk z hladkých svalových buněk**

V průběhu aterogeneze nevznikají pěnové buňky pouze z makrofágů, pohlcujících oxLDL především pomocí scavenger receptorů, ale také z hladkých svalových buněk. (Ruan et al., 2006). Expresce scavenger receptorů hladkými svalovými buňkami cévní stěny je však

velmi omezená. Spíše než scavenger receptory mohou hladké svalové buňky exprimovat LDL receptory, VLDL receptory a protein příbuzný LDL receptoru (LRP). LDL receptory mohou vychytávat modifikované i nemodifikované LDL částice, chylomikrony a remnanty. V regulaci genů pro LDL receptory jsou důležité dvě molekuly: protein aktivující štěpení proteinu SREB (SCAP) a protein vázající element regulovaný steroly (SREBP2), které mají původ v mediátorové ribonukleové kyselině (mRNA). Expresi LDL receptorů, a tím i akumulaci LDL v hladkých svalových buňkách výrazně zvyšuje IL-1 $\beta$  (Ruan et al., 2006; Doran et al., 2008).

SCAP protein při zánětlivé reakci zajišťuje také intracelulární translokaci mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem. V přítomnosti vysoké koncentrace LDL a po stimulaci prozánětlivými cytokiny začne Golgiho aparát přijímat SCAP protein, což naznačuje, že IL-1 $\beta$  narušuje normální fungování molekuly SCAP mezi Golgiho aparátem a endoplazmatickým retikulem. Translokace SCAP a exprese mRNA neprobíhají paralelně. Ke SCAP translokaci dochází krátce po stimulaci IL-1 $\beta$ , možná v důsledku post-translační modifikace proteinu a před zvýšením exprese SCAP mRNA.

Expresi LDL a VLDL receptorů také zvyšuje TNF- $\alpha$  a M-CSF. Tyto cytokiny rovněž zvyšují afinitu LDL k hladkým svalovým buňkám a tím i tvorbu pěnových buněk.

Scavenger receptorem, který se do jisté míry podílí na vychytávání oxLDL lidskými hladkými svalovými buňkami, je molekula označovaná zkratkou CXCL16/SR-PSOX. Tato molekula se vyskytuje pouze v cévách postižených aterosklerózou (Ruan et al., 2006).

Kromě způsobů, kterými mohou hladké svalové buňky vychytávat cholesterol, jsou, zejména na makrofázích, často studovaným tématem i cesty jeho zpětného transportu. K tomu slouží ATP-vázající přenašeče, označovány jako ABC (ATP-binding cassette). Hladké svalové buňky exprimují přenašeč ABCA1. Díky zpětné transportní dráze mohou lipidové buňky metabolizovat lipidy a exportovat je do nosičů, které je transportují do jater. Při progresi aterosklerózy dochází k down-regulaci těchto buněčných transportérů, což vede ke zvýšené tvorbě pěnových buněk (Doran et al., 2008).

#### **3.7.4 *Produkce extracelulární matrix***

Jednou z hlavních funkcí hladkých svalových buněk je produkce extracelulární matrix, která se v průběhu progresu léze hromadí. Přestože endotelové buňky a makrofágy také přispívají ke tvorbě extracelulární matrix, hlavními producenty pojivové tkáně jsou hladké svalové buňky, a to i ve zdravých cévách. Zatímco extracelulární matrix zdravých tepen obsahuje fibrilární kolagen typu I a III, aterosklerotické léze obsahují převážně proteoglykany



s rozptýlenými kolagenními vlákny typu I a s fibronektinem. Přítomnost mnoha aterogenních cytokinů v rozvíjející se lézi stimuluje hladké svalové buňky k produkci proteoglykanů, fibronektinu a ke zvýšené produkci extracelulární matrix, např. TGF- $\beta$ , MCP-1, MIF, IL-18 a IFN- $\gamma$ . Proteoglykany přítomné v cévní stěně umožňují, prostřednictvím iontových interakcí s ApoB<sub>100</sub> a Apolipoproteinem E, zachycení dalších LDL. Takto vázané LDL rychleji oxidují. OxLDL stimuluje hladké svalové buňky k vylučování vysoce sulfatovaných proteoglykanů, které mají větší afinitu k LDL (Doran et al., 2008; Raines a Ferri, 2005).

Chemokin MCP-1 přispívá k rozvoji stabilnějších ateromových plátů se zvýšeným obsahem hladkých svalových buněk a kolagenu. Naopak progresi nestabilních ateromových plátů může podporovat IL-1 $\beta$  (Raines a Ferri, 2005).

### ***3.7.5 Zadržování monocytů a makrofágů hladkými svalovými buňkami***

Nejen endotelové buňky, ale i hladké svalové buňky napomáhají monocytům prostoupit z krevního řečiště do intimy, kde se diferencují do makrofágů. Elektronovou mikroskopií a imunohistochemickou analýzou lidských aterosklerotických plátů bylo prokázáno, že hladké svalové buňky a makrofágy spolu mohou interagovat. Interakce makrofágů s hladkými svalovými buňkami je zprostředkována expresí adhezních molekul (ICAM-1 a VCAM-1) a fraktalkinu (CX3CL1).

K expresi adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1 nedochází u hladkých svalových buněk ve stěně zdravých cév, exprimovány jsou pouze v cévách náchylných ke tvorbě aterosklerotických lézí. Bylo prokázáno, že hladké svalové buňky, podobně jako buňky endotelové, exprimují adhezní molekuly ještě před vstupem monocytů do intimy, a tento vstup tak podporují. Expresi adhezních molekul hladkými svalovými buňkami snižují IL-10 a TNF- $\alpha$ . TGF- $\beta$  na expresi pravděpodobně vliv nemá.

Na rozdíl od adhezních molekul není fraktalkin exprimován endotelovými buňkami. Fraktalkin patří mezi chemokiny a váže se na receptor CX3CR1, který je exprimován na povrchu monocytů v přítomnosti oxLDL. Tato vazba umožňuje monocytům interagovat s hladkými svalovými buňkami a hromadit se tak ve stěně cévy (Doran et al., 2008; Raines a Ferri, 2005).

### ***3.7.6 Cytokiny produkované buňkami hladké svaloviny***

Prostřednictvím aktivovaných receptorů (např. TLR2, TLR4, NOD-like receptor-P3, a další) jsou hladké svalové buňky schopny produkovat velký počet látek podporujících zánětlivou reakci (Lim a Park, 2014). Z cytokinů jsou to především ty, které přitahují a aktivují leukocyty, vyvolávají proliferaci hladkých svalových buněk, podporují dysfunkci

endotelu, a stimulují produkci složek mezibuněčné hmoty. Mezi nejdůležitější z nich patří: PDGF, TGF- $\beta$ , MIF, IFN- $\gamma$  a MCP-1. Všechny tyto cytokiny mohou být produkovány také jinými buňkami v lézi (Doran et al., 2008). Přehled těchto cytokinů a jejich funkcí viz tabulka 2.

**Tabulka 2:** Aterogenní cytokiny produkované buňkami hladké svaloviny Zkratky: VSMC – hladké svalové buňky; EC – endotelové buňky; M – makrofágy; T – T lymfocyty; B – B lymfocyty (vytvořeno podle: Doran et al., 2008).

<b>CYTOKIN</b>	<b>ZDROJ</b>	<b>FUNKCE</b>
IFN- $\gamma$	VSMC, M, T	↑ migrace a proliferace VSMC ↑ remodelace extracelulární matrix ↑ exprese adhezních molekul
IL-1	VSMC, EC, M, T, B	↑ migrace a proliferace VSMC ↑ hromadění monocytů ↑ exprese adhezních molekul
IL-18	VSMC, EC, M	↑ exprese adhezních molekul ↑ akumulace VSMC ↑ remodelace extracelulární matrix
MCP-1	VSMC, EC, M, T	↑ nábor monocytů ↑ remodelace extracelulární matrix
MIF	VSMC, EC, M, T	↑ nábor monocytů ↑ exprese VSMC ↑ tvorba a remodelace ECM
PDGF	VSMC, EC, M	↑ migrace a proliferace VSMC
TGF- $\beta$	VSMC, EC, M, T	↑ migrace a proliferace VSMC ↑ tvorba extracelulární matrix

### 3.8 Destabilizace aterosklerotických plaků

Další osud nemocného závisí na stabilitě aterosklerotického plátu. Stabilní pláty mají malé lipidové jádro, které je pokryto silnou fibrózní čepičkou. Lipidové jádro obvykle zabírá méně než jednu čtvrtinu plátu. Invazivní zánětlivé buňky, např. makrofágy se ve stabilních plátech vyskytují pouze v malém množství nebo vůbec a šíření fibrózní tkáně způsobuje ztluštění intimy.

Oproti tomu nestabilní pláty jsou charakterizovány velkým, měkkým jádrem bohatým na lipidy, které zabírá přibližně třetinu až polovinu z celkové plochy plátu. Jádro je pokryto pouze tenkou vrstvou fibrózní čepičky. Tkáň, která se nachází mezi nekrotickým jádrem a fibrózní čepičkou, je vláknitá s vysokým obsahem kolagenu typu I. Kolagen, elastin, proteoglykany vláknité matrix jsou produkovány převážně hladkými svalovými buňkami se

sekrečním fenotypem. Nestabilní pláty obsahují také velké množství makrofágů. Tyto pláty jsou náchylné k prasknutí a dalším komplikacím (Virmani et al., 2005; Temma a Saji, 2012; Bentzon et al., 2014).

K destabilizaci aterosklerotického plátu vede pokračující zánětlivá odpověď, především prostřednictvím prozánětlivých cytokinů. Prozánětlivé cytokiny mohou inhibovat syntézu komponent, které pláty stabilizují, např. IFN- $\gamma$  inhibuje syntézu kolagenu typu I a III hladkými svalovými buňkami. TNF- $\alpha$  způsobuje redistribuci tukové tkáně a snižuje citlivost tkání na inzulín. IL-6 je stejně jako TNF- $\alpha$  a IL-1 součástí prozánětlivé kaskády, která vede k aktivaci jaterních buněk a tvorbě pozitivních reaktantů akutní fáze, např. CRP. Vyšší koncentrace CRP a IL-6 bývají nacházeny u pacientů s nestabilními koronárními syndromy (Ramji a Davies, 2015).

Prozánětlivé cytokiny také způsobují apoptózu a následnou nekrózu makrofágů a hladkých svalových buněk, spolu s pěnivými buňkami, což je důležitou příčinou vzniku nekrotického jádra. Vytvoření nekrotického jádra nevratně naruší normální strukturu intimy. Apoptické a jiné formy buněčné smrti jsou pozorovány na okraji nekrotického jádra. Volné apoptické zbytky přítomné v lézi nejsou spojeny s žádnými fagocytujícími buňkami, tyto zbytky tedy nemohou být odstraněny, což způsobuje další růst nekrotického jádra (Bentzon et al., 2014).

### **3.8.1 Apoptóza makrofágů**

K apoptóze makrofágů dochází v průběhu všech stádií aterosklerózy a je důležitým znakem vývoje ateromového plátu. Vyvolání apoptózy makrofágů je pravděpodobně výsledkem chronického, kumulativního účinku několika jemných, podprahových stimulů. Příkladem je oxidační stres, vysoké koncentrace esterifikovaného cholesterolu nebo oxysterolů, oxLDL, stres endoplazmatického retikula a vysoké koncentrace cytokinů IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ .

Makrofágy podléhající apoptóze jsou také zdrojem prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  a metaloproteináz, což podporuje zánět a nestabilitu plátu (Bobryshev et al., 2016).

### **3.8.2 Apoptóza hladkých svalových buněk**

Makrofágy produkující TNF- $\alpha$  vyvolávají apoptózu hladkých svalových buněk cestou TNF- $\alpha$ /NO a snižují i syntézu kolagenu sekrecí metaloproteináz, MMP-9 a MMP-12. TNF- $\alpha$  účinkuje prostřednictvím dvou receptorů TNF-R1 a TNF-R2. Oba tyto receptory kooperativně interagují a tím vyvolávají apoptózu. TNF- $\alpha$  má navíc synergický účinek s IL-1 $\beta$  a IFN- $\gamma$  (Boyle et al., 2003).

Také žírné buňky mohou produkovat řadu prozánětlivých cytokinů (např. IL-6), které vyvolávají apoptózu hladkých svalových buněk. Pokud je na povrchu žírných buněk aktivován TLR4, aktivují se následně signální dráhy, které vedou k aktivaci nukleárního faktoru- $\kappa$ B a k následné transkripci prozánětlivých cytokinů, včetně IL-6 (Wijnand et al., 2012).

Apoptóza hladkých svalových buněk v ateroskleróze má závažné důsledky, kterými jsou ztenčování fibrózní čepičky, rozšíření nekrotického jádra a infiltrace makrofágů, tím dochází k podpoře kalcifikace a progresi lézí (Bennett et al., 2016).

### **3.8.3 Toll-like receptory v destabilizaci plátu**

V ateromovém plátu byla prokázána zvýšená exprese TLR2 a TLR4. TLR2 podporuje zánětlivou reakci v hladkých svalových buňkách. Exprese TLR4 hladkými svalovými buňkami je stimulována především lipopolysacharidy a stejně jako TLR2 vyvolává zánět. TLR4 způsobuje produkci MCP-1, IL-6 a IL-1A. Pokud lipopolysacharidy stimulují TLR4/NF- $\kappa$ B dráhu, může být zvyšována exprese MMP-9, která destabilizuje ateromový plát (Lim a Park, 2014; Li a Sun, 2007).

### **3.8.4 Matrixové metaloproteinázy**

Mechanické oslabení fibrózní čepičky předchází prasknutí plátu a následnému trombu. S tímto významně souvisí MMP, jejichž exprese a aktivace je rovněž regulována pomocí cytokinů (Silvestre-Roig et al., 2014). MMP jsou zinek-dependentní endopeptidázy s proteolytickou aktivitou. Působí zejména na extracelulární matrix a za fyziologických i patologických podmínek se podílejí na remodelaci tkání. Jedná se o rozsáhlou rodinu proteináz, která obsahuje nejméně 26 členů, z nichž 23 může být exprimováno u člověka (Hladíková a Štourač, 2008).

V aterosklerotických plátech je zvýšená aktivita MMP-8, MMP-9 a MMP-12. Tyto všechny významně přispívají k destabilizaci aterosklerotických plátů. Například nadměrná exprese MMP-9 a MMP-12, které jsou produkovány makrofágy ve zranitelných plátech náchylných k prasknutí, snižuje syntézu kolagenu a oslabuje fibrózní čepičku. Oproti tomu metaloproteinázám MMP-2 a MMP-3 jsou přiřazovány spíše prospěšné funkce. MMP-2 a MMP-3 mají význam v regulaci migrace hladkých svalových buněk a při tvorbě fibrózní čepičky (Silvestre-Roig et al., 2014; Lim a Park, 2014).

### 3.8.5 *Angiogeneze*

Angiogeneze je dynamický proces tvorby nových kapilár, regulovaný rovnováhou mezi angiogenními a angiostatickými faktory. Může být zahájena hypoxií, která vyvolává expresi a uvolnění angiogenních a zánětlivých faktorů. Nedostatek kyslíku v aterosklerotickém plaku je zapříčiněn ztluštěním intimy a zánětem. Ke tvorbě angiogenního zárodku vede migrace a proliferace endotelových buněk. Buňky zárodku vylučují proteolytické enzymy, které degradují okolní extracelulární matrix, což usnadňuje jejich expanzi.

Důležitým zdrojem angiogenních faktorů jsou fibroblasty, které produkují např. endoteliální růstový faktor (VEGF), jehož produkce je podporována pomocí IL-17 (Camaré et al., 2017; Numasaki et al., 2003). Syntézu VEGF endotelovými a perivaskulárními zánětlivými buňkami vyvolává i TGF- $\beta$ . VEGF-A zvyšuje endotelovou propustnost, expresi adhezních molekul, MCP-1, čímž je podporována adheze monocytů, transendoteliální migrace a aktivace. Navíc může vyvolat pro-aterogenní změny v lipoproteinech. VEGF-B se specificky váže na receptor VEGFR1 a tím stimuluje příjem mastných kyselin endotelovými buňkami a prostřednictvím aktivace dráhy VEGF-A/VEGFR2 působí na tukové tkáni zvýšením hustoty kapilár.

Placentární růstový faktor PlGF se vyskytuje ve velkém množství v placentě, ale jeho exprese se za patologických stavů (jako je např. hypoxie, oxidační stres) může zvyšovat i v jiných orgánech. PlGF se váže na receptor VEGFR2. Při nízké koncentraci podporuje přežívání, migraci a aktivaci pericytů, endotelových buněk a makrofágů, jeho role je proaterogenní. PlGF potencuje účinky VEGF-A. Pericyty významně přispívají ke tvorbě nových kapilár.

Na angiogenezi se významně podílejí také růstové faktory rodiny PDGF. Zejména PDGF-B, jehož syntézu v endotelových buňkách podporuje TGF- $\beta$ . Po navázání na receptor PDGFR $\beta$ , který je přítomný na pericytech a hladkých svalových buňkách, vyvolává PDGF-B proliferaci těchto buněk.

Do angiogeneze je zapojen také b-FGF, a to prostřednictvím tyrosinkinázového receptoru FGFR2, který je vysoce exprimován na endotelu. VEGF a b-FGF působí synergicky a vyvolávají proliferaci a migraci endotelových buněk, pericytů, hladkých svalových buněk a také sekreci proteáz (Camaré et al., 2017).

### 3.8.6 *Kalcifikace*

V pozdních fázích progresivních aterosklerotických lézí jsou běžné kalcifikace. Apoptické buňky, extracelulární matrix a materiál nekrotického jádra mohou působit jako

shromaždiště mikroskopických granul vápníku, což následně může expandovat do větších hrudkovitých a deskovitých vápníkových depozit. Časem může nekrotické jádro zcela zvápenatět (Bentzon et al., 2014).

### 3.9 Stádium trvajících zánětů

Na rozdíl od akutních zánětů, které obvykle samy vymizí, je ateroskleróza dlouhotrvající zánětlivý stav, tzv. „unresolved inflammation“, postrádající přechod z prozánětlivé fáze do fáze rezoluce.

Při rezoluci zánětu začnou zánětlivé buňky podléhat apoptóze a jsou tak účinně odstraňovány. Makrofágy jsou přeprogramovány k protizánětlivému regeneračnímu fenotypu. V konečném důsledku dochází k regeneraci poškozených tkání.

Naopak v ateroskleróze se stále zvyšuje akumulace lymfocytů v místě léze a zánětlivá odpověď se zvyšuje. Makrofágy nahromaděné v lézi proliferují, což přispívá ke chronickému zánětu. Diferenciace makrofágů je ovlivňována okolním prostředím – cytokiny (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-10), chemokiny (CXCL4), růstovými faktory (M-CSF, GM-CSF) a dalšími komponentami plátu. Zatímco v časných fázích zánětu plát obsahuje více působků, které způsobují přeměnu na M2 fenotyp, v pozdních stádiích obsahuje více látek podporujících převahu prozánětlivých M1 makrofágů.

V průběhu aterosklerózy nedochází ke správné eferocytóze, k procesu, kdy dochází k odstranění mrtvých buněk, a tedy k potlačení prozánětlivé odpovědi. V časných lézích produkují apoptické buňky nadbytek signálů „najdi mě“ a „sněz mě“, které přitahují fagocyty, což vede k prudké eferocytóze. Výsledným efektem je snížení počtu buněk v lézích. Mezi „najdi mě“ signály patří např. fraktalkin.

Nedostatečná produkce rozpoznávacích molekul a signálů přitahujících fagocyty vede k defektní eferocytóze (Viola a Soehnlein, 2015). K porušení správného průběhu eferocytózy dochází v důsledku vyššího oxidačního stresu a zánětu. OxLDL a oxidované fosfolipidy narušují eferocytózu kompeticí s apoptickými buňkami pro navázání na fagocytární receptory. Důležitou roli zde hraje to, že oxidované fosfolipidy mají podobné epitopy jako apoptické buňky. Na zhoršení eferocytózy má vliv i aktivace TLR4 a jeho zvýšená exprese prozánětlivých cytokinů (Seimon a Tabas, 2009). Apoptické buňky nejsou odstraňovány, hromadí se a nakonec podléhají sekundární nekróze, čímž se zvyšuje zánětlivá odpověď.

Nedávné studie prokázaly, že hlavním regulátorem molekul zapojených do eferocytózy je extracelulární signál regulující kináza 5 (ERK5). ERK5 je členem mitogenem aktivované

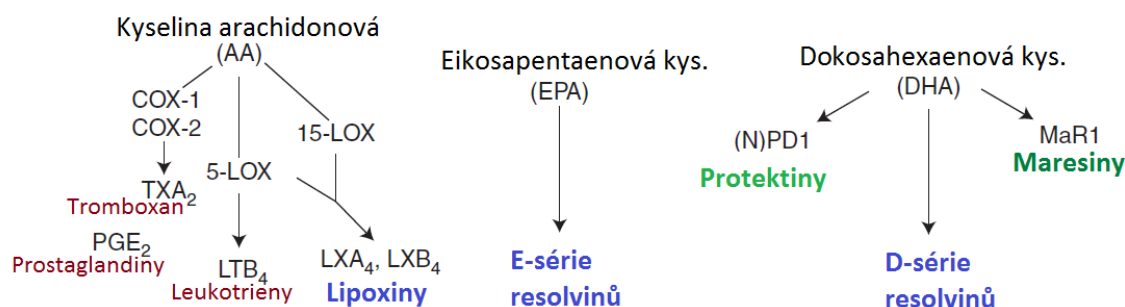
rodiny proteinových kináz, který je aktivovaný redoxním a hyperosmotickým stresem, růstovými faktory a G proteinovou signální dráhou (Viola a Soehnlein, 2015).

Pokračující zánětlivé signály vedou k nadměrné produkci leukotrienů. Leukotrieny jsou zánětlivé lipidové mediátory odvozené od kyseliny arachidonové zprostředkovávající nábor leukocytů.

V místech, kde je endotel poškozen, například rupturou plátu, nebo v místech, kudy leukocyty pronikaly do léze, se hromadí krevní destičky a vznikají tromby.

Stádium trvajících zánětů je široce spojeno nejen s aterosklerózou, ale také s dalšími chorobami, jako je artritida, periodontální onemocnění a rakovina (Recchiuti a Serhan, 2012).

Byly však objeveny specializované pro-resolvní lipidové mediátory, zahrnující lipoxiny, resolviny, protektiny, maresiny, a proteiny (annexin A1 a galektiny) (Headland a Norling, 2015). Tyto mediátory jsou odvozeny z polynenasycených mastných kyselin (PUFA), z kyseliny arachidonové, eikosapentaenové a dokosahexaenové (viz obrázek 4). Mají odlišné chemické struktury a regulují buněčné signální dráhy (Fredman a Spite, 2017).



**Obrázek 4:** Biosyntéza lipidových mediátorů. Zkratky: COX - cyklooxygenáza; PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E2; TXA<sub>2</sub> – tromboxan A2; LOX – lipoxygenáza; LTB<sub>4</sub> – leukotrien B4; LXA<sub>4</sub> – lipoxin A4; LXB<sub>4</sub> – lipoxin B4; (N)PD1 – protektin D1; MaR1 – maresin 1. (upraveno podle: Serhan et al., 2015)

Lipidové mediátory dokáží regulovat akutní i chronickou zánětlivou odpověď, většina z nich tlumí prozánětlivé dráhy a současně aktivuje dráhy pro rezoluci a mechanismy opravy tkání (Salic et al., 2016). Pro-resolvní mediátory mohou specifickým způsobem aktivovat například pro-resolvní receptory spřažené s G proteiny, zpomalovat nábor leukocytů, vyvolávat apoptózu neutrofilů a zlepšovat eferocytózu makrofágů (Fredman a Spite, 2017; Headland a Norling, 2015). Lipidové mediátory by mohly poskytnout nové způsoby léčby aterosklerózy (Salic et al., 2016).

### 3.9.1 Lipoxiny

Prvními uznávanými pro-resolvními mediátory byly lipoxin A4 a B4 (Salic et al., 2016). Tyto lipoxiny zastavují další vstup neutrofilů do zanícených míst a působí proti hlavním příznakům zánětu. Dokážou působit na mnoho typů buněk, včetně krevních buněk. Lipoxin A4 reguluje odpovědi leukocytů *in vitro* aktivací jejich specifického receptoru – receptoru pro lipoxin A4, který je exprimován leukocyty, snižuje fibrózu tkání a působí na hladké svalové buňky (Serhan et al., 2009).

### 3.9.2 Resolviny

Resolviny jsou odvozeny od kyseliny eikosapentaenové a dokosahexaenové, dělí se na E-série a D-řady, které mají chemicky odlišnou strukturu (Serhan et al., 2009). Mezi mechanismy, kterými resolviny vyvíjejí své biologické účinky, patří inhibice aktivity NF- $\kappa$ B. Předpokládá se, že tyto biologické účinky jsou zprostředkovány prostřednictvím receptorů spřažených s G-proteiny (Chatterjee et al., 2014).

Důležitým zástupcem E-série resolvinů je resolvin E1, který snižuje aktivaci zánětlivých signálních drah vyvolaných TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ . Tlumí sekreci také dalších prozánětlivých cytokinů, např. IL-1 $\beta$ , IL-6, a reguluje expresi chemokinů a chemokinových receptorů, např. CCL2, CCR5, tlumí odpovědi lymfocytů Th1 a Th17, snižuje infiltraci makrofágů do místa zánětu a zvyšuje expresi IL-10. Mimo to snižuje expresi molekul MHC II. třídy (Salic et al., 2016).

Resolviny D1 a D2 snižují proliferaci a migraci hladkých svalových buněk a adhezi monocytů, protože ovlivňují expresi adhezních molekul. Oba resolviny také snižují produkci nejrůznějších prozánětlivých cytokinů, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, IL-6, IL-1 $\alpha$  a s největší pravděpodobností i IL-1 $\beta$  (Miyahara et al., 2013).

### 3.9.3 Maresiny

Maresiny jsou skupina silných protizánětlivých a pro-resolvních mediátorů biosyntetizovaných makrofágy z kyseliny dokosahexaenové (Serhan et al., 2012).

Maresin 1, který inhibuje aktivaci NF- $\kappa$ B, zvyšuje eferocytózu, kapacitu fagocytů při odstraňování apoptických buněk a regeneraci tkání. Spolu s resolvinem D1 dokáže maresin 1 zvyšovat produkci protiatrogenního TGF- $\beta$  (Viola et al., 2012). K dalším účinkům maresinu 1 patří snižování počtu E-selektinů, které umožňují kutálení monocytů na povrchu endotelových buněk. Snižují produkci reaktivních forem kyslíku a řady prozánětlivých cytokinů a chemokinů, jako jsou IFN- $\gamma$ , MCP-1, RANTES, IL-3, IL-8, IL-16, GM-CSF.



Maresin 1 rovněž oslabuje účinky PDGF, důležitého regulátoru podporujícího migraci hladkých svalových buněk z medie do subendotelového prostoru, který je exprimován endotelovými buňkami.

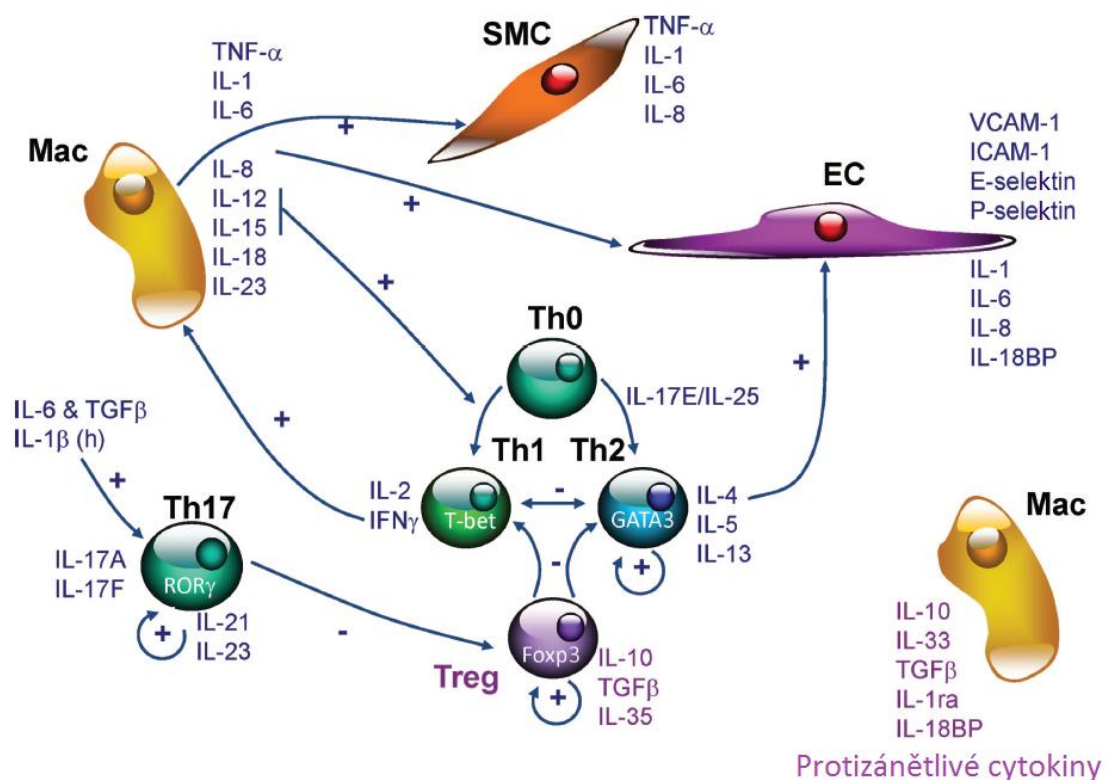
Bylo také prokázáno, že maresin 1 vede ke zvýšení hladin cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který má rovněž protizánětlivé účinky na hladké svalové buňky a lidské endotelové buňky aktivované pomocí cytokinů, protože blokuje aktivaci NF- $\kappa$ B a snižuje expresi adhezních molekul (Chatterjee et al., 2014).

#### **3.9.4 *Annexin A1***

Annexin A1 je endogenní pro-resolvní mediátor. Annexin A1 snižuje aterogenezi tím, že reguluje klíčové chemokiny podílející se na migraci leukocytů do aterosklerotického plátu. To je z velké části umožněno schopností annexinu A1 přenášet signál prostřednictvím jeho G proteinového receptoru (Fredman a Spite, 2017).

## 4 SOUHRN DŮLEŽITÝCH CYTOKINŮ OVLIVŇUJÍCÍCH ATEROSKLERÓZU

Myšlenka, že cytokiny jsou exprimovány v aterosklerotických plátech a významně ovlivňují jejich rozvoj, byla poprvé prokázána v polovině roku 1980 Hanssonem a jeho spolupracovníky (Tedgui a Mallat, 2006). Místa produkce důležitých cytokinů a jejich funkce jsou naznačeny na obrázku 5.



**Obrázek 5:** Důležité cytokiny. Zkratky: Mac – makrofágy; SMC – hladké svalové buňky; EC – endotelové buňky; Treg – regulační T lymfocyty; RORγ, T-bet, Foxp3, GATA3 – transkripční faktory

Cytokiny IL-12 a IL-18, produkované makrofágy, jsou silnými induktory IFN-γ a podporují diferenciaci T lymfocytů do proaterogenních lymfocytů Th1. Cytokiny pocházející z makrofágů aktivují endotelové a hladké svalové buňky za účelem vytvoření řady prozánětlivých mediátorů. Makrofágy však mohou produkovat i protizánětlivé mediátory, např. IL-10 a TGF-β, které aktivují Treg lymfocyty. Mezi další protizánětlivé mediátory patří IL-33, protein vázající IL-18 (IL-18BP) a IL-1ra. V myších modelech jsou lymfocyty Th17 diferencovány v odpovědi na kombinaci IL-6 nebo IL-21 a vyžadují indukci transkripčního faktoru RORγ (upraveno podle: Tedgui et al., 2011).

## 4.1 Interleukiny

### 4.1.1 IL-1

Interleukin 1 je prozánětlivý cytokin tvořený myeloidními buňkami. Vyskytuje se ve dvou formách IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , které vykonávají podobné funkce a mají stejnou molekulovou hmotnost. Častější formou je IL-1 $\beta$ . Působení IL-1 v organismu je různorodé (Šterzl, 2005; Fatkhullina et al., 2016). IL-1 působí prostřednictvím receptoru IL-1R. Navázání IL-1 na tento receptor vyvolává produkci širokého spektra dalších cytokinů a expresi adhezních molekul endotelovými buňkami. Kromě toho přispívá k poškození cév také tím, že stimuluje buněčné proliferace, diferenciaci a vyvolává uvolňování enzymů, které degradují extracelulární matrix.

Antagonista IL-1R (označovaný jako IL-1Ra), je strukturním homologem interleukinu-1. Váže se na IL-1R, ale nevyvolává žádnou buněčnou odpověď, proto je vnímán jako přírodní inhibitor aktivity IL-1 (Kleemann et al., 2008; Mehri-Soussi et al., 2005).

### 4.1.2 IL-6

Podle chemické struktury by mohl interleukin 6, složený ze čtyř helixových svazků, vytvořit vlastní skupinu společnou s onkostatinem M, leukemickým inhibičním faktorem a kolonie stimulujícím faktorem. Jedná se o cytokin produkovaný celou řadou buněk, fibroblasty, makrofágy, endoteliálními buňkami, atp. Důležitou roli hraje ve stimulaci růstu B lymfocytů. V jaterních buňkách vyvolává tvorbu proteinů akutní fáze (Šterzl, 2005). IL-6 působí jak přes svůj specifický IL-6 receptor, tak i přes signální transdukční protein gp130. Na myších modelech bylo prokázáno, že úloha IL-6 je v ateroskleróze ambivalentní. Mezi jeho proaterogenní funkce patří indukce syntézy IL-1 a uvolňování solubilního receptoru pro TNF. Inhibuje expresi scavenger receptorů SR-A na makrofázích. Stejně jako IFN- $\alpha$ , aktivuje IL-6 cytoplazmatické proteiny STAT1 a STAT3. Relativní rovnováha aktivace STAT1 a STAT3 určuje jeho pro- nebo protizánětlivý funkční profil (George a Johnson, 2010).

### 4.1.3 IL-10

Interleukin 10 je vedle IL-33 a růstového faktoru TGF- $\beta$  nejdůležitějším protizánětlivým cytokinem. Jedná se o pleiotropní cytokin produkovaný Th2 lymfocyty, B lymfocyty, monocyty a makrofágy. Monocyty a makrofágy vylučují IL-10 po aktivaci transkripce, která je vyvolána různými endogenními a exogenními mediátory působícími například na TLR4, nebo NF- $\kappa$ B. Lidský IL-10 je homodimer o molekulové hmotnosti 35 kDa, který se skládá ze dvou nekovalentně vázaných monomerů. Inhibuje širokou škálu

imunitních reakcí, včetně produkce cytokinů lymfocyty Th1. IL-10 má silné protizánětlivé působení na makrofágy a hraje klíčovou roli v omezení zánětlivé reakce v cévní stěně (Sabat et al., 2010; Tedgui a Mallat, 2006).

Jeho pleiotropní účinky jsou vyvolány navázáním IL-10 na receptor IL-10R, skládající se ze dvou různých řetězců, a to z IL-10R1 a IL-10R2. Oba řetězce patří do rodiny cytokinových receptorů II. třídy. Jedná se obvykle o transmembránové glykoproteiny, jejichž extracelulární domény se obvykle skládají asi z 210 aminokyselin. Navázání cytokinu na receptor se skládá ze dvou kroků. IL-10 se nejprve naváže na IL-10R1, čímž se mění konformace umožňující asociaci komplexu IL-10/IL-10R1 s IL-10R2, který sám není schopen vázat IL-10. IL-10 nejčastěji působí na buňky prostřednictvím signální dráhy JAK/STAT (Sabat et al., 2010).

## 4.2 Faktory stimulující kolonie

CSF působí na diferencované myeloidní buňky, jakými jsou makrofágy (na něž působí především M-CSF), granulocyty (G-CSF) a granulocyto-makrofágová linie (GM-CSF). CSF díky společným strukturám svých receptorů vykazují vzájemné funkční vztahy (Šterzl, 2005).

### 4.2.1 M-CSF

Kolonie stimulující faktor M-CSF je růstový faktor, který řídí přežití, proliferaci, diferenciaci a funkce mononukleárních fagocytů. V důsledku alternativního sestřihu mRNA existují 3 formy: sekretovaný glykoprotein, sekretovaný proteoglykan a glykoprotein na povrchu buněk, který je pomalu uvolňovaný jako solubilní molekula. Tyto formy mají *in vivo* různé funkce. M-CSF působí prostřednictvím tyrosinkinázového receptoru na povrchu buněk. Tento receptor je znám jako tzv. M-CSF receptor, nebo CD115. M-CSF je produkován fibroblasty, endoteliálními buňkami, monocyty a makrofágy. M-CSF vyvolává diferenciaci monocytů na makrofágy. Produkci M-CSF inhibuje IL-4 (Popova et al., 2010).

### 4.2.2 GM-CSF

Kolonie stimulující faktor GM-CSF je myeloidní růstový faktor, který indukuje diferenciaci dendritických buněk, reguluje vlastnosti zralých myeloidních buněk zánětu, je klíčovým faktorem pro proliferaci CD11c<sup>+</sup> dendritických buněk a většinu proliferujících buněk v časných aterosklerotických lézích. Nedostatek GM-CSF způsobuje snížení CD11c<sup>+</sup>. V *LDLr*<sup>-/-</sup> myších modelech snižuje nedostatek GM-CSF velikost lézí, zatímco u *ApoE*<sup>-/-</sup> myši

se s nedostatkem GM-CSF velikost lézí zvyšuje (Cybulsky et al., 2009). Na rozdíl od M-CSF nemá nedostatek GM-CSF významný vliv na cirkulující monocyty nebo tkáňové makrofágy (Tedgui a Mallat, 2006). Expresi GM-CSF endotelovými buňkami vyvolávají modifikované LDL (Tedgui et al., 2011).

### 4.3 Další důležité cytokiny

#### 4.3.1 *IFN- $\gamma$*

Charakteristický cytokin produkovaný Th1 lymfocyty, interferon  $\gamma$ , má výrazné proaterogenní účinky. Mimo Th1 lymfocyty jej mohou produkovat i monocyty, makrofágy, a také NK-buňky.

IFN- $\gamma$  má široké spektrum funkcí a stimuluje celou řadu buněčných odpovědí, které regulují imunitní systém, regulují buněčné proliferace nebo stimulují programovanou apoptózu. Tyto reakce vyvolává aktivaci buněčné signální dráhy. Nejčastěji aktivuje signální dráhu JAK/STAT, ale může vyvolat expresi také jiných transkripčních faktorů.

IFN- $\gamma$  má schopnost aktivovat makrofágy a dendritické buňky, což zvyšuje účinnost prezentace antigenu a další polarizaci Th1 lymfocytů. Je nutno podotknout, že takto aktivované makrofágy dále produkují velké množství prozánětlivých cytokinů. IFN- $\gamma$  zvyšuje expresi povrchových molekul SR-A na makrofázích, čímž dochází ke zvýšenému vychytávání oxLDL, a tím pádem ke zvýšené tvorbě pěnových buněk. Ke tvorbě pěnových buněk přispívá také tím, že snižuje eflux cholesterolu. K dalším účinkům IFN- $\gamma$  patří inhibice proliferace endotelových i hladkých svalových buněk a navození tvorby sekreční fosfolipázy A (McLaren a Ramji, 2009).

Genetický nedostatek IFN- $\gamma$  nebo jeho receptoru u *ApoE*<sup>-/-</sup> myši snižuje formování lézí a zlepšuje stabilitu plátů prostřednictvím zvýšení obsahu kolagenu (Fatkhullina et al., 2016; Ait-Oufella et al., 2014).

#### 4.3.2 *TNF- $\alpha$*

Faktor nekrotizující nádory  $\alpha$ , také nazýván jako kachektin, je prototypem prozánětlivých cytokinů, protože aktivuje několik prozánětlivých transkripčních faktorů v endotelových a hladkých svalových buňkách, které vedou k transkripci genů a následnému uvolňování dalších prozánětlivých mediátorů (cytokinů a chemokinů) do extracelulárního prostoru. Jeho klíčová role v ateroskleróze byla prokázána na myších modelech, kdy deficit

TNF- $\alpha$  u ApoE<sup>-/-</sup> myši značně podpořil zmenšení lézí (George a Johnson, 2010; Chatterjee et al., 2014).

Významným receptorem pro TNF- $\alpha$  je receptor TNFR1. TNFR1 podporuje aterosklerózu upregulací adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1) a chemokinů (MCP-1) (Zhang et al., 2007). Exprese těchto proteinů je závislá na transkripčním faktoru NF- $\kappa$ B.

Některé cytokiny IFN- $\alpha$  a  $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 a některé chemické látky, jako je vitamin D3, nebo prostaglandiny, tvorbu TNF utlumují. Předpokládá se, že TNF má také úlohu ve vývoji nebo diferenciaci monocytárně makrofágové linie interakcí s CSF (Šterzl, 2005; Xiao et al., 2008).

### **4.3.3 TGF- $\beta$**

Transformující růstový faktor  $\beta$  je, spolu s IL-10, považován za antiaterogenní faktor, zejména v časných stádiích onemocnění. TGF- $\beta$  hraje klíčovou roli v udržení normální stavby cévní stěny. Existují celkem 3 izoformy TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 a TGF- $\beta$ 3. Všechny tři izoformy se váží na stejné receptory a ve většině případů vykonávají podobné funkce (Redondo et al., 2012; Grainger, 2007).

TGF- $\beta$ 1 inhibuje nadměrnou akumulaci a proliferaci cévních hladkých svalových buněk a zamezuje ruptuře plátu prostřednictvím reparace tkání (Redondo et al., 2012). V hladkých svalových buňkách TGF- $\beta$ 1 výrazně stimuluje tvorbu extracelulární matrix, zejména kolagenu, inhibuje buněčnou proliferaci a zvyšuje expresi kontraktálních proteinů. V endotelových kulturách snižuje proliferaci, migraci buněk a expresi adhezních molekul vyvolávajících nábor leukocytů. V buněčných kulturách přímo působí na imunitní buňky a inhibuje tvorbu pěnových buněk v kultivovaných makrofázích (Grainger, 2007). TGF- $\beta$ 1 inhibuje proliferaci, aktivaci a diferenciaci T lymfocytů směrem k Th1 a Th2 a protože působí jako kostimulační faktor pro expresi transkripčního faktoru Foxp3, napomáhá udržování Treg v cirkulaci (Tedgui et al., 2011). V pozdějších stádiích aterosklerózy má však spíše proaterogenní účinky, protože způsobuje nadměrné zvyšování extracelulární matrix a vyvolává patologické remodelace cév (Redondo et al., 2012).

## **4.4 Chemokiny**

Chemokiny tvoří rodinu malých cytokinů o velikosti 8-11 kDa. Hlavní funkcí chemokinů je indukce aktivace a cílená migrace lymfocytů do místa zánětu, ovlivňují ale také produkci mezibuněčné hmoty a angiogenezi. Na základě strukturních charakteristik jsou

chemokiny rozdělovány do čtyř skupin, a to na  $\alpha$ -chemokiny (CXC),  $\beta$ -chemokiny (CC),  $\gamma$ -chemokiny (C) a  $\delta$ -chemokiny (CX3C). CXC chemokiny se liší od CC chemokinů tím, že mají mezi amino-terminálními cysteinovými zbytky obsaženu jednu aminokyselinu, CC chemokiny tuto aminokyselinu postrádají. Ve struktuře CX3C chemokinů, jejichž zástupcem je fraktalkin (CX3CL1), jsou amino-terminální cysteinové zbytky odděleny třemi aminokyselinami. Ve struktuře C chemokinů nejsou obsaženy dva ze čtyř cysteinových zbytků. Zástupcem C chemokinů je nedávno objevený lymfotaktin. Pro všechny chemokiny je charakteristická vysoká afinita k různým ligandům (Apostolakis et al., 2009; Šterzl, 2005).

#### **4.4.1 IL-8**

Interleukin 8, na základě novější nomenklatury označován jako CXCL8, je chemokin s molekulovou hmotností 8-10 kDa. Patří do CXC chemokinové rodiny. Je aktivně produkován v extracelulárním prostoru jako důsledek různých buněčných stimulů. V aterosklerotických lézích jej produkují makrofágy, endotelové buňky a hladké svalové buňky. Biologické efekty IL-8 jsou vyvolány jeho vazbou na dva receptory CXCR1 a CXCR2.

V počátečních stádiích aterosklerotického procesu, stejně jako RANTES, GRO- $\alpha$  a fraktalkin, zajišťuje IL-8 pevnou adhezi monocytů exprimujících receptor CXCR2 k endotelovým buňkám. IL-8 pravděpodobně hraje roli i v pokročilejších stádiích, pravděpodobně potencuje angiogenezi plátu (Apostolakis et al., 2009).

#### **4.4.2 MCP-1**

Existují celkem 4 lidské chemotaktické proteiny MCP (MCP-1 až -4). MCP-1 je členem rodiny CC chemokinů, má chemotaktickou aktivitu. Je jedním z klíčových faktorů podílejících se na iniciaci zánětu. Vyvolává chemotaxi a transendoteliální migraci monocytů z lumen do subendotelového prostoru, interakcí s membránovým receptorem CCR2. Bylo prokázáno, že za funkci MCP-1 a jeho receptorovou specifitu je odpovědný jeho N-terminální konec (Melgarejo et al., 2008; Niu a Kolattukudy, 2009; Ghousifam et al., 2017).

Důležitou úlohu v transendoteliální migraci monocytů sehrávají koncentrační gradienty MCP-1 v extracelulární matrix. Jakým způsobem dochází k vytvoření takového gradientu, není prozatím zcela objasněno (Ghousifam et al., 2017).

MCP-1 je exprimován fibroblasty, endotelovými buňkami, buňkami cévní hladké svaloviny, monocyty, T-buňkami a dalšími buněčnými typy, které zprostředkovávají influx buněk do míst zánětu. Obvykle je MCP-1 exprimován ve dvou formách o molekulových hmotnostech 9 a 13 kDa, které jsou výsledkem rozdílné O-glykosylace, neovlivňují však

schopnost působit na migraci monocytů. Exprese MCP-1 je regulována na transkripční úrovni stimulačními činidly, jako jsou TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , PDGF, oxLDL a stresové faktory, vlivem kterých může být aktivován NF- $\kappa$ B (Melgarejo et al., 2008).

#### **4.4.3 MIF**

Faktor inhibující makrofágy, MIF, je pleiotropní cytokin s enzymatickými vlastnostmi a vlastnostmi podobnými hormonům. Jedinečný mezi cytokiny je v tom, že je vycytáván cílovými buňkami, v nichž řídí buněčný cyklus a zánětlivou odpověď. MIF je produkován převážně makrofágy, T-lymfocyty a hladkými svalovými buňkami. Hlavním induktorem jeho produkce jsou oxLDL. MIF je ligandem receptoru CXCR a hraje významnou roli v náboru monocytů, T lymfocytů a neutrofilů, má tedy prozánětlivé chemoatraktivní funkce (Kleemann et al., 2008).



## 5 ZÁVĚR

Cytokiny mají v ateroskleróze nezastupitelné místo, neboť modulují složitou souhrnu procesů vedoucích k rozvoji aterosklerózy. V počáteční fázi aterosklerózy, tedy při endotelové dysfunkci, mají důležitou úlohu hlavně prozánětlivé cytokiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  přispívající k prostupu LDL částic do subendotelového prostoru cévní stěny. Látky produkované dysfunkčním endotelem, především chemokiny, ale také IL-1, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  poté napomáhají náboru imunitních buněk do cévní stěny. Takto prostupují např. monocyty, které se zde, zejména vlivem M-CSF, diferencují na makrofágy. Následuje vznik pěnových buněk ovlivňovaný např. TNF- $\alpha$ , který zvyšuje expresi scavenger receptorů na povrchu makrofágů. Pěnové buňky produkují značné množství prozánětlivých cytokinů a chemokinů (např. IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ ) podporujících zánětlivou odpověď. Podstatnou úlohu v zánětlivé odpovědi hrají rovněž cytokiny produkované Th lymfocyty. Pokročilejších stádií aterosklerózy se účastní hladké svalové buňky, které při působení cytokinů PDGF a TNF- $\alpha$  a TGF- $\beta$  mohou podléhat změnám fenotypu. Hladké svalové buňky se syntetickým fenotypem produkují extracelulární matrix, velké množství cytokinů (např. IL-1, IFN- $\gamma$ , MCP-1, PDGF), a také mohou vychytávat oxidované LDL částice a přeměňovat se v pěnové buňky. Na destabilizaci aterosklerotických plaků, která je způsobena mimo jiné apoptózou makrofágů a hladkých svalových buněk, mají vliv vysoké hladiny prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). V pozdních fázích aterosklerózy dochází k angiogenezi, na které se významně podílejí především růstové faktory. Chronickou zánětlivou odpověď modulují lipidové mediátory, odvozené z kyseliny arachidonové, eikosapentaenové nebo dokosahexaenové. Mezi důležité zástupce lipidových mediátorů ovlivňujících aterosklerózu patří např. resolvin E1, resolvin D1 a maresin 1, které mimo jiné dokážou snižovat produkci některých prozánětlivých cytokinů.

Procesy rozvoje aterosklerózy regulované pomocí cytokinů jsou velmi složité a staly se tak v posledních letech intenzivně studovaným tématem. Studium funkce cytokinů může přinést nové možnosti v léčbě aterosklerózy a eliminovat tak riziko vzniku dalších onemocnění souvisejících s aterosklerózou.

## SEZNAM ZKRATEK

<b>ABC</b>	ATP- vázající přenašeč ( <b>ATP-binding cassette</b> )
<b>ApoB</b>	Apolipoprotein B
<b>ApoE<sup>-/-</sup></b>	apolipoprotein E deficitní myši
<b>cAMP</b>	cyklický adenosinmonofosfát
<b>CC; CXC; CX3C</b>	označení chemokinů podle struktury
<b>CCL; CXCL; CX3CL</b>	chemokinové ligandy (chemokiny)
<b>CCL11</b>	eotaxin (chemokin)
<b>CCR; CXCR; CX3CR</b>	chemokinové receptory
<b>CD</b>	diferenční antigen ( <b>cluster of differentiation</b> )
<b>CRBP-1</b>	retinol vázající protein ( <b>cellular retinol-binding protein</b> )
<b>CRP</b>	C-reaktivní protein
<b>CSF</b>	faktor stimulujiící růst kolonií ( <b>colony-stimulating factor</b> )
<b>CX3CL1</b>	fraktalkin (chemokin)
<b>ERK</b>	extracelulární signál regulující kináza
<b>FGF</b>	růstový faktor fibroblastů ( <b>fibroblast growth factor</b> )
<b>Foxp3</b>	transkripční faktor (forkhead box p3)
<b>GDP</b>	guanosindifosfát
<b>GM-CSF</b>	faktor stimulujiící kolonie granulocytů a makrofágů ( <b>granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</b> )
<b>gp</b>	glykoprotein
<b>GRO-<math>\alpha</math> (CXCL1)</b>	faktor růstově podobný onkogenu ( <b>Growth-related oncogene alfa</b> )
<b>ICAM</b>	mezibuněčná adhezní molekula ( <b>intercellular adhesive molecule</b> )
<b>IFN</b>	interferon
<b>IGF</b>	inzulínu podobný růstový faktor ( <b>insuline-like growth factor</b> )
<b>IL</b>	interleukin
<b>IL-1R</b>	receptor interleukinu 1
<b>IL-1RA</b>	antagonista IL-1R
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	inhibiční podjednotka NF- $\kappa$ B
<b>JAK</b>	Janusovy kinázy ( <b>Janus Activated Kinase</b> )
<b>JAM</b>	adhezní molekuly tvořící spoje

	( <b>Junctional Adhesion Molecules</b> )
<b>kDa</b>	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
<b>LDL</b>	lipoproteiny o nízké hustotě ( <b>low density lipoproteins</b> )
<b>LDLr<sup>-/-</sup></b>	LDL receptor deficitní myši
<b>LFA</b>	adhezní molekula leukocytů ( <b>leukocyte-function-associated-antigen</b> )
<b>LRP</b>	protein příbuzný LDL receptoru
<b>LXR</b>	jaterní X receptor ( <b>liver X receptor</b> )
<b>MARCO</b>	makrofágový receptor kolagenní struktury
<b>MCP-1 (CCL2)</b>	monocytární chemoatraktantový protein 1 ( <b>Monocyte Chemoattractant Protein</b> ) – dysfunkce
<b>M-CSF</b>	faktor stimulující zrání makrofágů ( <b>macrophage colony stimulating factor</b> )
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex ( <b>major histocompatibility complex</b> )
<b>MIF</b>	faktor inhibující makrofágy ( <b>macrophage inhibiting factor</b> )
<b>mmLDL</b>	minimálně modifikované lipoproteiny o nízké hustotě
<b>MMP</b>	matrixové metaloproteinázy
<b>mRNA</b>	mediátorová ribonukleová kyselina
<b>NF-κB</b>	nukleární faktor kappa B ( <b>nuclear factor-κB</b> )
<b>NOD-like receptor</b>	receptorový protein obsahující oligomerizační doménu vázající nukleotidy
<b>NO-syntáza</b>	syntáza oxidu dusnatého
<b>oxLDL</b>	oxidované lipoproteiny o nízké hustotě
<b>PAMP</b>	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy ( <b>pathogen-associated molecular pattern</b> )
<b>PDGF</b>	růstový faktor produkovaný destičkami ( <b>platelet-derived growth factor</b> )
<b>PDGFR</b>	receptor pro PDGF
<b>PECAM (CD31)</b>	adhezní molekula destiček a endotelií ( <b>platelet endothelial cell adhesion molecule</b> )
<b>PIGF</b>	placentární růstový faktor ( <b>Placental growth factor</b> )
<b>RANTES (CCL5)</b>	chemotaktický faktor (chemokin) ( <b>regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</b> )

<b>SCAP</b>	protein aktivující štěpení SREBP ( <b>SREBP cleavage activating protein</b> )
<b>SCF</b>	faktor kmenových buněk ( <b>stem cell factor</b> )
<b>SMA</b>	hladkosvalový aktin ( <b>smooth muscle actin</b> )
<b>SM-MHC</b>	specifický povrchový protein hladkých svalových buněk
<b>SR-A; SR-B</b>	scavenger receptory
<b>SREBP</b>	protein vázající element regulovaný steroly ( <b>Sterol regulatory element-binding protein</b> )
<b>STAT</b>	přenašeč signálu a aktivátor transkripce ( <b>signal transducer and activator of transcription protein</b> )
<b>TGF</b>	transformující růstový faktor ( <b>transforming growth factor</b> )
<b>Th</b>	pomocný T lymfocyt ( <b>helper T cell</b> )
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF</b>	faktor nekrotizující nádory ( <b>tumor necrosis factor</b> )
<b>TNF-R1/TNF-R2</b>	receptory pro TNF
<b>Treg</b>	regulační T lymfocyty
<b>TWEAK</b>	slabý induktor apoptózy příbuzný TNF ( <b>TNF related weak inducer of apoptosis</b> )
<b>TYK</b>	tyrosin kináza
<b>VCAM</b>	cévní adhezní molekula ( <b>vascular cell adhesion molecule</b> )
<b>VEGF</b>	vaskulární endoteliální růstový faktor ( <b>vascular endothelial growth factor</b> )
<b>VEGFR</b>	receptor pro VEGF
<b>VLA</b>	pozdní aktivační antigen ( <b>very late activation antigen</b> )

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1:</i> Vývoj aterosklerotické léze.....	19
<i>Obrázek 2:</i> Prostup leukocytů do subendotelového prostoru.....	24
<i>Obrázek 3:</i> Tvorba tukových proužků.....	26
<i>Obrázek 4:</i> Biosyntéza lipidových mediátorů.....	39
<i>Obrázek 5:</i> Důležité cytokiny.....	42

## SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1:</i> Hlavní skupiny cytokinů a jejich funkce.....	14
<i>Tabulka 2:</i> Aterogenní cytokiny produkované buňkami hladké svaloviny.....	34

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AIT-OUFELLA, H.; SAGE, A. P.; MALLAT, Z.; TEDGUI, A. (2014): Adaptive (T and B Cells) Immunity and Control by Dendritic Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research*. Vol. 114. s 1640-1660. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302761

ANDERSSON, J.; LIBBY, P.; HANSSON, G. K. (2009): Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clinical Immunology*. Vol. 134. s 33–46. DOI: 10.1016/j.clim.2009.07.002

APOSTOLAKIS, S.; VOGIATZI, K.; AMANATIDOU, V.; SPANDIDOS, D. A. (2009): Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. Vol. 84. s 353–360. DOI: 10.1093/cvr/cvp241

BENNETT, M. R.; SINHA, S.; OWENS, G. K. (2016): Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research Compendium on Atherosclerosis*. Vol. 118. s 692-702. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361

BENTZON, J. F.; OTSUKA, F.; VIRMANI, R.; FALK, E. (2014): Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circulation Research*. Vol. 114. s 1852-1866. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721

BOBRY SHEV, Y. V. (2006): Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* 37. s 208-222. DOI: 10.1016/j.micron.2005.10.007

BOBRY SHEV, Y. V.; IVANOVA, E. A.; CHISTI AKOV, D. A.; NIKIFOROV, N. G.; OREKHOV, A. N. (2016): Review Article Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *BioMed Research International*. Vol. 2016. ID 9582430. s 13. DOI: 10.1155/2016/9582430

BOYLE, J. J.; WEISSBERG, P. L.; BENNETT, M. R. (2003): Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Promotes Macrophage-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis by Direct and Autocrine Mechanisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 23. s 1553-1558. DOI: 10.1161/01.ATV.0000086961.44581.B7

BROPHY, M. L.; DONG, Y.; WU, H.; RAHMAN, H. A.; SONG, K.; CHEN, H. (2017): Eating the Dead to Keep Atherosclerosis at Bay. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. Vol. 4(2). s 13. DOI: 10.3389/fcvm.2017.00002

CALDER, P. C. (2012): The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Molecular nutrition & food research*. Vol. 56. s 1073–1080. DOI: 10.1002/mnfr.201100710

CAMARÉ, C.; PUCELLE, M.; NÈGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R. (2017): Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biology*. Vol. 12. s 18–34. DOI: 10.1016/j.redox.2017.01.007

- CYBULSKY, M. I.; ZHU, S. N.; CHEN, M. (2009): GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesion. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 206. s 2141-2149 DOI: 10.1084/jem.20090866
- WIJNAND, K.; TEMPEL, D.; BOT, I.; BIESSEN, E. A.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G.; DUCKERS, H. J. et al. (2012): Mast Cells Induce Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis via a Toll-Like Receptor 4 Activation Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 32. s 1960-1969. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.250605
- DORAN, A. C.; MELLER N.; McNAMARA, C. A. (2008): Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 28. s 812-819. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.159327
- ENDEMANN, D. H. a SCHIFFRIN, E. L. (2004): Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*. Vol. 15. s 1983–1992. DOI: 10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA
- FATKHULLINA, A. R.; KOLTSOVA, E. K.; PESHKOVA, I. O. (2016): The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 81(11). s 1358-1370. DOI: 10.1134/S0006297916110134
- FOREJTOVÁ, Š. (2007): Ateroskleróza u revmatických onemocnění. *Medicína pro praxi*. Revmatologický ústav, Praha. 4(12). s 501–505
- FREDMAN, G. a SPITE, M. (2017): Specialized pro-resolving mediators in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine*. DOI: 10.1016/j.mam.2017.02.003
- GALKINA, E. a LEY, K. (2007): Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 27. s 2292-2301. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.149179
- GEORGE, S. J. a JOHNSON, J. (2010): *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. s 398. ISBN: 978-3-527-32448-4
- GHOUSIFAM, N.; MORTAZAVIAN, H.; BHOWMICK, R.; VASQUEZ, Y.; BLUM, F. D.; GAPPA-FAHLENKAMP, H. (2017): A three-dimensional in vitro model to demonstrate the haptotic effect of monocyte chemoattractant protein-1 on atherosclerosis-associated monocyte migration. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 97. s 141-147. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.072
- GRAINGER, D. J. (2007): TGF- $\beta$  and atherosclerosis in man. *Cardiovascular Research*. Vol. 74. s 213–222. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.02.022
- HEADLAND, S. E. a NORLING, L. V. (2015): The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*. Vol. 27. s 149-160. DOI: 10.1016/j.smim.2015.03.014

- HEDRICK, C. C. (2015): Lymphocytes in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 35. s 253-257. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.305144
- HLADÍKOVÁ, M. a ŠTOURÁČ, P. (2008): Matrixové metaloproteinázy v patogenezi roztroušené sklerózy. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. Vol. 71/10(5). s 530-536
- HOŘEJŠÍ, V. a BARTŮŇKOVÁ, J. (2009): *Základy imunologie*. Praha : TRITON. s 316. ISBN 978-80-7387-280-9
- HROMADOVÁ, D. (2004): *Kardiovaskulární onemocnění*. Brno: NEPTUN. s 190. ISBN 80-902896-8-1
- CHATTERJEE, A.; SHARMA, A.; CHEN, M.; TOY, R.; MOTTOLA, G.; CONTE, M. S. (2014): The Pro-Resolving Lipid Mediator Maresin 1 (MaR1) Attenuates Inflammatory Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells. *PLoS ONE*. Vol. 9(1). s 1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0113480
- CHIU, J. J. a CHIEN, S. (2011): Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiological reviews*. Vol. 91. s 327–387. DOI: 10.1152/physrev.00047.2009
- JOHNSON, J. L. (2014): Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. European Society of Cardiology. Vol. 103. s 452–460. DOI: 10.1093/cvr/cvu171
- KLEEMANN, R.; ZADELAAR, S.; KOOISTRA, T. (2008): Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovascular Research*. Vol. 79. s 360–376. DOI: 10.1093/cvr/cvn120
- KOENIG, W. a KHUSEYINOVA, N. (2007): Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability and Rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 27. s 15-26, ISSN: 1079-5642; DOI: 10.1161/01.ATV.0000251503.35795.4f
- KREJSEK, J. a KOPECKÝ, O. (2004): *Klinická imunologie*. Hradec Králové : NUCLEUS HK, s 941, ISBN: 80-86225-50-X.
- KRIEGLSTEIN, CH. F. a GRANGER, D. N. (2001): Adhesion Molecules and Their Role in Vascular Disease. *American Journal of Hypertension*. Vol. 14(6). s 44-54. DOI: 10.1016/S0895-7061(01)02069-6
- LEDVINA, M.; STOKLASOVÁ, A.; CERMAN, J. (2004): *BIOCHEMIE PRO STUDUJÍCÍ MEDICÍNY*. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum. 1. Díl. Kapitola 1-13. s 274. ISBN 80-246-0849-9
- LEE, S. a MARGOLIN, K. (2011): Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers*. Vol. 3. s 3856-3893. DOI:10.3390/cancers3043856



- LEONARD, W. J. a LIN, J. X. (2000): Cytokine receptor signaling pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol. 105(5). s 877-888. DOI: 10.1067/mai.2000.106899
- LI, H. a SUN, B. (2007): Toll-like receptor 4 in atherosclerosis. *Journal compilation: Foundation for Cellular and Molecular Medicine*. Vol. 11(1). s 88-95. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2007.00011.x
- LIM, S. a PARK, S. (2014): Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Reports*. ISSN: 1976-670X. DOI: 10.5483/BMBRep.2014.47.1.285
- LINTON, M. F.; BABAEV, V. R.; HUANG, J.; LINTON, E. F.; TAO, H.; YANCEY, P. G. (2016): Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Journal, Official Journal of the Japanese Circulation Society*. Vol. 80. s 2259 – 2268. ISSN-1346-9843. DOI: 10.1253/circj.CJ-16-0924
- LINTON, M. F.; TAO, H.; LINTON, E. F.; YANCEY, P. G. (2017): SR-BI: A Multifunctional Receptor in Cholesterol Homeostasis and Atherosclerosis. *Trends in Endocrinology & Metabolis*. Vol. 1213. s 1–12. DOI: 10.1016/j.tem.2017.02.001
- LYDYARD, P., WHELAN, A.; FANGER, M. (2011): *BIOS Instant Notes in Immunology*. Taylor & Francis, 2011. 3. vydání. s 358. ISBN: 978-0-4156-0753-7
- McLAREN, J. E. a RAMJI, D. P. (2009): Interferon gamma: A master regulator of atherosclerosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. Vol. 20. s 125-135. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2008.11.003
- McLAREN, J. E.; MICHAEL, D. R.; ASHLIN, T. G.; RAMJI, D. P. (2011): Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research*. Vol. 50. s 331 – 347. DOI: 10.1016/j.plipres.2011.04.002
- MELGAREJO, E.; MEDINA, M. Á.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; URDIALES, J. L. (2008): Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol. 41. s 998-1001. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.07.018
- MERHI-SOUSSI, F.; KWAK, B. R.; MAGNE, D.; CHADJICHRISTOS, C.; BERTI, M.; PELLI, G.; GABAY, C. et al. (2005): Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovascular research*. Vol. 66(3). s 583-593. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.01.008
- MICHAEL, D. R.; ASHLIN, T. G.; DAVIES, C. S.; GALLAGHER, H.; STONEMAN, T. W.; BUCKLEY, M. L.; RAMJI, D. P. (2013): Differential regulation of macropinocytosis in macrophages by cytokines: Implications for foam cell formation and atherosclerosis. *Cytokine*. Vol. 64. s 357–361. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.05.016

- MIYAHARA, T.; RUNGE, S.; CHATTERJEE, A.; CHEN, M.; MOTTOLA, G.; FITZGERALD, J. M.; CONTE, M. S. (2013): D-series resolvins attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury. *The FASEB Journal*. Vol. 27 (6). s 2220-2232. DOI: 10.1096/fj.12-225615.
- MOSSER, D. M. (2003) The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*. Vol 73(2). s 209-212. DOI: 10.1189/jlb.0602325
- NIU, J. a KOLATTUKUDY, P. E. (2009): Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clinical Science*. Vol. 117. s 95–109. DOI: 10.1042/CS20080581
- NUMASAKI, M.; FUKUSHI, J. I.; ONO, M.; NARULA, S. K.; ZAVODNY, P. J.; KUDO, T.; LOTZE, M. T. (2003): Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. Vol. 101(7). s 2620-2627. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1461
- PASCUAL-GARCÍA, M.; RUÉ, L.; LEÓN, T.; JULVE, J.; CARBÓ, J. M.; MATALONGA, J.; VALLEDOR, A. F. (2013): Reciprocal Negative Cross-Talk between Liver X Receptors (LXRs) and STAT1 Effects on IFN- $\gamma$ -Induced Inflammatory Responses and LXR-Dependent Gene Expression. *The Journal of Immunology*. Vol. 190. s 6520-653. DOI: 10.4049/jimmunol.1201393
- PERUŠIČOVÁ, J.; ČEŠKA, R.; LINHART, A.; PRÁZNÝ, M.; ŠKRHA, J.; VRABLÍK, M. (2009): *Kardiabetes: kardiovaskulární choroby & diabetes mellitus*. Brno : Facta Medica, s 239, 1. ISBN 978-80-904260-1-6.
- POPOVA, A.; KZHYSHKOWSKA, J.; NURGAZIEVA, D.; GOERDT, S.; GRATCHEV, A. (2010): Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation. *Immunobiology*. Vol. 216. s 164-172. DOI: 10.1016/j.imbio.2010.06.003
- QUAGLIARO, L.; PICONI, L.; ASSALONI, R.; DA ROS, R.; MAIER, A.; ZUODAR, G.; CERIELLO, A. (2005): Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis*, Vol. 183(2). s 259-267. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.015
- RAINES, E.V. a FERRI, N. (2005): Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *Journal of Lipid Research*. Thematic Review Series: The Immune System and Atherogenesis. Vol. 46. s 1081–1092. DOI: 10.1194/jlr.R500004-JLR200
- RAMJI, D. P. a DAVIES, T. S. (2015): Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. Vol 26. s 673–685. ISSN 1359-6101. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003
- RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. Vol. 117. s 1281-1283. DOI:10.1242/jcs.00963

- RECCHIUTI, A. a SERHAN, CH. N. (2012): Pro-resolving lipid mediators (SPMs) and their actions in regulating miRNA in novel resolution circuits in inflammation. *Frontiers in Immunology*. Vol. 3(298). s 1-23. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00298
- REDONDO, S.; NAVARRO-DORADO, J.; RAMAJO, M.; MEDINA, Ú.; TEJERINA, T. (2012): The complex regulation of TGF- $\beta$  in cardiovascular disease. *Vascular Health and Risk Management*. Vol. 8. s 533–539. DOI: 10.2147/VHRM.S28041
- RENSSEN, S. S. M.; DOEVENDANS, P. A. F. M.; VAN EYS, G. J. J. M. (2007): Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal*. Vol. 15. s 100-108.
- RUAN, X. Z.; MOORHEAD, J. F.; TAO, J. L.; MA, K. L.; WHEELER, D. C.; POWIS, S. H.; VARGHESE, Z. (2006): Mechanisms of Dysregulation of Low-Density Lipoprotein Receptor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells by Inflammatory Cytokines. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 26. s 1150-1155. DOI: 10.1161/01.ATV.0000217957.93135.c2
- SABAT, R.; GRÜTZ, G.; WARSZAWSKA, K.; KIRSCH, S.; WITTE, E.; WOLK, K.; GEGINAT, J. (2010): Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. Vol. 21. s 331-344. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.002
- SAKAMURI, S. S. V. P.; HIGASHI, Y.; SUKHANOV, S.; SIDDESHA, J. M.; DELAFONTAINE, P.; SIEBENLIST, U.; CHANDRASEKAR, B. (2016): TRAF3IP2 mediates atherosclerotic plaque development and vulnerability in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Atherosclerosis*. Vol. 252. s 153-160. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.029
- SALIC, K.; MORRISON, M. C.; VERSCHUREN, L.; WIELINGA, P. Y.; WU, L.; KLEEMANN, R.; KOOISTRA, T. (2016): Resolvin E1 attenuates atherosclerosis in absence of cholesterol-lowering effects and on top of atorvastatin. *Atherosclerosis*. Vol. 250. s 158-165. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.001
- SATAGOPAM, V. P.; THEODOROPOULOU, M. C.; STAMPOLAKIS, C. K.; PAVLOPOULOS, G. A.; PAPANDREOU, N. C.; BAGOS, P. G.; HAMODRAKAS, S. J. (2010): GPCRs, G-proteins, effectors and their interactions: human-gpDB, a database employing visualization tools and data integration techniques. *Database (Oxford)*. Vol. 2010. ID: baq019. DOI: 10.1093/database/baq019
- SEIMON, T. a TABAS, I. (2009): Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. Vol. 50. s 382–S387. DOI: 10.1194/jlr.R800032-JLR200
- SERHAN, CH. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. (2009): Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and proresolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*. Vol. 8(5). s 349-361. DOI: 10.1038/nri2294

SERHAN, C. N.; DALLI, J.; KARAMNOV, S.; CHOI, A.; PARK, C. K.; XU, Z. Z.; PETASIS, N. A. et al. (2012): Macrophage pro-resolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *The FASEB Journal*. Vol. 26(4). s 1755-1765. DOI: 10.1096/fj.11-201442

SILVESTRE-ROIG, C.; DE WINTHER, M. P.; WEBER, C.; DAEMEN, M. J.; LUTGENS, E.; SOEHNLEIN, O. (2014): Atherosclerotic Plaque Destabilization Mechanisms, Models, and Therapeutic Strategies. *Circulation Research*. Vol. 114. s 214-226. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302355

SVAČINA, Š. (2010): *Poruchy metabolismu a výživy*. 1. vydání. Praha: Galén. s 505. ISBN 978-80-7262-676-2

ŠTERZL, I. (2005): *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékařství*. 1. vydání, Praha, Karolinum, s 208. ISBN: 80-246-0972-X

TEDGUI, A. a MALLAT, Z. (2006): Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiological reviews*. Vol 86. S 515–581. DOI:10.1152/physrev.00024.2005

AIT-OUFELLA, H.; TALEB, S.; MALLAT, Z.; TEDGUI, A. (2011): Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 31. s 969-979. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207415

TEMMA, T. a SAJI, H. (2012): Radiolabelled probes for imaging of atherosclerotic plaques. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, Vol. 2(4). s 432–447. ISSN:2160-8407/ajnm1206002

ULBRICH, H.; ERIKSSON, E. E.; LINDBOM, L. (2003): Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Sweden. Vol. 24(12). s 640-647. DOI: 10.1016/j.tips.2003.10.004

VALLEDOR, A. F.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. (2015): Macrophage Foam Cells. *John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020730.pub2

VAN ES, T.; VAN PUIJVELDE, G. H.; FOKS, A. C.; HABETS, K. L. L.; BOT, I.; GILBOA, E.; KUIPER, J. et al. (2010): Vaccination against Foxp3+ regulatory T cells aggravates atherosclerosis. *Atherosclerosis*. Vol. 209. s 74-80. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.041

VERMA, I.; SYNGLE, A.; KRISHAN, P.; GARG, N. (2017): Endothelial Progenitor Cells as a Marker of Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis in Ankylosing Spondylitis: A Cross-Sectional Study. *International Journal of Angiology*. Vol. 26(1). s 26:36–42. DOI: 10.1055/s-0036-1593445. ISSN 1061-1711

VIOLA, J. a SOEHNLEIN, O. (2015): Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation. *Seminars in Immunology*. Vol. 27. s 184-193. DOI: 10.1016/j.smim.2015.03.013

VIOLA, J.; LEMNITZER, P.; JANSEN, Y.; CSABA, G.; WINTER, C.; NEIDECK, C.; WEBER, C. et al. (2016): Resolving Lipid Mediators Maresin 1 and Resolvin D2 Prevent Atheroprogession in Mice. *Circulation Research*. Vol. 119. s 1030-1038. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309492

VIRMANI, R.; KOLODZIE, F. D.; BURKE, A. P.; FINN, A. V.; GOLD, H. K.; TULENKO, T. N.; NARULA, J. et al. (2005): Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability to Rupture: Angiogenesis as a Source of Intraplaque Hemorrhage. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Vol. 25(10). S 2054-2061. DOI: 10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18

VRABLÍK, M.; JANOTOVÁ, M.; MOTYKOVÁ, E.; PRUSÍKOVÁ, M. M. (2011): Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy. *Medicína pro praxi*. III. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha. Vol. 8(3). s 119–122

XIAO, N.; YIN, M.; ZHANG, L.; QU, X.; DU, H.; SUN, X.; AN, L. et al. (2008): Tumor necrosis factor-alpha deficiency retards early fatty-streak lesion by influencing the expression of inflammatory factors in apoE-null mice. *Molecular Genetics and Metabolism*. Vol. 96. s 239-244. DOI: 10.1016/j.ymgme.2008.11.166

ZERNECKE, A. a WEBER, CH. (2005): Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Research in Cardiology*. Vol. 100(2). s 93 – 101. DOI 10.1007/s00395-005-0511-6

ZÍDEK, Z.; ANZENBACHER, P.; KMONÍČKOVÁ, E. (2009): Current status and challenges of cytokine pharmacology. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 157. s 342–361. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00206.x

ZYSSET, D.; WEBER, B.; RIHS, S.; BRASSEIT, J.; FREIGANG, S.; RIETHER, C.; OCHSENBEIN, A. F. et al. (2016): TREM-1 links dyslipidemia to inflammation and lipid deposition in atherosclerosis. *Nature communications*, 7. DOI: 10.1038/ncomms13151