

Received: 17.08.2017  
Accepted: 16.03.2018  
Published: 08.08.2018

## Receptory Toll-podobne jako potencjalny cel terapeutyczny w miażdżycy i chorobach sercowo-naczyniowych\*

### Toll-like receptors as a potential therapeutic target for atherosclerosis and cardiovascular disease

Dominika Łacheta, Wioletta Olejarz, Małgorzata Wrzosek, Grażyna Nowicka

Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

#### Streszczenie

Receptory Toll-podobne należą do grupy receptorów rozpoznających wzorce (pattern recognition receptors – PRR), odgrywających główną rolę w zachowywaniu równowagi między układem odpornościowym gospodarza, a inwazją drobnoustrojów. Są kluczowymi czynnikami wczesnych, wrodzonych mechanizmów obronnych układu odpornościowego, co przejawia się aktywacją klasycznych i alternatywnych szlaków zapalenia. Wykazano bowiem, że ich nadmierna aktywność zakłóca homeostazę organizmu. Z tego powodu odpowiedzi komórki z udziałem tych receptorów powinny być ściśle regulowane, aby zapobiec wszelkim szkodliwym skutkom ich nieprawidłowej aktywacji. Coraz więcej wiadomo o potencjalnym udziale receptorów Toll-podobnych w inicjacji i progresji miażdżycy. Wykazano, że aktywacja tych receptorów prowadzi do wzmożonej syntezy cytokin prozapalnych, sprzyja akumulacji komórek piankowatych w aorcie oraz migracji komórek naczyniowych mięśni gładkich z tunica do intima media. Głównym problemem w rozwoju leków blokujących receptory Toll-podobne jest zmniejszenie nadmiernego stanu zapalnego bez wpływu na wrodzoną odporność organizmu. Wprawdzie badania przedkliniczne potwierdzają, że są one obiecującymi celami terapeutycznymi i potencjalnymi biomarkerami w patogenezie miażdżycy, jednak istnieje konieczność pełnego zdefiniowania ich funkcji.

**Słowa kluczowe:** receptory Toll-podobne (TLR) • miażdżycza • zapalenie • komórki śródbłonna • limfocyty T • makrofagi

#### Summary

Toll-like receptors belong to the pattern recognition receptor (PRR) group, which plays a major role in maintaining a balance between the host immune system and the microbial invasion. They are key factors in the early, innate defense mechanisms of the immune system, which are manifested by the activation of classical and alternative inflammatory pathways. Excessive activity of these receptors has been shown to cause homeostasis disorders, so that the response of cells with these receptors must be strictly regulated to prevent any harmful effects of their abnormal activation. Thus, cellular responses mediated through TLR receptors have to be strictly regulated in order to prevent potentially harmful effects of their abnormal activation. There is an increasing evidence to suggest, that the Toll-like receptors can initiate and accelerate a development of atherosclerosis. Activation of these receptors leads to enhanced proinflammatory cytokine synthesis, promotes accumulation of foam cells in the aorta and migration of vascular smooth muscle cells from tunica to intima media. The major challenge for development of the TLR blocking drugs is to reduce inflammation without affecting the innate immunity of a body. Although preclinical studies confirm that they are promising therapeutic targets and potential biomarkers in the pathogenesis of atherosclerosis, however it is necessary to fully define their functions.

**Keywords:** Toll-like receptors (TLR) • atherosclerosis • inflammation • endothelial cells • T lymphocytes • macrophages

\* Praca została napisana w ramach grantu NCN Miniatura 1: 2017/01/X/NZ3/00248.

<b>GICID</b>	01.3001.0012.2340
<b>DOI:</b>	10.5604/01.3001.0012.2340
<b>Word count:</b>	5580
<b>Tables:</b>	1
<b>Figures:</b>	4
<b>References:</b>	87

**Adres autorki:** dr Wioletta Olejarz, Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. S. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: wioletta.olejarz@wum.edu.pl

## WPROWADZENIE

W walce z patogenami organizm uruchamia zarówno mechanizmy odpowiedzi nieswoistej, czyli wrodzonej (*innate*), jak i swoistej, czyli nabytej (*adaptive*) [21,71]. Głównymi komórkami odpowiedzi nieswoistej są makrofagi, natomiast w mechanizmy odpowiedzi swoistej są zaangażowane limfocyty T i B. Ważnym ogniwem łączącym odporność nieswoistą z odpornością swoistą są receptory Toll-podobne (Toll-like receptors), które uczestniczą w przekazywaniu sygnałów do wnętrza komórki, uruchamiając procesy mające na celu usunięcie patogenu z organizmu [69,78]. Receptory TLR umożliwiają komórkom układu immunologicznego odróżnianie antygenów własnych od obcych. Pierwszym zidentyfikowanym receptorem TLR był receptor rozpoznający lipopolisacharyd (LPS), główny składnik ściany bakterii Gram-ujemnych, zwany również endotoksyną [13,27]. W oparciu o badania na myszach transgenicznym pozbawionych TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) wykazano, że receptorem rozpoznającym LPS wyizolowanym z bakterii Gram-ujemnych jest receptor TLR4 [28]. Ważną rolę w procesie aktywacji receptora TLR4 przez LPS odgrywa także białko wiążące lipopolisacharyd – LBP (lipopolysaccharide binding protein). LBP przekazuje cząsteczkę LPS kompleksowi TLR4/CD14. Niedawne doniesienia wskazują, że białko LBP uczestniczy w wewnątrzkomórkowej aktywacji receptora TLR4, która prowadzi do indukcji IFN-β. Wykazano, że białko LBP jest niezbędne w fosforylacji N-terminalnych kinaz c-Jun, kinazy tyrozynowej 2, czynnika IRF3, p38 oraz STAT1 [34]. Zhao i wsp. wskazali, że LPS indukuje również ekspresję receptora lecytynopodobnego dla utlenionej lipoproteiny o niskiej gęstości (LOX-1) poprzez szlak aktywowany przez TLR4/MyD88/ROS p38MAPK/NF-κB w komórkach śródbłonna [87].

## BUDOWA I WYSTĘPOWANIE TLR

Receptory TLR są glikoproteinami typu I, zawierającymi pojedynczą transbłonową helisę, która łączy domenę odpowiadającą za wiązanie liganda umiejscowioną na końcu aminowym białka, z domeną sygnałową z końca karboksylowego receptora. Dotychczas zidentyfikowano i opisano trzynaście receptorów TLR występujących u ssaków, dziesięć z nich występuje u ludzi [33]. Receptory występujące u ssaków są zbudowane z 3 części: domeny wewnątrzkomórkowej wykazującej duże podobieństwo do receptora IL-1 i nazwanej Toll/IL-1

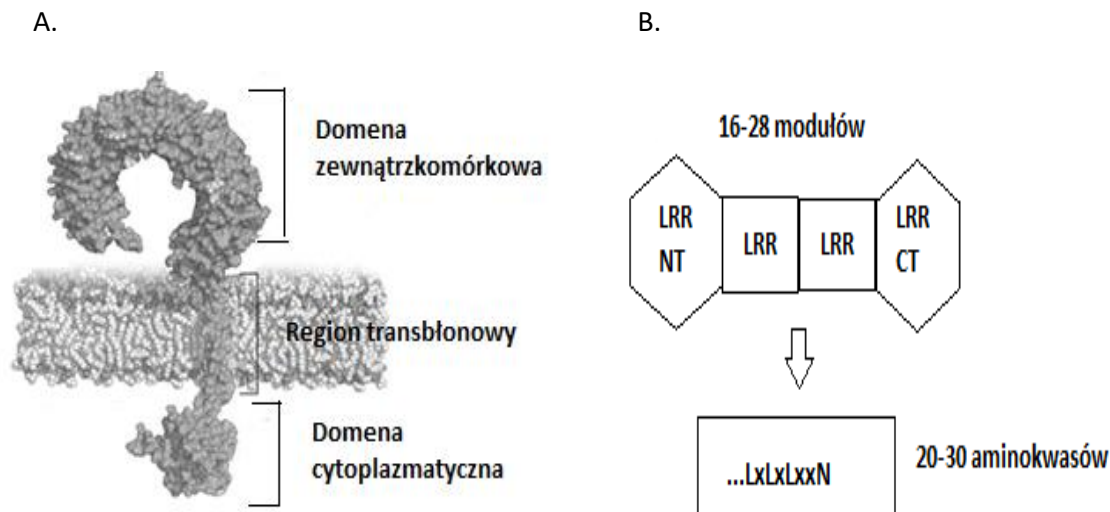
receptor (TIR), części transbłonowej oraz części zewnątrzkomórkowej mającej domenę zawierającą powtórzenia bogate w leucynę (LRR – leucine rich repeats). Domena zewnątrzkomórkowa jest odpowiedzialna za wiązanie oraz identyfikację ligandów, a wewnątrzkomórkowa wiąże liczne białka adaptorowe [45] (ryc. 1).

Większość receptorów TLR wykorzystuje białko MyD88 (myeloid differentiation factor 88), które łączy się z domeną TIR tych receptorów. Białkami uczestniczącymi w MyD88 zależnej drodze sygnałowej są IRAK-1 (IL-1-R-associated kinase), IRAK-4, TRAF-6 (TNFR-associated factor), kompleks TAK1/TAB oraz MAP kinazy. TLR2 i TLR4 używają dodatkowo strukturalnie podobnego do MyD88 białka TIRAP/Mal (TIR – domain-containing adaptor protein) [26]. Przez te białka dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB (nuclear factor-κB) i wydzielania cytokin prozapalnych. TLR4 wykorzystuje jednocześnie MyD88-zależną i -niezależną kaskadę sygnałową [17]. Natomiast TLR3 wykorzystuje m.in. białko adaptorowe TRIF/TICAM-1 w celu aktywacji czynnika transkrypcyjnego IRF-3, co powoduje wydzielanie INF-β [57,80]. Ligandy wiązane przez receptory Toll-podobne i wytwarzane cytokiny przedstawiono w tab.1.

TLR występują właściwie we wszystkich komórkach organizmu, a ich ekspresja jest zmienna. Monocyty/makrofagi wykazują ekspresję wszystkich TLR poza TLR3 [38]. Na komórkach dendrytycznych występują różne rodzaje TLR [31]. Komórki tuczne preferencyjnie wytwarzają TLR2, 4, 6 oraz 8 [52]. Ekspresję TLR wykazują komórki nabłonka oddechowego [77], jelitowego [72], dróg moczowych [79], rogówki [65], dziąsła [7], fibroblasty [61] oraz komórki śródbłonna naczyniowego [16]. Receptory TLR1, 2, 4, 5 oraz 6 występują na powierzchni błony komórkowej, pozostałe znajdują się w przestrzeni wewnątrzkomórkowej (endosomy) [22].

## MECHANIZM AKTYWACJI TLR

Receptory Toll-podobne rozpoznają tzw. wzorce molekularne związane z patogenami – PAMP (pathogen associated molecular patterns), do których należą lipopolisacharydy – LPS, peptoglikany, kwas lipotejchowy, lipoproteiny [50], a także molekuly uwolnione z uszkodzonych komórek – DAMP (damage associated molecular patterns), takie jak wolne kwasy tłuszczowe,



**Ryc. 1.** Budowa receptorów Toll-podobnych; A - model monomeru receptora TLR w błonie komórkowej na przykładzie TLR3 (wg [87], zmodyfikowany), B- schemat budowy domeny zewnątrzkomórkowej receptora TLR, zawierającej powtórzenia bogate w leucynę LRR (wg [33], zmodyfikowany)

oxLDL (oxidized low-density lipoprotein), fibronektyna, HSP (heats hock protein), CpG DNA (DNA zawierający niemetylowane sekwencje CpG) [86]. Połączenie PAMP lub DAMP z odpowiednim TLR wyzwala kaskadę sygnałową wewnątrz komórki, powodując wytwarzanie cytokin oraz aktywację wczesnej odpowiedzi immunologicznej. Jest ona bodźcem do wykształcenia swoistej odpowiedzi nabytej [2]. PAMP odgrywają istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej przez udział w indukcji zarówno limfocytów T-regulatorowych, jak również komórek kontrsupresyjnych [51].

Główna droga aktywacji receptorów TLR jest zależna od białka adaptorowego MyD88. Podczas pobudzenia receptora TLR, komponenta MyD88 łączy się domeną TIR bezpośrednio z receptorem TLR (TLR5, TLR7, TLR9) lub za pośrednictwem białka adaptorowego TIRAP (TLR2, TLR4). Dochodzi wówczas do aktywacji kinazy IRAK4, co powoduje fosforylację kolejnej kinazy IRAK-1 [73]. Powstająca aktywna kinaza IRAK1 zostaje uwolniona do cytoplazmy, gdzie łączy się z czynnikiem TRAF6, powodując aktywację kompleksu TAK1/TAB. Pobudzony kompleks TAK1/TAB aktywuje kinazę czynnika IκB (IKK) oraz kinazę MAP (mitogen-activated protein) [23]. Aktywna kinaza IKK powoduje fosforylację i degradację czynnika IκB (inhibitor czynnika NF-κB) prowadząc do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego NF-κB, który wnika do jądra komórkowego i indukuje ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne (ryc. 2).

Do białek adaptorowych, zaangażowanych w transdukcję sygnału aktywacji receptorów TLR, należą: TIRAP (TIR-domain-containing adapter protein), TRIF (TIR-domain-containing adapter inducing IFN-β) oraz TRAM (TRIF-related adapter molecule) [83]. Wykazano, że

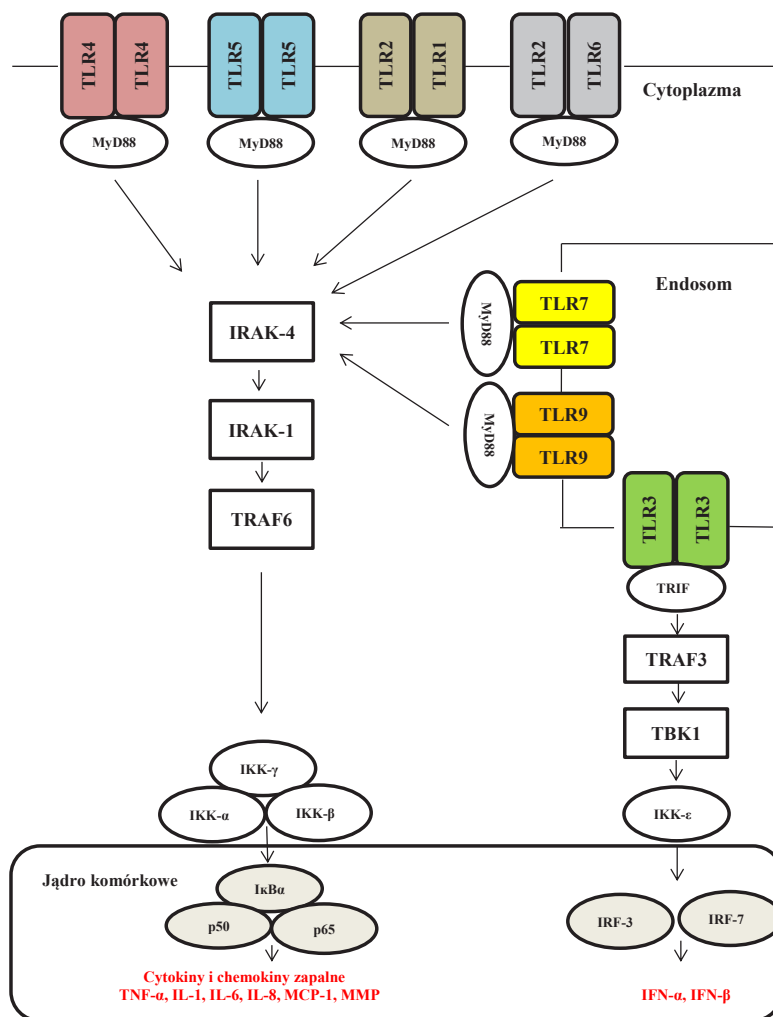
białko TIRAP odgrywa istotną rolę w MyD88-zależnej transdukcji sygnału pochodzącego z receptorów TLR4 oraz TLR2 [81]. Białko TRIF uczestniczy w MyD88-niezależnej drodze aktywacji receptorów TLR3 i TLR4, które w odpowiedzi na dsRNA i LPS powodują aktywację czynnika IRF-3 (interferon regulatory factor 3) i syntezy IFN-β. Na aktywację czynnika NF-κB w wyniku stymulacji receptorów TLR3 mają również wpływ kinazy RIP (receptor interacting protein): RIP1 i RIP3 [54]. Stwierdzono, że brak kinazy RIP1 obniża aktywację czynnika NF-κB, natomiast nie ma wpływu na aktywację kinazy JNK i syntezę IFN-β. Wykazano również, że kinaza RIP3 hamuje drogę aktywacji czynnika NF-κB poprzez białko TRIF. Receptor TLR3 jest zaliczany do receptorów zależnych od kinazy RIP. Białko adaptorowe TRAM bierze udział w MyD88-niezależnej aktywacji receptora TLR4 a jego brak zmniejsza syntezę cytokin prozapalnych oraz osłabia proliferację splenocytów w odpowiedzi na LPS [82].

### MONOCYTY/MAKROFAGI W PATOGENEZIE MIAŻDŻYCY – ROLA TLR

Cechą charakterystyczną zarówno wczesnych jak i późnych etapów rozwoju miażdżycy jest obecność monocytów/makrofagów oraz limfocytów w błonie wewnętrznej ściany naczynia [64]. Osiadłe w ścianie naczynia monocyty przekształcają się w aktywne makrofagi, co jest związane między innymi z pojawieniem się na ich powierzchni ekspresji receptorów zmiatających (scavenger receptors). Na drodze endocytozy zależnej od tych receptorów makrofagi pochłaniają obce antygeny, zmodyfikowane lipoproteiny (oksydowane oraz acetylowane LDL) i ciała apoptotyczne. Ekspresja receptorów zmiatających nie jest zwrotnie regulowana (jak np.

**Tabela 1.** Ligandy wiązane przez receptory Toll-podobne i białka efektorowe [1]

TLR	Lokalizacja	Ligandy PAMP	Ligandy DAMP	Analogi syntetyczne	Białka adaptorowe	Białka efektorowe
TLR2-1	Błona komórkowa	- lipoproteiny Mycobacterium - triacylowane lipopeptydy (Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> )	nieznane	- triacylowe lipopeptydy	MAL/MyD88	cytokiny prozapalne
TLR2-6	Błona komórkowa	- lipoproteiny Mycoplasma - kwas lipoteichojowy - peptydoglikan - zymosan	- białka szoku cieplnego - HMGB1 - wersikan - kwas hialuronowy	- diacylowe lipopeptydy	MAL/MyD88	cytokiny prozapalne
TLR 3	Błona pęcherzyków endosomalnych	- Poly(I:C) (dwuniciowe RNA wirusów)	- mRNA	- Poly(I:C) - Poly(I:C <sub>12</sub> U)	TRIF	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR 4	Błona komórkowa/ /błona pęcherzyków endosomalnych	- lipopolisacharyd (LPS) - wirus RSV (respiratory syncytial virus)	- białka szoku cieplnego - HMGB1 - β-defensyna 2 - fragment domeny A fibronektyny - kwas hialuronowy - siarczan heparanu - fibrynogen - utlenione fosfolipidy	- mimetyki lipidu A (monofosforylowy lipid A, 4- fosforan aminoalkiloglukozaminy) - E6020 - E5531 - E5564	MAL/MyD88 TRAM/TRIF	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR 5	Błona komórkowa	- flagellina	nieznane	- Nieciągły peptyd 13-aminokwasowy CBLB502	MyD88	cytokiny prozapalne
TLR 7	Błona pęcherzyków endosomalnych	- pojedyncza nić RNA wirusów (ssRNA) - imidazochinoliny, - analogi guanozyny (loxoribine)	- ssRNA (kompleks immunologiczny)	- oligonukleotydy - imidazochinolina - nukleotydy guanozyny - broprimine	MyD88	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR 8	Błona pęcherzyków endosomalnych	- pojedyncza nić RNA wirusów (ssRNA)	- ssRNA (kompleks immunologiczny)	- imidazochinoliny (Resiquimod)	MyD88	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR 9	Błona pęcherzyków endosomalnych	- bakteryjne i wirusowe niemetylowane sekwencje CpG DNA - hemozoina Plasmodium	- kompleksy IgG-chromatyna	- oligodeoksynukleotydy CpG	MyD88	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR 10	Błona komórkowa	- cząsteczka profilinopodobna	nieznane	nieznane	MyD88	cytokiny prozapalne
TLR 11	Błona pęcherzyków endosomalnych	- cząsteczka profilinopodobna - bakterie uropatogenne	nieznane	nieznane	MyD88	cytokiny prozapalne
TLR 12	Błona pęcherzyków endosomalnych	- cząsteczka profilinopodobna	nieznane	nieznane	MyD88	cytokiny prozapalne
TLR 13	Błona pęcherzyków endosomalnych	- bakteryjne rRNA 23S	nieznane	nieznane	MyD88	cytokiny prozapalne



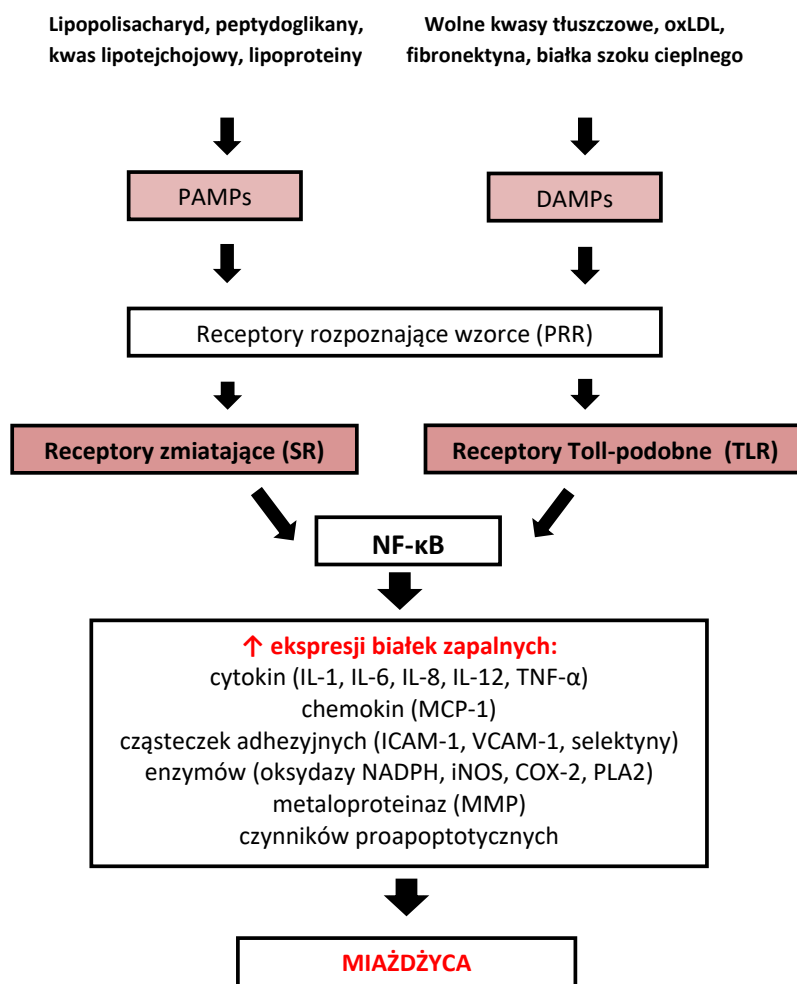
**Ryc. 2.** Schemat mechanizmu aktywacji TLR; IFN – interferon, IKK – inhibitor kinazy κB, IκB – inhibitor κB, IRAK – kinaza powiązana z interleukiną, IRF – interferonowy regulator czynnika, MMP – metaloproteinazy, MyD88 – czynnik różnicujący białaczki, TLR – receptor Toll-podobny, TNF-α – czynnik martwicy nowotworu, TRAM – cząsteczka adaptacyjna TRIF-powiązana, TRIF – domena zawierająca adapter indukujący IFN-β

ekspresja receptorów dla LDL), co prowadzi do niekontrolowanej akumulacji lipidów i powstania charakterystycznych dla miażdżycy komórek piankowatych [44]. Aktywacja znajdujących się na powierzchni makrofagów receptorów TLR, prowadzi do wzmożonej syntezy cytokin prozapalnych: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 oraz TNF-α. Stymulacja receptorów TLR4 zwiększa zdolności fagocytarne makrofagów oraz powoduje wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) oraz syntezę tlenku azotu (NO) [47]. Ponadto makrofagi aktywowane przez receptory TLR zwiększają ekspresję antygenów zgodności tkankowej MHC I i MHC II oraz molekuł CD80, CD86, co z kolei sprawia, że komórki te efektywniej prezentują antygeny limfocytom T i indukują swoistą odpowiedź immunologiczną [9,84] (ryc. 3).

Równowaga w MyD88-zależnej oraz TRIF-zależnej sygnalizacji TLR ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowej funkcji odporności [29]. Wang i wsp. wykazali, że Nrdp1

(ligaza ubikwitynowa E3) hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych, natomiast zwiększa wytwarzanie IFN-β w makrofagach, w których doszło do aktywacji TLR. Jest to możliwe dzięki hamowaniu MyD88-zależnej aktywacji NF-κB poprzez ubikwitynację MyD88 [74]. Alternatywny mechanizm zaproponowali Liu i wsp. Wykazali bowiem, że wewnątrzkomórkowe cząsteczki MHC klasy II w komórkach prezentujących antygen mogą aktywować zarówno kaskady MyD88, jak i TRIF, prowadząc do wytwarzania cytokin prozapalnych i interferonów [46].

Wykazano, że receptory Toll-podobne mogą bezpośrednio wpływać na powstawanie zmian miażdżycowych, gdyż stymulacja makrofagów ligandami TLR2, TLR4 i TLR9 promuje wychwytywanie lipidów przez te komórki, co prowadzi do powstawania komórek piankowatych [70]. Badania eksperymentalne z wykorzystaniem myszy pozbawionych Apolipoproteiny E (ApoE<sup>-/-</sup>) wykazały, że TLR4 oraz TLR2 sprzyjają akumulacji

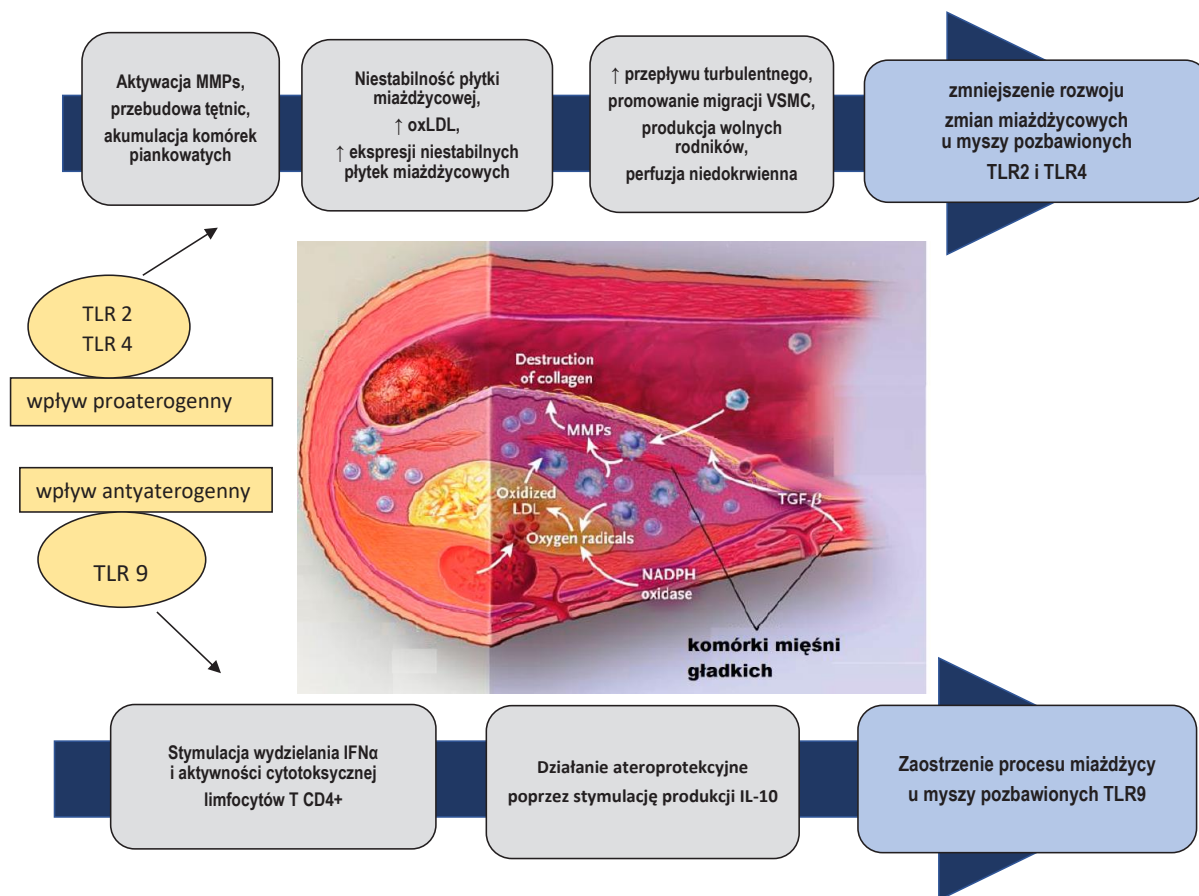


**Ryc. 3.** Schemat aktywacji odporności wrodzonej z udziałem receptorów zmiatających oraz receptorów Toll-podobnych; TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu- $\alpha$ , COX-2 - cyklooksygenaza-2, PLA2 - fosfolipaza A2, iNOS – indukowana syntaza tlenu azotu

komórek piankowatych w aorcie [24]. Zaobserwowano również zwiększoną ekspresję TLR2 w komórkach śródbłonna w miejscach podatnych na miażdżycę, takich jak wewnętrzna krzywizna łuku aorty [58]. Ponadto TLR2 promują migrację komórek naczyniowych mięśni gładkich (VSMC) z tunica media do intima w sposób zależny od IL-6 [40].

Wykazano, że TLR4 stymulują makropinocytozę lipidów w zróżnicowanych makrofagach [11]. Zwiększone wychwytywanie lipidów może być również regulowane poprzez ekspresję receptorów zmiatających indukowanych przez TLR3 i TLR9 [14]. TLR i ich ligandy mogą zakłócać także mechanizmy wpływu cholesterolu, co może się przyczyniać do powstawania komórek piankowatych. Myszy ApoE<sup>-/-</sup> z niedoborem receptorów TLR4 i TLR2 ujawniły zmniejszenie rozwoju zmian miażdżycowych o 55%, a u myszy ApoE<sup>-/-</sup> z niedoborem receptora TLR4 zaobserwowano zmniejszenie infiltracji makrofagów o 65% [55,59]. Zmniejszeniu rozmiaru tych

zmian chorobowych w naczyniach u zwierząt z niedoborem TLR2 i TLR4 towarzyszyło obniżenie obwodowego poziomu CCL2, chemokiny kluczowej dla rekrutacji monocytów do blaszek miażdżycowych [8,15]. Całkowita utrata receptora TLR2 u myszy podatnych na miażdżycę LDLR<sup>-/-</sup> prowadzi do redukcji zmian miażdżycowych [59]. Okazało się, że niedobór MyD88, białka od którego zależy sygnalizacja TLR2, skutkuje zmniejszeniem nasilenia miażdżycy aorty u myszy ApoE<sup>-/-</sup> [56]. W badaniu tym zaobserwowano obniżenie poziomu krążących cytokin prozapalnych, białka chemotaktycznego dla monocytów, liczby makrofagów i innych czynników, które odgrywają istotną rolę w progresji miażdżycy. Ponadto wykazano, że blokada TLR2 może doprowadzić do zmniejszenia wytwarzania cytokin prozapalnych, chemokin i metaloproteinaz poprzez zahamowanie aktywacji NF- $\kappa$ B. Satoh i wsp. wykazali wyższy poziom ekspresji mRNA dla TLR4 u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym niż ze stabilną dusznicą bolesną [66]. Również Gargiulo i wsp. powiązali TLR4 z niestabilnością blaszki



Ryc. 4. Udział TLR w patogenezie miażdżycy (wg [20, 63], zmodyfikowano); TGF-β - transformujący czynnik wzrostu β, MMPs - metaloproteinazy

miażdżycowej. Wykazali bowiem, że cząsteczki oxLDL, kumulujące się w blaszkach miażdżycowych nasilają uwalnianie cytokin prozapalnych i prowadzą do wydzielania MMP-9 w sposób zależny od TLR4/NF-κB [19,20] (ryc.4).

#### LIMFOCYTY W PATOGENIEZIE MIAŻDŻYCY – ROLA TLR

Obecne w płytce miażdżycowej limfocyty T, to limfocyty pomocnicze CD4<sup>+</sup> i limfocyty cytotoksyczne CD8<sup>+</sup>, przy czym zazwyczaj dominują CD4<sup>+</sup>. Odpowiedź limfocytów T jest inicjowana w momencie zetknięcia się „naiwnych” limfocytów T z komórkami prezentującymi antygen, takimi jak komórki dendrytyczne i makrofagi. Na powierzchni limfocytów T znajdują się receptory TCR, które mają zdolność swoistego wiązania antygenu połączonego z MHC (Major Histocompatibility Complex – główny układ zgodności tkankowej). CD8<sup>+</sup> rozpoznają peptydy prezentowane przez MHC klasy I a limfocyty CD4<sup>+</sup> przez MHC klasy II. Wysoka ekspresja HLA-DR (MHC-II) na komórkach prezentujących antygen i interakcje z limfocytami T są szczególnie widoczne w obszarach blaszek miażdżycowych, podatnych na pęknięcia [85].

Do efektywnej aktywacji limfocytów T, oprócz połączenia TCR z antygenami prezentowanymi przez cząsteczki

MHC, niezbędne są jednoczesne interakcje odpowiednich białek na limfocytach i komórkach prezentujących antygen. W patogenezie miażdżycy najbardziej poznana parą jest CD40L (CD154) na limfocytach i CD40 na komórkach prezentujących antygen. Z badań *in vitro* wynika, że interakcje między CD40L na limfocytach a CD40 na innych komórkach powodują ich aktywację, co promuje ekspresję czynników zaangażowanych w proces miażdżycy [4].

Interakcje między limfocytami T a komórkami prezentującymi antygen mogą prowadzić do powstania różnych typów limfocytów. Wśród limfocytów CD4<sup>+</sup>, których jest najwięcej w płytce miażdżycowej, dominują limfocyty Th1, odpowiedzialne za odpowiedź komórkową i wydzielające IFN-γ (interferon-γ), IL-2 i TNF-α. Dużo rzadziej występują zaś limfocyty Th2 związane z odpowiedzią humoralną, wydzielające IL-4, IL-5 i IL-10. Obecność limfocytów Th1 będących źródłem TNF-α i IFN-γ stymuluje proces miażdżycowy i sprzyja powstawaniu niestabilnej blaszki miażdżycowej. IFN-γ

jest silnym aktywatorem makrofagów, ponadto stymuluje on ekspresję śródbłonkowych cząsteczek adhezyjnych i tym samym nasila rekrutację jednojądrzastych leukocytów. IFN-γ hamuje również proliferację komór-

rek i infiltrację mięśni gładkich oraz syntezę kolagenu, nasila produkcję metaloproteinaz oraz jest czynnikiem indukującym apoptozę komórek mięśni gładkich i makrofagów. W ten sposób przyczynia się do osłabienia czapeczki łącznotkankowej i w konsekwencji do powstania płytki podatnej na pęknięcie lub do jej pęknięcia [53].

Badania wskazują, że istotną rolę w rozwoju miażdżycy mogą odgrywać tzw. limfocyty T regulatorowe (Treg). Zaobserwowano, że Treg hamują odpowiedź Th1 i Th2 w następstwie bezpośredniego kontaktu lub za pośrednictwem wydzielanych cytokin o silnych właściwościach immunosupresyjnych, takich jak IL-10 i transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ; TGF- $\beta$ ). Jednocześnie wydzielane przez inne komórki IL-10 i TGF- $\beta$  indukują różnicowanie limfocytów Treg. W efekcie przewaga odpowiedzi immunologicznej regulatorowej (Treg) nad efektorową (Th1 lub Th2) zmniejsza ryzyko rozwoju miażdżycy [53].

W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że stymulacja TLR4 przez LPS prowadzi do proliferacji oraz zwiększonej aktywności komórek Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Mechanizm aktywacji komórek Treg przez LPS nie jest jednak dokładnie poznany. Komórki Treg poza ekspresją receptorów TLR4, zawierają również receptory TLR5, TLR7 oraz TLR8. Można przypuszczać, że komórki te są bezpośrednio aktywowane przez LPS, jednak nie można wykluczyć, że mogą być w to również zaangażowane komórki prezentujące antygen (APC – Antigen Presenting Cell). Właśnie ten drugi mechanizm aktywujący komórki Treg okazał się dominującym w przypadku zakażeń wywołanych przez *Bordetella pertussis*, gdzie stymulacja TLR4 na komórkach APC powodowała wytwarzanie IL-10 [25]. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku badań nad indukacją komórek Treg podczas zakażeń wywołanych *Candida albicans*. Netea i wsp. wykazali, że infekcja *Candida albicans* prowadzi do immunosupresji poprzez aktywację receptorów TLR2, prowadzącą do syntezy IL-10 oraz zwiększającą przeżywalność komórek Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> [60].

## RECEPTORY TOLL-PODOBNE JAKO CEL TERAPII PRZECIWMIAŻDŻYCOWEJ

Strategie terapeutyczne wykorzystywane do zmniejszenia nadmiernej aktywacji TLR polegają na stosowaniu antagonistów, blokujących wiązanie ligandów lub kompleksów białko-ligand z receptorami lub antagonistami [32,42]. Antagoniści opracowani do tej pory obejmują małe cząsteczki, oligonukleotydy, peptydy, białka i przeciwciała [1]. W badaniach Arslan i wsp. wykazali, że przeciwciała monoklonalne anti-TLR2 (OPN-301) powoduje redukcję infiltracji neutrofilów, makrofagów i T-limfocytów jak również zmniejszenie wytwarzania cytokin prozapalnych TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  i GM-CSF [5]. Użycie przeciwciała anti-TLR2 (OPN-305) powodowało redukcję rozmiaru zawału serca, zachowywanie funkcji skurczowej i ostatecznie zapobiegało uszkodzeniu mięśnia sercowego na modelu świni [6,75].

TLR4 znajduje się na powierzchni komórki i aktywuje kaskady prozapalne z udziałem NF- $\kappa$ B. Liczne badania potwierdzają rolę tego receptora w patogenezie miażdżycy. Wykazano zależność między polimorfizmem Asp299Gly ludzkiego receptora TLR4, a zmniejszonym ryzykiem rozwoju miażdżycy w tętnicy szyjnej [36]. U pacjentów, u których stwierdzono ten polimorfizm, zaobserwowano niższe stężenia krążących cytokin prozapalnych, a także fibrynogeny. Myszy ApoE<sup>-/-</sup> z niedoborem TLR4 lub MyD88 wykazują osłabiony rozwój miażdżycy poprzez obniżoną rekrutację makrofagów do ściany tętnicy, co jest związane ze zredukowanym poziomem chemokin [3,55]. Badania przeprowadzone przez Lu i wsp. wykazały, że podawanie antagonisty TLR4 przyczynia się do hamowania zapalenia i procesu miażdżycy u myszy ApoE<sup>-/-</sup> chorych na cukrzycę [48]. Ponadto zaobserwowano, że zastosowanie melatoniny u królików spowodowało obniżenie ekspresji TLR4, MyD88 i NF- $\kappa$ B, a w konsekwencji hamowało dysfunkcję śródbłonna, proces zapalny i progresję miażdżycy tętnic [30]. Również Guan i wsp. wskazali, że TLR4 może odgrywać kluczową rolę w migracji VSMC, co przyczynia się do rozwoju miażdżycy tętnic. Wykazali bowiem, że TLR4 promują migrację VSMC poprzez wywołaną CREB produkcję IL-6 sygnalizowaną za pomocą kinazy p38 MAPK i ERK1/2, które pośredniczą w szlakach zależnych od MyD88 i TRIF [41]. Wang i wsp. wykazali, że inhibitor TLR4 (CLI-095) jest zdolny do skutecznego zmniejszania miażdżycy tętnic u myszy ApoE<sup>-/-</sup> przez hamowanie tworzenia komórek piankowatych. Wyniki te sugerują, że TLR4 może być uważany za potencjalny cel terapeutyczny w zapobieganiu progresji miażdżycy [76]. Ponadto, Ramani i wsp. wykazali, że peptyd określany jako SPA4 ingeruje w kontakt pomiędzy białkiem A surfaktantu a TLR4 i blokuje aktywację sygnalizacji TLR4. Badania wykazały zmniejszoną aktywność NF- $\kappa$ B i zmniejszone wydzielanie TNF- $\alpha$  po leczeniu SPA4. Co więcej, SPA4 hamował zapalenie wywołane LPS i łagodził endotoksyczne objawy podobne do wstrząsu na modelu myszy, co wskazuje na aktywność przeciwzapalną tego peptydu [62].

Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych miażdżycy wykazały, że poprzez inaktywację farmakologiczną szlaków TLR9 dochodzi do spowolnienia powstawania zmian miażdżycowych i wzmocnienia niestabilnych blaszek miażdżycowych. Zastosowanie IRS869 u myszy ApoE<sup>-/-</sup> skutkowało inaktywacją TLR9 i w konsekwencji zmniejszeniem rozmiaru oraz składu blaszki miażdżycowej w kierunku zmian bardziej stabilnych [49]. Potencjalnym kandydatem w leczeniu chorób o podłożu zapalnym może być IMO-3100, który jest antagonistą TLR7 i TLR9 [39]. Suarez-Farinas i wsp. w badaniach przedklinicznych wykazali, że IMO-3100 hamuje produkcję cytokin prozapalnych indukowaną przez receptory TLR7 i TLR9. Stymulacja TLR9 upośledzała reendotelizację po ostrym urazie naczyniowym i promowała rozwój blaszki miażdżycowej w modelu zapalenia skóry u myszy [68]. Wyniki uzyskane przez Li i wsp. sugerują, że CpG-ODN c41 (CpG-Containing Oligodeoxy-



nucleotide) wyizolowany z *Pseudomonas aeruginosa* może zapobiegać odpowiedzi zapalnej z udziałem receptorów TLR9. Działanie takie zaobserwowano w komórkach mysich i ludzkich monocytach [42].

Liczne badania wskazują na aterogenne działanie receptorów TLR2, TLR4, TLR7 i TLR9 [35,63], jednak niektórzy sugerują, że TLR9 chronią przed miażdżycą. Wykazali bowiem, że aktywacja TLR9 stymulowała produkcję interleukiny-10, która z kolei hamowała ekspresję INF- $\alpha$  wydzielanego przez komórki dendrytyczne i hamowała proliferację limfocytów T CD4 + CD25 + [10]. W celu wyjaśnienia roli TLR9 w miażdżycy Koullis i wsp. użyli modeli myszy pozbawionych genów TLR9 i ApoE. Wykazali 33% wzrost odkładania lipidów i wielkości blaszki miażdżycowej u myszy ApoE -/- i TLR9 -/- w porównaniu do myszy ApoE -/-. Co więcej, zaobserwowali znaczną akumulację makrofagów, komórek dendrytycznych i limfocytów T CD4+ w naczyniach u myszy ApoE -/ - i TLR9 -/-. Genetyczna delecja receptora TLR9 nasilała miażdżycę tętnic u myszy ApoE -/- karmionych dietą wysokotłuszczową. Limfocyty T CD4+ okazały się potencjalnymi mediatorami tego efektu. Agonista TLR9 (typ B CpG ODN) zmniejszał nasilenie zmian chorobowych, tym samym wskazując na nowe możliwości terapeutyczne w miażdżycy tętnic [37].

Ochronną rolę tych receptorów w patogenezie miażdżycy, zaobserwowano również w przypadku TLR3. Udowodniono bowiem, że myszy pozbawione TLR3 wykazywały przyspieszony rozwój zmian miażdżycowych. Natomiast zastosowanie agonisty TLR3 (Poly(I:C)) redukowało zmiany naczyniowe, co wskazuje na protekcyjną rolę tego receptora w patogenezie miażdżycy

[12,18]. Z ostatnich badań wynika również, że TLR3 i TLR4 mogą być potencjalnymi nieinwazyjnymi biomarkerami choroby wieńcowej oraz restenozy w sten-  
[67,43].

## PODSUMOWANIE

Wzrastająca liczba dowodów wskazuje na udział receptorów Toll-podobnych w patogenezie miażdżycy. Z dotychczasowych badań wynika, że blokowanie TLR2 i TLR4 może ograniczać powstawanie zmian chorobowych oraz rozwój stanu zapalnego, podczas gdy blokada TLR2 redukuje dodatkowo rozmiar zawału. Wykazano, iż aktywacja receptorów powierzchniowych pobudza produkcję cytokin prozapalnych oraz stymuluje makrofagi do pochłaniania lipidów, podczas gdy aktywacja receptorów wewnątrzkomórkowych może hamować rozwój miażdżycy. Wydaje się, że modulacja odpowiedzi zapalnej z udziałem tych receptorów jest nowym celem terapeutycznym w leczeniu miażdżycy, co może mieć ogromne korzyści kliniczne w zapobieganiu chorobom sercowo-naczyniowym. Dużym wyzwaniem w rozwoju negatywnych lub pozytywnych regulatorów TLR są liczne szlaki sygnalizacyjne kinaz, czynników transkrypcyjnych i regulatorowych, dlatego opracowanie zasad TLR-celowanego leczenia miażdżycy oraz ocena efektywności takiej terapii wymaga dalszych, szczegółowych badań.

## KONFLIKT INTERESÓW

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Achek, A., Yesudhas, D., Choi, S.: Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. Archives of Pharmacol. Research, 2016;39: 1032-1049.
- [2] Akira S., Takeda K., Kaisho T.: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol., 2001; 2: 675-680
- [3] Akira S., Takeda K.: Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol., 2004; 4: 499-511
- [4] Andersson J., Libby P., Hansson G.K.: Adaptive immunity and atherosclerosis. Clin. Immunol., 2010;134:33-46
- [5] Arslan F., Smeets M.B., O'Neill L.A., Keogh B., McGuirk P., Timmers L., Tersteeg C., Hoefler I.E., Doevendans P.A., Pasterkamp G., de Kleijn D.P.: Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. Circulation, 2010; 121: 80-90
- [6] Arslan, F., Houtgraaf, J.H., Keogh, B., Kazemi K., de Jong R., McCormack W.J., O'Neill L.A., McGuirk P., Timmers L., Smeets M.B., Akeroyd L., Reilly M., Pasterkamp G., de Kleijn D.P.: Treatment with OPN-305, a humanized anti-Toll-Like receptor-2 antibody, reduces myocardial ischemia/reperfusion injury in pigs. Circ. Cardiovasc. Interv., 2012; 5: 279-287
- [7] Beklen A., Hukkanen M., Richardson R., Konttinen Y.T.: Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. Oral Microbiol. Immunol., 2008; 23: 425-431
- [8] Bjorkbacka H., Kunjathoor V.V., Moore K.J., Koehn S., Ordija C.M., Lee M.A., Means T., Halmen K., Luster A.D., Golenbock D.T., Freeman M.W.: Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. Nat. Med. 2004;10:416-21
- [9] Blander J.M., Medzhitov R.: Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. Science, 2004; 304: 1014-1018
- [10] Bouaziz J.D., Calbo S., Maho-Vaillant M., Saussine A., Bagot M., Bensussan A., Musette P.: IL-10 produced by activated human B cell regulates CD4+ T-cell activation *in vitro*. European Journal of Immunology, 2010; 40:2686-91
- [11] Choi S.H., Harkewicz R., Lee J.H., Boullier A., Almazan F., Li A.C., Witztum J.L., Bae Y.S., Miller Y.I.: Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. Circ. Res., 2009;104: 1355-63

- [12] Cole J.E., Navin T.J., Cross A.J., Goddard M.E., Alexopoulou L., Mitra A.T., Davies A.H., Flavell R.A., Feldmann M., Monaco C.: Unexpected protective role for Toll-like receptor 3 in the arterial wall. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 2011;108:2372-7
- [13] Czerkies M., Kwiatkowska K.: Receptory Toll-podobne (TLR) i ich udział we wrodzonej odpowiadzi odpornościowej na przykładzie aktywacji TLR4 przez lipopolisacharyd. *Postępy Biologii Komórki* 2013; 40: 39-64
- [14] Doyle S., O'Connell R., Miranda G., et al.: Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J. Exp. Med.*, 2004;199:81-90
- [15] Falck-Hansen M., Kassireridi C., Monaco C.: Toll-Like Receptors in Atherosclerosis: *Int. J. Mol. Sci.*, 2013;14:14008-14023
- [16] Faure E., Equils O., Sieling P.A., Thomas L., Zhang F.X., Kirschning C.J., Polentarutti N., Muzio M., Arditi M.: Bacterial lipopolysaccharide activates NF- $\kappa$ B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 11058-11063
- [17] Fitzgerald K. A., Palsson-Mcdermott E. M., Bowie A.G., Jefferies C.A., Mansell A.S., Brady G., Brint E., Dunne A., Gray P., Harte M.T., McMurray D., Smith D.E., Sims J.E., Bird T.A., O'Neill L.A.: Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 2001; 413:78-83
- [18] Gao W., Xiong Y., Li Q., Yang H.: Inhibition of Toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: a journey from molecular to Nano therapeutics. *Frontiers in physiology*, 2017;8:508. 1-20.
- [19] Gargiulo S., Gramanzini M., Mancini, M.: Molecular Imaging of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016;17: 1511.
- [20] Gargiulo S., Gamba P., Testa G., Rossin D., Biasi F., Poli G., Leonarduzzi G.: Relation between TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway activation by 27-hydroxycholesterol and 4-hydroxynonenal, and atherosclerotic plaque instability. *Aging Cell*, 2015; 14: 569-581
- [21] Hansson G.K., Libby P., Schönbeck U. Yan Z.Q: Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2002; 91:2812-91
- [22] Heil F., Ahmad-Nejad P., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Gellert T., Dietrich H., Lipford G., Takeda K., Akira S., Wagner H., Bauer S.: The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.*, 2003; 33: 2987-2997
- [23] Heynink K., De Valck D., Van den Berghe W., Van Criekinge W., Contreras R., Fiers W., Haegeman G., Beyaert R.: The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF- $\kappa$ B-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF-2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF- $\kappa$ B-inhibiting protein ABIN. *J. Cell. Biol.*, 1999; 145: 1471-1482
- [24] Higashimori M., Tatro J.B., Moore K.J., Mendelsohn M.E., Galper J.B., Beasley D.: Role of toll-like receptor 4 in intestinal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011;31:50-7
- [25] Higgins S.C., Lavelle E.C., McCann C., Keogh B., McNeela E., Byrne P., O'Gorman B., Jarnicki A., McGuirk P., Mills K.H.: Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3119-3127
- [26] Horng T., Barton G. M., Medzhitov R.: TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 2001; 2:835-841
- [27] Horseman M., Surani S., D Bowman J.: Endotoxin, Toll-like Receptor-4, and Atherosclerotic Heart Disease. *Current Cardiology Reviews*, 2017, 13: 86-93.
- [28] Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S.: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.*, 1999; 162:3749-3752
- [29] Hovland A., Jonasson L., Garred P., Yndestad A., Aukrust P., Lappegård K.T., Espevik T., Mollnes T.E.: The complement system and toll-like receptors as integrated players in the pathophysiology of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2015; 241:480-494.
- [30] Hu, Z. P., Fang, X. L., Fang, N., Wang, X. B., Qian, H. Y., Cao, Z., & Wang, Y.: Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the TLR4/NF- $\kappa$ B system in high-fat-fed rabbits. *Journal of pineal research*, 2013;55: 388-398
- [31] Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R.W., Kastelein R.A., Bazan F., Liu Y.J.: Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.*, 2001; 194: 863-869
- [32] Kandimalla E.R., Bhagat L., Wang D., Yu D., Sullivan T., La Monica N., Agrawal S.: Design, synthesis and biological evaluation of novel antagonist compounds of toll-like receptors 7, 8 and 9. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:3947-3961
- [33] Kang J.Y., Lee J.O.: Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu. Rev. Biochem.* 2011; 80: 917-941
- [34] Kato A., Ogasawara T., Homma T., Saito H., Matsumoto K.: Lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN- $\beta$  signaling pathway in human monocytes. *J. Immunol.*, 2004; 172:6185-6194
- [35] Kay E., Scotland R. S., Whiteford J. R.: Toll-like receptors: Role in inflammation and therapeutic potential. *Biofactors*, 2014; 40: 284-294
- [36] Kiechl S., Lorenz E., Reindl M., Wiedermann C.J., Oberholzer F., Bonora E., Willeit J., Schwartz D.A.: Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *New England Journal of Medicine*, 2002 ;347: 185-192.
- [37] Koulis C., Chen Y.C., Hausding C. Ahrens I, Kyaw TS, Tay C, Allen T, Jandeleit-Dahm K, Sweet MJ, Akira S, Bobik A, Peter K, Agrotis A.: Protective role for toll-like receptor-9 in the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2014; 34:516-25
- [38] Kowalczyk E., Siednienko J., Matuszyk J.: Regulacja odpowiedzi zapalnej zależnej od receptorów Toll-podobnych. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2013; 67: 201-213
- [39] Krogmann A.O., Lüsebrink E., Steinmetz M., Asdonk T., Lahrmann C., Lütjohann D., Nickenig G., Zimmer S.: Proinflammatory stimulation of toll-like receptor 9 with high dose CpG ODN 1826 impairs endothelial regeneration and promotes atherosclerosis in mice. *PLoS ONE*, 2016; 11, no. 1, article e0146326
- [40] Lee G.L., Chang Y.W., Wu J.Y., Wu M.L., Wu K.K., Yet S.F., Kuo C.C.: TLR 2 induces vascular smooth muscle cell migration through cAMP response element-binding protein-mediated interleukin-6 production. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2012; 32:2751-2760.
- [41] Lee G.L., Wu J.Y., Tsai C.S., Lin C.Y., Tsai Y.T., Lin C.S., Wang Y.F., Yet S.F., Hsu Y.J., Kuo C.C.: TLR4-Activated MAPK-IL-6 Axis Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Function. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17: 1394
- [42] Li Y., Cao H., Wang N., Xiang Y., Lu Y., Zhao K., Zheng J., Zhou H.: A novel antagonist of TLR9 blocking all classes of immunostimulatory CpG-ODNs. *Vaccine*, 2011;29:2193-2198
- [43] Liang S., Aiqun M., Jiwu L., Ping Z.: TLR3 and TLR4 as potential clinical biomarkers for in-stent restenosis in drug-eluting stents patients. *Immunologic Research*, 2016; 64: 424-430.
- [44] Libby P.: Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002;420:868-874
- [45] Liu L., Botos I., Wang Y., Leonard J.N., Shiloach J., Segal D.M., Davies D.R.: Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 2008; 320: 379-381

- [46] Liu X., Zhan Z., Li D., Xu L., Ma F., Zhang P., Yao H., Cao X.: Intracellular MHC class II molecules promote TLR triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nature Immunology*, 2011;12: 416-424
- [47] Lin J., Kakkar V., Lu X.: Essential roles of toll-like receptors in atherosclerosis. *Current Medicinal Chemistry*, 2016, 23: 431-454
- [48] Lu, Z., Zhang, X., Li, Y., Jin, J., & Huang, Y.: TLR4 antagonist reduces early-stage atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Endocrinology*, 2013;216: 61-71.
- [49] Ma C., Ouyang Q., Huang Z., Chen X., Lin Y., Hu W., Lin L.: Toll-like receptor 9 inactivation alleviated atherosclerotic progression and inhibited macrophage polarized to M1 phenotype in ApoE<sup>-/-</sup> mice., *Disease Markers*, 2015: 909572. doi: 10.1155/2015/909572
- [50] Mahanonda R., Pichyangkul S.: Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol.* 2007; 43:41-55
- [51] Majewska M., Szczepanik M.: Rola receptorów toll-podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i nabytej oraz ich funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2006; 60: 52-63
- [52] Malaviya R., Abraham S. N.: Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol. Rev.*, 2001; 179: 16-24
- [53] Mallat Z., Ait-Oufella H., Tegui A. Regulatory T cell response: potential role in the control of atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2005;16:518-524
- [54] Meylan E., Burns K., Hofmann K., Blancheteau V, Martinon F, Keller M, Tschopp J.: RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3 - induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 503-507
- [55] Michelsen K.S., Wong M.H., Shah P.K., Zhang W., Yano J., Doherty T.M., Akira S., Rajavashisth T.B., Ardit M.: Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; 101:10679-10684
- [56] Michelsen K.S., Ardit M.: Toll-like receptor signaling and atherosclerosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2006; 13:163-168
- [57] Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., Mantovani A.: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 2000, 164, 5998-6004
- [58] Mullick A.E., Soldau K., Kiosses W.B., Bell T.A. 3rd, Tobias P.S., Curtiss L.K.: Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J. Exp. Med.*, 2008; 205:373-83
- [59] Mullick A.E., Tobias P.S., Curtiss L.K.: Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest.*, 2005;115:3149-56
- [60] Netea M.G., Suttmuller R., Hermann C., Van der Graaf C.A., Van der Meer J.W., van Krieken J.H., Hartung T., Adema G., Kullberg B.J.: Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2004; 172: 3712-3718
- [61] Quinchia-Rios B. H., Guerrero M., Abozeid S., Bainbridge B., Darveau R., Compton T., Bertics P.J.: Downregulation of epidermal growth factor receptor-dependent signaling by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in life-expanded human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.*, 2008; 43: 290-304
- [62] Ramani V., Madhusoodhanan R., Kosanke S., Awasthi S.: A TLR4-interacting SPA4 peptide inhibits LPS-induced lung inflammation. *Innate Immun.*, 2013;19:596-610
- [63] Roshan M. H., Tambo A., Pace N. P.: The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *International journal of inflammation*, 2016:1532832
- [64] Ross R.: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New Eng. J. Med.*, 1999;340:115-126
- [65] Saint Andre A., Blackwell N. M., Hall L. R., Hoerauf A., Brattig N.W., Volkman L., Taylor M.J., Ford L., Hise A.G., Lass J.H., Diaconu E., Pearlman E.: The role of endosymbiotic Wolbachia bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science*, 2002; 295: 1892-1895
- [66] Satoh S., Yada R., Inoue H., Omura S., Ejima E., Mori T., Takenaka K., Kawamura N., Numaguchi K., Mori E., Asoh A., Nakamura T., Hiyamuta K.: Toll-like receptor-4 is upregulated in plaque debris of patients with acute coronary syndrome more than Toll-like receptor-2. *Heart Vessels*, 2016; 31:1-5
- [67] Shao L., Zhang P., Zhang Y., Lu Q., Ma A.: TLR3 and TLR4 as potential clinically biomarkers of cardiovascular risk in coronary artery disease (CAD) patients. *Heart and Vessels*, 2014; 29:690-698.
- [68] Suarez-Farinas M., Arbeit R., Jiang W., Ortenzio F.S., Sullivan T., Krueger J.G.: Suppression of molecular inflammatory pathways by toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonists in a model of IL-23-induced skin inflammation. *PLoS One* 2013; 8:e84634,
- [69] Seneviratne A.N., Monaco C.: Role of Inflammatory Cells and Toll-Like Receptors in Atherosclerosis. *Current Vascular Pharmacology*, 2015, 13: 146-160.
- [70] Seneviratne A.N., Sivagurunathan B., Monaco C.: Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis; *Clinica Chimica Acta*, 2012;413: 3-14
- [71] Takeda K., Akira S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.*, 2005; 17:1-14
- [72] Takeda K., Kaisho T., Akira S.: Toll-like receptors. *Ann. Rev. Immunol.*, 2003; 21: 335-376
- [73] Takeda K., Akira S.: TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 3-9
- [74] Wang C., Chen T., Zhang J., Yang M., Li N., Xu X., Cao X.: The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 'preferentially' promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nature Immunology*, 2009; 10: 744-752
- [75] Wang L., Du J., Li H. H.: Role of toll-like receptor 2 in cardiovascular diseases. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 2013; 44:259-263.
- [76] Wang X. Q., Wan H. Q., Wei X. J., Zhang Y., Qu P.: CLI-095 decreases atherosclerosis by modulating foam cell formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Molecular medicine reports*, 2016; 14: 49-56.
- [77] Wang X., Moser C., Louboutin J. P., Moser C., Weiner D.J., Wilson J.M.: Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J. Immunol.*, 2002; 168: 810-815
- [78] Witztum J.L., Lichtman A.H.: The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol.*, 2014;9:73-102, doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-163936
- [79] Wolfs T. G., Buurman W. A., Van Schadewijk A., de Vries B., Daemen M.A., Hiemstra P.S., van't Veer C.: In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J. Immunol.*, 2002; 168: 1286-1293
- [80] Yamamoto M., Sato S., Mori K., Hoshino K., Takeuchi O., Takeda K., Akira S.: Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-Like receptor signaling. *J. Immunol.*, 2002; 169:668-6672
- [81] Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K., Akira S.: Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 2002; 420: 324-329
- [82] Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Uematsu S., Hoshino K., Kaisho T., Takeuchi O., Takeda K., Akira S.: TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 2003; 4: 1144-1150
- [83] Yamamoto M., Takeda K., Akira S.: TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.*, 2004; 40:861-868

[84] Yang K., Liu X., Liu Y., Wang X., Cao L., Zhang X., Xu C., Shen W., Zhou T.: DC-SIGN and Toll-like receptor 4 mediate oxidized low-density lipoprotein-induced inflammatory responses in macrophages. *Scientific Reports*, 2017; 7:3296

[85] Yilmaz A., Lochno M., Traeg F., Cicha I., Reiss C., Stumpf C., Raaz D., Anger T., Amann K., Probst T., Ludwig J., Daniel W.G., Garlich C.D.: Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis*, 2004;176:101-10

[86] Yu L., Wang L., and Chen S.: "Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010; 14:2592-2603

[87] Zhao W., Ma G., Chen X.: Lipopolysaccharide induced LOX-1 expression via TLR4/MyD88/ROS activated p38MAPK-NF-κB pathway. *Vascul. Pharmacol.* 2014; 63:162-172