

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Makrofágy lidské tukové tkáně a aterogeneze

HABILITAČNÍ PRÁCE

MUDr. Ivana Králová Lesná, Ph.D.

Praha, 2021

Název habilitační práce: Makrofágy lidské tukové tkáně a aterogeneze

Autor: MUDr. Ivana Králová Lesná, Ph.D.

Pracoviště autora: Univerzita Karlova, Praha
1. lékařská fakulta,
Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny
U Vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6

Habilitační obor: Lékařská imunologie a mikrobiologie

Forma habilitační práce: Souhrn publikovaných výsledků

1. Úvod	
1.1. Ateroskleróza.....	4
1.2. Tuková tkáň.....	5
1.2.1. Rozdělení tukové tkáně.....	5
1.2.2. Funkce bílé tukové tkáně.....	6
1.2.3. Tuková tkáň jako imunitní orgán.....	7
1.3. Monocyty a makrofágy.....	9
1.3.1. Polarizace monocytů a makrofágů.....	9
1.3.2. Tkáňově specifické monocyty a makrofágy.....	10
1.3.2.1. Krevní monocyty.....	10
1.3.2.2. Makrofágy v cévní stěně.....	10
1.3.2.3. Makrofágy v tukové tkáni	12
1.4. CD 36: jeho význam pro aterogenezi	13
1.5. Shrnutí literárního přehledu.....	14
2. Přehled výsledků zahrnutých do habilitační práce	
2.1. Spolupráce s klinickými pracovišti.....	14
2.2. Význam množství a zánětlivých změn v perivaskulární tukové tkáni pro aterogenezi.....	14
2.3. Využití průtokové cytometrie pro analýzu stromavaskulární frakce a volba sledovaných markerů.....	16
2.4. Charakterizace a srovnání makrofágů izolovaných z lidské podkožní, viscerální a perivaskulární tukové tkáně.....	17
2.5. Vztah proporce metabolicky aktivovaných makrofágů k prediktorům kardiovaskulárního Rizika.....	19
2.6. Ovlivnění adheze monocytů k endotelu biologicky aktivními produkty tukové tkáně.....	21
2.7. Vztah mezi polarizací makrofágů tukové tkáně a spektrem mastných kyselin ve fosfolipidech buněčných membrán.....	22
2.8. Spojení prozánětlivých změn ve viscerální a perivaskulární tukové tkáni a cévní stěně.....	24
3. Závěrečné shrnutí.....	27
4. Literatura.....	27
5. Přílohy.....	35

1. Úvod- současný stav problematiky:

1.1. Ateroskleróza

Ateroskleróza je onemocnění vznikající na podkladě postupně se rozvíjejících patologických dějů v cévní stěně. Incidence aterosklerózy kontinuálně vzrůstá v zásadě od začátku minulého století. Hlavní klinickou komplikací aterosklerózy je infarkt myokardu, cévní mozková příhoda a ischemická choroba končetin, souhrnně označované jako kardiovaskulární onemocnění (KVO). V současnosti jsou známé hlavní faktory, které přispívají k rozvoji a progresi KVO - jsou to zejména dyslipidémie, hypertenze, obezita a kouření. Nicméně i přes uspokoivý pokrok v léčbě (zejména účinná hypolipidemika a antihypertenziva) stále asi 50% úmrtí připadá na komplikace aterosklerózy. Je tedy zřejmé, že pro pochopení aterosklerózy je nutné vnímat i vliv patologií dalších systémů. Velká většina KVO a zejména ateroskleróza jsou spojeny s prozánětlivými procesy. Je klinicky známým faktem, že riziko rozvoje KVO stoupá u autoimunních onemocnění, například lupus erythematosus, mikroangiitida s granulomatózou (dříve Wegenerova granulomatóza) či revmatoidní artritida. Spojení infekčních onemocnění s aterogenezí bylo a je cílem mnoha studií, z mnoha patogenů byl zvažován zejména vliv *Chlamydia pneumoniae*, ale i herpetických virů, *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis* a dalších [1], nicméně zjištění, že podání antibiotik nevedlo k snížení kardiovaskulárních příhod, přímý vliv spíše vylučuje [2]. Na druhou stranu v průběhu infekce influencí u myši dochází k významným proinflamačním změnám a infiltraci aterosklerotických plátů makrofágy a T lymfocyty [3], dále vysokým hladinám proinflamačních a protrombotických cytokinů spojených s endoteliální dysfunkcí. Zda je ale vztah mezi infekcí a KVO a jejich komplikacemi kauzální, nelze na základě publikovaných dat jednoznačně stanovit.

Funkce endoteliálních buněk dalece přesahuje původní vnímání endotelu jako mechanické bariéry. Za fyziologického stavu je endotel vysoce sekrečně aktivní, tvořené působky na lokální úrovni udržují antitrombotické vlastnosti endotelu, regulují cévní tonus a adhezi leukocytů a trombocytů. K endotelu je ukotvena glykokalyx, negativně nabitá hydrofilní gelovitá síť (muko)polysacharidů, která přispívá k udržování cévní permeability, nesmáčivosti a koagulace. Dysfunkce endotelu je pokládána za první, presymptomatické, ještě plně reverzibilní stadium aterosklerózy [4], nicméně pochopitelně trvá po celou dobu vývoje aterosklerotického plátu. Narušení endoteliálních funkcí vede ke ztrátě regulace a je spojen se zvýšenou propustností jak pro aterogenní lipidy, tak pro imunocyty. Příčiny této patologie zahrnují vlivy mechanické (turbulentní proudění, zvýšení krevní tlak), imunologické (např. prozánětlivé cytokiny), ischemie/reperfuze a další. Nárůst koncentrací aterogenních lipidů vede nejprve k vzniku izolovaných pěnových buněk (původem z makrofágů či myocytů), přes tvorbu tukových proužků až k vývoji ateromu, plaku uvnitř cévní stěny.

Progrese aterosklerózy je pak daná postupným narůstáním plaku, toto vede k postupnému omezení průtoku danou cévou a poruše orgánu zásobovaného danou arterií. Nejzávažnější akutní klinické komplikace aterosklerózy jsou pak dané erozí, případně rupturou, plaku a obnažením subendoteliálních kolagenních vláken a k aktivaci koagulační kaskády. Existují oblasti cév predisponované k výskytu plaků, což potvrzuje podíl fyzikálních faktorů, např. narušení laminárního proudění, v daných oblastech. Endotel cév je lokálně aktivován, vznikají strukturální i funkční změny a při souběhu dalších faktorů, zejména dyslipidémie s vysokou hladinou lipoproteinů o nízké

denzitně (*low density lipoproteins* (LDL)), dochází k rozvoji aterosklerotické léze. Aktivovaný dysfunkční endotel je pro tyto částice zvýšeně propustný, LDL jsou v cévní stěně chemicky modifikovány (např. oxidací či glykací) a dochází k narušení fyziologických procesů transportů cholesterolu [5].

1.2. Tuková tkáň

Hlavní funkcí tukové tkáně je podpora metabolických potřeb organismu, tepelná izolace, termogeneze (zejména u hnědé tukové tkáně) a mechanická ochrana. Umožňuje uchovávat velké množství energie ve formě intracelulárních tukových kapének a tím překlenout období lačnění. Po většinu evoluce lidského rodu byla kapacita tohoto ukládání energie velmi důležitá pro přežití jedinců. V podmínkách tzv. moderního světa, kdy nedostatek potravy je spíše výjimečný a převažujícím problémem je naopak přebytek přijímané energie, je epidemie obezity zásadním zdravotnickým problémem. V České republice je až 45% jedinců s nadváhou, tj. BMI 25-30 kg.m⁻², přičemž až 15% jedinců je obézních, tj. s BMI nad 30 kg.m⁻². Lépe na tom nejsou ani ostatní země se srovnatelným životním stylem, přičemž v rámci Evropy je nejnižší incidence ve Švýcarsku [6]. Ve srovnání s ostatními hominidy je procento tělesného tuku u lidí vyšší, a to i u fyzicky aktivních jedinců, například v tradičních lovecko-sběračských společnostech. Lidé také mají vyšší metabolický obrat zejména díky rozvoji mozku [7], což společně s dietními změnami ve prospěch vysoce energetické stravy a zvýšení dostupnosti živin úpravou stravy vedlo k evolučně pozitivní adaptivní změně – tj. zvýšení kapacity akumulovat tuk. Tato evoluční změna má však i svou obrácenou stránku - riziko rozvoje chorob spojených s obezitou. Centrální obezita, tj. zvýšení zejména viscerální a břišní podkožní tukové tkáně, je pokládána za rizikovější oproti nahromadění tukové tkáně v gluteofemorální oblasti.

Ačkoliv vztah mezi nárůstem tukové tkáně a kardiovaskulárním onemocněním byl popsán před více než 70 lety [8], mechanismy vlivu obezity na kardiovaskulární onemocnění nebyly dosud zcela objasněny. Patologický nárůst tukové tkáně je totiž spojen s narušením mnoha tělních funkcí – obézní jedinci jsou ve vyšším riziku nejen kardiovaskulárních, endokrinních, ale i nádorových, kloubních, plicních a dalších patologií [9]. Tyto s obezitou spojené patologie se pak spolupodílejí na výsledném stavu, tj. vyšší morbiditě a mortalitě [10]. Tato práce se zaměřuje na propojení subklinického zánětu v tukové tkáni s kardiovaskulárními prediktory a patologickými změnami v cévní stěně.

1.2.1. Rozdělení tukové tkáně

Klasickým kritériem dělení tukové tkáně je její lokalizace, rozdělující tukové tkáně podkožní (*subcutaneous adipose tissue*, SCAT), viscerální (*visceral adipose tissue*, VAT) a perivaskulární (*perivascular adipose tissue*, PVAT), přičemž všechny tyto skupiny lze dále členit [11]. SCAT bývá členěna jednak na abdominální (povrchovou a hlubokou), jinak dále na gluteální, femorální, *etc.* Viscerální tuková tkáň zahrnuje zejména omentální, epikardiální, retroperitoneální a perirenální tukové tkáně. Někteří autoři včleňují PVAT jako samostatnou podskupinu do VAT. V rámci PVAT bývají rozlišeny tzv. perikoronární, periaortální, perirenální a další perivaskulární tukové tkáně. Byly popsány významné funkční rozdíly nejen mezi SCAT, VAT a PVAT, ale i mezi jednotlivými typy SCAT

[12] VAT [13] či PVAT [14]. Je zajímavé, že jednotlivé tukové tkáně pocházejí zřejmě z různých prekurzorů [15]. Převažující data v literatuře potvrzují významnější roli VAT jako rizika metabolických komplikací obezity [16]. Na druhou stranu PVAT přímo přiléhá k cévní stěně a může ji tedy lokálně ovlivnit. Tento vliv je předmětem intenzivního výzkumu a může být zprostředkován parakrinně, pronikáním aktivních látek difuzí, či přes *vasa vasorum* (recentně shrnuto[17]). Velké množství tuků je i za fyziologických podmínek i v dalších lokalitách, např. v kostní dřeni, z hlediska funkčního však o tukovou tkáň nejde.

Za patologických podmínek dochází k deponování tuků i v tkáních, které primárně tuto funkci nemají. K tomuto dochází například v jaterní, svalové či pankreatické tkáni, pro takto patologicky uložený tuk se užívá název ektopická tuková tkáň. Uložené triacylglyceroly v těchto primárně netukových tkáních působí lipotoxicky a narušují nejen jejich fyziologické metabolické funkce, ale i zvyšují kardiovaskulární riziko [18].

Tukové tkáně lze členit i podle funkce, kdy vyhraněně odlišné tkáně jsou nazývané bílou resp. hnědou tukovou tkání, přičemž přechodné typy jsou označovány jako „*beige*“ nebo „*brown-like*“ tuková tkáň. Hlavním kritériem pro rozdělení jsou preferenční metabolická aktivita, počet a morfologie tukových kapének v cytoplazmě, počet mitochondrií a exprese tzv. *uncoupling protein 1* (UCP-1), přičemž tyto parametry zásadně ovlivňují funkci a velikost adipocytů. Bílá tuková tkáň typicky slouží zejména k uchování lipidů ve formě cytoplazmatických kapének, zatímco klíčovou funkcí hnědé tukové tkáně je tzv. netřesová termogeneze. Recentně bylo prokázáno, že pod vlivem adrenergní stimulace či expozice chladu mohou i bílé adipocyty exprimovat UCP-1 a přispívat k termogenezi [19, 20]. Množství hnědé tukové tkáně je nicméně u dospělých lidí velmi limitované (na rozdíl od drobných savců) a její přispění k celkovému metabolismu je velmi kontroverzní a diskutované téma (recentně shrnuto[21]). Ostrůvky hnědé tukové tkáně, případně jednotlivé hnědé adipocyty, bývají nicméně součástí VAT, a to zejména PVAT [22].

1.2.2. Funkce bílé tukové tkáně

V tukové tkáni probíhají dva zásadní metabolické děje – lipogeneze a lipolýza. Lipolýzou triglyceridů dochází k uvolnění volných mastných kyselin, které mohou být využity v ostatních tkáních. Nicméně od 90.let dvacátého století je zřejmé, že význam tukové tkáně zásadně přesahuje koncept tukové tkáně jako úložiště energie. Tuková tkáň je nyní vnímána nejen jako tepelná izolace a pasivní zásobárna energie, ale je také zdrojem biologicky aktivních molekul, které působí nejen parakrinně, ale i systémově ovlivňují funkci mnoha orgánů a systémů [23]. Některé z těchto látek jsou označovány jako hormony (tzv. adipokiny) a významně ovlivňují metabolismus. Jejich zřejmě nejvýznamnějším zástupcem je leptin, první identifikovaný hormon tvořený výhradně adipocyty. Leptin je peptid který významně reguluje příjem potravy a výdej energie ovlivněním centrální nervové soustavy, nicméně lze předpokládat jeho širší význam [24]. Vysoké plazmatické koncentrace leptinu a s nimi spojená leptinová rezistence se spolupodílí na rozvoji změn spojených s obezitou [25]. Dalším významným adipokinem tvořeným výhradně adipocyty je adiponektin zvyšující senzitivitu k inzulinu a jeho hladiny s obezitou klesají [26]. Ačkoliv leptin a adiponektin primárně ovlivňují metabolismus, nepřímo významně zasahují i do imunitních reakcí. Tuková tkáň je významným zdrojem také adipokinů primárně zasahujících do imunitních dějů. Jedním z nich je rezistin, který je u lidí tvořen makrofágy tukové tkáně. Rezistin primárně působí prozánětlivě a jím

zprostředkované ovlivnění metabolismu je nepřímé přes zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů, zejména IL-6 a *tumor necrosis factor α* (TNF α). Byly popsány i další primárně prozánětlivé (retinol-binding protein 4) i protizánětlivé (omentin-1) adipokiny a vzhledem k propojení metabolických a imunitních dějů mají tyto adipokiny odpovídající vztah k patogenezi KVO [27, 28]. Tuková tkáň ale produkuje i velké množství cytokinů a chemokinů, které nejsou tkáňově specifické a jsou nedílnou součástí imunitních reakcí (TNF α , IL-6, IL-18, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) a další). Jejich tvorbou tuková tkáň systémově zasahuje do imunitního systému jedince jak za fyziologických, tak patologických stavů.

Aktivace imunitní odpovědi je energeticky velmi náročný proces a pro jeho fungování je nezbytný přesun energetických zdrojů z méně prioritních systémů. Typické jsou např. sepsí vyvolané změny funkce mitochondrií, či rozvoj inzulínové rezistence [29]. Obezita, chronický patologický stav daný akumulací tukové tkáně, je spojena s prozánětlivým stavem a to zejména přímo v tukové tkáni [30]. V posledních dvou dekádách byl přesvědčivě prokázán vztah mezi dysfunkcí imunitních dějů v tukové tkáni a rozvojem metabolického syndromu, inzulínové rezistence, diabetu druhého typu a kardiovaskulární nemoci [31]. Jak bylo uvedeno, převažující shrnutá data demonstrovala význam prozánětlivých změn ve VAT a PVAT pro patogenezi kardiovaskulárních onemocnění [14, 32].

1.2.3. Tuková tkáň jako imunitní orgán

Tuková tkáň obsahuje kromě adipocytů a jejich prekurzorů velmi pestrou směs různých buněk. Pojem stroma vaskulární frakce (SVF), tj. neadipocytární buněčná část tukové tkáně, zahrnuje tedy mnoho různých buněčných typů. Kromě endoteliálních buněk, fibroblastů, kmenových buněk, preadipocytů a nervových buněk obsahuje i velké množství imunitních buněk vrozené i získané imunity. Do první skupiny lze zahrnout zejména nejpočetnější makrofágy, ale i různé typy granulocytů, dále *natural killers cells* (NK), žírné a dendritické buňky. Druhou skupinu reprezentují zejména různé typy T lymfocytů. Zásadní regulační roli pro udržení fyziologické homeostázy tukové tkáně mají zřejmě T regulační lymfocyty, uvolňující protizánětlivě působící cytokiny (IL-10 a TGF- β). SVF obsahuje i B lymfocyty, jejichž role je zatím nejistá. Zřejmě velmi významnou regulační roli budou mít i buňky nacházející se na rozhraní tradičního členění, tj. *natural killer cells* (přirození zabíječi, NK buňky), a zejména tzv. *innate lymphoid cells* (ILC).

Za fyziologického stavu převládá role imunocytů aktivně potlačujících rozvoj zánětu. Významnou roli pro udržování homeostázy mají tzv. *innate lymphoid cells type 2* (ILC2), které sekretují cytokiny, zejména IL-5 a IL-13 podporující akumulaci eosinofilních granulocytů [33]. IL-4 tvořený těmito granulocyty je klíčový pro udržování protizánětlivého stavu makrofágů [34]. ILC2 ovlivňují prostředí tukové tkáně nejen nepřímo stimulací eozinofilů, ale i přímo působí na makrofágy [33]. Zdá se, že podobně významnou roli pro udržování homeostázy má i IL-33 [35]. Na udržení homeostázy se zřejmě podílí tzv. invariantní NK T-lymfocyty [36], nicméně mechanismy jejich působení nejsou zatím objasněny. T regulační lymfocyty jsou početné v neobézní tukové tkáni, jejich počet významně klesá s obezitou [37].

Není zcela jasné, co je prvotním stimulem pro rozvoj zánětu v tukové tkáni. Vzhledem k vysoké endokrinní aktivitě adipocytů je pravděpodobné, že hypertrofie adipocytů je spojena s přesmykem sekrece cytokinů a adipokinů prozánětlivým směrem. Případně hypertrofie může vést až k nekróze adipocytů, uvolnění nitrobuněčného obsahu a spuštění zánětlivých změn okolními buňkami, zejména

makrofágy. Existují ale i další mechanismy, které přispívají k prozánětlivým změnám v tukové tkáni a lze je rozdělit na bakteriální a metabolické. U obézních jedinců je střevní stěna propustnější pro lipopolysacharid (LPS) gramnegativních bakterií a lze i detekovat následné zvýšení jeho plazmatické koncentrace [38, 39]. Tento stav se také nazývá endotoxémie. LPS se váže na komplex receptorů a signalizačních molekul, jehož součástí je Toll like receptor 4 (TLR4). TLR 4 je exprimován na makrofázích i adipocytech [40] a jeho stimulace vede k aktivaci inflamační kaskády s aktivací *nuclear factor κB* [41]. Proinflamační vliv saturevaných mastných kyselin je nicméně pleiotropní (shrnuto v [42]). Dieta s vysokým obsahem saturevaných mastných kyselin ovlivňuje střevní mikroflóru, dochází jednak k zvýšenému uvolňování LPS ze střevních bakterií a k endotoxémii. Dieta s vysokým obsahem saturevaných tuků vede také k zvýšení LDL cholesterolu a jeho následné modifikaci. Takto modifikované lipoproteiny pak působí v tkáních prozánětlivě, jsou imunitním systémem vnímány jako tzv. *danger associated molecular patterns*, DAMP, např. stimulací TLR a CD36. Oxidované modifikované LDL (oxLDL) ovlivňují také polarizaci makrofágů (viz níže [43]). Zvýšený intracelulární obsah volných mastných kyselin (např. kys. palmitová) vede také k tzv. změnám endoplazmatického retikula, označovaným jako *endoplasmatic reticulum stres* (ERS) a následně aktivaci významných proinflamačních drah (spojených s aktivací *c-Jun-N terminal kinase* a NF-κB [44]). Je zřejmé, že mastné kyseliny uvolněné z hypertrofovaných adipocytů také slouží jako ligandy pro TLR4 a přispívají k zhoršení stavu [45]. Bylo také prokázáno, že hypertrofované adipocyty zvyšují expresi enzymů konvertujících arachidonovou kyselinu na prozánětlivé mediátory [46]. Tyto a další procesy se spolupodílí na rozvoji proinflamačního stavu tukové tkáně spojeném s její dysfunkcí. Obdobně jako při infekčním stimulu, prvními buňkami transientně infiltrujícími hypertrofovanou tukovou tkáň jsou neutrofilní granulocyty [47], následně pak vstupují do tukové tkáně monocyty a dochází k jejich transformaci na makrofágy. Makrofágy jsou na rozdíl od neutrofilních granulocytů dlouhověké buňky. V obézní tukové tkáni jsou dobře pozorovatelné v tzv. *crown-like structures*, tj. obkroužení nekrotických adipocytů M1 makrofágy exprimujícími TNFα a IL-6 [48]. Zdá se také, že i v tukové tkáni se makrofágy spolupodílí na remodelaci extracelulární matrix, angiogenezi a diferenciaci preadipocytů. V hypertrofované tukové tkáni dochází k prozánětlivým změnám makrofágů označovaných jako polarizace a jsou podrobně popsány v následujících kapitolách. Tyto změny jsou spojeny s rozvojem insulinové resistance - není ale jasné, zda metabolické změny spojené s proinflamačními změnami v tukové tkáni jsou příčinou či následkem insulinové resistance [49]. Je ale pravděpodobné, že právě chronický zánět hraje zásadní roli v rozvoji insulinové resistance spojené s obezitou [50]. Právě propojení zánětlivých a metabolických dějů vedl k používání souhrnného termínu imunometabolismus – tento pojem byl v souvislosti s tukovou tkání prvně použit v roce 2011 [51], nicméně počet publikací věnovaných tomuto tématu strmě narůstá. Byly navrženy různé mechanismy tohoto propojení. Zásadní význam pro tento efekt mají makrofágy. TNFα tvořený prozánětlivě polarizovanými makrofágy přímo blokuje účinek insulinu na adipocyty [52]. Makrofágy nejsou tedy jen součástí zánětlivých procesů v tukové tkáni, ale přímo ovlivňují intracelulární metabolismus mastných kyselin.

1.3. Monocyty a makrofágy

Moderní nomenklatura z roku 1972 [53] používá pro tyto imunitní buňky pojem mononukleární fagocytující systém. Do tohoto systému patří kromě monocytů a makrofágů i jejich prekurzory v kostní dřeni a dendritické buňky. Monocyty i makrofágy jsou významnou součástí tzv. vrozené, nespecifické imunity. Makrofágy byly prvně popsány 1882 Eli Mečnikovem a byla mu (společně s Erlichem) za tento objev udělena Nobelova cena v roce 1908. Od té doby bylo popsáno mnoho funkcí monocytů a makrofágů a je pravděpodobné, že jejich výčet se bude dále rozšiřovat. Monocyty jsou myeloidního původu, tvoří 5-10% buněk periferní krve, po stimulaci se přesouvají do tkání, kde dochází k jejich diferenciaci na tkáňovou formu, makrofágy. Tato diferenciaci je provázána morfologickými, fenotypovými i funkčními změnami. Lokální zánět je spojen s infiltrací krevních monocytů do tkání a s jejich transformací na makrofágy. Původní předpoklad, že krevní monocyty klasického typu jsou výhradním zdrojem tkáňových makrofágů, byl nicméně vyvrácen. Naopak se zdá, že většina tkáňových makrofágů je usazená v tkáních již před narozením a udržována sebeobnovováním (shrnuto v [53]) a proto jsou monocyty a makrofágy dnes studovány jako odlišné entity. Hlavní funkcí makrofágů je recepce patogenů, prezentace antigenu T lymfocytům, pohlcování apoptotických buněk a buněčného debrisu, produkce mnoha cytokinů a další regulační funkce. Jsou klíčové v udržování homeostázy a rekonstituce fyziologického stavu. Právě široké spektrum procesů, v nichž jsou makrofágy zapojeny, vedou k jejich mimořádné plasticitě, schopnosti adaptace a reakce na široké spektrum prostředí a stimulů. Makrofágy reagují stimulací zánětu v případě infekce, protizánětlivě při hojení a zdá se, že tyto děje je mohou simultánně prolínat *in vivo* v procesu rekonstituce fyziologického stavu v dané tkáni. Toto je zároveň důvod, proč je v zásadě nemožné komplexně zkoumat tuto skupinu buněk.

Akumulace a patologické změny makrofágů v cévní stěně je zásadní nedílnou součástí aterosklerózy. V aterosklerotických lézích makrofágy reagují na různé stimuly z okolí, od modifikovaných lipidů, cytokinů či látek uvolněných rozpadem erytrocytů, jak je rozebráno dále. Mají široké spektrum mechanismů, kterými mohou ovlivnit vývoj aterosklerotického plátu, od fagocytózy modifikovaných lipoproteinů a apoptotických buněk, přes syntézu plejády cytokinů a chemokinů. Makrofágy se však účastní i dalších aterogenních dějů, které s imunitním systémem souvisí nepřímo, jsou klíčové např. pro zajištění tzv. reverzního transportu cholesterolu.

1.3.1. Polarizace monocytů a makrofágů

Změny monocytů a makrofágů provázejí jejich přizpůsobení aktuálně potřebné funkci, přičemž tyto funkce se mohou zásadně lišit. V rámci snahy o definování tohoto spektra s různou mírou polarizace makrofágů bývá používána kategorizace, jejíž hraniční stavy jsou nazývané prozánětlivé, M1, respektive protizánětlivé, M2, makrofágy. Data získaná z *in vitro* experimentů popisují diferenciaci směrem M1 makrofágům inkubací s LPS nebo interferonem γ , tyto makrofágy mají vysokou produkci prozánětlivých cytokinů, zejména TNF α , IL-1 β , IL-6, a exprese NO syntázy. Na druhou stranu inkubace naivních monocytů jednak s rostoucími koncentracemi tzv. Th2 cytokinů (IL-4, IL-10) či glukokortikoidů [54], ale i s oxidovanými lipidy [55] vedou k indukci tzv. M2 polarizace a tvorbě protizánětlivých cytokinů, zejména TGF β a IL-10, a expresi arginázy. Tradičně jsou členěny do různých vzájemně se částečně prolínajících podskupin. Patří sem M2a makrofágy (aktivované IL-4 a

IL-13), M2b makrofágy (aktivované imunokomplexy a LPS), M2c makrofágy (aktivované glukokortikoidy a/či IL-10) a M2d makrofágy (aktivované adenosinem či IL-6). U těchto, většinou *in vitro* generovaných subpopulací, se předpokládá široké spektrum funkcí od obrany proti určitým patogenům, hojení ran či regulace imunitní reakce [56]. Je však sporné, nakořik experimenty *in vitro* prováděné za přesně definovaných podmínek obráží komplexní *in vivo* situaci v tkáních vedoucí k tkáňově specifickým typům polarizace. Naopak se zdá, že plasticita makrofágů přesahuje dichotomický model M1 a M2 makrofágů a existuje široké spektrum aktivačních stavů mezi těmito stavy.

Polarizace makrofágů je spojena i s metabolickými změnami [57], kdy prozánětlivé makrofágy získávají energii zejména glykolýzou, která umožňuje rychlou produkci energie nutné k usmrcení patogenů. Prozánětlivé makrofágy mají i vysokou kapacitu tvořit reaktivní radikály a oxidy dusíku. Na druhou stranu protizánětlivé IL-4 indukované makrofágy získávají energii primárně mitochondriální oxidací; tento proces je náročnější na aktivaci, nicméně umožňuje získat výrazně větší množství energie.

1.3.2. Tkáňově specifické monocyty a makrofágy

1.3.2.1. Krevní monocyty

Cirkulující monocyty tvoří dynamickou populaci buněk zahrnující různé subpopulace lišící se fenotypem, velikostí, morfologií a transkripčními profily [58]. Monocyty cirkulující v krvi bývají tradičně děleny do tří základních subtypů na základě koexpresy CD14 (koreceptor pro vazbu LPS) a CD16 (FcγRIII, nízoafinitní receptor pro Fcγ). Tento přístup dělí krevní monocyty na – tzv. klasické monocyty (CD14⁺⁺CD16⁻), přechodné (CD14⁺⁺CD16⁺) a neklasické (CD14⁺CD16⁺⁺). Za bazálních podmínek většina krevních monocytů silně exprimuje CD14 a málo, nebo vůbec CD16, tj. převažují klasické a přechodné monocyty. Přechodné i neklasické monocyty významně exprimují TNFα [59]. Systémový zánět vede k přesmyku a zvýšení exprese CD16 (tj. vzniku neklasických monocytů), což bylo demonstrováno v kinetické studii s aplikací endotoxinu [60].

Zvýšení počtu monocytů v krvi je pro systémový zánět typické a byly publikovány i práce ukazující toto zvýšení jako rizikový faktor KVO [61]. Zároveň jsou k dispozici i data o přímém vlivu vysokých plazmatických hladin LDL cholesterolu na počet monocytů v cirkulaci [62]. Užívání statinů simultánně se snížením nonHDL-cholesterolu snižuje i počet cirkulujících monocytů [63].

Velká pozornost byla věnována i možnosti, že právě zastoupení jednotlivých subpopulací monocytů v krvi obráží kardiovaskulární riziko. Bohužel publikovaná data nejsou konzistentní a jak zvýšení [64] tak snížení počtu [65] klasických monocytů v krvi byly popsány jako rizikové pro klinické manifestace KVO. Byl popsán i vliv vyšších hodnot neklasických monocytů pro riziko endotelové dysfunkce [66] či restenozy [67].

1.3.2.2. Makrofágy v cévní stěně

Monocyty po průniku endotelem cév jsou v cévní stěně transformovány pod vlivem specifických faktorů, např. *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) na makrofágy. Celkový obsah makrofágů v cévní stěně je souhrnem této migrace, proliferace *in situ*, retence, vycestování a jejich nekrózy či apoptózy (shrnuto v [68]). Tyto makrofágy mají zásadní význam pro aterogenezi, na základě signálů z prostředí dochází k jejich polarizaci a této polarizaci odpovídající sekreci velkého množství biologicky aktivních látek (a to jak proaterogenních, např. TNF-α, IL-6, IL-12, CCL2, tak i

protiaterogenních, např. TGFβ a IL-10)[69]. Na základě *in vitro* studií byly navrženy i specifické subpopulace polarizovaných makrofágů v aterosklerotických plátech (např. Mhem subpopulace indukovaná prostředím s hemoglobinem) [70].

Průnik LDL částic do subendoteliálního prostoru je fyziologický děj, nicméně při vyšších plazmatických hladinách je zvýšené množství částic, které do cévní stěny proniknou. Makrofágy (ale i myocyty cévní stěny) tyto LDL částice, pohlcují. Pro tento transport cholesterolu jsou zásadní tzv. scavengerové receptory, např. SR-A a CD36 [71, 72]. Tato internalizace LDL probíhá i fyziologicky a jde o základní proces odstraňování nadbytečného cholesterolu z intercelulárního prostoru cévní stěny, nicméně modifikované LDL jsou pohlcovány výrazně efektivněji. V lysozomech jsou LDL částice rozloženy kyselou lipázou a dochází k uvolnění volného cholesterolu a mastných kyselin. Následná esterifikace v endoplazmatickém retikulu (EPR) eliminuje toxicitu volného cholesterolu a umožňuje skladování ve formě intracelulárních kapének. Akumulace cholesterolu vede k down-regulaci LDL receptoru a snížení endogenní syntézy cholesterolu. Část intracelulárního cholesterolu opouští buňky pasivní difuzí nebo pomocí tzv. reverzního transportu cholesterolu. Jde o aktivní ateroprotektivní děj, kdy pomocí tzv. *ATP binding cassette (ABC) transporters* dochází k zpětnému efluxu cholesterolu z buněk a jeho navázání na prekurzory HDL částic a transportu do jater. Pro tento proces jsou klíčové ABC transportéry (ABCA1, ABCG1 a ABCG4) [73]. Pokud kapacita tohoto efluxu cholesterolu nestačí k udržení intracelulární homeostázy, dochází k akumulaci lipidů a tvorbě tzv. pěnových buněk. Velké klinické studie potvrdily, že kapacita efluxu cholesterolu cestou RCT je inverzní prediktor CVD a tím potvrdily i význam tohoto ateroprotektivního děje [74, 75]. Při dysregulaci metabolismu cholesterolu v buňkách dochází k narušení jeho odstraňování z lysozomů do EPR [76] a k hromadění toxického volného cholesterolu. Dochází k indukci stresové odpovědi EPR spojené s narušením esterifikace cholesterolu acyl-CoA cholesterol acyltransferázy a tím další akumulací volného cholesterolu v makrofázích. Dochází k apoptóze, pokud nedojde k efektivnímu odstranění buněčných zbytků eferocytózou zprostředkovanou okolními makrofágy vznikají nekrotické části aterosklerotického plátu. Efektivní eferocytóza je tedy zásadní pro regresi plátu, nicméně v pokročilých stádiích vývoje plátu je tato schopnost omezena, zřejmě díky akumulaci cholesterolu v pohlcujících makrofázích. Na narušené eferocytóze se podílí i up-regulace CD47, tedy tzv. *don't eat me* signalizace, na apoptotických makrofázích [77]. Bylo prokázáno, že ani následná buněčná smrt není pasivní proces a jde o naprogramované procesy [78]. Kromě apoptózy byly v aterosklerotickém plátu popsány různé další typy imunologicky kontrolované buněčné smrti, tj. pyroptóza, děj závislý na kaspáze a spojený s aktivací inflamazomu, a nekroptóza, na kaspáze nezávislá forma programovaného zániku buněk s uvolněním tzv. *danger associated molecular patterns* [78]. Ačkoliv je prokázáno, že v iniciálních fází aterosklerózy mohou makrofágy i vycestovat z cévní stěny [79], není zcela jasné, čím je tento proces stimulován. Nicméně na myším modelu byl prokázán například význam netrinu-1 pro vycestování makrofágů a regresi aterosklerózy [80]. Bohužel nejsou k dispozici jednoznačná data, která by umožnila fenotypové začlenění makrofágů lidských aterosklerotických plátů podle povrchových CD znaků. Dosud publikovaná data (získaná imunohistochemickými metodami) shodně hodnotí CD86 jako znak M1 makrofágů, zatímco CD163 a CD206 jako znak M2 makrofágů. Jsou založeny na přenosu dat získaných z *in vitro* studií na analýzu aterosklerotických plátů a výsledky neprokázaly jednoznačný vztah takto určených M1 či M2 makrofágů k struktuře plátu [69, 81]. Vyjímkou je CD163, marker akumulace železa v makrofázích,

čemuž odpovídá i jeho vyšší exprese v hemorhagických [70] plátech. Jeho exprese roste i se stabilitou aterosklerotického plátu [82]. Pouze v jedné studii byl sledován CD36 v aterosklerotických plátech získaných z karotických arterií v rámci endarterektomií, jeho exprese byla vyšší v plátech způsobujících symptomatickou stenozu *a. carotis*, vyšší exprese byla také v morfologicky ulcerovaných plátech [83]. Z dalších znaků exprimovaných na aterosklerotických plátech byly ještě sledovány např. indukibilní *nitric oxide synthase*, (iNOS) a dectin-1 [84].

1.3.2.3. Makrofágy v tukové tkáni

Makrofágy jsou nejpočetnějšími imunitními buňkami v SVF a hrají významnou roli za fyziologických i patologických stavů tukové tkáně. Jejich počet narůstá s obezitou, v experimentálních modelech tvoří až 40% buněk SVF [85]. Migrace monocytů do tukové tkáně je zprostředkována chemokiny, zejména MCP-1, přičemž tato infiltrace a zvýšení exprese prozánětlivých genů v tukové tkáni předchází následné metabolické důsledky [86]. MCP-1 je tvořen jednak adipocyty, nicméně k jeho produkci přispívají i aktivované makrofágy (např. po zmíněné interakci satureovaných mastných kyselin s TLR 4). Tato zpětná vazba dále stimuluje infiltraci makrofágů a další akceleraci zánětu v tukové tkáni [87]. Výsledný počet makrofágů ovlivňuje nejen jejich vstup do tukové tkáně, lokální proliferace a apoptóza, ale zřejmě i vycestování makrofágů z tkáni [88, 89]. Pod vlivem tzv. Th2 buněčné odpovědi (charakterizované tvorbou typických cytokinů jako IL-4, IL-5, a IL-13) makrofágy polarizují směrem k M2 fenotypu. Tyto M2 makrofágy fyziologické tukové tkáně exprimují arginázu, inhibují iNOS aktivitu a tvoří protizánětlivé cytokiny, např. IL-10, který udržuje senzitivitu adipocytů k inzulinu inhibicí TNF α [90] a tak významně ovlivňují lokální mikroprostředí a funkci adipocytů. Prozánětlivé prostředí v obézní tukové tkáni vede k přesmyku k M1 makrofágům [91] sekretujících zejména IL-1 β , TNF α a IL-6. Tyto cytokiny narušují funkční stav adipocytů [92, 93] a citlivost k inzulinu klesá již u klinicky zdravých osob s nadváhou [94]. Vztah mezi adipocyty a makrofágy je zřejmě oboustranný, neboť bylo prokázáno parakrinní vzájemné ovlivňování adipocytů a makrofágů, v němž zřejmě zásadní roli hrají volné mastné kyseliny a TNF α [95]. Důsledkem je zpětná vazba a další infiltrace monocytů z krevního oběhu. V *in vitro* modelu bylo také recentně potvrzeno, že vzájemné působení makrofágů a adipocytů vede k zvýšení produkce kyslíkových radikálů v makrofázích, přičemž obsah triglyceridů v adipocytech se v tomto modelu se zvýšil o více než 70% [96], což opět potvrzuje možnost významného vzájemného parakrinního ovlivňování těchto buněk *in situ* v tukové tkáni.

Stejně jako populace v ostatních tkáních, jsou i makrofágy v tukové tkáni vysoce rozmanité. Ačkoliv je i u makrofágů v tukové tkáni přijímán koncept M1 prozánětlivých a M2 protizánětlivých makrofágů, je jejich fenotypové určení velmi nejisté. To přispívá i k významným kontradikcím v publikovaných datech, kdy prozánětlivé stavy tukové tkáně, jako jen např. obezita, jsou spojeny s expresí protizánětlivých markerů [97, 98], případně jsou popisovány makrofágy exprimující pro- i protizánětlivé fenotypové či funkční znaky [98, 99]. Určitým specifikem M2 makrofágů v bílé tukové tkáni může být jejich produkce katecholaminů a indukce změn označovaných jako browning, tj. exprese UCP-1. Ačkoliv význam M2 makrofágů pro tento proces byl opakovaně popsán [100, 101], jiní autoři jej zpochybnili [102]. Je ale zřejmé, že specifické mikroprostředí bohaté na palmitát, volné mastné kyseliny a inzulín determinuje tkáňově specifickou polarizaci makrofágů v lidské tukové tkáni. Naše práce prokázaly zásadní význam míry exprese znaku CD36 pro tuto polarizaci [103] a její vztah k rizikovým faktorům kardiovaskulárního onemocnění [104-106]. Recentní data [107] potvrdila

v *in vitro* experimentech význam tohoto markeru pro polarizaci makrofágů v tukové tkáni, přičemž tento typ polarizace označují autoři jako metabolickou polarizaci a takto aktivované makrofágy jako metabolicky aktivované.

1.3.3. CD36: jeho význam pro aterogenezi

CD36 je glykoprotein který se účastní mnoha důležitých patologických procesů. Je netypický, má dvě transmembránové domény dvě velmi krátké intracytoplazmatické domény a dlouhou glykosylovanou extracelulární část. Vyskytuje se na povrchu různých typů buněk – exprese CD36 byla popsána u trombocytů, adipocytů, myocytů, části endoteliálních a epiteliálních buněk [108]. Pleiotropnímu výskytu odpovídá i četnost funkcí tohoto receptoru. Tento receptor umožňuje vazbu různých ligandů obsahujících tzv. *trombospondin type-1 structural homology* oblast. Na kapilárních buňkách je vazba spojena s významným anti-angiogenním, proapoptickým efektem [109, 110]. CD36 receptor patří mezi scavengerové receptory a kromě ostatních funkcí [111] byl popsán i jejich význam pro vychytávání oxidovaných LDL částic makrofágy [112], společně s dalšími proateroaterogenními vlivy (dysfunkce endotelu a buněk hladkého svalstva cév). Exprese CD36 je zřejmě regulována na úrovni transkripce, posttranskripčních modifikací (miRNA) a dalších (recentně shrnuto [113]).

Již v roce 1997 bylo prokázáno, že prostředím s LDL částicemi, a to zejména oxLDL, vede k zvýšení exprese CD36 na makrofázích [114]. Vazba oxidovaných LDL aktivuje intracelulárně peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) a indukuje prozánětlivé změny. LDL částice jsou makrofágy vychytávány, jejich hromadění v plátech a přeměna na pěnové buňky je charakteristickým znakem aterogeneze. Oxidované LDL stimulují mechanismem závislým na CD36 produkci reaktivních kyslíkových radikálů a indukcí prozánětlivých změn v makrofázích, v důsledku tedy přispívají k polarizaci těchto makrofágů k M1 fenotypu a oxidativní fosforylaci [115]. OxLDL ovlivňuje i migraci makrofágů a i na tomto ději se zřejmě podílí CD36 receptor [116]. Recentně bylo také prokázáno, že s oxLDL spojená aktivace CD36 vede k produkci vimentinu a prozánětlivých cytokinů v makrofázích [117]. Pěnové buňky mohou kromě makrofágů vznikat i z myocytů cévní stěny. OxLDL jsou těmito buňkami vychytávány také přes CD36 receptor, přičemž tento děj byl v *in vitro* modelu blokován alfa-tokoferolem [118]. Dá se tedy shrnout, že oxLDL působí na makrofágy a myocyty cévní stěny proaterogenně. Statiny snižují expresi CD36, jak v kultivovaných myocytech cévní stěny [119] tak i na makrofázích [120], shodně snížení exprese na makrofázích tukové tkáně při užívání statinů demonstrovala i naše data [105]. Je také zajímavé, že lze dohledat řadu studií ukazujícími vliv dalších bioaktivních látek, zejména rostlinných léčivých produktů, na expresi CD36 a vychytávání lipidů (shrnut v [113]).

1.4. Shrnutí literárního přehledu

Subklinický zánět v tukové tkáni a jeho vztah k patologickým procesům byl v posledních letech intenzivně studován, nicméně zůstává mnoho nezodpovězených otázek. Ačkoliv klinická data jednoznačně prokázala vztah hypertrofie tukové tkáně k prozánětlivým změnám s významnými metabolickými důsledky, aplikace dat z *in vitro* studií na analýzu lidských tkání vedly k rozporuplným výsledkům. Klíčový děj, polarizace makrofágů, je v mikroprostředí tukové tkáně ovlivněna lokálně specifickými metabolickými vlivy. Data zařazená do této publikace byla získána analýzou lidských tkání a jednoznačně prokázala význam makrofágů s vysokou expresí markeru CD36. Výsledky jsou v souladu se studií, která paralelně sledovala polarizaci makrofágů v tukové tkáni *in vitro* [107].

2. Přehled výsledků zahrnutých do habilitační práce

2.1. Spolupráce s klinickými pracovišti

Veškerá data prezentovaná v této práci byla získána ve spolupráci jednak s chirurgickými klinikami Institutu klinické a experimentální medicíny – tj. Klinikou transplantační chirurgie a Klinikou kardiochirurgie, dále pak ve spolupráci s Pracovištěm laboratorních metod. V rámci rozsáhlého transplantačního programu bylo umožněno řešení našich výzkumných projektů zaměřených na význam tukové tkáně v patogenezi aterosklerózy. V naší první studii jsme analyzovali vzorky odebrané na oddělení patologie z explantovaných srdcí - vzorky proximální a distální části levé přední sestupné (*left anterior descending artery*, LAD) koronární arterie a perivaskulární tukové tkáně obklopující oba vzorky. Veškeré další výsledky prezentované v této práci byly uskutečněny ve spolupráci s Klinikou transplantační chirurgie, na které probíhá program transplantací ledvin od žijících dárců. Ačkoliv jsou živí dárce ledvin důkladně vyšetřeni, kritéria pro darování ledviny umožňují i účast dárců s různě zastoupenými rizikovými parametry kardiovaskulárních onemocnění – tj. obezita, dyslipidémie, mírná hypertenze. Tím je tato skupina vhodným modelem nejen pro studium zdravé tukové tkáně, ale i pro studium iniciálních fází aterosklerózy. Zcela unikátní je pak možnost získat vzorky tří různých tukových tkání, tj. SCAT, VAT a PVAT od jednoho dárce. Další výhodou těchto dárců je vysoká míra ochoty spolupracovat a tím i relevance dat získaných dotazníkovou formou. Transplantace od živých dárců jsou také plánovány v předstihu, což umožnilo zahájení zpracování vzorku během 15 minut po explantaci a tím využití průtokové cytometrie.

2.1.1. Význam množství a zánětlivých změn v perivaskulární tukové tkáně pro aterogenezi

Příloha č. 1: Kralova Lesna, Z. Tonar, I. Malek, J. Maluskova, L. Nedorost, J. Pirk, J. Pitha, V. Lanska, R. Poledne. Is the amount of coronary perivascular fat related to atherosclerosis?, *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 64 Suppl 3 (2015) S435-43.

IF 1,64

Cílem našeho prvního projektu zaměřeného na význam tukové tkáně bylo zjistit, zda množství PVAT má vliv na aterosklerotické změny v arteriích, které obklopuje. V literatuře je popisován pozitivní vztah mezi množstvím perivaskulární (většinou epikardiální) tukové tkáně [121, 122] a aterogenezi. Většina těchto dat byla však získána pomocí zobrazovacích metod [122], část post-mortem obdobně jako v naší studii [123]. Obecně lze říci, že data týkající se vlivu množství tukové tkáně na aterogenezi jsou inkonzistentní. V našem projektu jsme srovnali morfologické a imunologické parametry koronárních arterií a přilehlých perivaskulárních tukových tkání. Využili jsme srdcí explantovaných z dvou odlišných diagnóz. Modelem aterosklerózy byly tkáně získané ze srdcí explantovaných pro pokročilou aterosklerózu koronárních arterií (*coronary heart disease*, CHD, n=58). Tkáně srdcí explantovaných z důvodu pokročilé kardiomyopatie, bez významné koronární aterosklerózy, byly použity jako kontrolní (*dilated cardiomyopathy*, DCMP, n=38). Byly analyzovány plochy průřezu koronárních arterií a přilehlých perikoronárních tukových tkání, v dalším kroku byla s využitím imunohistochemie určena míra infiltrace těchto tkání makrofágy. Tyto parametry byly určeny ve dvou oblastech – tj. v proximální části (při odstupu arterie) a v distální části.

V rámci našeho souboru byli pacienti s CHD signifikantně starší (55.9 ± 8.6 let) oproti pacientům s DCMP (48.6 ± 12.3 let). Mezi skupinami nebyly zjištěny rozdíly v celkovém a HDL cholesterolu, tento výsledek byl ovlivněn rozdílnou frekvencí užívání hypolipidemické léčby mezi oběma skupinami (96% u pacientů s CHD vs. 29% u pacientů s DCMP). Pacienti s CHD měli vyšší hodnoty triglyceridů než pacienti s DCMP (11.53 ± 0.7 v.s. 1.13 ± 0.51 mmol.l⁻¹). Obě skupiny se nelišily v průměrném BMI. Plocha průřezu v obou vzorcích (proximální a distální) koronární arterie byl vyšší u pacientů s CHD oproti pacientům s DCMP, zatímco plocha přilehlé PVAT se mezi skupinami nelišila. V koronárních arteriích byl vyšší podíl makrofágů u pacientů s CHD oproti pacientům s DCMP ($p < 0.001$), nicméně v PVAT nebyl mezi skupinami nalezen rozdíl. Analýza distální části koronární arterie došla ke shodným výsledkům.

Podstatnou částí projektu je analýza vztahu mezi počtem makrofágů v cévní stěně a v PVAT. Ačkoliv byl nalezen velmi významný vztah mezi těmito parametry u pacientů s CHD ($r=0.45$, $p < 0.002$ a $r=0.43$ $p < 0.005$ v proximální, resp. distální části), tento vztah zcela chyběl při analýze tkání pacientů s DCMP.

Lze tedy shrnout, že při morfologické analýze nebyl potvrzen vztah mezi množstvím PVAT a aterosklerotickými změnami v karotických arteriích jak ukazovaly studie založené na zobrazovacích metodách. Je také zřejmé, že procesy určující infiltraci makrofágů do cévní stěny a perivaskulární tukové tkáně jsou u pokročilé, nikoliv incipientní, aterosklerózy spojeny, nicméně není jasné, zda je tento vztah přímý či nepřímý.

Zásadní limitací této práce byl fakt, že byly pouze identifikovány makrofágy, nicméně jejich charakter (tj. pro- či protizánětlivé) nebyl v rámci použité metodiky (imunohistochemie) možný. Další projekt byl tedy zaměřen na identifikaci subtypů makrofágů v tukové tkáni.

2.3. Využití průtokové cytometrie pro analýzu stromavaskulární frakce a volba sledovaných markerů.

Pro detailnější analýzu fenotypu buněk je optimální využití průtokové cytometrie, její nevýhodou je však nutnost zpracovat vzorek bezprostředně po odběru. Většina transplantací srdce probíhá neplánovaně a v nočních hodinách, proto pro další pokračování bylo nezbytné změnit model a další výsledky byly získány analýzou vzorků od živých dárců ledvin.

Pro objasnění typu polarizace v lidské tukové tkáni bylo prvotně identifikovat povrchové markery odlišující jednotlivé subpopulace makrofágů. Dalším úkolem bylo analyzovat rozdíly mezi jednotlivými tukovými tkáněmi. Navazujícím logickým krokem bylo zjištění vztahu takto fenotypově definovaných subpopulací makrofágů ke kardiovaskulárním rizikovým faktorům. Do tohoto prvotního projektu bylo zařazeno 52 živých dárců ledvin.

Markery použité pro rozlišení jednotlivých subpopulací byly nejprve určeny na základě literárních dat, gatovací strategie byla definována na základě primárních výsledků. Primárním markerem pro odlišení buněk monocyto-makrofágové řady byl CD14. I když byl výskyt tohoto markeru popsán i na dendritických buňkách, fakt, že takto identifikované buňky v 95% exprimovaly alespoň jeden další scavengerový receptor, svědčí pro vhodnost tohoto přístupu. Na základě publikovaných dat jsme do panelu sledovaných znaků zvolili znak CD16, tj. nízkoafinní receptor pro imunoglobuliny. Krevní monocyty vysoce exprimující CD16 byly opakovaně popsány jako prozánětlivé s vyšší kapacitou prezentace antigenu a produkce prozánětlivých cytokinů [124-126], tomu odpovídalo i popsání snížení této subpopulace v krvi při imunosupresivní léčbě [127, 128] či snížení jeho exprese na makrofázích v *in vitro* studii [129]. Expese CD16 byla popsána také u tkáňově specifických diferencovaných prozánětlivých makrofágů [130]. Výskyt tohoto znaku na makrofázích v tukové tkáni sledoval Bourlier [99], kdy popsal vyšší zastoupení makrofágů CD206+CD16- v lidské subkutánní tukové tkáni u obézních žen. Podobný fenotyp makrofágů byl sledován i v další studii, ve které však intervence dietou vedla k poklesu subpopulací makrofágů bez ohledu na expresi tohoto znaku [131]. Ačkoliv význam CD36 (dle nového označení také *scavenger receptor* B2, SR-B2) pro aterogenezi byl podrobně popsán (viz výše), nebylo v době zahájení našeho projektu mnoho známo o expresi znaku CD36 na specificky na makrofázích tukové tkáně. Jak bylo uvedeno výše, expese CD36 není limitována na monocyty či makrofágy. K volbě tohoto markeru nás kromě vztahu k aterogenezi vedla nejen jeho účast v lipidovém metabolismu, kterého se účastní nejen jako translokáza mastných kyselin, ale i účast v reverzním transportu cholesterolu. V průběhu projektu byla správnost této volby potvrzena, neboť Kratz [107] popsal specifickou polarizaci makrofágů v prostředí bohatém na glukózu, palmitát a inzulin. Kultivace makrofágů v tomto prostředí, blízcím se mikroprostředí v tukové tkáni, vedla k nárůstu exprese CD36. Autoři na základě výsledků popsali nový fenotyp makrofágů s vysokou expresí CD36, který nazvali metabolicky aktivované makrofágy. Posledním analyzovaným markerem byl CD163. Jde o hemoglobino-scavengerový receptor, u nějž majorita publikovaných dat prokázala protizánětlivé vlastnosti a který bývá užíván k určení M2 makrofágů, nicméně i jeho role v tukové tkáni je zřejmě ambivalentní [131, 132].

2.4. Charakterizace a srovnání makrofágů izolovaných z lidské podkožní, viscerální a perivaskulární tukové tkáně

Příloha č. 2:

I. Kralova Lesna, A. Kralova, S. Cejkova, J. Fronek, M. Petras, A. Sekerkova, F. Thieme, L. Janousek, R. Poledne. Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue, *Journal of translational medicine* 14(1) (2016) 208. IF 3,79

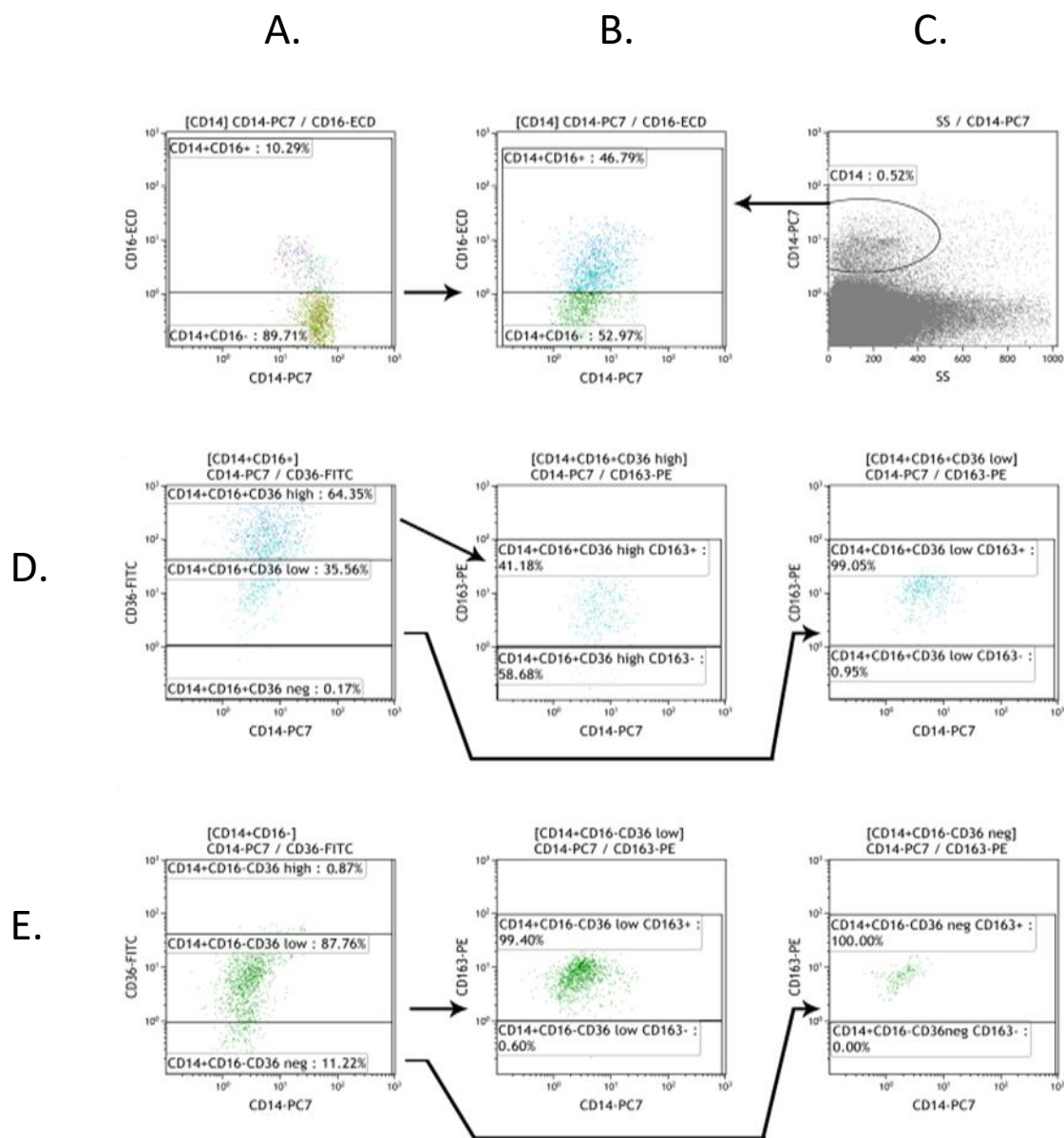
Vzorky tukových tkání byly odebrány dárcům při dodržení všech zákonných norem, zejména podepsání informovaného souhlasu. V rámci standardního operačního výkonu očištění a vyjmutí ledviny byla odebrána viscerální (vně Gerotovy fascie) a perivaskulární (obklopující *a. renalis*) tuková tkáň, pouze SCAT a vzorky krve byly odebírány nad rámec běžného postupu. Do studie bylo zařazeno 52 klinicky zdravých dárců. Klinická data byla získána z dokumentace zařazených subjektů a z vyplnění standardizovaného dotazníku zaměřeného na kardiovaskulární rizikové faktory, dotazník byl vyplněn během vyšetření studijní sestrou po zařazení subjektu do studie.

Krevní vzorky byly odebrány po 12 hodinovém lačnění, bezprostředně před podáním anestézie před operací. Celkový cholesterol, triglyceridy a HDL cholesterol byly stanoveny enzymatickou metodou, v případě HDL frakce po precipitaci apolipoprotein B obsahujících částí. hsCRP byl stanoven immunotubidimetrickou metodou.

Detailní postup izolace SVF a analýza makrofágů pomocí průtokové cytometrie byl publikován [103]. Velmi krátce, tuková tkáň byla bezprostředně po odběru donesena do laboratoře, viditelné krevních cévy a fibrózní tkáň byly odstraněny. Vzorky tukové tkáně byly nastříhány na velmi malé díly (cca 1mm³), poté znovu pročištěny. Dílky tukové tkáně byly natráveny kolagenázou při teplotě 37°C a došlo k oddělení SVF od adipocytů. SVF byla poté opakovaně očištěna (centrifugací) a filtrována (50um filtr). Po inkubaci s monoklonálními protilátkami (antiCD14, antiCD16, anti CD36, antiCD163) byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru.

Prvotním zjištěním bylo definování subpopulací makrofágů v SVF pomocí zvolených znaků. Shodně ve všech tukových tkáních bylo možné rozdělit CD14 pozitivní makrofágy na základě koexpresie CD16 znaku na zhruba stejně velké subpopulace (obr. 1). Obě tyto subpopulace (tj. CD14+CD16+ a CD14+CD16-) vykazovaly odlišnou distribuci CD36 markeru. Část CD14+CD16+ makrofágů exprimovala CD36 ve velmi vysoké intenzitě (CD36^{high}), ostatní makrofágy exprimovaly CD36 jen slabě. Oproti tomu CD14+CD16- subpopulace uniformně slabě exprimovala CD36 (CD36^{low}). Detailní analýza zahrnující i případnou koexpresi CD163 markeru prokázala, že velká část makrofágů tento znak exprimovala, makrofágy bez exprese CD163 byly nalezeny pouze v rámci CD14+CD16CD36^{high} frakce.

Obrázek 1. Gatovací strategie analýzy stromavaskulární frakce



Obr. 1 . Analýza stromavaskulární frakce izolované z tukové tkáně. A: hranice positivity CD16 markeru byla nejprve nastavena na krevním vzorku. C: byly identifikovány CD14+ buňky v SVF a B: podle nastavené hranice pro CD16 byly v SVF identifikovány dvě subpopulace. D(vlevo): CD16 pozitivní (CD16+) makrofágy byly rozděleny podle míry exprese CD36 a následně D (uprostřed a vpravo): i podle koexprese CD163. Podobně E (vlevo): CD16 negativní makrofágy (CD16-) byly rozděleny na základě CD36 markeru a následně (E uprostřed a vpravo) koexprese CD163 (převzato z [103])

Výsledky:

- Byly identifikovány subpopulace makrofágů v lidské SCAT, VAT a PVAT. Prozánětlivý fenotyp CD14+CD16+ makrofágů byl potvrzen unikátním výskytem subpopulace s vysokou expresí CD36 markeru a zároveň pouze v této CD14+CD16+CD36^{high} subpopulace byly identifikovány makrofágy neexprimující CD163 (jehož exprese je typická pro protizánětlivé M2 makrofágy). Makrofágy s vysokou expresí CD36 se v rámci subpopulace CD14+CD16- nevyskytovaly. V souladu s předpokládaným protizánětlivým fenotypem byl CD163 exprimován uniformě na všech makrofázích této subpopulace.
- Zatímco VAT a PVAT mají velmi podobné zastoupení sledovaných subpopulací makrofágů, významné rozdíly byly identifikovány oproti SCAT, která vykazovala významně menší proporce makrofágů s prozánětlivým fenotypem (CD14+CD16+CD36^{high}) (39.4 a 38.7% ve VAT, resp. PVAT, oproti 32.7% v SCAT)
- Dalším zjištěním bylo, že ačkoliv v celém souboru nebyly zjištěny rozdíly mezi muži a ženami, proporce makrofágů byly odlišné u pre- a postmenopauzálních žen. Menopauza významně zvýšila rozdíly mezi jednotlivými tkáněmi, přičemž u postmenopauzálních žen bylo pozorováno i relativně vyšší zastoupení prozánětlivých fenotypů v PVAT oproti premenopauzálním (45.2 v.s. 34.8%).

Závěry:

1. Použitá gatovací strategie umožnila rozdělení makrofágů ve sledovaných tukových tkáních. Zcela nově byla popsán význam CD36 v rámci analýzy makrofágů tukové tkáně.
2. Makrofágy izolované z SCAT vykazují méně prozánětlivých markerů oproti tukové tkáni viscerální či perivaskulární.
3. Menopauza je spojena s přesmykem části makrofágů VAT a PVAT směrem k prozánětlivému fenotypu.

2.5. Vztah proporce metabolicky aktivovaných makrofágů k prediktorům kardiovaskulárního rizika

Příloha č. 3:

I. Kralova Lesna, R. Poledne, J. Fronek, A. Kralova, A. Sekerkova, F. Thieme, J. Pitha. Macrophage subsets in the adipose tissue could be modified by sex and the reproductive age of women. *Atherosclerosis* 241(1) (2015) 255-8. IF 3.94

Příloha č. 4:

R. Poledne, I. Kralova Lesna, A. Kralova, J. Fronek, S. Cejkova, The relationship between non-HDL cholesterol and macrophage phenotypes in human adipose tissue. *J Lipid Res* 57(10) (2016) 1899-1905. IF 4.71

Příloha č. 5:

I.K. Lesna, S. Cejkova, A. Kralova, J. Fronek, M. Petras, A. Sekerkova, F. Thieme, L. Janousek, R.Poledne. Human adipose tissue accumulation is associated with pro-inflammatory changes in subcutaneous rather than visceral adipose tissue, *Nutr Diabetes* 7(4) (2017) e264. IF 2.74

Příloha č. 6:

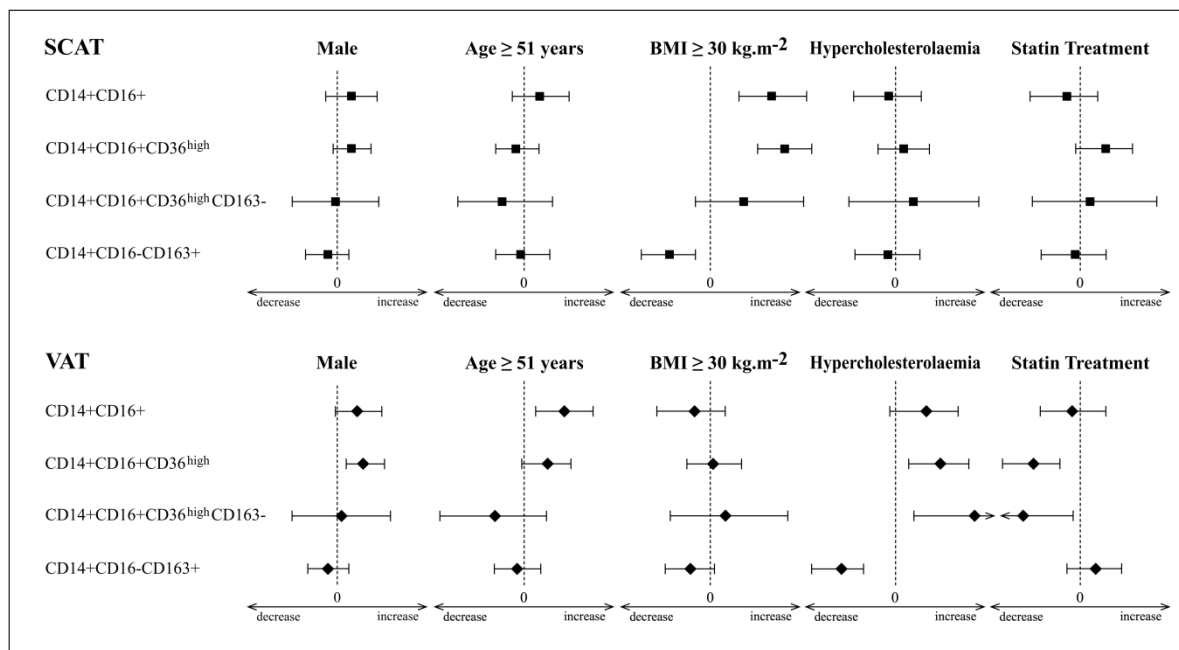
Kralova Lesna, M. Petras, S. Cejkova, A. Kralova, J. Fronek, L. Janousek, F. Thieme, T. Tyll, R. Poledne. Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macrophage polarization: Is there a link?. Eur J Prev Cardiol 25(3) (2018) 328-334. IF 5,74

Příloha č. 7:

Kauerova S, Bartuskova H, Muffova B, Janousek L, Fronek J, Petras M, Poledne R, Kralova Lesna I. Statins directly influence the polarization of adipose tissue macrophages: A role in chronic inflammation. Biomedicines (2021) Feb 19;9(2):211 IF 4,7

V této kapitole jsou shrnuty výsledky pěti publikací zahrnutých do této práce. V době zahájení analýz byla již k dispozici práce popisující specifickou polarizaci makrofágů spojenou s vysokou expresí CD36 v prostředí simulujícím mikroprostředí tukové tkáně [107] a takto polarizované makrofágy autoři nazvali metabolicky aktivované. V souladu s tím jsou takto v dalším textu nazývány makrofágy s fenotypem CD14+CD16+CD36^{high}. SCAT a VAT získané od dárců ledvin (n=52) byly zpracovány a v izolované SVF byly pomocí průtokové cytometrie určeny subpopulace makrofágů. Analýza výsledků potvrdila vztah metabolicky aktivovaného prozánětlivého fenotypu makrofágů v tukové tkáni k rizikovým faktorům KVO, tj. menopauze [133], nonHDL cholesterolu [134] a *body mass indexu* (BMI) [135]. Vzhledem k výrazné provázanosti těchto rizikových faktorů byla data následně rozšířena o výsledky získané analýzou SCAT a VAT pacientů s pokročilou aterosklerózou dolních končetin řešenou rekonstrukcí arteriálního řečiště (n=27) a následně reanalyzována Bayesovou analýzou [105]. Po adjustaci dat bylo potvrzeno významnější spojení prozánětlivé polarizace makrofágů s rizikovými faktory KVO ve VAT oproti tkáni SCAT (obr. 2). Výsledky ukázaly, že mužské pohlaví, a hypercholesterolemie významně zvyšovaly proporci metabolicky aktivovaných (CD14+CD16+CD36^{high}) ve SVF izolované z VAT, naopak léčba statiny tuto subpopulaci jednoznačně snižovala. Naopak pouze vysoký BMI (nad 30 kg.m⁻²) zvyšoval proporci této subpopulace ve SCAT, vliv ostatních prediktorů zjištěn nebyl. Je zajímavé, že zahrnutí absence znaku CD163 do analýzy a tím zpřesnění prozánětlivého charakteru takto určené subpopulace (tj. C14+CD16+CD36^{high}CD163-) výsledky zásadně neovlivnilo.

Obrázek 2. Vliv sledovaných prediktorů kardiovaskulárního onemocnění na nárůst či pokles subpopulací makrofágů



Obr. 2.

Vliv sledovaných prediktorů kardiovaskulárního onemocnění na nárůst či pokles proporcí subpopulací makrofágů. Stromkový graf zachycuje rozdíly, včetně 99% důvěryhodného intervalu u subjektů, které splnily zkoumaný prediktor. V případě že úsečka neprotínala osu v bodě nula, pak byl prokázán efekt takového prediktoru na zvýšení či snížení dané subpopulace makrofágů [105].

Vztah hypercholesterolemie k polarizaci jednotlivých subpopulací makrofágů v tukové tkáni byl dále podrobně analyzován [134]. Ačkoliv hladina nonHDL cholesterolu nijak neovlivnila celkové množství makrofágů izolovaných z tukové tkáně, byla prokázána mírná korelace s počtem subpopulace koexprimující i CD16, tj. subpopulace v rámci které byl prokázán výskyt metabolicky aktivovaných makrofágů. Síla vztahu mezi nonHDL cholesterolem a prozánětlivými makrofágy byla mimořádně významná pro CD14+CD16+ i CD14+CD16+CD36^{high} makrofágy a bylo možné detekovat i vliv zpřesnění fenotypu (CD 36 znak) na sílu vztahu ($r=0.46$, $p<0.0005$, respektive $r=0.54$, $p<0.0001$). Tento vztah byl velmi silný i pokud jsme do analýzy zařadili pouze subjekty s fyziologickou hladinou nonHDL cholesterolu, tj. méně než 4.00 mmol/l. Je tedy zřejmé, že i v tomto rozmezí je hladina cholesterolu svázána se zánětlivými změnami v tukové tkáni.

Zjištěný vliv statinů na polarizaci makrofágů tukové tkáně stimuloval další návazné analýzy. Nejprve byl tento vztah potvrzen na větším souboru pacientů ($n=118$) a následně byl potvrzen i v *in vitro* i *in vivo* experimentu na hlodavcích [136].

Závěry:

V tomto projektu byl prokázán vztah mezi metabolicky aktivovanými makrofágy s vysokou expresí CD36 a sledovanými rizikovými prediktory KVO. Za velmi významný výsledek lze považovat i vliv léčby statiny, neboť právě protizánětlivým účinkem statinů bývá vysvětlován jejich protektivní terapeutický účinek, který přesahuje jejich hypolipidemický význam.

2.6. Ovlivnění adheze monocytů k endotelu biologicky aktivními produkty tukové tkáně

Příloha č. 8:

S. Cejkova, H. Kubatova, F. Thieme, L. Janousek, J. Froněk, R. Poledne, I. Kralova Lesna. The effect of cytokines produced by human adipose tissue on monocyte adhesion to the endothelium, *Cell Adh Migr* 13(1) (2019) 293-302. IF 3.69

Vzhledem k vysoké sekreční aktivitě tukové tkáně jsme vznesli hypotézu, že látky uvolňované z tukové tkáně mohou přímo ovlivnit iniciační krok aterosklerogeneze, tj. adhezi monocytů k endotelu. Zaměřili jsme se na identifikaci látek produkovaných tukovou tkání s potenciálem ovlivnit adhezivitu endotelu pro monocyty a následně byl efekt těchto látek testován *in vitro*. V průběhu získávání vzorků tukových tkání pro předchozí projekt byly z části z odebrané VAT využity k vytvoření tzv. kondiciovaných médií. Ve sterilních podmínkách v laminárním boxu byla tuková tkáň očištěna, zbavena zbytků cév a fibrózních tkání a separována na velmi malé části. Takto získané vzorky tkání rozděleny na dvě části. První část byla v kultivačním médiu ponechána po dobu 24 hodin (tzv. *adipose tissue-conditioned media*, ATCM). Z druhé části byla nejprve izolována SVF, tato frakce byla pak také ponechána 24 hodin v kultivačním médiu (tzv. *stroma-vascular fraction-conditioned media*, SVFCM) pro analýzu uvolněných produktů vytvořených před odběrem tkáně do média. V těchto médiích byla stanovena hladiny IL1 β , TNF α , MCP-1, IL-10, RANTES/CCL5, IL-4, IL-5, a CXCL5. Data jasně ukázala zásadně vyšší hodnoty TNF α v SVFCM oproti ATCM ($p < 0.02$). Naopak koncentrace IL-6, MCP-1 a IL-10 byly významně vyšší v ATCM oproti SVFCM ($p < 0.001$), vyšší byla i koncentrace RANTES ($p < 0.01$). Koncentrace IL1 β byla shodná v obou typech médií. Výsledky tedy ukázaly, že TNF α je tvořen primárně buňkami SVF, zatímco zdrojem IL-6, MCP-1, IL-10 a RANTES jsou primárně adipocyty.

Využití takto vytvořených kondiciovaných médií nám umožnilo přiblížení k *in vivo* situaci. Byl testován ATCM na adhezi monocytů (THP-1 linie) k endotelu (HUVEC) a tím tedy i možný přímý vliv produktů tukové tkáně na tento děj. HUVEC byly výrazně stimulovány inkubací s ATCM, došlo k signifikantnímu zvýšení jejich adhezivity pro THP-1 monocyty ($p < 0.001$). Byl vyhodnocen vztah mezi koncentracemi jednotlivých cytokinů v ATCM k adhezi monocytů indukované kokultivací HUVEC s ATCM. Následný oddělený experiment, kde byly využity inhibitory jednotlivých cytokinů, umožnil vyhodnotit jejich vliv odděleně. V aktivovaném endotelu byla určena genová exprese vybraných adhezních molekul a cytokinů.

Výsledky demonstrovaly jednoznačný vliv IL1 β , TNF α , MCP-1 IL-10 a RANTES na adhezi monocytů. Využití inhibitorů jednotlivých cytokinů ukázalo zásadní význam IL1 β a TNF α na tento proces. Kondiciovaná média dále zvýšila genovou expresi *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), MCP-1 a IL-6 v jimi ovlivněných HUVEC, zatímco exprese TGF β byla v takto stimulovaných buňkách snížena.

Závěr:

Dá se tedy shrnout, že byla potvrzena vysoká sekreční aktivita VAT s tím, že dominantním zdrojem TNF α jsou buňky SVF a lze předpokládat, že na této produkci se podílí zejména makrofágy. Naopak IL-6, MCP-1 a IL-10 jsou tvořeny zejména adipocyty. Zjištěná data jednak podporují možnost přímého vlivu produktů tukové tkáně na adhezi monocytů na endotel a tedy iniciační fázi aterosklerózy, klíčový vliv má zřejmě TNF α a IL1 β .

2.7. Vztah mezi polarizací makrofágů tukové tkáně a spektrem mastných kyselin ve fosfolipidech buněčných membrán.

Příloha č. 9:

R. Poledne, H. Malinska, H. Kubatova, J. Froněk, F. Thieme, S. Kauerova, I.K. Lesna. Polarization of Macrophages in Human Adipose Tissue is Related to the Fatty Acid Spectrum in Membrane Phospholipids, *Nutrients* 12(1) (2019). IF 4.55

Další otázkou, kterou jsme si položili, se týkala vztahu mezi prozánětlivými změnami tukové tkáně (polarizace makrofágů) k spektru mastných kyselin ve fosfolipidech tukové tkáně. Jde o velmi relevantní problém, neboť jeden z parametrů zásadně ovlivňujících polarizaci byla hladina nonHDL cholesterolu, tj. faktoru ovlivnitelného dietou. Dieta je faktorem zásadně ovlivňujícím i metabolismus mastných kyselin, přičemž u některých (esenciálních) mastných kyselin je dieta jediným zdrojem a jejich přítomnost v buněčných membránách ji tedy reflektuje.

Část (cca 500ug) VAT byla zamrazena a zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve fosfolipidech tukové tkáně bylo stanoveno plynovou chromatografií. Data týkající se diety subjektů (se zaměřením na používání rostlinných či živočišných tuků a konzumaci ryb a ořechů), byla získána dotazníkovou formou. Následně byly analyzovány vztahy mezi proporcí metabolicky aktivovaných makrofágů a proporčním zastoupením hlavních mastných kyselin izolovaných z identické tukové tkáně.

Proporce metabolicky aktivovaných makrofágů a kyseliny palmitové, stejně jako jejího desaturačního produktu, tj. kys palmitooleové, korelovala významně ($p < 0.05$ a $p < 0.001$), přičemž vztah proporce kyseliny stearové vykazoval opačný trend ($p < 0.05$). Naopak s nárůstem n-3 polynenasycených kyselin (α -linolenová a eikosapentaenová) klesaly proporce metabolicky aktivovaných makrofágů ($p < 0.05$ a $p < 0.01$, respektivně). Byly analyzovány i vztahy sledovaných mastných kyselin k protizánětlivým makrofágům, tyto vztahy byly v zásadě inverzní k vztahům k metabolicky aktivovaným makrofágům. I tato analýza potvrdila zásadní vztah zastoupení kyseliny palmitooleové ve fosfolipidech buněčných membrán k protizánětlivé polarizaci makrofágů tukové tkáně.

Naše výsledky jsou v souladu s publikovanými výsledky ukazujícími možnosti ovlivnění zánětu v tukové tkáni dietou [137] či vazbu mezi metabolismem mastných kyselin a polarizací makrofágů [138]. Obecně se předpokládá, že *de novo* syntetizované mastné kyseliny jsou inkorporovány do fosfolipidů buněčných membrán a přímo ovlivňují polarizaci makrofágů. Za tohoto předpokladu naše výsledky naznačují, že kyselina palmitová, konečný produkt syntézy mastných kyselin, může vést

k prozánětlivé polarizaci makrofágů. Překvapivě byl zjištěn rozdílný vztah mezi prozánětlivými makrofágy a kyselinou palmitovou, resp. kyselinou stearovou. Ačkoliv nejsou k dispozici data vysvětlující tento rozdíl lze spekulovat, že je výsledkem kompartmentizace prozánětlivých dějů [139]. V našich výsledcích je patrný zásadní vliv kyseliny palmitooleové; její zastoupení ve fosfolipidech buněčných membrán, ač je relativně zastoupena málo, mělo nejužší vztah s prozánětlivými makrofágy. I takto malá proporce však může zásadně ovlivnit funkci membrány, neboť kyselina palmitooleová je v rámci buněčných membrán zastoupena disproporčně. Vyskytuje se zejména v tzv. membránových raftech, tj. mimořádně důležitých oblastech buněčných membrán zodpovědných za signalizaci a prostupnost [140]. Negativní efekt palmitové kyseliny v dietě na reverzní transport cholesterolu prokázala naše starší práce [141], vliv tohoto typu diety na tento děj i na indukci sekrece prozánětlivých cytokinů z peritoneálních makrofágů prokázali i další autoři [142]. Více je známo o pozitivním efektu omega-3 mastných kyselin pro udržení fyziologického stavu tukové tkáně (recentně shrnuto [143]).

Zajímalo nás dále, nakolik se tyto vztahy v tukové tkáni odrážejí v systémovém zánětu, detekovaném zvýšením koncentrace TNF α v plazmě. Ačkoliv vztahy mezi hladinou tohoto významného prozánětlivého cytokinu k proporcím jednotlivých mastných kyselin byly v zásadě ve shodě výsledky zjištěnými pro proporce metabolicky aktivovaným makrofágům, statisticky významné byly pouze negativní korelace s n-3 polynenasycenými mastnými kyselinami (data nebyla zařazena do publikovaného článku [144]).

Analýza vztahu mezi proporcí metabolicky aktivovaných makrofágů a dietním skóre ukázala významný vztah ($p < 0.01$), kdy vyšším proporcím těchto makrofágů odpovídala skóre odpovídající vysoké konzumaci živočišných tuků a minimálnímu zastoupení ryb a ořechů v dietě.

Závěr:

Lze tedy shrnout, že naše data naznačují nově popsany vztah mezi imunitními a metabolickými ději. Zásadní limitací tohoto projektu je analýza všech membrán v tukové tkáni, přičemž chybí informace ohledně podílu jednotlivých frakcí (alespoň rozdělení adipocytů a stromavaskulární frakce). Tímto problémem se zabývá nově zahájený projekt (9/2020).

2.8. Spojení prozánětlivých změn ve viscerální a perivaskulární tukové tkáni a cévní stěně

Příloha č. 10:

H. Kubatova, S. Kauerova, M. Petras, R. Poledne, J. Froněk, L. Janousek, I. Kralova Lesna. Links between macrophages in perivascular adipose tissue and the arterial wall: A role in atherosclerosis initiation?

V roce 2015 byl zahájen nový projekt, jehož cílem bylo objasnit, nakolik je polarizace makrofágů v tukové tkáni spojena s obdobnými změnami v cévní stěně, a pokud ano, tak zda je tento vztah systémový či lokální. Výsledky tohoto projektu byly recentně zpracovány a jsou připraveny k publikaci. Opět byly využity tkáně standardně odebírané dárcům ledvin, tentokrát byla analyzována nejen VAT a PVAT, ale i odebraný úsek *a.renalis*, kterou tato PVAT obklopovala. Jde o tu část arterie, která je mechanicky poškozena kovovými svorkami, nelze ji tedy použít pro transplantační výkon a vzorky

nezařazené do projektu jsou likvidovány. Metodicky byla tato studie velmi podobná předchozí studii, tím nám i umožnila následné propojení obou souborů. Odlišně jsme hodnotili obezitu – kromě hodnocení BMI jsme u pacientů stanovili % tělesného tuku. V dotaznících jsme se zaměřili na přesný údaj ohledně kouření, tento faktor byl pak zařazen do analýzy. Vzhledem k tomu, že v předchozích analýzách jsme neprokázali význam sledování exprese CD163, vyřadili jsme ho v této studii z panelu markerů. Byly tedy hodnoceny metabolicky aktivované makrofágy (CD14+CD16+CD36^{high}), protizánětlivé makrofágy (CD14+CD16-CD36^{low}) a transientní subpopulace (CD14+CD16+CD36^{low}). Nově byla analyzována *a. renalis* – postup izolace makrofágů z cévy se mírně odlišoval od izolace z tukové tkáně, pro natrávení bylo nutné použít kromě kolagenázy i hyaluronidázu.

Získaná data od 68 pacientů byla opět analyzována Bayesovou analýzou (Metropolis-Hastings algoritmus). Subjekty byly stratifikovány podle přítomnosti či nepřítomnosti zkoumaného prediktoru. Na základě toho byl vyhodnocen hrubý rozdíl průměrných hodnot makrofágových subpopulací mezi subjekty s přítomným a nepřítomným prediktorem. Tento rozdíl byl doplněn 95% intervalem spolehlivosti. Tytéž rozdíly, ovšem adjustované všemi sledovanými prediktory byly získány z koeficientů multivariátní lineární regrese za použití Bayesovského přístupu s pomocí algoritmu Metropolis – Hastings. Rozdíl byl navíc doplněn přísnějším 99% důvěryhodným intervalem. Nově byla dále přijata kritéria hodnocení pro přijatelnou asociaci mezi změnou hladin studovaných makrofágů a zkoumaným prediktorem. Pokud rozdíl včetně spodního či horního limitu 99% důvěryhodného intervalu byl vyšší nebo nižší než 2 % (delta margin), pak byla změna, tj. nárůst nebo pokles, považována za relevantní. Tímto hodnocením se podařilo eliminovat rozdíly sice statisticky významné, ale bez zřejmého klinického dopadu.

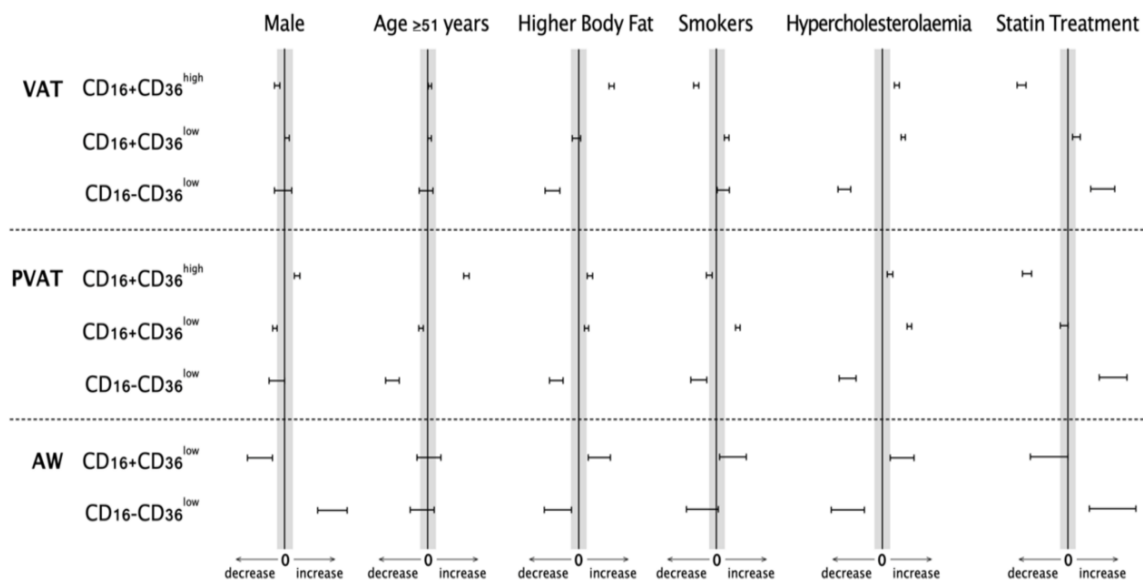
V tomto novém souboru jsme potvrdili výsledky předchozí studie a vztahy sledovaných prediktorů KVO a subpopulací makrofágů SVF izolovaných z VAT byly v zásadě shodné (Obr.3). I v této analýze byla zásadním rizikovým faktorem zvyšujícím proporce metabolicky aktivovaných makrofágů ve VAT hypercholesterolémie a opět užívání statinů mělo opačný efekt. Nově jsme prokázali i vztah vyššího procenta tělesného tuku k proporcí metabolicky aktivovaných makrofágů (nicméně pokud jsme hodnotili BMI tak opět vztah nalezen nebyl). Kouření hraničně zvyšovalo zastoupení transientních makrofágů, přesun byl na úkor metabolicky aktivovaných makrofágů.

Výsledky analýzy PVAT také prokázaly vliv rizikových faktorů CVD na zvýšení proporce metabolicky aktivovaných makrofágů – prokázán byl vztah k mužskému pohlaví, vyššímu věku, a obezitě, vztah k hypercholesterolémii byl hraniční. Efekt užívání statinů na tuto subpopulaci byl identický efektu nalezenému ve VAT. Kouření zvyšovalo počet transientních makrofágů v PVAT, opět obdobně jako ve VAT. Protizánětlivá subpopulace klesala s vyšším věkem, obezitou, kouřením a hypercholesterolémií, naopak léčba statiny proporcí této subpopulace zvyšovala.

Makrofágy izolované z arteriální stěny uniformně exprimovaly CD36 slabě, bylo možné odlišit dvě subpopulace na základě exprese CD16. Subpopulace CD14+CD16+CD36^{low} se zvyšovala s obezitou a hypercholesterolémií. Prokázán byl i pokles CD14+CD16-CD36^{low} při hypercholesterolémii a hraničně i u obézních. Velmi zajímavý byl vliv mužského pohlaví, kdy trend byl v zásadě opačný – tj. tento rizikový faktor byl v protikladu k ostatním faktorům. Vliv pohlavních hormonů na expresi genů

v makrofázích byl nicméně prokázán [145] a *in vitro* bylo prokázáno i snížení exprese prozánětlivých cytokinů vlivem testosteronu [146]. Lze tedy připustit odlišný vliv tohoto rizikového faktoru CVD.

Obrázek 3. Subpopulace makrofágů asociovaných s rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění a léčbou statiny



Obr. 3. Vliv sledovaných prediktorů kardiovaskulárního onemocnění na nárůst či pokles podílů subpopulací makrofágů. Linky ukazují rozdíly dané subpopulace při přítomném či chybějícím prediktoru. Pokud linka včetně horního a dolního limitu nezahrnuje $\pm 2\%$ delta margin interval, pak daný prediktor zvyšuje či snižuje danou subpopulaci. VAT; N = 65, PVAT; N = 62 a stěně arterie (AW); N = 63.

Analyzovali jsme vztahy pro všechny tři sledované subpopulace v obou tukových tkáních k subpopulacím makrofágů v cévní stěně. V žádné z analýz nebyl nalezen vztah mezi subpopulacemi makrofágů ve VAT a cévní stěně. Byl ale nalezen signifikantní vztah mezi transientní subpopulací makrofágů PVAT a subpopulací makrofágů CD14+CD16-CD36^{low}. Vzhledem k našim datům a k nárůstu této subpopulace s obezitou a hypercholesterolémií a naopak poklesu při léčbě statiny je zřejmý protizánětlivý charakter těchto makrofágů. Je také zajímavé, že pokud jsme se v analýze zaměřili na vliv jednotlivých rizikových faktorů, tak zásadní vliv byl prokázán pro mužské pohlaví a hypercholesterolémiie, neboť v těchto skupinách subjektů došlo k výraznému prohloubení těsnosti vztahu.

V této studii jsme u deseti vzorků SVF sortováním oddělili makrofágy, ty pak byly rozděleny na základě exprese CD16 markeru (tj. CD14+CD16+ a CD14+CD16-). V takto oddělených buněčných suspenzích jsme demonstrovali významně vyšší genovou expresi TNF α , IL-1 β a NF κ B ($p < 0.001$,

p=0.025 a p=0.045). Rozdělení pomocí exprese CD16 markeru tedy ukázalo signifikantně vyšší prozánětlivý charakter CD16 pozitivních makrofágů izolovaných z tukové tkáně. Ačkoliv metodicky nebylo možné analyzovat plně charakterizované metabolicky aktivované makrofágy (tj. CD14+CD16+CD36^{high}), pokládáme v kontextu našich dat a zastoupení této subpopulace výhradně v rámci CD14+CD16+ subpopulace za prokázaný prozánětlivý charakter námi sledovaných metabolicky aktivovaných makrofágů.

Závěr:

Prezentovaná data je nutno hodnotit opatrně, nicméně jednoznačně podporují hypotézu, že PVAT lokálně ovlivňuje přilehlou cévní stěnu. Je možné, že transientní makrofágy mají vyšší kapacitu ovlivnit okolní tkáň například sekrecí cytokinů, oproti plně polarizovaným makrofágům. To je principiálně v souladu s průkazem makrofágů s povrchovými protizánětlivými markery, které vykazovaly vyšší sekreci prozánětlivých cytokinů v porovnání s makrofágy nesoucími prozánětlivé CD znaky [98]. Naše vzorky byly získané od jedinců s incipientními fázemi aterogeneze a naše závěry lze aplikovat pouze v tomto kontextu a systémový účinek VAT v pokročilých fázích aterogeneze nelze vyloučit.

3. Závěrečné shrnutí

Prezentovaná práce zahrnuje soubor projektů, které byly řešeny v Institutu Klinické a Experimentální medicíny v letech 2012-2020. Jde o logicky na sebe navazující studie, jejichž prvotním cílem je objasnění mechanismů, kterými lidská tuková tkáň ovlivňuje rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. Zásadním přínosem je jednak definování specifického fenotypu makrofágů v lidské tukové tkáně a jejich vztahu k prediktorům kardiovaskulárních onemocnění, dále pak prokázání přímého spojení prozánětlivých změn arteriální stěny a přilehlé perivaskulární tukové tkáně v iniciální fázi aterogeneze. Ačkoliv protizánětlivé účinky statinů jsou dlouhodobě popsány *in vitro*, jejich vztah k polarizaci makrofágů izolovaných z lidských tkání byl demonstrován prvně. Byla také potvrzena vysoká sekreční aktivita tukové tkáně a demonstrován vliv produktů tukové tkáně na iniciální fázi aterogeneze, změně adhezních vlastností endotelu spojené s vyšší adhezí monocytů.

4. Literatura:

- [1] P. Libby, D. Egan, S. Skarlatos, Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research, *Circulation* 96(11) (1997) 4095-103.
- [2] J.B. Muhlestein, J.L. Anderson, J.F. Carlquist, K. Salunkhe, B.D. Horne, R.R. Pearson, T.J. Bunch, A. Allen, S. Trehan, C. Nielson, Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease: primary clinical results of the ACADEMIC study, *Circulation* 102(15) (2000) 1755-60.
- [3] M. Naghavi, P. Wyde, S. Litovsky, M. Madjid, A. Akhtar, S. Naguib, M.S. Siadaty, S. Sanati, W. Casscells, Influenza infection exerts prominent inflammatory and thrombotic effects on the atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-deficient mice, *Circulation* 107(5) (2003) 762-8.
- [4] S. Sitia, L. Tomasoni, F. Atzeni, G. Ambrosio, C. Cordiano, A. Catapano, S. Tramontana, F. Perticone, P. Naccarato, P. Camici, E. Picano, L. Cortigiani, M. Bevilacqua, L. Milazzo, D. Cusi, C. Barlassina, P. Sarzi-Puttini, M. Turiel, From endothelial dysfunction to atherosclerosis, *Autoimmun Rev* 9(12) (2010) 830-4.
- [5] Y.I. Miller, S.H. Choi, L. Fang, S. Tsimikas, Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis, *Subcell Biochem* 51 (2010) 229-51.
- [6] A. Marques, M. Peralta, A. Naia, N. Loureiro, M.G. de Matos, Prevalence of adult overweight and obesity in 20 European countries, 2014, *Eur J Public Health* 28(2) (2018) 295-300.
- [7] H. Pontzer, M.H. Brown, D.A. Raichlen, H. Dunsworth, B. Hare, K. Walker, A. Luke, L.R. Dugas, R. Durazo-Arvizu, D. Schoeller, J. Plange-Rhule, P. Bovet, T.E. Forrester, E.V. Lambert, M.E. Thompson, R.W. Shumaker, S.R. Ross, Metabolic acceleration and the evolution of human brain size and life history, *Nature* 533(7603) (2016) 390-2.
- [8] J. Vague, [Sexual differentiation; Factor determining forms of obesity], *Presse Med* 55(30) (1947) 339.
- [9] H.E. Bays, J.M. González-Campoy, R.R. Henry, D.A. Bergman, A.E. Kitabchi, A.B. Schorr, H.W. Rodbard, Is adiposopathy (sick fat) an endocrine disease?, *Int J Clin Pract* 62(10) (2008) 1474-83.
- [10] K.B. Smith, M.S. Smith, Obesity Statistics, *Prim Care* 43(1) (2016) 121-35, ix.
- [11] R.K. Zwick, C.F. Guerrero-Juarez, V. Horsley, M.V. Plikus, Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue, *Cell Metab* 27(1) (2018) 68-83.
- [12] R. Canello, A. Zulian, D. Gentilini, S. Maestrini, A. Della Barba, C. Invitti, D. Corà, M. Caselle, A. Liuzzi, A.M. Di Blasio, Molecular and morphologic characterization of superficial- and deep-subcutaneous adipose tissue subdivisions in human obesity, *Obesity (Silver Spring, Md.)* 21(12) (2013) 2562-70.
- [13] M.E. Kranendonk, J.A. van Herwaarden, T. Stupkova, W. de Jager, A. Vink, F.L. Moll, E. Kalkhoven, F.L. Visseren, Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depots relate differently to metabolic risk factors for cardiovascular disease: distinct fat depots and vascular risk factors, *Atherosclerosis* 239(2) (2015) 419-27.
- [14] D.I. Siegel-Axel, H.U. Häring, Perivascular adipose tissue: An unique fat compartment relevant for the cardiometabolic syndrome, *Rev Endocr Metab Disord* 17(1) (2016) 51-60.
- [15] J. Sanchez-Gurmaches, D.A. Guertin, Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed, *Nat Commun* 5 (2014) 4099.
- [16] C.S. Fox, J.M. Massaro, U. Hoffmann, K.M. Pou, P. Maurovich-Horvat, C.Y. Liu, R.S. Vasan, J.M. Murabito, J.B. Meigs, L.A. Cupples, R.B. D'Agostino, Sr., C.J. O'Donnell, Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study, *Circulation* 116(1) (2007) 39-48.
- [17] S. Ahmadi, H.W. Kim, N.L. Weintraub, Potential role of perivascular adipose tissue in modulating atherosclerosis, *Clin Sci (Lond)* 134(1) (2020) 3-13.
- [18] D. Ferrara, F. Montecucco, F. Dallegri, F. Carbone, Impact of different ectopic fat depots on cardiovascular and metabolic diseases, *J Cell Physiol* 234(12) (2019) 21630-21641.
- [19] J.E. Richard, L. López-Ferreras, B. Chanclón, K. Eerola, P. Micallef, K.P. Skibicka, I. Wernstedt Asterholm, CNS $\beta(3)$ -adrenergic receptor activation regulates feeding behavior, white fat browning, and body weight, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 313(3) (2017) E344-E358.

- [20] B.S. Finlin, H. Memetimin, A.L. Confides, I. Kasza, B. Zhu, H.J. Vekaria, B. Harfmann, K.A. Jones, Z.R. Johnson, P.M. Westgate, C.M. Alexander, P.G. Sullivan, E.E. Dupont-Versteegden, P.A. Kern, Human adipose beiging in response to cold and mirabegron, *JCI Insight* 3(15) (2018).
- [21] R. Fernández-Verdejo, K.L. Marlatt, E. Ravussin, J.E. Galgani, Contribution of brown adipose tissue to human energy metabolism, *Mol Aspects Med* 68 (2019) 82-89.
- [22] S. Hildebrand, J. Stümer, A. Pfeifer, PVAT and Its Relation to Brown, Beige, and White Adipose Tissue in Development and Function, *Front Physiol* 9 (2018) 70.
- [23] L. Scheja, J. Heeren, The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease, *Nat Rev Endocrinol* 15(9) (2019) 507-524.
- [24] X. Su, D. Peng, Emerging functions of adipokines in linking the development of obesity and cardiovascular diseases, *Mol Biol Rep* (2020).
- [25] A.G. Izquierdo, A.B. Crujeiras, F.F. Casanueva, M.C. Carreira, Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later?, *Nutrients* 11(11) (2019).
- [26] T. Yamauchi, T. Kadowaki, Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases, *International journal of obesity* (2005) 32 Suppl 7 (2008) S13-8.
- [27] N. Ouchi, J.L. Parker, J.J. Lugus, K. Walsh, Adipokines in inflammation and metabolic disease, *Nature reviews. Immunology* 11(2) (2011) 85-97.
- [28] M.F. Landecheo, C. Tuero, V. Valentí, I. Bilbao, M. de la Higuera, G. Frühbeck, Relevance of Leptin and Other Adipokines in Obesity-Associated Cardiovascular Risk, *Nutrients* 11(11) (2019).
- [29] L. Van Wyngene, J. Vandewalle, C. Libert, Reprogramming of basic metabolic pathways in microbial sepsis: therapeutic targets at last?, *EMBO Mol Med* 10(8) (2018).
- [30] M.S. Ellulu, I. Patimah, H. Khaza'ai, A. Rahmat, Y. Abed, Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications, *Arch Med Sci* 13(4) (2017) 851-863.
- [31] T. McLaughlin, S.E. Ackerman, L. Shen, E. Engleman, Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease, *The Journal of clinical investigation* 127(1) (2017) 5-13.
- [32] I.J. Neeland, R. Ross, J.P. Després, Y. Matsuzawa, S. Yamashita, I. Shai, J. Seidell, P. Magni, R.D. Santos, B. Arsenault, A. Cuevas, F.B. Hu, B. Griffin, A. Zambon, P. Barter, J.C. Fruchart, R.H. Eckel, Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: a position statement, *Lancet Diabetes Endocrinol* 7(9) (2019) 715-725.
- [33] A.B. Molofsky, J.C. Nussbaum, H.E. Liang, S.J. Van Dyken, L.E. Cheng, A. Mohapatra, A. Chawla, R.M. Locksley, Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages, *J Exp Med* 210(3) (2013) 535-49.
- [34] Y. Zhang, P. Yang, R. Cui, M. Zhang, H. Li, C. Qian, C. Sheng, S. Qu, L. Bu, Eosinophils Reduce Chronic Inflammation in Adipose Tissue by Secreting Th2 Cytokines and Promoting M2 Macrophages Polarization, *Int J Endocrinol* 2015 (2015) 565760.
- [35] M. Hashiguchi, Y. Kashiwakura, H. Kojima, A. Kobayashi, Y. Kanno, T. Kobata, IL-33 activates eosinophils of visceral adipose tissue both directly and via innate lymphoid cells, *Eur J Immunol* 45(3) (2015) 876-85.
- [36] L. Lynch, M. Nowak, B. Varghese, J. Clark, A.E. Hogan, V. Toxavidis, S.P. Balk, D. O'Shea, C. O'Farrelly, M.A. Exley, Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production, *Immunity* 37(3) (2012) 574-87.
- [37] M. Feuerer, L. Herrero, D. Cippolletta, A. Naaz, J. Wong, A. Nayer, J. Lee, A.B. Goldfine, C. Benoist, S. Shoelson, D. Mathis, Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters, *Nat Med* 15(8) (2009) 930-9.
- [38] N.E. Boutagy, R.P. McMillan, M.I. Frisard, M.W. Hulver, Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant?, *Biochimie* 124 (2016) 11-20.
- [39] S.J. Creely, P.G. McTernan, C.M. Kusminski, M. Fisher, N.F. Da Silva, M. Khanolkar, M. Evans, A.L. Harte, S. Kumar, Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(3) (2007) E740-7.
- [40] K. McKernan, M. Varghese, R. Patel, K. Singer, Role of TLR4 in the induction of inflammatory changes in adipocytes and macrophages, *Adipocyte* 9(1) (2020) 212-222.

- [41] K. Miyake, Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2, *Trends Microbiol* 12(4) (2004) 186-92.
- [42] M. Fresno, R. Alvarez, N. Cuesta, Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity, *Arch Physiol Biochem* 117(3) (2011) 151-64.
- [43] J.W. Seo, E.J. Yang, K.H. Yoo, I.H. Choi, Macrophage Differentiation from Monocytes Is Influenced by the Lipid Oxidation Degree of Low Density Lipoprotein, *Mediators Inflamm* 2015 (2015) 235797.
- [44] G.S. Hotamisligil, Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease, *Cell* 140(6) (2010) 900-17.
- [45] T. Suganami, J. Nishida, Y. Ogawa, A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25 (2005).
- [46] I. Mothe-Satney, C. Filloux, H. Amghar, C. Pons, V. Bourlier, J. Galitzky, P.A. Grimaldi, C.C. Féral, A. Bouloumié, E. Van Obberghen, J.G. Neels, Adipocytes secrete leukotrienes: contribution to obesity-associated inflammation and insulin resistance in mice, *Diabetes* 61(9) (2012) 2311-9.
- [47] V. Elgazar-Carmon, A. Rudich, N. Hadad, R. Levy, Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding, *J Lipid Res* 49(9) (2008) 1894-903.
- [48] J.M. Wentworth, G. Naselli, W.A. Brown, L. Doyle, B. Phipson, G.K. Smyth, M. Wabitsch, P.E. O'Brien, L.C. Harrison, Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity, *Diabetes* 59(7) (2010) 1648-56.
- [49] S.M. Reilly, A.R. Saltiel, Adapting to obesity with adipose tissue inflammation, *Nat Rev Endocrinol* 13(11) (2017) 633-643.
- [50] Z. Miao, M. Alvarez, A. Ko, Y. Bhagat, E. Rahmani, B. Jew, S. Heinonen, L.L. Muñoz-Hernandez, M. Herrera-Hernandez, C. Aguilar-Salinas, T. Tusie-Luna, K.L. Mohlke, M. Laakso, K.H. Pietiläinen, E. Halperin, P. Pajukanta, The causal effect of obesity on prediabetes and insulin resistance reveals the important role of adipose tissue in insulin resistance, *PLoS Genet* 16(9) (2020) e1009018.
- [51] D. Mathis, S.E. Shoelson, Immunometabolism: an emerging frontier, *Nature reviews. Immunology* 11(2) (2011) 81.
- [52] C.N. Lumeng, S.M. Deyoung, A.R. Saltiel, Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(1) (2007) E166-74.
- [53] R. van Furth, Z.A. Cohn, J.G. Hirsch, J.H. Humphrey, W.G. Spector, H.L. Langevoort, The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells, *Bull World Health Organ* 46(6) (1972) 845-52.
- [54] P.J. Murray, J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, J.A. Hamilton, L.B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F.O. Martinez, J.L. Mege, D.M. Mosser, G. Natoli, J.P. Saeij, J.L. Schultze, K.A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J.A. van Ginderachter, S.N. Vogel, T.A. Wynn, Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines, *Immunity* 41(1) (2014) 14-20.
- [55] S. Adamson, N. Leitinger, Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids, *Curr Opin Lipidol* 22(5) (2011) 335-42.
- [56] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nature reviews. Immunology* 8(12) (2008) 958-69.
- [57] J. Van den Bossche, D.L. Saraber, Metabolic regulation of macrophages in tissues, *Cell Immunol* 330 (2018) 54-59.
- [58] K.L. Wong, J.J. Tai, W.C. Wong, H. Han, X. Sem, W.H. Yeap, P. Kourilsky, S.C. Wong, Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets, *Blood* 118(5) (2011) e16-31.
- [59] M. Frankenberger, T. Sternsdorf, H. Pechumer, A. Pforte, H.W. Ziegler-Heitbrock, Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis, *Blood* 87(1) (1996) 373-7.
- [60] A.A. Patel, Y. Zhang, J.N. Fullerton, L. Boelen, A. Rongvaux, A.A. Maini, V. Bigley, R.A. Flavell, D.W. Gilroy, B. Asquith, D. Macallan, S. Yona, The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation, *J Exp Med* 214(7) (2017) 1913-1923.

- [61] R. Olivares, P. Ducimetière, J.R. Claude, Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease?, *Am J Epidemiol* 137(1) (1993) 49-53.
- [62] G. Rothe, H. Gabriel, E. Kovacs, J. Klucken, J. Stöhr, W. Kindermann, G. Schmitz, Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16(12) (1996) 1437-47.
- [63] S. Tani, M. Matsumoto, T. Anazawa, H. Kawamata, S. Furuya, H. Takahashi, K. Iida, T. Washio, N. Kumabe, M. Kobori, K. Nagao, A. Hirayama, Development of a model for prediction of coronary atherosclerotic regression: evaluation of high-density lipoprotein cholesterol level and peripheral blood monocyte count, *Heart Vessels* 27(2) (2012) 143-50.
- [64] K.E. Berg, I. Ljungcrantz, L. Andersson, C. Bryngelsson, B. Hedblad, G.N. Fredrikson, J. Nilsson, H. Björkbacka, Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events, *Circ Cardiovasc Genet* 5(1) (2012) 122-31.
- [65] E. Ammirati, F. Moroni, M. Magnoni, S. Di Terlizzi, C. Villa, F. Sizzano, A. Palini, K. Garlaschelli, F. Tripiciano, I. Scotti, A.L. Catapano, A.A. Manfredi, G.D. Norata, P.G. Camici, Circulating CD14⁺ and CD14^(high)CD16⁻ classical monocytes are reduced in patients with signs of plaque neovascularization in the carotid artery, *Atherosclerosis* 255 (2016) 171-178.
- [66] K. Urbanski, D. Ludew, G. Filip, M. Filip, A. Sagan, P. Szczepaniak, G. Grudzien, J. Sadowski, B. Jasiewicz-Honkisz, T. Sliwa, B. Kapelak, E. McGinnigle, T. Mikolajczyk, T.J. Guzik, CD14⁽⁺⁾CD16⁽⁺⁺⁾ "nonclassical" monocytes are associated with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease, *Thromb Haemost* 117(5) (2017) 971-980.
- [67] M. Wildgruber, M. Czubba, T. Aschenbrenner, H. Wendorff, A. Hapfelmeier, A. Glinzer, M. Schiemann, A. Zimmermann, H.H. Eckstein, H. Berger, W.A. Wohlgemuth, R. Meier, P. Libby, A. Zerneck, Increased intermediate CD14⁽⁺⁺⁾CD16⁽⁺⁺⁾ monocyte subset levels associate with restenosis after peripheral percutaneous transluminal angioplasty, *Atherosclerosis* 253 (2016) 128-134.
- [68] K.J. Moore, S. Koplev, E.A. Fisher, I. Tabas, J.L.M. Björkegren, A.C. Doran, J.C. Kovacic, Macrophage Trafficking, Inflammatory Resolution, and Genomics in Atherosclerosis: JACC Macrophage in CVD Series (Part 2), *J Am Coll Cardiol* 72(18) (2018) 2181-2197.
- [69] J.L. Stoger, M.J. Gijbels, S. van der Velden, M. Manca, C.M. van der Loos, E.A. Biessen, M.J. Daemen, E. Lutgens, M.P. de Winther, Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis, *Atherosclerosis* 225(2) (2012) 461-8.
- [70] J.J. Boyle, H.A. Harrington, E. Piper, K. Elderfield, J. Stark, R.C. Landis, D.O. Haskard, Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype, *Am J Pathol* 174(3) (2009) 1097-108.
- [71] V.R. Babaev, L.A. Gleaves, K.J. Carter, H. Suzuki, T. Kodama, S. Fazio, M.F. Linton, Reduced atherosclerotic lesions in mice deficient for total or macrophage-specific expression of scavenger receptor-A, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20(12) (2000) 2593-9.
- [72] M. Febbraio, E.A. Podrez, J.D. Smith, D.P. Hajjar, S.L. Hazen, H.F. Hoff, K. Sharma, R.L. Silverstein, Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice, *The Journal of clinical investigation* 105(8) (2000) 1049-56.
- [73] N. Wang, L. Yvan-Charvet, D. Lütjohann, M. Mulder, T. Vanmierlo, T.W. Kim, A.R. Tall, ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain, *Faseb j* 22(4) (2008) 1073-82.
- [74] A. Rohatgi, A. Khera, J.D. Berry, E.G. Givens, C.R. Ayers, K.E. Wedin, I.J. Neeland, I.S. Yuhanna, D.R. Rader, J.A. de Lemos, P.W. Shaul, HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events, *The New England journal of medicine* 371(25) (2014) 2383-93.
- [75] S. Shea, J.H. Stein, N.W. Jorgensen, R.L. McClelland, L. Tascau, S. Shrager, J.W. Heinecke, L. Yvan-Charvet, A.R. Tall, Cholesterol Mass Efflux Capacity, Incident Cardiovascular Disease, and Progression of Carotid Plaque, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 39(1) (2019) 89-96.
- [76] W.G. Jerome, Advanced atherosclerotic foam cell formation has features of an acquired lysosomal storage disorder, *Rejuvenation Res* 9(2) (2006) 245-55.
- [77] Y. Kojima, J.P. Volkmer, K. McKenna, M. Civelek, A.J. Lusis, C.L. Miller, D. DiCorleone, V. Nanda, J. Ye, A.J. Connolly, E.E. Schadt, T. Quertermous, P. Betancur, L. Maegdefessel, L.P. Matic, U. Hedin, I.L. Weissman, N.J. Leeper, CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis, *Nature* 536(7614) (2016) 86-90.

- [78] K.J. Rayner, Cell Death in the Vessel Wall: The Good, the Bad, the Ugly, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37(7) (2017) e75-e81.
- [79] R.G. Gerrity, H.K. Naito, Lipid clearance from fatty streak lesions by foam cell migration, *Artery* 8(3) (1980) 215-9.
- [80] J.M. van Gils, M.C. Derby, L.R. Fernandes, B. Ramkhalawon, T.D. Ray, K.J. Rayner, S. Parathath, E. Distel, J.L. Feig, J.I. Alvarez-Leite, A.J. Rayner, T.O. McDonald, K.D. O'Brien, L.M. Stuart, E.A. Fisher, A. Lacy-Hulbert, K.J. Moore, The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques, *Nat Immunol* 13(2) (2012) 136-43.
- [81] H.J. Medbury, V. James, J. Ngo, K. Hitos, Y. Wang, D.C. Harris, J.P. Fletcher, Differing association of macrophage subsets with atherosclerotic plaque stability, *Int Angiol* 32(1) (2013) 74-84.
- [82] K.Y. Cho, H. Miyoshi, S. Kuroda, H. Yasuda, K. Kamiyama, J. Nakagawara, M. Takigami, T. Kondo, T. Atsumi, The phenotype of infiltrating macrophages influences atherosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery, *J Stroke Cerebrovasc Dis* 22(7) (2013) 910-8.
- [83] P.M. Isoviita, K. Nuotio, J. Saksi, R. Turunen, P. Ijäs, J. Pitkäniemi, L. Soine, M. Kaste, P.T. Kovanen, P.J. Lindsberg, An imbalance between CD36 and ABCA1 protein expression favors lipid accumulation in stroke-prone ulcerated carotid plaques, *Stroke; a journal of cerebral circulation* 41(2) (2010) 389-93.
- [84] S. Shaikh, J. Brittenden, R. Lahiri, P.A. Brown, F. Thies, H.M. Wilson, Macrophage subtypes in symptomatic carotid artery and femoral artery plaques, *Eur J Vasc Endovasc Surg* 44(5) (2012) 491-7.
- [85] S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, A.W. Ferrante, Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *The Journal of clinical investigation* 112(12) (2003) 1796-808.
- [86] H. Xu, G.T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C.J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J.S. Ross, L.A. Tartaglia, H. Chen, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *The Journal of clinical investigation* 112 (2003).
- [87] Y. Bai, Q. Sun, Macrophage recruitment in obese adipose tissue, *Obes Rev* 16(2) (2015) 127-36.
- [88] B. Ramkhalawon, E.J. Hennessy, M. Menager, T.D. Ray, F.J. Sheedy, S. Hutchison, A. Wanschel, S. Oldebeken, M. Geoffrion, W. Spiro, G. Miller, R. McPherson, K.J. Rayner, K.J. Moore, Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity, *Nat Med* 20(4) (2014) 377-84.
- [89] S.U. Amano, J.L. Cohen, P. Vangala, M. Tencerova, S.M. Nicoloso, J.C. Yawe, Y. Shen, M.P. Czech, M. Aouadi, Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation, *Cell Metab* 19 (2014).
- [90] T. Smallie, G. Ricchetti, N.J. Horwood, M. Feldmann, A.R. Clark, L.M. Williams, IL-10 inhibits transcription elongation of the human TNF gene in primary macrophages, *J Exp Med* 207(10) (2010) 2081-8.
- [91] D. Thomas, C. Apovian, Macrophage functions in lean and obese adipose tissue, *Metabolism* 72 (2017) 120-143.
- [92] J. Jager, T. Grémeaux, M. Cormont, Y. Le Marchand-Brustel, J.F. Tanti, Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression, *Endocrinology* 148(1) (2007) 241-51.
- [93] P.A. Permana, C. Menge, P.D. Reaven, Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance, *Biochem Biophys Res Commun* 341(2) (2006) 507-14.
- [94] M. Rydén, P. Petrus, D.P. Andersson, G. Medina-Gómez, E. Escasany, P. Corrales Cordón, I. Dahlman, A. Kulyté, P. Arner, Insulin action is severely impaired in adipocytes of apparently healthy overweight and obese subjects, *J Intern Med* 285(5) (2019) 578-588.
- [95] T. Suganami, J. Nishida, Y. Ogawa, A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor α , *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25(10) (2005) 2062-8.
- [96] L. Nimri, C. Grajeda-Iglesias, N. Volkova, M. Aviram, Pro-atherogenic and pro-oxidant crosstalk between adipocytes and macrophages, *Eur J Nutr* 58(2) (2019) 879-893.
- [97] K. Fjeldborg, S.B. Pedersen, H.J. Moller, T. Christiansen, M. Bennetzen, B. Richelsen, Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity, *J Immunol Res* 2014 (2014).
- [98] M. Zeyda, D. Farmer, J. Todoric, O. Aszmann, M. Speiser, G. Györi, G.J. Zlabinger, T.M. Stulnig, Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production, *International journal of obesity* (2005) 31(9) (2007) 1420-8.

- [99] V. Bourlier, A. Zakaroff-Girard, A. Miranville, S. De Barros, M. Maumus, C. Sengenès, J. Galitzky, M. Lafontan, F. Karpe, K.N. Frayn, A. Bouloumie, Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages, *Circulation* 117(6) (2008) 806-15.
- [100] K.D. Nguyen, Y. Qiu, X. Cui, Y.P. Goh, J. Mwangi, T. David, L. Mukundan, F. Brombacher, R.M. Locksley, A. Chawla, Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis, *Nature* 480(7375) (2011) 104-8.
- [101] Y. Qiu, K.D. Nguyen, J.I. Odegaard, X. Cui, X. Tian, R.M. Locksley, R.D. Palmiter, A. Chawla, Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat, *Cell* 157(6) (2014) 1292-1308.
- [102] K. Fischer, H.H. Ruiz, K. Jhun, B. Finan, D.J. Oberlin, V. van der Heide, A.V. Kalinovich, N. Petrovic, Y. Wolf, C. Clemmensen, A.C. Shin, S. Divanovic, F. Brombacher, E. Glasmacher, S. Keipert, M. Jastroch, J. Nagler, K.W. Schramm, D. Medrikova, G. Colden, S.C. Woods, S. Herzig, D. Homann, S. Jung, J. Nedergaard, B. Cannon, M.H. Tschöp, T.D. Müller, C. Büttner, Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis, *Nat Med* 23(5) (2017) 623-630.
- [103] I. Kralova Lesna, A. Kralova, S. Cejkova, J. Froněk, M. Petras, A. Sekerkova, F. Thieme, L. Janousek, R. Poledne, Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue, *Journal of translational medicine* 14(1) (2016) 208.
- [104] I. Kralova Lesna, R. Poledne, J. Froněk, A. Kralova, A. Sekerkova, F. Thieme, J. Pitha, Macrophage subsets in the adipose tissue could be modified by sex and the reproductive age of women, *Atherosclerosis* 241 (2015).
- [105] I. Kralova Lesna, M. Petras, S. Cejkova, A. Kralova, J. Froněk, L. Janousek, F. Thieme, T. Tyll, R. Poledne, Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macrophage polarization: Is there a link?, *Eur J Prev Cardiol* 25(3) (2018) 328-334.
- [106] R. Poledne, I. Kralova Lesna, S. Cejkova, Adipose tissue and atherosclerosis, *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 64 Suppl 3 (2015) S395-402.
- [107] M. Kratz, B.R. Coats, K.B. Hisert, D. Hagman, V. Mutskov, E. Peris, K.Q. Schoenfelt, J.N. Kuzma, I. Larson, P.S. Billing, R.W. Landerholm, M. Crouthamel, D. Gozal, S. Hwang, P.K. Singh, L. Becker, Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages, *Cell Metab* 20(4) (2014) 614-25.
- [108] M. Febbraio, D.P. Hajjar, R.L. Silverstein, CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism, *The Journal of clinical investigation* 108(6) (2001) 785-91.
- [109] D.W. Dawson, S.F. Pearce, R. Zhong, R.L. Silverstein, W.A. Frazier, N.P. Bouck, CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells, *J Cell Biol* 138(3) (1997) 707-17.
- [110] D.P. Ramakrishnan, R.A. Hajj-Ali, Y. Chen, R.L. Silverstein, Extracellular Vesicles Activate a CD36-Dependent Signaling Pathway to Inhibit Microvascular Endothelial Cell Migration and Tube Formation, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 36(3) (2016) 534-44.
- [111] Y.M. Park, CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis, *Exp Mol Med* 46(6) (2014) e99.
- [112] S. Nozaki, H. Kashiwagi, S. Yamashita, T. Nakagawa, B. Kostner, Y. Tomiyama, A. Nakata, M. Ishigami, J. Miyagawa, K. Kameda-Takemura, et al., Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects, *The Journal of clinical investigation* 96(4) (1995) 1859-65.
- [113] K. Tian, Y. Xu, A. Sahebkar, S. Xu, CD36 in Atherosclerosis: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Implications, *Curr Atheroscler Rep* 22(10) (2020) 59.
- [114] J. Han, D.P. Hajjar, M. Febbraio, A.C. Nicholson, Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36, *The Journal of biological chemistry* 272(34) (1997) 21654-9.
- [115] Y. Chen, M. Yang, W. Huang, W. Chen, Y. Zhao, M.L. Schulte, P. Volberding, Z. Gerbec, M.T. Zimmermann, A. Zeighami, W. Demos, J. Zhang, D.A. Knaack, B.C. Smith, W. Cui, S. Malarkannan, K. Sodhi, J.I. Shapiro, Z. Xie, D. Sahoo, R.L. Silverstein, Mitochondrial Metabolic Reprogramming by CD36 Signaling Drives Macrophage Inflammatory Responses, *Circ Res* 125(12) (2019) 1087-1102.
- [116] Y.M. Park, M. Febbraio, R.L. Silverstein, CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima, *The Journal of clinical investigation* 119(1) (2009) 136-45.

- [117] S. Kim, W. Cho, I. Kim, S.H. Lee, G.T. Oh, Y.M. Park, Oxidized LDL induces vimentin secretion by macrophages and contributes to atherosclerotic inflammation, *J Mol Med (Berl)* 98(7) (2020) 973-983.
- [118] R. Ricciarelli, J.M. Zingg, A. Azzi, Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells, *Circulation* 102(1) (2000) 82-7.
- [119] K. Fukuda, T. Matsumura, T. Senokuchi, N. Ishii, H. Kinoshita, S. Yamada, S. Murakami, S. Nakao, H. Motoshima, T. Kondo, D. Kukidome, S. Kawasaki, T. Kawada, T. Nishikawa, E. Araki, Statins mediate anti-atherosclerotic action in smooth muscle cells by peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation, *Biochem Biophys Res Commun* 457(1) (2015) 23-30.
- [120] J. Han, X. Zhou, T. Yokoyama, D.P. Hajjar, A.M. Gotto, Jr., A.C. Nicholson, Pitavastatin downregulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36, *Circulation* 109(6) (2004) 790-6.
- [121] K.A. Britton, A. Pedley, J.M. Massaro, E.M. Corsini, J.M. Murabito, U. Hoffmann, C.S. Fox, Prevalence, distribution, and risk factor correlates of high thoracic periaortic fat in the Framingham Heart Study, *J Am Heart Assoc* 1(6) (2012) e004200.
- [122] M. Greif, A. Becker, F. von Ziegler, C. Leberherz, M. Lehrke, U.C. Broedl, J. Tittus, K. Parhofer, C. Becker, M. Reiser, A. Knez, A.W. Leber, Pericardial adipose tissue determined by dual source CT is a risk factor for coronary atherosclerosis, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29(5) (2009) 781-6.
- [123] S.N. Verhagen, A. Vink, Y. van der Graaf, F.L. Visseren, Coronary perivascular adipose tissue characteristics are related to atherosclerotic plaque size and composition. A post-mortem study, *Atherosclerosis* 225(1) (2012) 99-104.
- [124] L. Ziegler-Heitbrock, The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation, *J Leukoc Biol* 81(3) (2007) 584-92.
- [125] C. Ulrich, G.H. Heine, M.K. Gerhart, H. Köhler, M. Girndt, Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients, *Am J Transplant* 8(1) (2008) 103-10.
- [126] B. Pamukcu, G.Y. Lip, A. Devitt, H. Griffiths, E. Shantsila, The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease, *Ann Med* 42(6) (2010) 394-403.
- [127] G. Fingerle-Rowson, M. Angstwurm, R. Andreesen, H.W. Ziegler-Heitbrock, Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy, *Clin Exp Immunol* 112(3) (1998) 501-6.
- [128] A. Sekerkova, E. Krepsova, E. Brabcova, J. Slatinska, O. Viklicky, V. Lanska, I. Striz, CD14+CD16+ and CD14+CD163+ monocyte subpopulations in kidney allograft transplantation, *BMC Immunol* 15 (2014) 4.
- [129] F. Dayyani, K.U. Belge, M. Frankenberger, M. Mack, T. Berki, L. Ziegler-Heitbrock, Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes, *J Leukoc Biol* 74(1) (2003) 33-9.
- [130] S. Koch, T. Kucharzik, J. Heidemann, A. Nusrat, A. Luegering, Investigating the role of proinflammatory CD16+ monocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Clin Exp Immunol* 161(2) (2010) 332-41.
- [131] M. Kovacikova, C. Sengenès, Z. Kovacova, M. Siklova-Vitkova, E. Klimcakova, J. Polak, L. Rossmeislova, M. Bajzova, J. Hejnova, Z. Hnevkovska, A. Bouloumie, D. Langin, V. Stich, Dietary intervention-induced weight loss decreases macrophage content in adipose tissue of obese women, *International journal of obesity* (2005) 35(1) (2011) 91-8.
- [132] J. Aron-Wisnewsky, J. Tordjman, C. Poitou, F. Darakhshan, D. Hugol, A. Basdevant, A. Aissat, M. Guerre-Millo, K. Clement, Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94(11) (2009) 4619-23.
- [133] I. Kralova Lesna, R. Poledne, J. Froněk, A. Kralova, A. Sekerkova, F. Thieme, J. Pitha, Macrophage subsets in the adipose tissue could be modified by sex and the reproductive age of women, *Atherosclerosis* 241(1) (2015) 255-8.
- [134] R. Poledne, I. Kralova Lesna, A. Kralova, J. Froněk, S. Cejkova, The relationship between non-HDL cholesterol and macrophage phenotypes in human adipose tissue, *J Lipid Res* 57(10) (2016) 1899-1905.
- [135] I.K. Lesna, S. Cejkova, A. Kralova, J. Froněk, M. Petras, A. Sekerkova, F. Thieme, L. Janousek, R. Poledne, Human adipose tissue accumulation is associated with pro-inflammatory changes in subcutaneous rather than visceral adipose tissue, *Nutr Diabetes* 7(4) (2017) e264.
- [136] S. Kauerova, H. Bartuskova, B. Muffova, L. Janousek, J. Froněk, M. Petras, R. Poledne, I. Kralova Lesna, Statins Directly Influence the Polarization of Adipose Tissue Macrophages: A Role in Chronic Inflammation, *Biomedicines* 9(2) (2021).

- [137] N. Siriwardhana, N.S. Kalupahana, M. Cekanova, M. LeMieux, B. Greer, N. Moustaid-Moussa, Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds, *J Nutr Biochem* 24(4) (2013) 613-23.
- [138] L. Menegaut, C. Thomas, L. Lagrost, D. Masson, Fatty acid metabolism in macrophages: a target in cardio-metabolic diseases, *Curr Opin Lipidol* 28(1) (2017) 19-26.
- [139] L. Hodson, F. Karpe, Is there something special about palmitoleate?, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 16(2) (2013) 225-31.
- [140] K. Simons, M.J. Gerl, Revitalizing membrane rafts: new tools and insights, *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(10) (2010) 688-99.
- [141] I. Kralova Lesna, P. Suchanek, J. Kovar, P. Stavek, R. Poledne, Replacement of dietary saturated FAs by PUFAs in diet and reverse cholesterol transport, *J Lipid Res* 49(11) (2008) 2414-8.
- [142] M.S. Afonso, M.S. Lavrador, M.K. Koike, D.E. Cintra, F.D. Ferreira, V.S. Nunes, G. Castilho, L.A. Gioielli, R. Paula Bombo, S. Catanozi, E.G. Caldini, N.R. Damaceno-Rodrigues, M. Passarelli, E.R. Nakandakare, A.M. Lottenberg, Dietary interesterified fat enriched with palmitic acid induces atherosclerosis by impairing macrophage cholesterol efflux and eliciting inflammation, *J Nutr Biochem* 32 (2016) 91-100.
- [143] O. Kuda, M. Rossmeisl, J. Kopecky, Omega-3 fatty acids and adipose tissue biology, *Mol Aspects Med* 64 (2018) 147-160.
- [144] R. Poledne, H. Malinska, H. Kubatova, J. Fronek, F. Thieme, S. Kauerova, I.K. Lesna, Polarization of Macrophages in Human Adipose Tissue is Related to the Fatty Acid Spectrum in Membrane Phospholipids, *Nutrients* 12(1) (2019).
- [145] C. Bolego, A. Cignarella, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi, Macrophage function and polarization in cardiovascular disease: a role of estrogen signaling?, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33(6) (2013) 1127-34.
- [146] M.P. Corcoran, M. Meydani, A.H. Lichtenstein, E.J. Schaefer, A. Dillard, S. Lamon-Fava, Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and C-reactive protein expression in macrophages from older men and postmenopausal women, *The Journal of endocrinology* 206(2) (2010) 217-24.

5. Přílohy

Příloha č. 1:

Kralova Lesna, Z. Tonar, I. Malek, J. Maluskova, L. Nedorost, J. Pirk, J. Pitha, V. Lanska, R. Poledne, Is the amount of coronary perivascular fat related to atherosclerosis?, *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 64 Suppl 3 (2015) S435-43.

Příloha č. 2:

I. Kralova Lesna, A. Kralova, S. Cejkova, J. Fronek, M. Petras, A. Sekerkova, F. Thieme, L. Janousek, R. Poledne, Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue, *Journal of translational medicine* 14(1) (2016) 208.

Příloha č. 3:

I. Kralova Lesna, R. Poledne, J. Fronek, A. Kralova, A. Sekerkova, F. Thieme, J. Pitha, Macrophage subsets in the adipose tissue could be modified by sex and the reproductive age of women, *Atherosclerosis* 241(1) (2015) 255-8.

Příloha č. 4:

R. Poledne, I. Kralova Lesna, A. Kralova, J. Fronek, S. Cejkova, The relationship between non-HDL cholesterol and macrophage phenotypes in human adipose tissue, *J Lipid Res* 57(10) (2016) 1899-1905.

Příloha č. 5:

I.K. Lesna, S. Cejkova, A. Kralova, J. Fronek, M. Petras, A. Sekerkova, F. Thieme, L. Janousek, R. Poledne, Human adipose tissue accumulation is associated with pro-inflammatory changes in subcutaneous rather than visceral adipose tissue, *Nutr Diabetes* 7(4) (2017) e264.

Příloha č. 6:

Kralova Lesna, M. Petras, S. Cejkova, A. Kralova, J. Fronek, L. Janousek, F. Thieme, T. Tyll, R. Poledne, Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macrophage polarization: Is there a link?, *Eur J Prev Cardiol* 25(3) (2018) 328-334

Příloha č. 7:

S. Cejkova, H. Kubatova, F. Thieme, L. Janousek, J. Fronek, R. Poledne, I. Kralova Lesna, The effect of cytokines produced by human adipose tissue on monocyte adhesion to the endothelium, *Cell Adh Migr* 13(1) (2019) 293-302.

Příloha č. 8:

R. Poledne, H. Malinska, H. Kubatova, J. Fronek, F. Thieme, S. Kauerova, I.K. Lesna, Polarization of Macrophages in Human Adipose Tissue is Related to the Fatty Acid Spectrum in Membrane Phospholipids, *Nutrients* 12(1) (2019).

Příloha č. 9:

H. Kubatova, Sona Kauerova, Marek Petras, Rudolf Poledne, Jiri Fronek, Libor Janousek, Ivana Kralova Lesna
Links between macrophages in perivascular adipose tissue and the arterial wall: A role in atherosclerosis initiation?