

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Chirurgické modely studia proinflamačního vlivu tukové tkáně
v rozvoji aterosklerózy

MUDr. Filip Thieme

2021

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika transplantační chirurgie, IKEM

Školitel: doc. MUDr. Jiří Froněk, Ph.D., FRCS

Konzultant: doc. MUDr. Libor Janoušek, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah:

1.	Seznam použitých zkratk	3
2.	Abstrakta	4
3.	Úvod	6
4.	Hypotézy a cíle práce	7
5.	Materiál a metodika	8
6.	Výsledky	10
7.	Diskuse	16
8.	Závěry	24
9.	Použitá literatura	25
10.	Publikace autora	27

1. Seznam použitých zkratk

ATM	adipose tissue macrophages
BMI	body mass index
CD	cluster of differentiation
CVD	cardiovascular disease
CRP	C-reactive protein
DBP	diastolic blood pressure
FSH	follicle-stimulating hormone
GFR	glomerular filtration rate
HARS	hand-assisted-retroperitoneoscopic surgery
HDL	high density lipoprotein
HHTG	hereditary hypertriglyceridemic rat
hsCRP	high-sensitivity C-reactive protein
IL-1β	interleukin 1 beta
IL-6	interleukin 6
IL-10	interleukin 10
LDL	low density lipoprotein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
PAD	peripheral arterial disease
postW	women of postmenopausal age
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
preW	women of premenopausal age
PVAT	perivascular adipose tissue
SBP	systolic blood pressure
SCAT	subcutaneous adipose tissue
SVF	stromal vascular fraction
TGF-β	transforming growth factor beta
TNF α	tumor necrosis factor alfa
TZD	thiazolidinedione
VAT	visceral adipose tissue

2. Abstrakt

Úvod:

Ateroskleróza je závažné systémové onemocnění. Naší snahou je zpřesnění vyšetření žijících dárců ledvin ve smyslu rizika rozvoje aterosklerózy. Technika odběru tukové tkáně od žijícího dárce umožňuje vedle odběru subkutánní (SCAT) i odběr viscerální (VAT) a perivaskulární (PVAT) tukové tkáně, které jsou využity pro výzkum rozvoje kardiovaskulárních chorob.

Cíle:

Prvotním cílem je objasnění mechanismů, kterými lidská tuková tkáň ovlivňuje rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. Chceme porovnat zastoupení subpopulací makrofágů v různých tukových tkáních (SCAT, VAT a PVAT) a prokázat vztah mezi metabolicky aktivovanými makrofágy a sledovanými rizikovými faktory rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Dále chceme testovat časný rozvoj funkce štěpu ledviny s ohledem na body mass index (BMI) dárců, infiltraci perivaskulárního tuku z okolí renální artérie prozánětlivými makrofágy a zánětlivé parametry v plazmě. Cílem je zpřesnění stratifikace rizika žijících dárců ledvin a tím prevence dlouhodobých komplikací po dárcovství.

Metody:

U žijících dárců ledvin jsme získali v jedné době tukovou tkáň z odlišných tělesných kompartmentů, tj. SCAT, VAT a PVAT. Následně jsme provedli průtokovou cytometrii.

Výsledky:

Prozánětlivé makrofágy (M1) exprimovaly na svém povrchu receptor CD36 (cluster of differentiation 36). Přítomnost prozánětlivých makrofágů byla téměř dvakrát vyšší ve viscerální ($p < 0,0001$) a perivaskulární ($p < 0,001$) tukové tkáni než v podkožní tukové tkáni. Vyšší podíl makrofágů M1 jsme zaznamenali u postmenopauzálních žen než u žen před menopauzou. Věk, mužské pohlaví a hypercholesterolémie pozitivně korelovaly se zastoupením prozánětlivých makrofágů M1 ve viscerální tukové tkáni. Současná léčba statiny významně snížila jejich podíl. Celkový počet makrofágů ($p < 0,02$) a podíl prozánětlivých makrofágů CD14+CD16+CD36^{high} ($p < 0,01$) v podkožní tukové tkáni pozitivně korelovaly s BMI. Časná funkce štěpu ledviny, měřená jako průměrné zvýšení glomerulární filtrace (GFR) v prvních sedmi dnech po transplantaci, nekorelovala s BMI žijících dárců ledvin. Nenašli jsme žádnou souvislost mezi časnou funkcí štěpu ledviny s plazmatickou koncentrací CRP, adiponektinu, ani se zastoupením makrofágů M1 v dárcovské perirenální tukové tkáni.

Závěry:

Přispěli jsme k detailnímu poznání fenotypu prozánětlivých M1 a protizánětlivých makrofágů M2 v lidské tukové tkáni. Zcela nově byl popsán význam markeru CD36 v rámci analýzy makrofágů tukové tkáně. Byl prokázán vztah mezi metabolicky aktivovanými makrofágy s vysokou expresí CD36 a sledovanými rizikovými kardiovaskulárními prediktory. Za velmi významný výsledek lze považovat vliv léčby statiny na snížení prozánětlivých makrofágů ve viscerální tukové tkáni. Vyšší podíl prozánětlivých makrofágů ve viscerální tukové tkáni u postmenopauzálních žen může souviset se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem u žen po menopauze. Prozánětlivé změny související s obezitou u metabolicky zdravých subjektů dominantně probíhají nejdříve v podkožní tukové tkáni. Nepotvrdili jsme naši hypotézu, že míra obezity u žijících dárců ledvin negativně ovlivňuje časný rozvoj funkce transplantované ledviny. Časný rozvoj funkce ledviny nesouvisel ani s plazmatickou koncentrací CRP a adiponektinu, ani s množstvím prozánětlivých makrofágů M1 v perivaskulárním tuku kolem renální artérie dárcovské ledviny.

Prezentovaná práce je dílčím krokem v dlouhodobém projektu, který má za cíl nalezení dalších možných parametrů pro hodnocení rizika rozvoje aterosklerózy u žijících dárců. Jedná se hlavně o obézního dárce, u kterého bychom před samotným odběrem ledviny vyšetřili podkožní tuk, a tím zjistili míru zastoupení prozánětlivých makrofágů. Výzkumný projekt má

potenciál zvýšit bezpečnost žijícího dárcovství ledvin a současně může přispět k dalšímu pochopení mechanismů rozvoje aterosklerózy.

Abstract

Background:

Atherosclerosis is a serious inflammatory systemic disease. The effort to refine assessments of living kidney donors in terms of eliminating the risk of developing atherosclerosis is a long-term project. Collecting tissue from a living donor involves not only subcutaneous tissue (SCAT) but also visceral (VAT) and perivascular tissue (PVAT), which could prove useful in the research of cardiovascular diseases.

Aims:

The primary goals are as follows: to find the mechanisms by which human adipose tissue could affect the development of cardiovascular disease; to compare macrophage subpopulations in different adipose tissues (SCAT, VAT and PVAT); and to demonstrate a relationship between metabolically activated macrophages (with high CD36 expression) and cardiovascular risk factors.

Methods:

We obtained adipose tissue (SCAT, VAT and PVAT) from different body compartments simultaneously, and flow cytometry was subsequently performed.

Results:

M1 macrophages express proinflammatory CD36 markers. The levels of proinflammatory macrophages were almost twice as high in visceral ($p < 0.0001$) and perivascular ($p < 0.0001$) adipose tissue as they were in subcutaneous tissue. Difference was more pronounced in the postmenopausal women subgroup. We observed that older women had a higher proportion of M1 macrophages than did younger women. Age, male sex and hypercholesterolemia were positively associated with M1 macrophages in visceral adipose tissue, and their proportions were substantially decreased through statin therapy. Total macrophage numbers in subcutaneous adipose tissue ($p < 0.02$) increased as body mass index increased, with a similar increase seen in the proportion in proinflammatory macrophages CD14+CD16+CD36^{high} ($p < 0.01$). Early renal graft function, measured as an average increase in the glomerular filtration rate (GFR) in the first seven days post-transplantation, had no correlation to donor BMI. We did not find an association between early renal graft function and the percentage of M1 macrophages in donor perirenal adipose tissue, adiponectin or plasma CRP.

Conclusions:

We obtained detailed information regarding M1 and M2 macrophage phenotypes in human adipose tissue. The significance of the CD36 marker in the analysis of adipose tissue macrophages has been described. An effect of cardiovascular risk predictors on adipose tissue macrophage subpopulations was revealed. We documented a decreasing effect of the statins on proinflammatory macrophages. For postmenopausal women, a higher proportion of proinflammatory macrophages in the visceral adipose tissue may be related to their increased cardiovascular risk. We demonstrated that obesity-related proinflammatory changes in metabolically healthy subjects take place predominantly in subcutaneous adipose tissue. We were unable to confirm our hypothesis that there is a statistically significant negative correlation between donor BMI and an increase in GFR in the first seven days post-transplantation. Furthermore, we could not find a correlation between early renal graft function and the percentage of M1 macrophages in donor perirenal adipose tissue or plasma CRP.

This was the first phase in a long-term project that aims to find other parameters that could be used to assess the risk of atherosclerosis development in living kidney donors. Especially in

obese living kidney donors, who should undergo a subcutaneous fat examination before the living kidney donation to determine the level of proinflammatory macrophages. The project may increase the safety of living kidney donation and contribute to the knowledge of cardiovascular disease development.

3. ÚVOD

Tuková tkáň

Tuková tkáň je základním orgánem pro regulaci energetické homeostázy. Primárně má za úkol ukládání přebytečné energie ve formě triglyceridů. Uložené triglyceridy jsou v konstantním stavu cirkulace, přičemž skladování energie a mobilizace energie jsou do značné míry určeny hormonálními výkyvy (Qatanani and Lazar 2007). Všechny cévy jsou obklopeny tukovou tkání (Cinti 2002). Tuková tkáň, a to především viscerální tuková tkáň, je v dnešní době vnímána jako významný endokrinní a imunologicky aktivní orgán produkující látky s parakrinním i endokrinním účinkem. Je známo, že adipokiny z viscerální tukové tkáně se uplatňují v patogenezi inzulínové rezistence a metabolického syndromu (Hitsumoto, Takahashi et al. 2007). Chronický zánět je zásadní v rozvoji tzv. metabolického syndromu. Metabolický syndrom je těsně spjatý s vývojem kardiovaskulárních onemocnění na podkladě progresu aterosklerózy (Trayhurn 2005, Matsuzawa 2006, Teramoto, Sasaki et al. 2008).

Žijící dárce ledviny

Žijícím dárce ledviny může být každá osoba starší 18 let, která chce nezištně poskytnout tento orgán svému příbuznému či jinak blízké osobě. S rostoucím nedostatkem orgánů se stále zvyšuje poptávka po dárce ledvin. Kandidát dárce nefrektomie by měl být informován o možnosti rizika selhání ledvin vyžadující dialýzu nebo transplantaci. Ovšem tato postnefrektomická rizika jsou velmi nízká v prvních několika desetiletích a jsou jen mírně vyšší, nežli rizika v běžné populaci (Kasiske 1998, Lentine, Kasiske et al. 2017).

Metabolický syndrom jako kontraindikace pro dárce ledvin

Metabolický syndrom je spojením nemocí: dyslipidémie, viscerální obezita, hypertenze a porucha metabolismu glukózy. Vede k řadě zdravotních komplikací plynoucích ze zvýšeného rizika vzniku a progresu aterosklerózy jako je ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin a cévní mozková příhoda. Metabolický syndrom představuje hlavní příčinu vyloučení dárce v některých programech dárce nefrektomie (Kasiske, Ravenscraft et al. 1996). U některých nemocných se často vyskytuje kombinace centrální obezity, dyslipoproteinémie, hypertenze a inzulínové rezistence s poruchou glukózové tolerance či diabetu mellitu 2. typu. Kombinace více těchto faktorů je velmi riziková z hlediska rozvoje a progresu aterosklerózy a s ní spojených komorbidit (Duvnjak and Duvnjak 2009). Dále vede prokazatelně ke vzniku a progresi chronické renální insuficience (Thomas, Sehgal et al. 2011). Zhodnocení biopsií parenchymu ledvin od živých dárce ukázalo, že výskyt jednotlivých rizikových faktorů metabolického syndromu je spojen se sníženou hustotou glomerulů (Rule, Semret et al. 2011, Ohashi, Thomas et al. 2013). Nefrektomie představuje pro dárce ledviny zvětšení objemu zbylé ledviny mezi 4,5 % až 66 % dle velikosti ledvin předoperačně a věku (Jeon, Lee et al. 2010), proto se každý dárce musí posuzovat z hlediska těchto rizikových faktorů přísně individuálně.

Význam odběru tukové tkáně při dárce nefrektomii

Jistý vztah kardiovaskulárních nemocí a obezity je dobře znám už z konce 40. let minulého století (Vague 1947). Vliv množství tuku na komplikace aterosklerózy zůstává poměrně nejasný. Vedle zprostředkovaného vztahu patofyziologických parametrů „metabolického syndromu“ (jak je v současnosti tento souhrn patologií označen) se ale objevuje v posledních

několika letech vztah daleko méně zprostředkovaný, související s produkcí molekul tukovou tkání, které mohou přímo ovlivnit aterogenní proces. Dále mohou nepřímo ovlivnit vlastnosti monocytů a jejich vliv na rozvoj aterogeneze (Bays, Ballantyne et al. 2011, Chinetti-Gbaguidi, Baron et al. 2011). Možnost přímého vlivu tukové perivaskulární tkáně a vztah k aterogenezi v přilehlé artérii byl rovněž recentně popsán (Szasz and Webb 2012). Většina nálezů, které dokumentují přímý vztah tukové tkáně a aterosklerózy, jsou získány z experimentálních studií na zvířecích (většinou transgenních) modelech (Szasz and Webb 2012). Dlouhodobě je známo, že tzv. viscerální tuková tkáň je imunologicky aktivnějším orgánem oproti tkáni podkožní. Cytokiny a adipokiny uvolňované z viscerální tukové tkáně (TNF- α , IL-6, IL-1 β , adiponektin aj.) jsou jednoznačně faktory vedoucími k chronickému proinflamačnímu stavu, inzulinové rezistenci a metabolickému syndromu (Surmi and Hasty 2010). Přímé lokální ovlivnění přilehlého endotelu vysoce proinflamačními cytokiny uvolňovanými z perivaskulární tukové tkáně může pak zásadně ovlivnit endotelovou dysfunkci a rozvoj aterosklerotické léze (Karastergiou and Mohamed-Ali 2010). Odběr dárcovské ledviny od zdravých jedinců nabízí možnost pro studium perivaskulárního tuku u lidí. Jsou to nejen tedy zdraví probandi, ale i důkladně vyšetření dárci ledvin s rizikovými faktory kardiovaskulárního onemocnění – obezita, hypertenze, dyslipidémie, kteří v rámci guidelines nebyli kontraindikováni.

4. Hypotézy a cíle práce

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

Hypotézy: V různých typech tukové tkáně zdravých jedinců, resp. žijících dárců ledviny, bude jiné zastoupení prozánětlivé subpopulace makrofágů.

Cíle: Definovat subpopulace makrofágů ve stromavaskulární frakci tukové tkáně pomocí zvolených znaků. Porovnat zastoupení subpopulací makrofágů v různých tukových tkáních (SCAT, VAT a PVAT) u zdravých jedinců. Sledovat možný vliv věku jedinců na zastoupení jednotlivých subpopulací makrofágů.

Zastoupení subpopulací makrofágů v lidské tukové tkáni je ovlivněné pohlavím a menopauzou u žen

Hypotézy: U mužů bude v tukové tkáni vyšší zastoupení prozánětlivých makrofágů než u žen. V souboru žen po menopauze už nebudou rozdíly mezi pohlavím patrné.

Cíle: Analyzovat zastoupení prozánětlivých makrofágů v tukové tkáni žijících dárců ledvin a zjistit, zda má na polarizaci makrofágů vliv pohlaví a menopauza u žen.

Vztah proporce metabolicky aktivovaných makrofágů k prediktorům kardiovaskulárního rizika

Hypotézy: Výskyt kardiovaskulárních rizikových faktorů (mužské pohlaví, věk, BMI a hypercholesterolémie) u sledovaného souboru pacientů bude provázen zvýšeným zastoupením prozánětlivých makrofágů (CD16+ a CD36+) ve všech sledovaných typech tukové tkáně.

Cíle: Prvotním cílem je objasnění mechanismů, kterými lidská tuková tkáň ovlivňuje rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. Prokázat vztah mezi metabolicky aktivovanými makrofágy, s vysokou expresí CD36, a sledovanými rizikovými faktory rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Sledovat vliv statinů na zastoupení prozánětlivých makrofágů v lidské tukové tkáni.

Akumulace tukové tkáně zvyšuje v těle zastoupení prozánětlivých makrofágů v subkutánní tukové tkáni více než ve viscerální

Hypotézy: Zvýšení obezity povede ke zvýšení počtu prozánětlivých makrofágů ve viscerální i subkutánní tukové tkáni.

Cíle: Sledovat změny v zastoupení jednotlivých subtypů makrofágů vlivem změny hmotnosti u zdravých jedinců. **Efekt ektopické tukové tkáně na funkci štěpu po transplantaci od žijícího dárce**

Hypotézy: Míra obezity u žijících dárců ledvin bude negativně ovlivňovat rozvoj časné funkce transplantované ledviny v prvním týdnu po transplantaci. Časný rozvoj funkce ledviny bude negativně korelovat se zánětlivými parametry v plazmě a množstvím prozánětlivých makrofágů v perivaskulárním prostoru kolem renální artérie dárcovské ledviny.

Cíle: Testovat časný rozvoj funkce štěpu ledviny s ohledem na BMI dárců, infiltraci perivaskulárního tuku z okolí renální artérie štěpu ledviny prozánětlivými makrofágy a zánětlivé parametry v plazmě.

5. Materiál a metodika

Studijní soubor

Antropometrická, klinická a laboratorní data o dárcích a příjemcích byla získána z nemocniční databáze. Zařazení byli všichni dárce i příjemci v období od ledna 2013 do prosince 2014, kteří splnili kritéria k zařazení do transplantačního programu a podepsali informovaný souhlas se studií. Do projektu bylo zařazeno celkem 52 živých dárců ledvin. (viz. Tabulka 1).

Tabulka 1: Charakteristika žijících dárců ledvin

Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD a významnosti podle nepárového parametrického Studentova t testu; Ženy, W (n = 33), muži, M (n = 19), ženy před menopauzou, PreW (n = 16) a ženy po menopauze, PostW (n = 17)

Parameters	Women (W)	Men (M)	Significance (M×W)	PreW	PostW	Significance (PreW×PostW)
Age (years)	46,60 \pm 11,53	45,09 \pm 8,98	n.s.	43,22 \pm 5,26	56,24 \pm 5,48	p <0,0001
BMI (kg/m ²)	25,17 \pm 3,48	26,94 \pm 3,74	p=0,05	24,42 \pm 3,39	25,97 \pm 3,49	n.s.
Total cholesterol (mmol.l ⁻¹)	4,37 \pm 1,01	4,32 \pm 0,64	n.s.	4,01 \pm 0,70	4,86 \pm 1,20	p <0,05
HDL-C (mmol.l ⁻¹)	1,32 \pm 0,35	0,99 \pm 0,26	p <0,01	1,32 \pm 0,26	1,31 \pm 0,47	n.s.
nonHDL-C (mmol.l ⁻¹)	3,15 \pm 1,07	3,39 \pm 0,64	n.s.	2,69 \pm 0,68	3,54 \pm 0,99	p <0,02
Triglycerides (mmol.l ⁻¹)	1,23 \pm 0,78	1,57 \pm 0,64	n.s.	1,11 \pm 0,42	1,39 \pm 1,10	n.s.
hsCRP (mg.l ⁻¹)	1,66 \pm 2,90	1,18 \pm 1,34	n.s.	1,61 \pm 2,33	1,72 \pm 3,67	n.s.

Metodika odběru tukové tkáně

V našich podmínkách se při dárcovské nefrektomii odebírá tuková tkáň z podkoží, z oblasti Gerotovy fascie a perirenální tuková tkáň od arteria renalis (viz. Obrázek 1). Dále se u dárců ledvin jako jedinečný materiál odebírá vzorek samotné arteria renalis, která byla mechanicky přerušena staplerem při odběru ledviny. Ve výše zmíněných lokalizacích jsme odebírali i tuk od pacientů s aterosklerotickým postižením, kteří byli indikováni k suprainquinální cévní rekonstrukci pro ischemickou chorobu dolních končetin. Všechn tento materiál je podrobně vyšetřován s identifikací buněčných markerů proinflamačního stavu a protizánětlivých cytokinů u zdravých subjektů (dárci ledvin). Tyto elektivní výkony, které se začínají brzy ráno, umožní nejen odebrat tukovou tkáň, ale hlavně časově umožní následné laboratorní zpracování.



Obrázek 1: tuková tkáň –
SCAT – subcutaneous adipose tissue
VAT – visceral adipose tissue
PVAT – perivascular adipose tissue

6. Výsledky

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

Rozdíl v zastoupení CD16+36^{high} CD163- (tedy zánětlivých M1 makrofágů) ve SCAT oproti VAT a PVAT byl vysoce významný (pro obě $p < 0,0001$). Zastoupení makrofágů CD16+36^{low} bylo vyšší ve SCAT než v PVAT ($p < 0,01$). Většina makrofágů (~90 %) také exprimovala na povrchu marker CD163. Když jsme do analýzy zahrnuli marker CD163, tak bylo zastoupení subpopulace makrofágů CD14+ CD16+36^{low}163+ významně nižší ve VAT ($p < 0,05$) a PVAT ($p < 0,005$) ve srovnání se SCAT. Většina makrofágů CD16-CD36^{low} byla zároveň i CD163+. Zastoupení makrofágů CD16-CD36^{low} a CD16-CD36^{low}CD163+ bylo také vyšší v SCAT v porovnání s VAT ($p < 0,02$). V celé skupině žijících dárců ledvin bylo zastoupení prozánětlivých makrofágů nižší ve SCAT než VAT a PVAT. S každým dalším analyzovaným markerem byl tento rozdíl více vyjádřený od CD16+, CD16+ CD36^{high} a nakonec CD16+36^{high} CD163- (viz. Tabulka 2).

Tabulka 2. Rozdílné fenotypy makrofágů izolované z tukové tkáně
Zastoupení typů makrofágů v subkutánní (SCAT, n=44), viscerální (VAT, n=52) a perivaskulární (PVAT, n=52) tukové tkáni. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry \pm SD a významnost v závislosti na Studentově párovém t-testu; n.s. – nevýznamné.

CD14+				SCAT	Statistická významnost (SCAT×VAT)	VAT	Statistická významnost (VAT×PVAT)	PVAT	Statistická významnost (SCAT×PVAT)
CD16	CD36	CD163							
+			%	48,9 \pm 14,3	$p < 0,02$	53,4 \pm 13,3	n.s.	50,6 \pm 14,0	n.s.
+	+++		%	32,7 \pm 13,7	$p < 0,02$	39,4 \pm 13,4	n.s.	38,7 \pm 15,5	$p < 0,05$
+	+		%	14,1 \pm 7,7	n.s.	12,4 \pm 7,5	n.s.	10,4 \pm 6,9	$p < 0,01$
+	+++	+	%	19,9 \pm 9,5	n.s.	15,4 \pm 6,8	n.s.	13,5 \pm 8,1	$p < 0,005$
+	+++	-	%	14,3 \pm 8,0	$p < 0,0001$	25,5 \pm 11,8	$p < 0,05$	29,2 \pm 12,6	$p < 0,0001$
+	+	+	%	13,1 \pm 6,2	n.s.	11,8 \pm 6,8	$p < 0,05$	9,4 \pm 5,3	$p < 0,005$
-			%	51,1 \pm 14,3	$p < 0,02$	46,6 \pm 13,3	n.s.	49,4 \pm 14,0	n.s.
-	+		%	45,0 \pm 13,5	$p < 0,02$	40,4 \pm 12,1	n.s.	41,8 \pm 12,3	n.s.
-	-		%	6,1 \pm 5,0	n.s.	6,9 \pm 6,3	n.s.	7,6 \pm 7,2	n.s.
-	+	+	%	43,9 \pm 13,1	$p < 0,02$	39,0 \pm 12,2	n.s.	39,7 \pm 12,5	n.s.
-	-	+	%	5,8 \pm 4,9	n.s.	5,8 \pm 6,2	n.s.	7,1 \pm 6,9	n.s.

Zastoupení subpopulací makrofágů v lidské tukové tkáni je ovlivněné pohlavím a menopauzou u žen

Průměrný věk zařazených mužů byl $42,8 \pm 12,9$ let, a průměrný věk zařazených žen byl $50,3 \pm 7,9$ let. Věkový rozdíl mezi oběma skupinami byl významný ($p < 0,02$). Žádný z jedinců se neléčil s vysokým arteriálním tlakem, cukrovkou a neměl záznam o kardiovaskulárním onemocnění. Jen dvě ženy měly dyslipidémii. Šest mužů, čtyři mladší ženy a 3 starší ženy kouřili. Průměrné BMI celé sledované skupiny bylo $25,4 (\pm 3,3)$ kg/m². BMI mužů bylo $25,9 (\pm 3,3)$; žen před menopauzou $24,7 (\pm 3,6)$; a žen po menopauze $25,7 (\pm 3,3)$ kg/m². Mezi skupinami nebyly v BMI statisticky významné rozdíly. Mezi muži a ženami nebyly ani rozdíly v zastoupení jednotlivých makrofágů v tukové tkáni. Následně byly ženy analyzovány s ohledem na věk (viz. Tabulka 3). V perirenálním tuku jsme mezi skupinami nenašli rozdíly v celkovém počtu makrofágů. Zánětlivé makrofágy CD14+CD16+ byly více zastoupeny u starších žen než u mladších ($p < 0,01$). Poměr CD14+CD16+/CD14+CD16- makrofágů, hlavní prozánětlivý znak, byl rovněž vyšší u starších žen než u mladších ($p < 0,02$). V perirenálním tuku jsme ve sledovaných parametrech mezi muži a ženami nepozorovaly žádný významný rozdíl. Stejně tak i v renálním perivaskulárním tuku (s výjimkou celkového počtu CD14+ makrofágů). Makrofágy CD14+CD16- měly ve velké míře (96 ± 4 %) zastoupený i další protizánětlivý marker CD163+. Subpopulace protizánětlivých makrofágů CD14+CD16-CD163+ v perirenálním tuku byla vyšší (55 ± 17 % vs. 37 ± 9 %; $p < 0,01$) u žen v premenopauzálním věku než u žen v postmenopauzálním. Dále jsme zjišťovali zastoupení makrofágů v tukové tkáni v závislosti na věku. Našli jsme silnou korelaci mezi poměrem makrofágů CD14+CD16+/CD14+CD16- v perirenální tukové tkáni a věkem v našem souboru žen, ale ne ve skupině mužů. Když jsme sledovali závislost tohoto poměru na věku žen, potvrdili jsme silnou korelaci ve skupině žen po menopauze. V celé studijní skupině jsme nenašli souvislost mezi celkovým počtem makrofágů v žádné z tukových tkání a věkem jedinců.

Tabulka 3: Zastoupení subpopulací makrofágů v perirenálním a perivaskulárním tuku u zdravých žijících dárců ledvin a jeho ovlivnění pohlavím a menopauzou u žen. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry nebo procenta (SD) (Kralova, Poledne et al. 2015).

	Men (n = 15)	Pre-menopausal women (n = 14)	Post-menopausal women (n = 14)	A	B	C
Age (years)	42.8 (12.9)	44.8 (3.3)	57.5 (6.0)	n.s.	$p < 0.01$	$p < 0.0001$
<i>Perirenal fat</i>						
CD14+ (No. of cells/gram of tissue)	8660 (7106)	9134 (7204)	14 925 (10 121)	n.s.	n.s.	n.s.
CD14+CD16+ (%)	51 (16)	45 (14)	58 (8)	n.s.	n.s.	$p < 0.01$
CD14+CD16+/CD14+CD16-	1.25 (0.86)	1.02 (0.79)	1.74 (0.43)	n.s.	n.s.	$p < 0.02$
<i>Renal perivascular fat</i>						
CD14+ (No. of cells/gram of tissue)	9324 (8076)	10 894 (9151)	20 522 (18 641)	n.s.	$p < 0.05$	$p < 0.05$
CD14+CD16+ (%)	50 (17)	48 (13)	57 (8)	n.s.	n.s.	$p < 0.05$
CD14+CD16+/CD14+CD16-	1.35 (1.32)	1.04 (0.71)	1.42 (0.45)	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. – non-significant. Differences: A: Men v.s. Women of Pre-menopausal age, B: Men v.s. Women of Post-menopause, C: Women of Pre-menopausal age v.s. Women of Post-menopausal age.

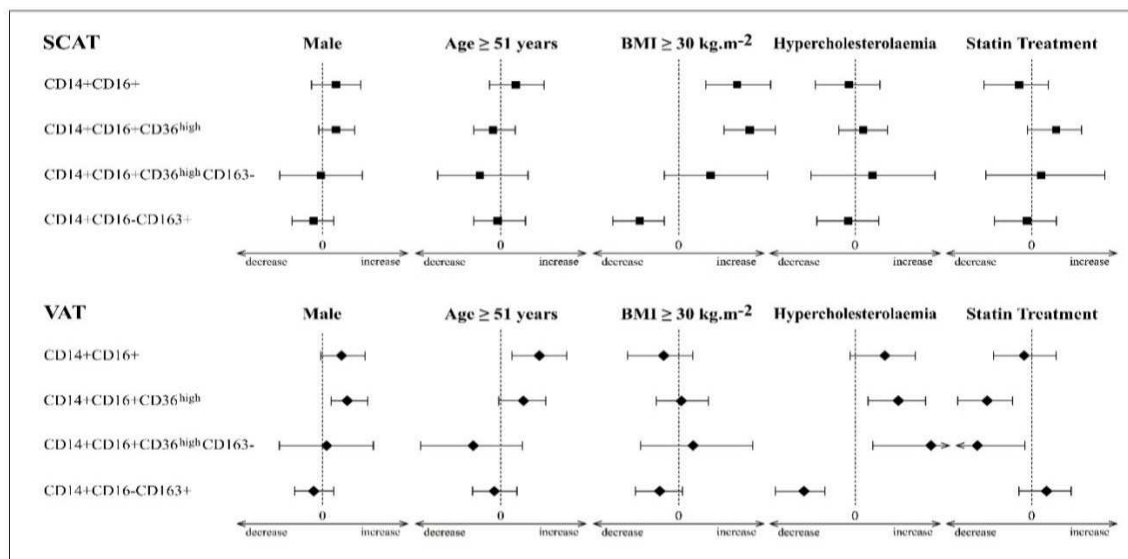
Vztah proporce metabolicky aktivovaných makrofágů k prediktorům kardiovaskulárního rizika

Subcutaneous adipose tissue - SCAT

Jediný sledovaný prediktor kardiovaskulárního onemocnění, který měl významný vliv na nárůst či pokles subpopulací makrofágů ve SCAT bylo BMI (viz. Obrázek 5). Obézní jedinci (s BMI vyšším než 30 kg/m²) měli vyšší zastoupení prozánětlivých a nižší protizánětlivých subtypů makrofágů.

Visceral adipose tissue - VAT

Překvapivě jsme neprokázali vliv obezity na proporce makrofágů ve VAT. Na druhou stranu, všechny ostatní prediktory kardiovaskulárního onemocnění (CVD) (viz. Obrázek 2) proporce makrofágů v této tukové tkáni ovlivnily. Starší jedinci (přes 51 let) měli větší zastoupení prozánětlivých makrofágů než mladší jedinci. Dále jsme sledovali větší zastoupení prozánětlivé subpopulace makrofágů u mužů. Hypercholesterolemie, která byla definována jako plazmatická koncentrace cholesterolu vyšší než 5 mmol/l nebo současná léčba statiny, zvyšovala proporce prozánětlivých makrofágů s fenotypem CD14+CD16+CD36^{high} i CD14+CD16+CD36^{high}CD163⁻ (viz. Obrázek 2). Navíc měli jedinci s hypercholesterolemií ve VAT nižší hladinu protizánětlivých makrofágů. Léčba statiny prozánětlivou subpopulaci makrofágů ve VAT jednoznačně snižovala. Avšak na protizánětlivou populaci makrofágů žádný efekt neměla. Je zajímavé, že vyšší věk, mužské pohlaví a hypercholesterolemie významně zvyšovaly proporce metabolicky aktivovaných makrofágů (CD14+CD16+CD36^{high}) ve SVF izolované z VAT, naopak pouze vysoký BMI (nad 30 kg/m²) zvyšoval proporce této subpopulace ve SCAT, vliv ostatních prediktorů CVD zjištěn nebyl.



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

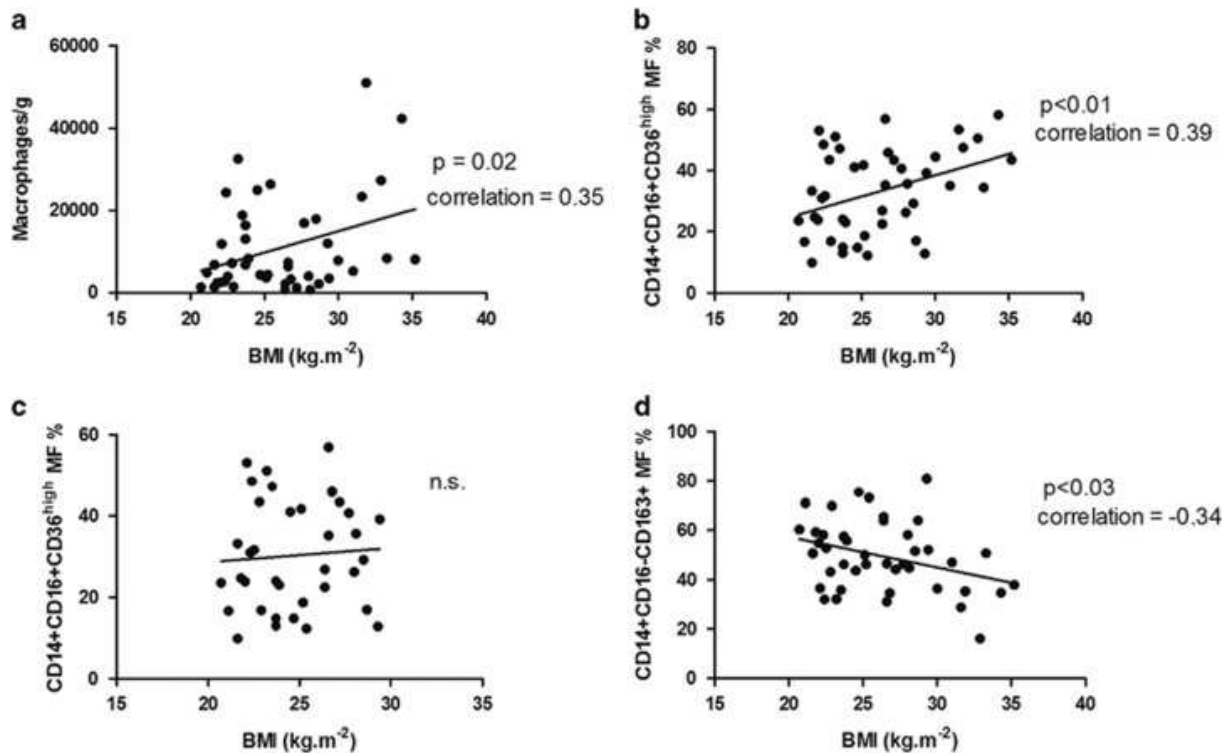
Akumulace tukové tkáně zvyšuje v těle zastoupení prozánětlivých makrofágů v subkutánní tukové tkáni více než ve viscerální

Ve SCAT jsme pozorovali méně makrofágů s fenotypem CD14+CD16+CD36^{high} než ve VAT ($p < 0,02$), avšak zastoupení protizánětlivých makrofágů (CD14+CD16-CD163+) se mezi oběma tukovými tkáněmi významně nelišilo. Zbýlých 15-20 % z celkových makrofágů tvořili makrofágy s přechodným fenotypem mezi oběma hlavními typy (viz. Tabulka 4).

Pozorovali jsme významný vztah ($p=0,02$) mezi BMI a celkovým počtem makrofágů izolovaných ze stromální vaskulární frakce SCAT (viz. Obrázek 3a). Zastoupení prozánětlivých CD14+CD16+CD36^{high} makrofágů také korelovalo s BMI všech účastníků studie ($p < 0,01$) (viz. Obrázek 3b). Když jsme do statistiky zahrnuli jen jedince bez obezity ($BMI \leq 30 \text{ kg/m}^2$), tak tato pozitivní korelace mezi BMI a počtem prozánětlivých makrofágů zmizela (viz. Obrázek 3c). Podobně i zastoupení protizánětlivých makrofágů (CD14+CD16-CD163+) korelovalo negativně s BMI v celé skupině jedinců ($p < 0,03$) (viz. Obrázek 3d).

Tabulka 4: Makrofágy izolované ze SCAT a VAT, jejich zastoupení a srovnání ve skupinách. Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm s.d. Statistická významnost byla stanovena pomocí párového Studentova t-testu; n.s. - non-significant.

Charakteristika makrofágů izolovaných ze SCAT a VAT			
Makrofágy	SCAT (n=44)	VAT (n=52)	Významnost SCAT vs. VAT
Makrofágy CD14+ počet/g	10 900 \pm 12 250	13 200 \pm 10 350	n.s.
CD14+CD16+ (%)	48,9 \pm 14,3	53,4 \pm 13,3	$p < 0,05$
CD 14+CD16+CD36 ^{high} (%)	32,7 \pm 13,8	39,4 \pm 13,4 %	$p < 0,02$
CD14+CD16-CD163+ (%)	49,7 \pm 14,1	45,2 \pm 13,6	n.s.



Obrázek 3: Vztah mezi jednotlivými podskupinami makrofágů v subkutánní tukové tkáni (MF) a BMI jedinců. Vztah mezi celkovým počtem MF a BMI (a); vztah mezi prozánětlivými MF CD14+CD16+CD36^{high} a BMI (b); stejný vztah u neobézních jedinců (c); vztah mezi protizánětlivými MF CD14+CD16-CD163+ a BMI (d).

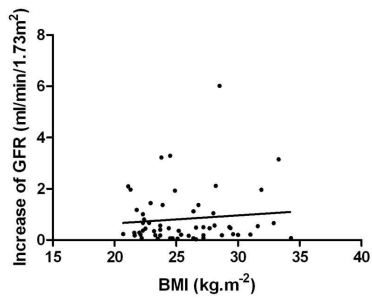
Efekt ektopické tukové tkáně na funkci štěpu po transplantaci od žijícího dárce

Časný rozvoj funkce štěpu měřený jako průměrný vzestup glomerulární filtrace (GFR) prvních sedm dní po transplantaci nekoreloval s BMI žijících dárců ledvin (viz. Obrázek 4). Nenašli jsme žádný vztah mezi časným rozvojem funkce štěpu ledviny a množstvím zánětlivých M1 makrofágů v perirenální tukové tkáni dárce ($p = 0,83$, $r = 0,03$, $n = 58$), plazmatickou hladinou adiponectinu ($p = 0,65$, $r = 0,06$, $n = 58$) ani plazmatickou hladinou CRP ($p = 0,16$, $r = 0,2$, $n = 58$).

Potvrdili jsme negativní korelaci mezi BMI příjemců a průměrným vzestupem GFR prvních sedm dní po transplantaci ($p < 0,02$, $r = -0,325$, $N = 58$) (viz. Obrázek 5).

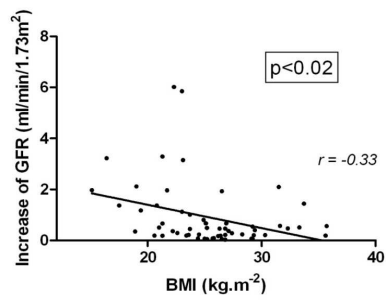
Potvrdili jsme negativní korelaci mezi plazmatickou hladinou adiponectinu a BMI žijících dárců ledvin (viz. Obrázek 6).

Correlation of BMI of donors with the average GFR in recipients



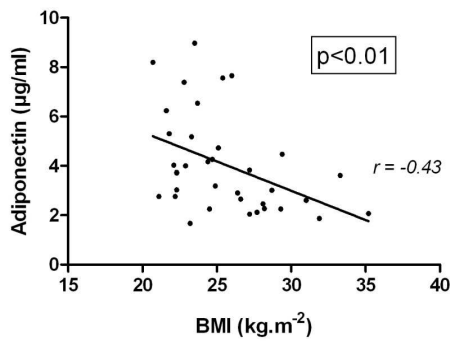
Obrázek 4: Korelace mezi BMI žijících dárců ledvin s průměrnou GFR u příjemců

Correlation of BMI of recipients with the average GFR in recipients



Obrázek 5: Korelace mezi BMI příjemců s průměrnou GFR u příjemců (p < 0,02, r = -0,33, n = 58)

Correlation of BMI with adiponectin concentrations



Obrázek 6: Korelace mezi BMI a plazmatickou koncentrací adiponectinu žijících dárců ledvin (p < 0,01, r = -0,43, n = 58)

7. Diskuse

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

Shodně ve všech typech tukové tkáně bylo možné rozdělit CD14+ pozitivní makrofágy na základě koexpresie markeru CD16 na zhruba stejně velké subpopulace (Tabulka 2). Dokázali jsme, že jejich zastoupení se liší v jednotlivých typech tukových tkání SCAT a VAT nebo PVAT. U makrofágů CD 16+ byla sledována podskupina s velkou intenzitou exprese markeru CD36 (CD36^{high}). Na druhou stranu u CD16- makrofágů jsme pozitivitu CD36^{high} nezachytili. Skupina makrofágů s nízkou expresí CD36 (CD36^{low}) byla uniformně pozitivní i na marker CD163. Prozánětlivý fenotyp CD14+CD16+ makrofágů byl potvrzen unikátním výskytem subpopulace s vysokou expresí CD36 markeru a zároveň pouze v této CD14+CD16+CD36^{high} subpopulaci byly identifikovány makrofágy neexprimující CD163. VAT a PVAT mají velmi podobné zastoupení sledovaných subpopulací makrofágů. Zatímco 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 % ve SCAT).

Makrofágy s expresí markerů CD16+ CD36^{high} CD163- se vyskytovaly až ve dvojnásobně větším počtu ve VAT a PVAT v porovnání se SCAT. Můžeme spekulovat, že tento fenomén odráží vyšší metabolickou a prozánětlivou aktivitu viscerální tukové tkáně v porovnání se subkutánní tukovou tkání, což bylo opakovaně prokázáno (Kraunsoe, Boushel et al. 2010). Ačkoli byly makrofágy v tukové tkáni opakovaně popsány, jen málo studií popsalo jejich zastoupení i kvantitativně na gram tukové tkáně. Naše výsledky popisující počet makrofágů na gram tukové tkáně jsou v souladu s publikovanými daty (Zeyda, Farmer et al. 2007, Kovacikova, Sengenés et al. 2011). Někteří autoři popsali vyšší procentuální zastoupení makrofágů CD16+ v subkutánní tukové tkáni, (průměrně 60 %), v porovnání s našimi daty. Avšak jiní autoři (Bourlier, Zakaroff-Girard et al. 2008, Rose, Stansky et al. 2014) zjistili jen malou subpopulaci CD16+ ve SCAT. Co je nám známo, tak žádná data o zastoupení CD16+ makrofágů ve VAT ještě nebyla publikována, proto nemůžeme naše data s ničím srovnat.

CD36 marker funguje jako scavenger receptor, který na sebe váže různé ligandy jako oxidovaný LDL, oxidované fosfolipidy a apoptické buňky. Interakce CD36 s ligandy indukuje influx monocytů do tkáně a produkci prozánětlivých cytokinů (Jiang, Wang et al. 2012). Důležitá je i funkce CD36 při tvorbě pěnových buněk během progresu aterosklerózy (Park 2014). Expresie receptoru CD36 ve tkáních může být modifikována složením diety (Larter, Yeh et al. 2013). Recentní studie sledovala silnou korelaci mezi expresí CD36 na makrofázích tukové tkáně a metabolickou dysfunkcí (Kratz, Coats et al. 2014). Naše data ukazují, že jeho exprese se mezi CD16+ a CD16- makrofágy výrazně liší.

Podle nové nomenklatury je marker CD163 kategorizován jako protizánětlivý marker M2 makrofágů (Murray, Allen et al. 2014). Prokázali jsme, že všechny makrofágy s CD16- byly i CD163+ ve všech třech typech tukové tkáně. Proto věříme, že populace CD16- CD36^{low} CD163+ by měla odpovídat protizánětlivým makrofágům. Kritéria pro vyloučení žijících dárců ledvin se v našem transplantačním centru podobně jako v jiných centrech rozvolnila a do programu byli přijati tři hypertoničtí jedinci s dyslipoproteinémií a sedm obézních jedinců. Je důležité zmínit, že zařazení dalších dvou markerů na povrchu makrofágů v tukové tkáni (CD36 and CD163) nám pomohlo určit, zda se jedná o M1 nebo M2 makrofágy. Ve viscerální a perivaskulární tukové tkáni bylo vyšší zastoupení prozánětlivých M1 makrofágů než ve SCAT. Situace s protizánětlivými M2 makrofágy je zjevně obrácená.

Zastoupení subpopulací makrofágů v lidské tukové tkáni je ovlivněné pohlavím a menopauzou u žen

Dále jsme prokázali, že při srovnávání všech žen s muži neexistují v subpopulacích makrofágů v tukové tkáni významné rozdíly. Tyto rozdíly byly zjizitelné až po následném rozdělení žen podle reprodukčního věku na premenopauzální a postmenopauzální. Všechny prozánětlivé parametry se po menopauze zvyšují, včetně zastoupení prozánětlivých makrofágů v tukové tkáni. Tento posun zdůrazňuje význam tohoto období u žen, kdy se zvyšuje kardiovaskulární riziko. V našem souboru žen jsme po jejich rozdělení podle menopauzy zaznamenali u postmenopauzálních žen až dvojnásobné zvýšení CD14+CD16+ makrofágů v tukové tkáni v porovnání s ženami před menopauzou. U žen po menopauze byla mezi počtem makrofágů a věkem silná korelace. Většina dat, která dokumentují souvislost mezi tukovou tkání a aterosklerózou byla získána z experimentálních studií na zvířecích modelech (Soltis and Cassis 1991, Szasz and Webb 2012). Jedinou studií hodnotící podíl CD16+ makrofágů v lidské subkutánní tukové tkáni publikoval Bourlier (Bourlier, Zakaroff-Girard et al. 2008). Bylo opakovaně prokázáno, že mírný chronický zánět v tukové tkáni, zprostředkovaný imunitními buňkami (především makrofágy) je úzce spojen s metabolickými chorobami souvisejícími s obezitou, zejména s inzulínovou rezistencí (Chawla, Nguyen et al. 2011). V naší studii, která byla omezena na neobézní jedince, jsme nezjistily žádnou významnou korelaci mezi BMI a proporcí makrofágů v tukové tkáni. To může znamenat, že v rámci normálních fyziologických rozmezí neexistuje významná souvislost mezi tělesnou hmotností a zánětlivými změnami v tukové tkáni. Potenciální nepříznivý dopad perivaskulární tukové tkáně na cévy byl opakovaně potvrzen v epidemiologických, experimentálních i klinických studiích (Greif, Becker et al. 2009, Lehman, Massaro et al. 2010). Jedním z omezení naší studie je relativně nízký počet účastníků. Významným přínosem naší výzkumné práce je identifikace speciálních populací makrofágů v tukové tkáni na různých místech u vyšetřených zdravých neobézních dárců ledvin se zaměřením na rozdíly v pohlaví a hodnocení vlivu menopauzálního stavu. V budoucích studiích by bylo vhodné, aby byly proporce makrofágů v tukové tkáni hodnoceny podle pohlaví a reprodukčního stáří u žen.

Vztah proporce metabolicky aktivovaných makrofágů k prediktorům kardiovaskulárního rizika

Analýza podílu makrofágů v lidské tukové tkáni dokumentovala odlišný dopad rizikových faktorů pro kardiovaskulární onemocnění (pohlaví, věk, BMI a hypercholesterolemie) na zánětlivý stav tukové tkáně. Hlavním přínosem naší analýzy bylo zjištění přímého účinku statinové terapie na tlumení prozánětlivých změn makrofágů tukové tkáně. Je známo, že makrofágy se v tukové tkáni vyskytují v celém spektru nediferencovaných fenotypů (Zeyda, Farmer et al. 2007, Bourlier, Zakaroff-Girard et al. 2008). Na základě současných znalostí můžeme spekulovat, že přechodné fenotypy (CD14+CD16+CD36^{high}CD163+ a CD14+CD16+CD36^{low}CD163+) jsou nepolarizované subpopulace makrofágů s možností proměny na oba subtypy. V případě VAT nebyl prokázán žádný účinek obezity (s výjimkou malé přechodné frakce), což není v souladu s publikovanými údaji (Klimcakova, Roussel et al. 2011). Jiní autoři (Spoto, Di Betta et al. 2014) dokumentovali, že obezita koreluje se zánětlivými změnami ve SCAT ve srovnání s VAT. V souladu s našimi dřívějšími údaji byl účinek věku, na rozdíl od obezity, výraznější u VAT (Kralova Lesna, Poledne et al. 2015). Ve VAT byl vyšší věk spojen se zvýšením podílu potenciálně prozánětlivého fenotypu makrofágů. Účinek vyššího věku se projevil také v přechodné frakci CD14+CD16+CD36^{low}(CD163+). Rovněž byly zjištěny významné rozdíly mezi muži a

ženami. U mužů byl vyšší podíl prozánětlivých a přechodných makrofágů ve VAT. Je třeba zdůraznit, že jedna z možných příčin může být strava a speciálně nasycené mastné kyseliny (Lee, Zhao et al. 2010). Vliv věku byl detekován pouze na pravděpodobně prozánětlivých makrofázích. Hypercholesterolémie měla zásadní vliv na zastoupení prozánětlivých makrofágů ve VAT. Subjekty s hypercholesterolémií vykazovaly zvýšený podíl prozánětlivých fenotypů makrofágů ve VAT, zatímco podíl protizánětlivého fenotypu byl v této tkáni významně nižší. Velká epidemiologická prospektivní studie (Ridker, Danielson et al. 2009) prokázala pozitivní účinky statinů na snížení LDL. Dále byl dokumentován vliv statinů na pokles koncentrace hsCRP, který naznačuje vliv na prozánětlivý stav celého těla. Naše data prokázala účinek statinů na pokles prozánětlivých makrofágů ve VAT. To by mohlo vysvětlovat navrhovaný pleiotropní pozitivní účinek statinů. Bayesiánská analýza účinků pohlaví, věku, obezity, kouření, hypertenze a hypercholesterolémie na zastoupení prozánětlivých subtypů dokumentovala účinek vyššího BMI (> 30 kg/m²) u SCAT, ale žádný vliv ve VAT. Účinek hypercholesterolémie na podíl prozánětlivého subtypu makrofágů byl vyvážen zahrnutím podávání statinu jako dalšího faktoru. Na základě našich údajů předpokládáme, že negativní účinek kouření na progresi aterosklerózy (Siasos, Tsigkou et al. 2014) není zprostředkovan stavem zánětu tukové tkáně. Zdá se, že totéž platí pro hypertenzi. Věříme, že výsledky této studie pomohly porozumět mechanismům pleiotropního účinku statinů. Naše výsledky ukázaly, že polarizace makrofágů v lidské tukové tkáni souvisí s prozánětlivým stavem tukové tkáně a je ovlivněna hlavními rizikovými faktory kardiovaskulárních chorob.

Akumulace tukové tkáně zvyšuje v těle zastoupení prozánětlivých makrofágů v subkutánní tukové tkáni více než ve viscerální

Nefrektomie u živých dárců ledvin nám poskytly jedinečnou příležitost porovnat význam různých typů lidské tukové tkáně. Jedním z důležitých zjištění byla role makrofágů v subkutánní tukové tkáni u obézních jedinců. Pozorovali jsme zde velkou infiltraci makrofágy (CD14+CD16+CD36^{high}), která pozitivně korelovala s BMI. Dále jsme zjistili negativní korelaci mezi protizánětlivými makrofágy (CD14+CD166-CD163+, odpovídající makrofágům M2) a BMI. Zajímavé je, že ve viscerální tukové tkáni nebyl takový vztah nalezen. Pokud jsme makrofágy v tukové tkáni rozlišovali jen podle markeru CD16, nenašli jsme významnou souvislost se změnami BMI. To je v souladu s daty ze studie na malé skupině extrémně obézních dobrovolníků (Kovacikova, Sengenés et al. 2011), kde dietní intervence nezměnila podíl prozánětlivých makrofágů ve SCAT, pokud se k odlišení použil pouze marker CD16. Přidání dalších markerů (CD36 a CD163) však odhalilo významnou korelaci prozánětlivých a protizánětlivých makrofágů s BMI. To jasně dokumentuje význam těchto markerů pro měření zánětu tukové tkáně. Po vyloučení ze statistiky všech jedinců s obezitou (BMI více než 30 kg/m²) uvedené korelace vymizely. Je zajímavé, že svévolná hranice obezity odpovídala našim údajům a dokumentovala přechod tukové tkáně do subklinického zánětu u jedinců s obezitou. Bylo prokázáno, že makrofágy jsou vysoce adaptivní na tkáňové prostředí a jednotlivé fenotypy mohou být specifické pro tkáň. Vzhledem k tomu, že CD36 je přenašeč mastných kyselin, zvýšení CD36^{high} makrofágů by mohlo odrážet zvýšení pufrové kapacity těchto buněk v prostředí zvětšené tukové tkáně s vysokými mezibuněčnými koncentracemi volných mastných kyselin (Castoldi, Naffah de Souza et al. 2015). Dále bylo prokázáno, že exprese CD36 v makrofázích se může zvýšit při aktivaci v "metabolicky nezdravém" prostředí, tj. v prostředí s vysokou koncentrací glukózy, inzulínu a palmitátu (Bai and Sun 2015). To může přispívat k inzulínové rezistenci vyvolané dietou (Kennedy, Kuchibhotla et al. 2011). Viscerální tuková tkáň je považována za metabolicky více aktivní než podkožní tuková tkáň, což je důvod, proč se obvod pasu často

používá jako další marker centrální obezity. Naše výsledky překvapivě ukázaly významné asociace BMI a obvodu pasu s prozánětlivými a protizánětlivými makrofágy ve SCAT nikoli ve VAT. I jiní autoři si všimli souvislosti mezi markery inzulinové rezistence a větší infiltrací makrofágy ve SCAT v porovnání s VAT (Frederiksen, Nielsen et al. 2009, Wentworth, Naselli et al. 2010). Nedávné údaje od Moreno-Indias (Moreno-Indias, Oliva-Olivera et al. 2016) ukázaly, že na počátku vývoje metabolického syndromu prozánětlivé změny ve SCAT mohou hrát důležitější roli ve srovnání s VAT. Na základě našich výsledků usuzujeme, že prozánětlivé změny související s obezitou u metabolicky zdravých subjektů dominantně probíhají nejdříve v podkožní tukové tkáni.

Efekt ektopické tukové tkáně na funkci štěpu po transplantaci od žijícího dárce

Transplantace ledviny od žijícího dárce je bezesporu nejvhodnější alternativou náhrady funkce ledvin pro pacienty s chronickým selháním s minimálními krátkodobými i dlouhodobými riziky (Murray, Tilney et al. 1976). Ledviny od žijících dárců jsou podrobně vyšetřeny a samotná transplantace probíhá za ideálních podmínek. Opoždění funkce transplantované ledviny od žijícího dárce se v porovnání s kadaverózní ledvinou vyskytuje velmi zřídka, nicméně se může objevit. Mezi možnými faktory, které mohou časný rozvoj funkce ledvin ovlivnit, je narůstající počet obézních dárců. V současné době se body mass index (BMI) > 35 kg/m² považuje za relativní kontraindikaci pro dárcovství ledvin (Kalble, Lucan et al. 2005). Observační studie ukazují na zvýšené riziko chronické renální insuficience u obézních osob i po adjustaci na zvýšený krevní tlak a diabetes mellitus (Gelber, Kurth et al. 2005). U obézních pacientů byla ve studiích prokázána hyperfiltrace glomerulů (Chagnac, Weinstein et al. 2003). Podle jiné studie nezvyšovala obezita u dárců riziko pro samotné dárce ledvin, ale u příjemců představovala riziko pro opožděný rozvoj funkce štěpu. Hlavně u dárců ledvin, kteří měli BMI nad 35 kg/m². Na snížení časné funkce ledviny od dárce s obezitou se může podílet řada faktorů. Jedním z nich může být přítomnost ektopického perivaskulárního tuku s parakrinní sekrecí mnoha cytokinů a zánětlivou infiltrací (Reese, Feldman et al. 2009). Perivaskulární tuk obklopuje cévy a pravděpodobně se podílí na regulaci cévního tonu (Yudkin, Eringa et al. 2005, Tran, Gealekman et al. 2012). Z jiných studií je známo, že příjemci orgánů od obézních žijících dárců mají častější výskyt akutní rejeckce v porovnání s příjemci od dárců s normální váhou (Espinoza, Gracida et al. 2006).

Podle metaanalýzy, která hodnotila výsledky u obézních dárců ledvin, nebylo snížení glomerulární filtrace po nefrektomii u těchto pacientů větší než u neobézních dárců (Espinoza et al. 2006). Nelišilo se ani krátkodobé přežívání štěpu ledviny od dárců s vyšším BMI (Arita, Kihara et al. 1999).

Nepotvrdili jsme naši hypotézu, že míra obezity u žijících dárců ledvin bude negativně ovlivňovat rozvoj časné funkce transplantované ledviny v prvním týdnu po transplantaci. Nepotvrdili jsme ani hypotézu, že časný rozvoj funkce ledviny bude negativně korelovat se zánětlivými parametry (hsCRP) v plazmě a množstvím prozánětlivých makrofágů M1 v perivaskulárním tuku kolem renální artérie dárcovské ledviny. Důvodem je pravděpodobně malý počet zařazených párů a také nízké procento obézních jedinců v naší sledované skupině – pouze 13,8 %. Nízký počet jedinců s nadváhou a obezitou byl limitací naší studie. V našem souboru bylo celkem 58 dárců, z nichž pouze 8 mělo BMI > 30 kg/m². Všichni příjemci měli rychlý nástup funkce transplantované ledviny.

V naší studii jsme potvrdili negativní korelaci mezi BMI příjemců a časným rozvojem glomerulární filtrace transplantované ledviny. Všechny výsledky byly v mezích normy pro normální funkci. Dále jsme potvrdili negativní korelaci mezi BMI a hladinou adiponektinu v plazmě.

III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Úloha perivaskulární tukové tkáně při vzniku aterosklerózy; intervenční studie s využitím zvířecího modelu

Úvod

Studie (Takaoka, Nagata et al. 2009) využívající transplantační studie podala důležité důkazy o úloze perivaskulární tukové tkáně (PVAT) při cévním poranění. Tato studie prokázala ochrannou funkci PVAT při cévním poranění za bazálních podmínek a vliv dysfunkce PVAT vyvolané krátkodobým podáváním vysokotukové diety projevující se zvýšenou tvorbou neointimy po operačním zákroku. Thiazolidindiony (TZD) jsou známé insulin-senzitizující léky, aktivátory PPAR gama signalizace (stimulátor transkripčního faktoru PPAR gamma), snižující glykémii a pozitivně ovlivňující i další složky metabolického syndromu. Pozitivní vliv podávání TZD snižující riziko vzniku aterosklerózy a restenózy byl prokázán například ve studiích (Chen et al. 2001). V naší studii jsme se zaměřili na souvislost mezi metabolickým stavem a tvorbou neointimy při transplantačních studiích. Zejména jsme se soustředili na předpokládaný ochranný mechanismus působení PPAR gamma signalizace za těchto podmínek.

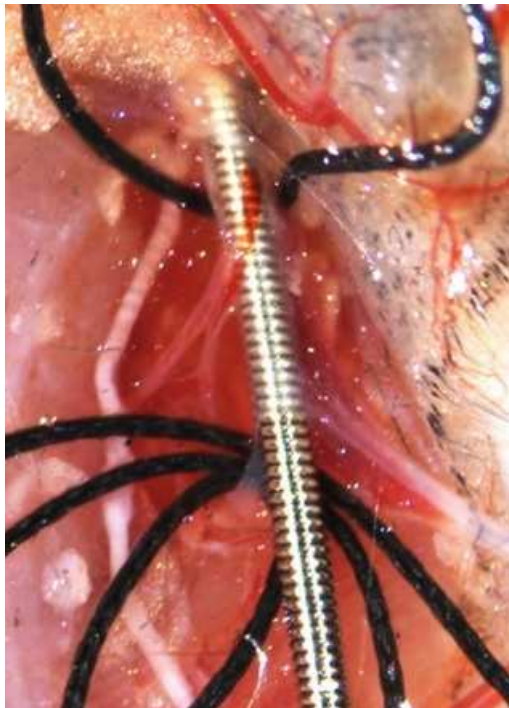
Cílem projektu bylo přinést nové poznatky stran PVT při patogenezi aterosklerózy. Dostupné údaje týkající se PVT naznačují vliv této tkáně mimo jiné v procesu modulace zánětu a vaskulární remodelace.

Metodika

Jako zvířecí model jsme zvolili HHTg potkana – potkan s hereditární hypertriglyceridemií a inzulinovou rezistencí (Vrana, Kazdova et al. 1990). Fenotyp metabolického syndromu se u těchto zvířat projevuje i bez nutričních stimulů, avšak vysokosacharidová dieta tyto příznaky dále umocňuje (Klimes, Vrana et al. 1995). Za účelem prohloubení metabolické poruchy, byla proto vybraná zvířata – příjemci, dietně manipulována před usmrcením po dobu 4 týdnů pomocí diety s vysokým podílem sacharózy (70 % kal). Vybrané pokusné skupině příjemců pak byl navíc přidáván do vysokosacharidové diety i TZD (pioglitazon 300 mg/kg diety) – stimulátor transkripčního faktoru PPAR gamma. Jako kontrolní skupina byla využita zvířata stejného věku bez dietní manipulace, zároveň se jednalo o donory epididymálního tuku. Zvířata byla chována za standardních podmínek s neomezeným přístupem k potravě a vodě a byla usmrcena pro účely transplantační studie ve věku 17 týdnů. Postupováno bylo v souladu se zákonem na ochranu zvířat a mezinárodně uznávanými ARRIVE guidelines (Kilkenny, Browne et al. 2010). Tento pokus byl schválený lokální Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat a Ministerstvem zdravotnictví, číslo pokusu NT13188.

Transluminální mechanické poranění stehenní tepny příjemců bylo provedeno pomocí již v minulosti popsané metody (Sata, Maejima et al. 2000). Operace byla prováděna za použití operačního mikroskopu (Leica M690). Anestezie zvířat byla provedena pentobarbitalem sodným (65 mg/kg, ip) a na pravé stehenní tepně bylo provedeno mechanické poranění za použití pružinového drátu (0,38mm, C-SF-15-15, COOK). Od arterie byl nejprve opatrně oddělen nerv. Přívod krve do stehenní tepny byl dočasně po dobu operace přerušen proximálně a distálně za použití hedvábné smyčky. Tepna byla pečlivě očištěna od okolní tkáně. Obnažená svalová větev arterie byla nastřižena mikrochirurgickými nůžkami. Cca 5 mm drátu bylo poté opatrně zasunuto do stehenní tepny směrem k arteria iliaca (viz. Obrázek

7). Drát byl ponechán v arterii po dobu 1 minuty, aby došlo k dilataci tepny. Drát byl následně z tepny odstraněn a svalová větev ligována. Průtok krve ve stehenní tepně byl obnoven uvolněním smyček. Kolem poraněné tepny bylo navíc při našich studiích transplantováno cca 0,3 g epididymálního tuku zvířete - donora z kontrolní skupiny. Zároveň byl na druhé - párové zadní končetině operovaných příjemců proveden kontrolní zákrok, kdy byla femorální artérie pouze očištěna od okolní tkáně bez poranění tepny drátem a transplantace epididymálního tuku. Příjemci byli usmrceni 4 týdny po provedení operačního výkonu ve věku 17 týdnů. Pokusy na zvířatech byly prováděny na dospělých samcích s velikostí jednotlivých skupin $n=8$ (viz. Tabulka 6). Pro morfometrické studie byly využity 5 μm řezy arterie barvené hematoxylin-eosinem a barvením sirius red s elastikou. Od každého operovaného zvířete byly hodnoceny 4 řezy za sebou z končetiny s transplantací a párové kontrolní končetiny bez provedené transplantace. Míra vaskulární remodelace byla hodnocena sledováním poměru tloušťky neointima/media. Digitalizované snímky byly hodnoceny s využitím softwaru Elipse (ViDiTo, Košice, Slovakia). Jako referenční standard (100 %) byl použit poměr tloušťky neointima/media na kontrolních končetinách příslušných skupin. Všichni potkani z našich skupin přežili danou operaci. Na žádné z intervenovaných tepen nebyla prokázána trombóza.



Obrázek 7: drátek COOK 0,38mm zasunutý směrem do pánevní tepny

Výsledky

HHTg potkani po dietní intervenci vysokosacharidovou dietou a terapií TZD zvýšily svoji hmotnost oproti skupině HHTg potkanů s vysokosacharidovou dietou ($p < 0,05$). Hladina plazmatické glukózy byla po dietní intervenci u všech skupin stejná. Hladina celkového cholesterolu a triglyceridů v plazmě se u skupiny HHTg potkanů po vysokosacharidové dietě významně zvýšila (obě $p < 0,001$) oproti kontrolní skupině. Ve skupině HHTg potkanů, kterým byly zároveň podávány TZD se hladiny celkového cholesterolu a triglyceridů v plazmě významně snížily ($p < 0,01$; $p < 0,001$) oproti skupině potkanů s vysokosacharidovou dietou. Proti kontrolní skupině byla hladina celkového cholesterolu v plazmě také významně nižší ($p < 0,001$) a hladina triglyceridů skoro 5x nižší ($p < 0,001$). Hladina HDL cholesterolu byla ve skupině s TZD významně vyšší než v ostatních skupinách ($p < 0,001$) (viz. Tabulka 5).

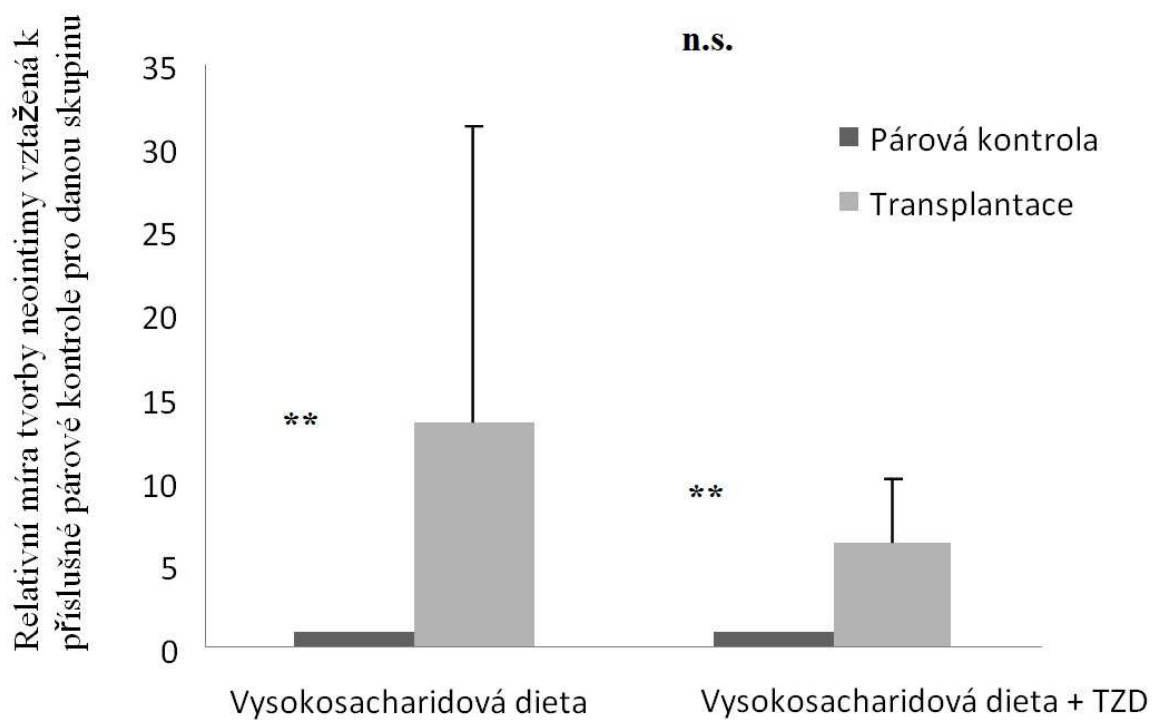
Neprokázali jsme původní předpoklad, že transplantace tuku od dárce z kontrolní skupiny zmírní míru vaskulární remodelace po poranění cévy ve skupině zvířat manipulovaných vysokosacharidovou dietou + TZD, v porovnání se skupinou zvířat manipulovaných pouze vysokosacharidovou dietou. Naše výsledky ukazují na zvýšenou tvorbu neointimy po transplantaci tuku dietně manipulovaných příjemců v porovnání s kontrolní párovou končetinou (viz. Obrázek 8). Otázkou je vhodnost použitého modelu HHTg potkana, který byl pro podobné studie použit poprvé.

Tabulka 5: Biochemické parametry zvířat

Významný rozdíl vs. kontrolní skupina: p=nevýznamné (n.s.); $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Významný rozdíl vs. skupina s vysokosacharidovou dietou: p=nevýznamné (n.s.); $p < 0,05$ (ϕ); $p < 0,01$ ($\phi \phi$); $p < 0,001$ ($\phi \phi \phi$)

Sledované parametry zvířat donorů	Kontrola (n=8)	Vysokosacharidová dieta (n=8)	p	Vysokosacharidová dieta + TZD (n=8)	p
Hmotnost (g)	387,63±35,9	376,75±31,63	n.s.	423,38±23,5	ϕ
Glukóza (mmol.l ⁻¹)	8,04±0,36	8,38±1,58	n.s.	7,85±0,9	n.s.
Celkový cholesterol (mmol.l ⁻¹)	2,01±0,23	3,53 ± 0,35	***	1,66±0,12	*** $\phi \phi$
TG (mmol.l ⁻¹)	11,22±1,65	18,62±0,53	***	2,26±0,54	*** $\phi \phi \phi$
HDL cholesterol (mmol.l ⁻¹)	0,13±0,03	0,17±0,07	***	0,85±0,10	*** $\phi \phi \phi$
LDL cholesterol (mmol.l ⁻¹)	neměřitelné	neměřitelné	n.s.	0,12±0,03	n.s.



Obrázek 8: Vliv intervence (vysokosacharidová dieta × vysokosacharidová dieta + TZD) na relativní míru tvorby neointimy na končetině po cévním traumatu; vztážené k párové kontrole (druhostranná končetina)

N.s.: rozdíl v relativní míře tvorby neointimy bez statistické významnosti mezi HHTg potkany s vysokosacharidovou dietou a vysokosacharidovou dietou + TZD

****** ($p < 0,01$): rozdíl v relativní míře tvorby neointimy u transplantovaných příjemců × párové kontrole

8. Závěry

Přispěli jsme k detailnímu poznání fenotypu prozánětlivých M1 a protizánětlivých makrofágů M2 v lidské tukové tkáni. Zcela nově byl popsán význam markeru CD36 v rámci analýzy makrofágů tukové tkáně. Byl prokázán vztah mezi metabolicky aktivovanými makrofágy s vysokou expresí CD36 a sledovanými rizikovými prediktory CVD. Za velmi významný výsledek lze považovat vliv léčby statiny, neboť právě protizánětlivým účinkem statinů bývá vysvětlován jejich protektivní terapeutický účinek, který přesahuje jejich hypolipidemický význam.

Vyšší podíl prozánětlivých makrofágů ve viscerální tukové tkáni u postmenopauzálních žen může souviset se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem u žen po menopauze. Na základě našich výsledků usuzujeme, že prozánětlivé změny související s obezitou u metabolicky zdravých subjektů dominantně probíhají nejdříve v podkožní tukové tkáni. Nepotvrdili jsme naši hypotézu, že míra obezity u žijících dárců ledvin negativně ovlivňuje rozvoj časně funkce transplantované ledviny v prvním týdnu po transplantaci. Časný rozvoj funkce ledviny nesouvisel se zánětlivými parametry v plazmě a množstvím prozánětlivých makrofágů M1 v perivaskulárním tuku kolem renální artérie dárcovské ledviny.

U HHTg potkanů podávání thiazolidindionů snížilo hladinu celkového cholesterolu a triglyceridů v plazmě a zvýšilo významně hladinu HDL cholesterolu. Míra tvorby neointimy po vaskulárním infarktu nebyla podáváním thiazolidindionů ovlivněna. Výsledky intervenční studie zaměřené na studium vlivu PVT na patogenezi aterosklerózy s využitím modelu HHTg potkana nepotvrdily původní hypotézu o ochranné roli PPAR gamma signalizace při tvorbě neointimy po cévním poranění za podmínek ovlivněných metabolickým syndromem.

Většina publikovaných dat, která dokumentují souvislost mezi tukovou tkání a aterosklerózou je získávána z experimentálních studií na zvířecích modelech. V rámci programu transplantací ledvin od živých dárců je umožněno řešení projektů, které jsou zaměřeny na výzkum tukové tkáně a její roli v patogenezi aterosklerózy u lidí. V současné době umožňují kritéria pro darování ledviny i zařazení dárců s různě zastoupenými rizikovými parametry kardiovaskulárních onemocnění (mírná hypertenze, dyslipidémie a obezita). Tím tento soubor představuje ideální model pro studium patogenetických mechanismů, které se podílejí na rozvoji aterosklerózy. Prezentovaná práce je dílčím krokem v dlouhodobém projektu, který má za cíl nalezení dalších možných parametrů pro hodnocení rizika rozvoje aterosklerózy u žijících dárců. Jedná se hlavně o obézního darce, u kterého bychom před samotným odběrem ledviny vyšetřili podkožní tuk, a tím zjistili míru zastoupení prozánětlivých makrofágů. Výzkumný projekt má potenciál zvýšit bezpečnost žijícího dárcovství ledvin a současně může přispět k dalšímu pochopení mechanismů rozvoje aterosklerózy.

8. Použitá literatura

1. Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi and Y. Matsuzawa (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(1): 79-83.
2. Bai, Y. and Q. Sun (2015). "Macrophage recruitment in obese adipose tissue." *Obes Rev* **16**(2): 127-136.
3. Bays, H. E., C. M. Ballantyne, J. J. Kastelein, J. L. Isaacsohn, R. A. Braeckman and P. N. Soni (2011). "Eicosapentaenoic acid ethyl ester (AMR101) therapy in patients with very high triglyceride levels (from the Multi-center, placebo-controlled, Randomized, double-blIND, 12-week study with an open-label Extension [MARINE] trial)." *Am J Cardiol* **108**(5): 682-690.
4. Bourlier, V., A. Zakaroff-Girard, A. Miranville, S. De Barros, M. Maumus, C. Sengenès, J. Galitzky, M. Lafontan, F. Karpe, K. N. Frayn and A. Bouloumie (2008). "Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages." *Circulation* **117**(6): 806-815.
5. Castoldi, A., C. Naffah de Souza, N. O. Camara and P. M. Moraes-Vieira (2015). "The Macrophage Switch in Obesity Development." *Front Immunol* **6**: 637.
6. Cinti, S. (2002). "Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ." *J Endocrinol Invest* **25**(10): 823-835.
7. Duvnjak, L. and M. Duvnjak (2009). "The metabolic syndrome - an ongoing story." *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 7**: 19-24.
8. Espinoza, R., C. Gracida, J. Cancino and A. Ibarra (2006). "Effect of obese living donors on the outcome and metabolic features in recipients of kidney transplantation." *Transplant Proc* **38**(3): 888-889.
9. Frederiksen, L., T. L. Nielsen, K. Wraae, C. Hagen, J. Frystyk, A. Flyvbjerg, K. Brixen and M. Andersen (2009). "Subcutaneous rather than visceral adipose tissue is associated with adiponectin levels and insulin resistance in young men." *J Clin Endocrinol Metab* **94**(10): 4010-4015.
10. Gelber, R. P., T. Kurth, A. T. Kausz, J. E. Manson, J. E. Buring, A. S. Levey and J. M. Gaziano (2005). "Association between body mass index and CKD in apparently healthy men." *Am J Kidney Dis* **46**(5): 871-880.
11. Greif, M., A. Becker, F. von Ziegler, C. Leberherz, M. Lehrke, U. C. Broedl, J. Tittus, K. Parhofer, C. Becker, M. Reiser, A. Knez and A. W. Leber (2009). "Pericardial adipose tissue determined by dual source CT is a risk factor for coronary atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(5): 781-786.
12. Hitsumoto, T., M. Takahashi, T. Iizuka and K. Shirai (2007). "Relationship between metabolic syndrome and early stage coronary atherosclerosis." *J Atheroscler Thromb* **14**(6): 294-302.
13. Chagnac, A., T. Weinstein, M. Herman, J. Hirsh, U. Gafter and Y. Ori (2003). "The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity." *J Am Soc Nephrol* **14**(6): 1480-1486.
14. Chawla, A., K. D. Nguyen and Y. P. Goh (2011). "Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease." *Nat Rev Immunol* **11**(11): 738-749.
15. Chinetti-Gbaguidi, G., M. Baron, M. A. Bouhrel, J. Vanhoutte, C. Copin, Y. Sebti, B. Derudas, T. Mayi, G. Bories, A. Tailleux, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude and B. Staels (2011). "Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRalpha pathways." *Circ Res* **108**(8): 985-995.
16. Jeon, H. G., S. R. Lee, D. J. Joo, Y. T. Oh, M. S. Kim, Y. S. Kim, S. C. Yang and W. K. Han (2010). "Predictors of kidney volume change and delayed kidney function recovery after donor nephrectomy." *J Urol* **184**(3): 1057-1063.
17. Jiang, Y., M. Wang, K. Huang, Z. Zhang, N. Shao, Y. Zhang, W. Wang and S. Wang (2012). "Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1beta by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation." *Biochem Biophys Res Commun* **425**(2): 121-126.
18. Kalble, T., M. Lucan, G. Nicita, R. Sells, F. J. Burgos Revilla, M. Wiesel and U. European Association of (2005). "EAU guidelines on renal transplantation." *Eur Urol* **47**(2): 156-166.
19. Karastergiou, K. and V. Mohamed-Ali (2010). "The autocrine and paracrine roles of adipokines." *Mol Cell Endocrinol* **318**(1-2): 69-78.
20. Kasiske, B. L. (1998). "The evaluation of prospective renal transplant recipients and living donors." *Surg Clin North Am* **78**(1): 27-39.
21. Kasiske, B. L., M. Ravenscraft, E. L. Ramos, R. S. Gaston, M. J. Bia and G. M. Danovitch (1996). "The evaluation of living renal transplant donors: clinical practice guidelines. Ad Hoc Clinical Practice Guidelines Subcommittee of the Patient Care and Education Committee of the American Society of Transplant Physicians." *J Am Soc Nephrol* **7**(11): 2288-2313.

22. Kennedy, D. J., S. Kuchibhotla, K. M. Westfall, R. L. Silverstein, R. E. Morton and M. Febbraio (2011). "A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling." *Cardiovasc Res* **89**(3): 604-613.
23. Kilkenny C., W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson, D. G. Altman (2012). „Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research.“ *Osteoarthritis Cartilage* 2012 **20**(4): 256-60
24. Klimcakova, E., B. Roussel, Z. Kovacova, M. Kovacikova, M. Siklova-Vitkova, M. Combes, J. Hejnova, P.
25. Klimes I., A. Vrana, J. Kunes., E. Sebokova, Z. Dobesova, P. Stolba, J. Zicha (1995). „Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension.“ *Blood Press* 1995 **4**(3): 137-42
26. Decaunes, J. J. Maoret, T. Vedral, N. Viguerie, V. Bourlier, A. Bouloumie, V. Stich and D. Langin (2011). "Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat." *Diabetologia* **54**(4): 876-887.
27. Kovacikova, M., C. Sengenès, Z. Kovacova, M. Siklova-Vitkova, E. Klimcakova, J. Polak, L. Rossmeislova, M. Bajzova, J. Hejnova, Z. Hnevkovska, A. Bouloumie, D. Langin and V. Stich (2011). "Dietary intervention-induced weight loss decreases macrophage content in adipose tissue of obese women." *Int J Obes (Lond)* **35**(1): 91-98.
28. Kralova Lesna, I., R. Poledne, J. Froněk, A. Kralova, A. Sekerkova, F. Thieme and J. Pitha (2015). "Macrophage subsets in the adipose tissue could be modified by sex and the reproductive age of women." *Atherosclerosis* **241**(1): 255-258.
29. Kratz, M., B. R. Coats, K. B. Hisert, D. Hagman, V. Mutskov, E. Peris, K. Q. Schoenfeld, J. N. Kuzma, I. Larson, P. S. Billing, R. W. Landerholm, M. Crouthamel, D. Gozal, S. Hwang, P. K. Singh and L. Becker (2014). "Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages." *Cell Metab* **20**(4): 614-625.
30. Kraunsoe, R., R. Boushel, C. N. Hansen, P. Schjerling, K. Qvortrup, M. Stockel, K. J. Mikines and F. Dela (2010). "Mitochondrial respiration in subcutaneous and visceral adipose tissue from patients with morbid obesity." *J Physiol* **588**(Pt 12): 2023-2032.
31. Larter, C. Z., M. M. Yeh, W. G. Haigh, D. M. Van Rooyen, J. Brooling, D. Heydet, C. J. Nolan, N. C. Teoh and G. C. Farrell (2013). "Dietary modification dampens liver inflammation and fibrosis in obesity-related fatty liver disease." *Obesity (Silver Spring)* **21**(6): 1189-1199.
32. Lee, J. Y., L. Zhao and D. H. Hwang (2010). "Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids." *Nutr Rev* **68**(1): 38-61.
33. Lehman, S. J., J. M. Massaro, C. L. Schlett, C. J. O'Donnell, U. Hoffmann and C. S. Fox (2010). "Peri-aortic fat, cardiovascular disease risk factors, and aortic calcification: the Framingham Heart Study." *Atherosclerosis* **210**(2): 656-661.
34. Lentine, K. L., B. L. Kasiske, A. S. Levey, P. L. Adams, J. Alberu, M. A. Bakr, L. Gallon, C. A. Garvey, S. Guleria, P. K. Li, D. L. Segev, S. J. Taler, K. Tanabe, L. Wright, M. G. Zeier, M. Cheung and A. X. Garg (2017). "Summary of Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Care of Living Kidney Donors." *Transplantation* **101**(8): 1783-1792.
35. Matsuzawa, Y. (2006). "The metabolic syndrome and adipocytokines." *FEBS Lett* **580**(12): 2917-2921.
36. Moreno-Indias, I., W. Oliva-Olivera, A. Omiste, D. Castellano-Castillo, S. Lhamyani, A. Camargo and F. J. Tinahones (2016). "Adipose tissue infiltration in normal-weight subjects and its impact on metabolic function." *Transl Res* **172**: 6-17 e13.
37. Murray, J. E., N. L. Tilney and R. E. Wilson (1976). "Renal transplantation: a twenty-five year experience." *Ann Surg* **184**(5): 565-573.
38. Murray, P. J., 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 and T. A. Wynn (2014). "Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines." *Immunity* **41**(1): 14-20.
39. Ohashi, Y., G. Thomas, S. Nurko, B. Stephany, R. Fatica, A. Chiesa, A. D. Rule, T. Srinivas, J. D. Schold, S. D. Navaneethan and E. D. Poggio (2013). "Association of metabolic syndrome with kidney function and histology in living kidney donors." *Am J Transplant* **13**(9): 2342-2351.
40. Park, Y. M. (2014). "CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis." *Exp Mol Med* **46**: e99.
41. Qatanani, M. and M. A. Lazar (2007). "Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu." *Genes Dev* **21**(12): 1443-1455.

42. Reese, P. P., H. I. Feldman, D. A. Asch, A. Thomasson, J. Shults and R. D. Bloom (2009). "Short-term outcomes for obese live kidney donors and their recipients." Transplantation **88**(5): 662-671.
43. Ridker, P. M., E. Danielson, F. A. Fonseca, J. Genest, A. M. Gotto, Jr., J. J. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A. J. Lorenzatti, J. G. Macfadyen, B. G. Nordestgaard, J. Shepherd, J. T. Willerson, R. J. Glynn and J. T. S. Group (2009). "Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial." Lancet **373**(9670): 1175-1182.
44. Rose, S., E. Stansky, P. K. Dagur, L. Samsel, E. Weiner, A. Jahanshad, J. Doveikis, H. B. Naik, M. P. Playford, J. P. McCoy and N. N. Mehta (2014). "Characterization of immune cells in psoriatic adipose tissue." J Transl Med **12**: 258.
45. Rule, A. D., M. H. Semret, H. Amer, L. D. Cornell, S. J. Taler, J. C. Lieske, L. J. Melton, 3rd, M. D. Stegall, S. C. Textor, W. K. Kremers and L. O. Lerman (2011). "Association of kidney function and metabolic risk factors with density of glomeruli on renal biopsy samples from living donors." Mayo Clin Proc **86**(4): 282-290.
46. Sata M., Y. Maejima, F. Adachi, K. Fukino, A. Saiura, S. Sugiura, T. Aoyagi, Y. Imai, H. Kurihara, K. Kimura, M. Omata, M. Makuuchi, Y. Hirata, R. Nagai (2000). „A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia.“ J Mol Cell Cardiol 2000 **32**(11): 2097-104
47. Siasos, G., V. Tsigkou, E. Kokkou, E. Oikonomou, M. Vavuranakis, C. Vlachopoulos, A. Verveniotis, M. Limperi, V. Genimata, A. G. Papavassiliou, C. Stefanadis and D. Tousoulis (2014). "Smoking and atherosclerosis: mechanisms of disease and new therapeutic approaches." Curr Med Chem **21**(34): 3936-3948.
48. Soltis, E. E. and L. A. Cassis (1991). "Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness." Clin Exp Hypertens A **13**(2): 277-296.
49. Spoto, B., E. Di Betta, F. Mattace-Raso, E. Sijbrands, A. Vilarde, R. M. Parlongo, P. Pizzini, A. Pisano, W. Vermi, A. Testa, S. Cutrupi, G. D'Arrigo, S. Lonardi, G. Tripepi, G. Cancarini and C. Zoccali (2014). "Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity." Nutr Metab Cardiovasc Dis **24**(10): 1137-1143.
50. Surmi, B. K. and A. H. Hasty (2010). "The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue." Vascul Pharmacol **52**(1-2): 27-36.
51. Szasz, T. and R. C. Webb (2012). "Perivascular adipose tissue: more than just structural support." Clin Sci (Lond) **122**(1): 1-12.
52. Takaoka M., D. Nagata, S. Kihara, L. Shimomura, Y. Kimura, Y. Tabata, Y. Saito, R. Nagai, M. Sata (2009). „Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling.“ Circ Res 2009 **105**(9): 906-11
53. Teramoto, T., J. Sasaki, H. Ueshima, G. Egusa, M. Kinoshita, K. Shimamoto, H. Daida, S. Biro, K. Hirobe, T. Funahashi, K. Yokote and M. Yokode (2008). "Metabolic syndrome." J Atheroscler Thromb **15**(1): 1-5.
54. Thomas, G., A. R. Sehgal, S. R. Kashyap, T. R. Srinivas, J. P. Kirwan and S. D. Navaneethan (2011). "Metabolic syndrome and kidney disease: a systematic review and meta-analysis." Clin J Am Soc Nephrol **6**(10): 2364-2373.
55. Tran, K. V., O. Gealekman, A. Frontini, M. C. Zingaretti, M. Morroni, A. Giordano, A. Smorlesi, J. Perugini, R. De Matteis, A. Sbarbati, S. Corvera and S. Cinti (2012). "The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells." Cell Metab **15**(2): 222-229.
56. Trayhurn, P. (2005). "Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue." Endocrinology **146**(3): 1003-1005.
57. Vague, J. (1947). "[Not Available]." Presse Med **55**(30): 339.
58. Vrana A., L. Kazdova (1990). „The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia.“ Transplant Proc 1990 **22**(6): 2579
59. Wentworth, J. M., G. Naselli, W. A. Brown, L. Doyle, B. Phipson, G. K. Smyth, M. Wabitsch, P. E. O'Brien and L. C. Harrison (2010). "Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity." Diabetes **59**(7): 1648-1656.
60. Yudkin, J. S., E. E. Ringa and C. D. Stehouwer (2005). ""Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease." Lancet **365**(9473): 1817-1820.
61. Zeyda, M., D. Farmer, J. Todoric, O. Aszmann, M. Speiser, G. Gyori, G. J. Zlabinger and T. M. Stulnig (2007). "Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production." Int J Obes (Lond) **31**(9): 1420-1428.

9. Publikace autora

9.1 Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) publikace s impact factorem

- 1) **THIEME, F.**, JANOUŠEK, L., FRONĚK, J., KRÁLOVÁ, A., ČEJKOVÁ, S., KRÁLOVÁ LESNÁ, I., POLEDNE, R. The effect of ectopic fat on graft function after living kidney transplantation. *Physiological research*. 2015, **64**(Suppl. 3), S411-S417. ISSN 0862-8408. IF 1,643.
- 2) POLEDNE, R., MALÍNSKÁ, H., KUBÁTOVÁ, H., FRONĚK, J., **THIEME, F.**, KAUFEROVÁ, S., KRÁLOVÁ LESNÁ, I. Polarization of Macrophages in Human Adipose Tissue is Related to the Fatty Acid Spectrum in Membrane Phospholipids. *Nutrients*. 2020, **12**(1), art. no. 8. ISSN 2072-6643. IF 4,546
- 3) ČEJKOVÁ, S., KUBÁTOVÁ, H., **THIEME, F.**, JANOUŠEK, L., FRONĚK, J., POLEDNE, R., KRÁLOVÁ LESNÁ, I. The effect of cytokines produced by human adipose tissue on monocyte adhesion to the endothelium. *Cell adhesion and migration*. 2019, **13**(1), 293-302. ISSN 1933-6918. e-ISSN 1933-6926. IF 3,694.
- 4) KRÁLOVÁ LESNÁ, I., PETRAS, M., ČEJKOVÁ, S., KRÁLOVÁ, A., FRONĚK, J., JANOUŠEK, L., **THIEME, F.**, TYLL, T., POLEDNE, R. Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macrophage polarization: Is there a link?. *European journal of preventive cardiology*. 2018, **25**(3), 328-334. ISSN 2047-4873. IF 5,640.
- 5) KRÁLOVÁ LESNÁ, I., ČEJKOVÁ, S., KRÁLOVÁ, A., FRONĚK, J., PETRAS, M., SEKERKOVÁ, A., **THIEME, F.**, JANOUŠEK, L., POLEDNE, R. Human adipose tissue accumulation is associated with pro-inflammatory changes in subcutaneous rather than visceral adipose tissue. *Nutrition and diabetes [online]*. 2017, **7**(April), art. no. e264. ISSN 2044-4052. IF 2,742.
- 6) ČEJKOVÁ, S., KRÁLOVÁ LESNÁ, I., FRONĚK, J., JANOUŠEK, L., KRÁLOVÁ, A., ŽDYCHOVÁ, J., **THIEME, F.**, POLEDNE, R. Pro-inflammatory gene expression in adipose tissue of patients with atherosclerosis. *Physiological research*. 2017, **66**(4), 633-640. ISSN 0862-8408. IF 1,324.
- 7) KRÁLOVÁ LESNÁ, I., KRÁLOVÁ, A., ČEJKOVÁ, S., FRONĚK, J., PETRAS, M., SEKERKOVÁ, A., **THIEME, F.**, JANOUŠEK, L., POLEDNE, R. Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue. *Journal of translational medicine [online]*. 2016, **14**(July 2016), art. no. 208. ISSN 1479-5876. IF 3,786.
- 8) KRÁLOVÁ LESNÁ, I., POLEDNE, R., FRONĚK, J., KRÁLOVÁ, A., SEKERKOVÁ, A., **THIEME, F.**, PÍŤHA, J. Macrophage subsets in the adipose tissue could be modified by sex and the reproductive age of women. *Atherosclerosis*. 2015, **241**(1), 255-258. ISSN 0021-9150. e-ISSN 1879-1484. IF 3,942.
- 9) KRÁLOVÁ, A., KRÁLOVÁ LESNÁ, I., FRONĚK, J., ČEJKOVÁ, S., SEKERKOVÁ, A., JANOUŠEK, L., **THIEME, F.**, STRÍŽ, I., ŽDYCHOVÁ, J., POLEDNE, R. Macrophage phenotypes in the adipose tissue of postmenopausal women. *Physiological research*. 2015, **64**(Suppl. 3), S427-S433. ISSN 0862-8408. IF 1,643.

b) bez impact factoru

1) **THIEME, F.**, JANOUŠEK, L., KRÁLOVÁ, A., ČEJKOVÁ, S., KRÁLOVÁ LESNÁ, I., POLEDNE, R., FRONĚK, J. Odběr tukové tkáně při dárcovské nefrektomii; chirurgický model pro výzkum aterosklerózy. *Rozhledy v chirurgii*. 2019, 98(12), 476-480. ISSN 0035-9351.

9.2 Publikace in extenso, bez vztahu k tématu disertace

a) publikace s impact factorem

1) FEJFAROVÁ, V., PAVLU, J., BÉM, R., WOSKOVÁ, V., DUBSKÝ, M., NĚMCOVÁ, A., JIRKOVSKÁ, A., SIXTA, B., SUTORIS, K., **THIEME, F.**, ARMSTRONG, DG., VRÁTNÁ, E., HAZDROVÁ, J., LÁNSKÁ, V. The superiority of removable contact splints in the healing of diabetic foot during postoperative care. *Journal of diabetes research*. 2019, 2019(15 September), art. no. 5945839. ISSN 2314-6745. e-ISSN 2314-6753. IF 2,965.

2) SPACEK, M., MERICKA, P., JANOUŠEK, L., STADLER, P., ADAMEC, M., VLACHOVSKY, R., GUNKA, I., NAVRATIL, P., **THIEME, F.**, SPUNDA, R., BURKERT, J., STAFFA, R., NEMEC, P., LINDNER, J. Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. *Advances in clinical and experimental medicine*. 2019, 28(4), 529-534. ISSN 1899-5276. IF 1,514.

3) SPACEK, M., MERICKA, P., JANOUŠEK, L., STADLER, P., ADAMEC, M., VLACHOVSKY, R., GUNKA, I., NAVRATIL, P., **THIEME, F.**, MITAS, P., SPUNDA, R., SPATENKA, J., STAFFA, R., NEMEC, P., LINDNER, J. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell and tissue banking*. 2018, 19(3), 437-445. ISSN 1389-9333. e-ISSN 1573-6814. IF 1,939.

b) bez impact factoru

1) **THIEME, F.**, FRONĚK, J. Sharp liver excision under hepatic vascular exclusion in case of liver transplant for large polycystic disease. Case report of a new surgical technique. *International journal of surgery case reports [online]*. 2018, 44(January 8), 143-147. ISSN 2210-2612.

2) CHLUPÁČ, J., MARADA, T., **THIEME, F.**, MALÝ, Š., NOVOTNÝ, R., PANTOFLÍČEK, T., SUTORIS, K., VYŠOHLÍD, R., LIPÁR, K., JANOUŠEK, L., FRONĚK, J. Aorto-iliac endarterectomy: Old-fashioned or re-newed method?. *Rozhledy v chirurgii*. 2018, 97(11), 493-498. ISSN 0035-9351.