

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program

Studijní obor: Experimentální chirurgie



**MUDr. Filip Thieme**

**Název závěrečné práce**

Chirurgické modely studia proinflamačního vlivu tukové tkáně v rozvoji aterosklerózy

**Title**

Surgical models of the study of the pro-inflammatory effect of adipose tissue in the development of atherosclerosis

Typ závěrečné práce

**Disertační**

Školitel:

doc. MUDr. Jiří Froněk, Ph.D., FRSC

Konzultant

doc. MUDr. Libor Janoušek, Ph.D.

Klinika transplantační chirurgie, IKEM

Praha, 2021

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 30.3.2021

MUDr. Filip Thieme

Podpis:

Identifikační záznam:

Thieme, Filip. *Chirurgické modely studia proinflamačního vlivu tukové tkáně v rozvoji aterosklerózy [Surgical models of the study of the pro-inflammatory effect of adipose tissue in the development of atherosclerosis]*. Praha, 2021. Počet stran: 78, počet příloh: 6. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 1. LF UK 2021. Vedoucí závěrečné Školitel: doc. MUDr. Jiří Froněk, Ph.D., FRSC, Konzultant: doc. MUDr. Libor Janoušek, Ph.D., Klinika transplantační chirurgie, IKEM.

## **Abstrakt**

### **Úvod:**

Ateroskleróza je závažné systémové onemocnění. Chirurgie jako obor řeší především komplikace aterosklerózy. Chirurgický výkon může být i důvodem akcelerovaného rozvoje aterosklerózy. Příkladem je žijící dárce ledviny, zejména dárce splňující mezinárodně uznaná kritéria dárcovství, a současně trpící metabolickým syndromem. Snaha o zpřesnění některých vyšetření žijících dárců ledvin ve smyslu rizika rozvoje aterosklerózy je dlouhodobý projekt. 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, s vysokou expresí CD36, 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. 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<sup>high</sup> ( $p < 0,01$ ) 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. Hlavně pokud se jedná 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.

**Klíčová slova:** Ateroskleróza, tuková tkáň, transplantace ledviny od žijícího dárce, metabolický syndrom

## **Abstract**

### **Background:**

Atherosclerosis is a serious inflammatory systemic disease. Surgery mainly addresses its vascular complications. Conversely, surgery may also lead to the development and acceleration of atherosclerosis, e.g., in a living kidney donor. This would especially be the case in a donor who meets internationally recognized donation criteria but suffers from metabolic syndrome. The effort to refine assessments of living kidney donors in terms of eliminating the risk of developing atherosclerosis is a long-term project. Our aim is to determine risk factors for living kidney donors and to prevent long-term complications after donation. 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. The project may increase the safety of living kidney donation and contribute to the knowledge of cardiovascular disease development.

### **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 was 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 hypercholesterolaemia 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+CD36high ( $p < 0.01$ ).

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. We confirmed a negative correlation between recipient BMI and an average increase of GFR in the first seven days posttransplantation ( $p < 0.02$ ,  $r = -0.325$ ,  $N = 58$ ).

### **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.

**Key words:** atherosclerosis, human adipose tissue, living-donor kidney transplant, metabolic syndrome

## **Poděkování**

Poděkování patří školitelovi doc. MUDr. Jiřímu Froňkovi, Ph.D., FRSC za realizaci projektu a následné vedení školence.

Moje největší poděkování patří mé ženě Lence a synům Kubíkovi a Honzíkovi. Za jejich podporu a pomoc. Rád bych poděkoval svým kolegům a kolegyním, kteří se na realizaci spolupodíleli - MUDr. Ivana Králová Lesná, Ph.D., Prof. Ing. Rudolf Poledne, CSc., MUDr. Soňa Čejková, Ph.D., MUDr. Jana Ždychová, Ph.D.

Poděkování patří také MUDr. Jaroslavi Chlupáčovi, Ph.D., který byl nedílnou součástí vývoje této dizertační práce



## **Obsah:**

<b>ABSTRAKT A KLÍČOVÁ SLOVA</b>	4
<b>ABSTRACT AND KEY WORDS</b>	6
<b>I. ÚVOD DO DISERTAČNÍ PRÁCE A PŘEHLED LITERATURY K JEJÍ PROBLEMATICE</b>	
<b>1. Ateroskleróza</b>	11
1.1. Klasifikace aterosklerózy dle morfoložického obrazu	12
1.2. Imunologické pozadí vzniku aterosklerózy	13
<b>2. Tuková tkáň</b>	13
2.1. Rozdělení tukové tkáně	14
2.2. Tuková tkáň jako imunitní orgán	15
2.3. Monocyty a makrofágy	15
2.4. Makrofágy CD36	16
<b>3. Transplantace ledviny</b>	16
3.1. Žijící dárce ledviny	17
3.2. Metabolický syndrom	17
3.3. Technika dárcovské nefrektomie	18
3.4. Současné kontraindikace dárcovské ledviny	19
3.5. Vliv nefrektomie na funkci ledvin u živých dárců	19
<b>4. Význam odběru tukové tkáně při dárcovské nefrektomii</b>	19
<b>5. Metodika odběru tukové tkáně</b>	20
5.1. Odběr tukové tkáně u živého dárce ledvin	21
5.2. Odběr tukové tkáně u pacienta s aterosklerózou	23
<b>II. VÝZKUM TUKOVÉ TKÁNĚ ŽIJÍCÍCH DÁRCŮ LEDVIN</b>	
<b>1. Hypotézy a cíle</b>	25
<b>2. Metodika</b>	27
<b>3. Výsledky</b>	29
3.1 Charakterizace a srovnání makrofágů izolovaných z lidské podkožní, viscerální a perivaskulární tukové tkáně	29
3.2 Zastoupení subpopulací makrofágů v lidské tukové tkáni je ovlivněné pohlavím a menopauzou u žen	32
3.3 Vztah proporce metabolicky aktivovaných makrofágů k prediktorům kardiovaskulárního rizika	34
3.4 Akumulace tukové tkáně zvyšuje v těle zastoupení prozánětlivých makrofágů v subkutánní tukové tkáni více než ve viscerální	36
3.5 Efekt ektopické tukové tkáně na funkci štěpu po transplantaci od žijícího dárce	38

### **III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - ÚLOHA PERIVASKULÁRNÍ TUKOVÉ TKÁNĚ PŘI VZNIKU ATEROSKLERÓZY; INTERVENČNÍ STUDIE S VYUŽITÍM ZVÍŘECÍHO MODELU**

<b>1.</b>	<b>Hypotézy a cíle</b>	50
<b>2.</b>	<b>Metodika</b>	50
<b>3.</b>	<b>Výsledky</b>	55
<b>4.</b>	<b>Diskuse</b>	42
<b>5.</b>	<b>Souhrn hlavních výsledků</b>	58
<b>6.</b>	<b>Závěry disertační práce</b>	59
<b>7.</b>	<b>Summary of main outcomes</b>	60
<b>8.</b>	<b>Conclusions</b>	61
<b>9.</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b>	62
<b>10.</b>	<b>Seznam příloh</b>	63
<b>11.</b>	<b>Publikační činnost autora</b>	64
<b>12.</b>	<b>Seznam použité literatury</b>	72

# I. ÚVOD DO DISERTAČNÍ PRÁCE A PŘEHLED LITERATURY K JEJÍ PROBLEMATICE

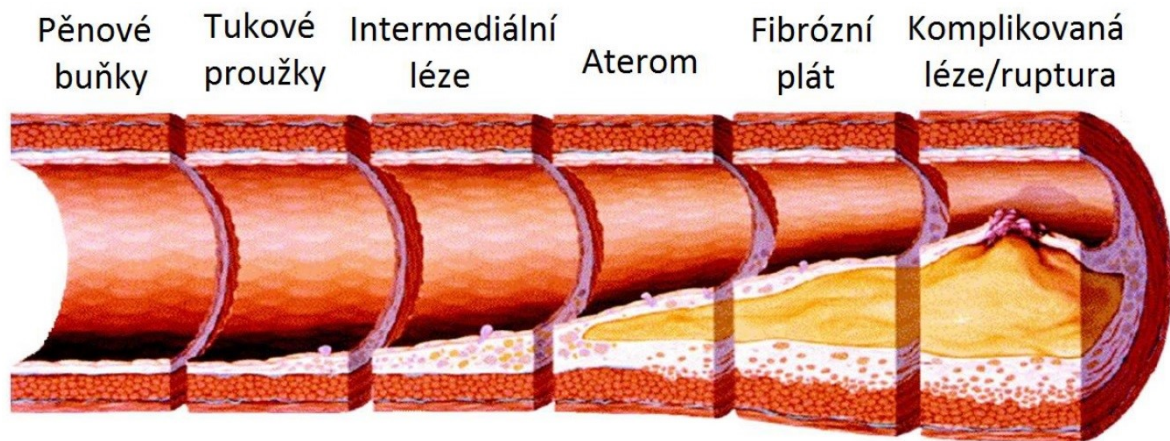
(Příloha 1)

## 1. Ateroskleróza

Aterosklerózu lze chápat jako degenerativní zánětlivé onemocnění cévní stěny. Je to dlouhotrvající proces, který je ovlivňován genetickým pozadím jedince a vlivy prostředí. Klinicky se manifestuje jako ischemické kardiovaskulární choroby (infarkt myokardu, cévní mozková příhoda a ischemická choroba dolních končetin), kterým je pro jejich vysokou prevalenci věnována velká pozornost na poli vědy. Jak přibývají vědecké znalosti, tak se i rozšiřuje seznam činitelů podílejících se na vzniku a progresi aterosklerózy (Kralova Lesna, Suchanek et al. 2013). Hlavními rizikovými faktory, které přispívají k rozvoji kardiovaskulárních chorob, jsou dyslipidémie, hypertenze, kouření a obezita. V současné době je ateroskleróza vnímána jako imunitně zánětlivý proces, který je odpovědí na poškození intimy (Jonasson, Holm et al. 1986). Příčiny poškození endotelu mohou nastat při změně z laminárního na turbulentní proudění, při vysokém tlaku, při působení prozánětlivých cytokinů, ale i při ischemii či reperfúzi. Dysfunkční endotel má v časně fázi aterogeneze vyšší propustnost pro aterogenní lipidy a makrofágy. Při zvýšené hladině low density lipoproteinu (LDL) částic v plazmě se zvyšuje jejich průnik endotelem a jejich vychytávání intimálními makrofágy a buňkami hladkých svalů cévní stěny. Současně se zvyšuje i množství oxidovaných LDL částic. Po překročení degradační kapacity těchto buněk se v nich lipidy hromadí zejména ve formě esterů cholesterolu a vznikají pěnové buňky. Ty jsou potom základem ateromové léze. Zároveň dochází k vystupňované expresi cytoadhezivních molekul, cytokinů a dalších mediátorů zánětu jak v makrofázích, tak v buňkách cévní stěny (Stary 1989, Ross 1999). Nakonec dochází k poruše zásobení tkání/orgánu při progresi aterosklerózy, která vede k postupnému zúžení až uzávěru zásobující artérie. Fyzikálně existují predisponující místa, kde dochází k narušení laminárního proudění – nejčastěji v tepenných odstupech a bifurkacích.

### 1.1. Klasifikace aterosklerózy dle morfologického obrazu

Aterosklerotické změny cévní stěny rozdělujeme podle histopatologického obrazu do šesti typů (Stary 1989). Typy I–II jsou označovány jako prekurzorové léze, léze III jako léze přechodová a typy IV–VI označujeme jako léze pokročilé (viz. Obrázek 1). Počáteční léze jsou první mikroskopicky identifikovatelnou akumulací lipidů s doprovodnou buněčnou reakcí v intimě arterií. Vyskytuje se již v dětském věku. Podle některých autorů difúzní ztlustění intimy předchází samotnou akumulaci lipidů (Nakashima, Wight et al. 2008). Pro stadium II jsou charakteristické „tukové proužky“, které jsou viditelné pouhým okem a jsou tvořeny lokálním nahromaděním monocytů, makrofágů a pěnových buněk v intimě cévní stěny (Stary, Chandler et al. 1994). Elektronomikroskopicky je patrna akumulace lipidů, makrofágů a pěnových buněk, ojediněle jsou přítomny i buňky hladkého svalstva s kapénkami lipidů. Fáze III je označována jako preaterom a je charakterizována velkou akumulací lipidů, především v extracelulárním prostoru. Buňky hladkého svalstva migrují do intimální vrstvy cévní stěny. Pokročilé aterosklerotické léze zahrnují aterom (léze IV) a fibroaterom (léze V). U ateromu nacházíme makroskopicky lipidové jádro plátu. Z buněk jsou zastoupeny makrofágy a velká je invaze buněk hladkého svalstva, z nichž se podobně jako makrofágy tvoří pěnové buňky. Ve fibroateromu (léze V) dochází k zmnožení fibrózní tkáně, která je tvořena zejména buňkami hladké svaloviny. Fibrózní tkáň tvoří takzvanou čepičku plátu. V periferii těchto lézí dochází snadno k disrupcím a vzniku komplikovaných lézí (léze VI) (Stary, Chandler et al. 1995).



Obrázek 1: Vývoj aterosklerotické léze

(Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture)

Koenig W, Khuseyinova N. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jan;27(1):15-26

## **1.2. Imunologické pozadí vzniku aterosklerózy**

Na rozvoji aterosklerotických procesů mají významný podíl imunologické mechanismy. Jako odpověď na hemodynamické poškození cévní stěny v nejmáhaných místech vzniká chronický zánětlivý proces stěny arterií. Na počátku rozvoje aterosklerózy stojí porušení cévní výstelky vedoucí k dysfunkci cévního endotelu s tvorbou cytokinů, adhezních molekul a růstových faktorů (Jonasson, Holm et al. 1986). Dochází k navázání cirkulujících monocytů na endotelové buňky a jejich průnik do subendotelového prostoru (Cejkova, Kralova Lesna et al. 2017). Aktivované endotelové buňky přitahují z krevní cirkulace do místa léze nejen monocyty, ale i T-lymfocyty (Geissmann, Auffray et al. 2008). Diferencující se monocyty v patogenezi aterosklerózy se uplatňují hlavně akumulací oxidovaných LDL částic a produkcí celé řady cytokinů (Galkina and Ley 2007). V aterosklerotickém plátu se vyskytují makrofágy. Jejich četnost pozitivně koreluje s pokročilostí aterosklerotické léze (Stoger, Gijbels et al. 2012). Jsou známy dva odlišné fenotypy makrofágů označované jako M1 (prozánětlivé) a M2 (protizánětlivé), které se diferencují na podkladě působení celé řady okolních signálů. Důležitý je jejich vzájemný poměr. Podle některých autorů M1 makrofágy převažují v symptomatických aterosklerotických placích, kdežto M2 makrofágy se vyskytují v placích, které jsou častěji asymptomatické (Cho, Miyoshi et al. 2013). Imunologické mechanismy vzniku a vývoje aterosklerózy jsou stále předmětem intenzivního výzkumu (Kralova, Kralova Lesna et al. 2014).

## **2. 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).

## 2.1 Rozdělení tukové tkáně

Lokalizace je hlavním kritériem pro dělení tukové tkáně. Rozlišujeme podkožní, viscerální a perivaskulární tukovou tkáň. Každou z těchto jednotek lze dále členit. Každá tuková tkáň pochází zřejmě z různých prekurzorů (Sanchez-Gurmaches and Guertin 2014). Recentní data potvrzují významnou roli viscerální tukové tkáně v riziku rozvoje metabolických komplikací obezity (Fox, Massaro et al. 2007). Ektopickou tukovou tkání označujeme patologické ukládání tuku do tkání, které primárně tuto funkci nemají. Jedná se o jaterní, svalovou nebo pankreatickou tkáň (Ferrara, Montecucco et al. 2019).

### 2.1.1 Podkožní tuk

Podkožní tuk (*subcutaneous adipose tissue - SCAT*) tvoří cca 80% všech tukových tkání v těle (Reddy, Lent-Schochet et al. 2019). SCAT tedy představuje fyziologický pufr pro nadměrný příjem energie v době omezených výdajů na energii a působí jako metabolický "dřez" pro přebytečné ukládání lipidů (Freedland 2004). Při překročení této skladovací kapacity se tuk začne hromadit ektopicky v oblastech mimo podkoží. Kromě toho SCAT funguje jako izolátor, aby se zabránilo tepelným ztrátám, jako bariéra proti dermální infekci a jako ochranný polštář proti fyzickému vnějšmu stresu. Distribuce SCAT má silnou dědičnou složku (Baker, Gaukrodger et al. 2005).

### 2.1.2 Viscerální tuk

Viscerální tuková tkáň (*visceral adipose tissue - VAT*) zahrnuje omentální, retroperitoneální, perirenální a epikardiální tuk. Štíhlí, zdraví jedinci nemají velké množství viscerálního tuku, který do značné míry spadá do kategorie ektopického tuku. Viscerální tuk je vysoce metabolicky aktivní a neustále uvolňuje volné mastné kyseliny do oběhu. Jako takový, viscerální obsah tuku přispívá k různým rysům metabolického syndromu, jako je hyperinsulinemie, systémový zánět, dyslipidémie a ateroskleróza (Bjorntorp 1990).

### 2.1.3 Perivaskulární tuková tkáň

Tuk, který obklopuje cévy, se nazývá perivaskulární tuk (*perivascular adipose tissue - PVAT*). PVAT produkuje mnoho bioaktivních molekul, které ovlivňují vaskulární reaktivitu, včetně adipokinů (např. leptin, adiponektin, omentin, visfatin, resistin, a apelin), cytokiny/chemokiny [např. interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)] a vasoaktivní molekuly (např. oxid dusnatý, prostacyclin a angiotensin II) (Qi, Qu et al. 2018). PVAT byl dlouho považován spíše jen za pasivní strukturální oporu cév. Řada výzkumných prací poukazuje na jeho významnou vasokrinní úlohu v regulaci průsvitu cév (Gao 2007, Gao, Lu et al. 2007).

## 2.2 Tuková tkáň jako imunitní orgán

Tuková tkáň obsahuje adipocitární buněčnou část s jejich prekurzory a dále neadipocytární buněčnou složku - stromální vaskulární frakci (SVF). SVF obsahuje fibroblasty, endoteliální, kmenové a nervové buňky. Dále obsahuje množství imunitních buněk vrozené i získané imunity. Společně udržují fyziologickou homeostázu tukové tkáně uvolňováním protizánětlivě působících cytokinů (IL-10 a transforming growth factor  $\beta$  - TGF- $\beta$ ). Existuje několik variant, které mohou zapříčinit rozvoj zánětu v tukové tkáni. Hypertrofie adipocytů může vést ke zvýšené sekreci prozánětlivých cytokinů. Dále dochází k polarizaci makrofágů k prozánětlivému typu, který má efekt na rozvoj inzulinové rezistence (Reilly and Saltiel 2017). Tyto a další procesy se spolupodílí na rozvoji proinflamačního stavu tukové tkáně spojené s její dysfunkcí (Mothe-Satney, Filloux et al. 2012).

## 2.3 Monocyty a makrofágy

Součástí vrozené imunity člověka jsou monocyty a makrofágy. 5-10 % buněk periferní krve je tvořena monocyty, které se při stimulaci přesouvají do tkání. V tkáních dochází k diferenciaci na makrofágy s morfologickou, fenotypovou i funkční změnou (van Furth, Cohn et al. 1972). Makrofágy se přizpůsobují dané situaci v tkáních, proto se dají definovat dva základní typy – M1 prozánětlivé a M2 protizánětlivé makrofágy. Tato výsledná polarizace makrofágů je spojena i s metabolickými změnami samotných buněk v daném prostředí (Van den Bossche and Saraber 2018). Průnikem monocytů do cévní stěny dochází k jejich příslušné polarizaci a následně sekreci velkého množství biologicky aktivních látek. Při zvýšené hladině LDL částic dochází k jejich zvýšenému vylučování v makrofázích cévní stěny. Důležité pro transport cholesterolu jsou tzv. scavengerové receptory, např. CD36 (cluster of differentiation 36) (Babaev, Gleaves et al. 2000). Pokud dojde k porušení intracelulární homeostázy cholesterolu,

akumulace lipidů má za následek tvorbu pěnových buněk (Rohatgi, Khera et al. 2014). Počet makrofágů v SVF nárůstá s obezitou a tvoří až 40 % buněk (Weisberg, McCann et al. 2003). Prozánětlivý stav v tukové tkáni vede k polarizaci makrofágů do stavu M1 a tvorbě řady cytokinů, které narušují samotné adipocyty. Díky tomu i u zdravých osob s nadváhou klesá citlivost k inzulinu (Ryden, Petrus et al. 2019).

## **2.4 Makrofágy CD36**

Expresi glykoproteinu CD36 byla popsána u trombocytů, adipocytů, myocytů a u částí endoteliálních a epiteliálních buněk (Febbraio, Hajjar et al. 2001). V prostředí s obsahem LDL částic byla prokázána zvýšená exprese CD36 na makrofázích. Dochází k vychytávání LDL částic makrofágy a postupnou změnou dochází k transformaci na pěnové buňky, tolik charakteristické pro aterosogenezi (Nozaki, Kashiwagi et al. 1995). Díky indukci prozánětlivých změn v makrofázích, dochází k polarizaci k M1 fenotypu (Chen, Yang et al. 2019). Pěnové buňky vznikají kromě makrofágů i z myocytů cévní stěny (Ricciarelli, Zingg et al. 2000). Bylo popsáno, že užívání statinů snižuje expresi CD36 a tím dochází ke snížení proaterogenních vlivů (Han, Zhou et al. 2004).

## **3. Transplantace ledviny**

Transplantace ledviny je nejvýhodnější a v současné době rutinní možností terapie chronického selhání ledvin. K transplantaci ledviny je indikován každý nemocný s chronickým selháním ledvin, který nemá žádnou kontraindikaci této léčby. Česká republika patří dlouhodobě k zemím, které jsou v počtu transplantací ledvin na předním místě v Evropě (Kuman 2015). Je to jednak díky transplantačnímu zákonu, který předpokládá souhlasné stanovisko zemřelého dárce k dárcovství, a hlavně díky zavedenému transplantačnímu programu transplantací od zemřelých dárců a v posledních letech i přibývajícimu počtu transplantací od žijících dárců. V západní Evropě včetně České republiky jsou nejčastějšími příčinami chronického selhání ledvin diabetická nefropatie, hypertenze a ischemická nefropatie. Dalšími důležitými příčinami jsou chronická glomerulonefritida, autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin a chronická intersticiální nefritida. Dialyzovaní pacienti s chronickým selháním ledvin mají velmi špatnou prognózu s přibližně 20 % roční mortalitou (Becker and Nissenson 2018). Transplantace ledviny představuje optimální léčbu pacientů s chronickým renálním selháním. Kvůli nedostatku zemřelých dárců se prodlužuje čekací doba a stoupá mortalita pacientů na čekací listině. Jedna z možností, jak zkrátit dobu čekání, je transplantace od žijícího dárce. Poprvé provedl transplantaci od žijícího dárce



Joseph Murray a jeho tým před 65-ti lety v Bostonu v roce 1954 (Murray and Barnes 1968). Během této doby se ukázalo, že 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). V IKEM se za rok 2018-2020 uskutečnilo 1280 orgánových transplantací. Z tohoto spektra bylo transplantováno 827 ledvin, 734 od zemřelých dárců a 93 od žijících dárců (www.ikem.cz 2020).

### **3.1. 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).

### **3.2 Metabolický syndrom jako kontraindikace pro dárce ledvin**

Metabolický syndrom je spojení 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 dárců 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 progresu chronické renální insuficience (Thomas, Sehgal et al. 2011). Zhodnocení biopsií parenchymu ledvin od živých dárců 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.

### 3.3 Technika dárcovské nefrektomie

Světovým trendem dárcovské nefrektomie je laparoskopický odběr, který může být transperitoneální nebo retroperitoneoskopický. Obě laparoskopické formy mohou být modifikovány ručně asistovanou technikou. Bylo prokázáno, že metoda HARS (hand-assisted-retroperitoneoscopic surgery) je metodou volby, vzhledem k nízkému riziku komplikací a současně kratším časem teplé ischemie štěpu, celkovým operačním časem, ale i délkou hospitalizačního pobytu (Ozdemir-van Brunschot, Koning et al. 2015, Widmer, Schlegel et al. 2018). HARS dárcovská nefrektomie je standardem i na naší klinice (Fronek, Chang et al. 2006, Wadstrom, Biglarnia et al. 2011). Vzhledem k nižší technické náročnosti se samotná transplantace ledviny provádí do pravé/levé jámy kyčelní – heterotopická pozice. U vybraných pacientů, kteří nejsou vhodnými kandidáty pro heterotopickou pozici; např. pro aterosklerotické postižení pánevních tepen, nevhodné pánevní žíly, vaskulární pánevní anomálie, kavální trombózu (Catala, Marti et al. 2010), je upřednostněna pozice ortotopická – „fyziologická“ – na původní místo po nefrektomii vlastní ledviny (Hevia, Gomez et al. 2015). U pacientů, kteří jsou indikováni k bilaterální nefrektomii v době transplantace, by měla být ortotopická pozice zvažována jako alternativa (Novotny, Marada et al. 2018).

Zkušenosti chirurga při dárcovské nefrektomii jsou nezbytné. Jedná se o precizní chirurgický výkon, který se provádí na zdravém pacientovi, kdy je nezbytné eliminovat jakékoliv komplikace (Helantera, Honkanen et al. 2017). Dle Evropské urologické asociace nejsou věkové hranice pro dárcovství ledvin v současnosti stanoveny, chybí doporučení pro maximální věk pro darování. Mladí dárci ve věku <18 let a ženy v reprodukčním věku nejsou indikováni k dárcovské nefrektomii, s výjimkou vzácných případů, kdy pro příjemce neexistují žádné další možnosti. Body mass index (BMI) > 35 kg/m<sup>2</sup> se považuje za relativní kontraindikaci pro živé dárce ledvin (Kalble, Lucan et al. 2005). S rozvojem zobrazovacích metod a jednotlivých laparoskopických technik nefrektomie jsou nyní indikovány i velmi složité cévně anatomické odchylky ledvin, které byly dříve kontraindikovány k samotnému odběru (Lentine, Kasiske et al. 2017), např. štěp ledviny se třemi renálními tepnami (Ahmadi, Lafranca et al. 2015). Vzhledem k relativně nižší technické náročnosti odběru při laparoskopické operaci se provádí přednostně levostranná nefrektomie. Pokud se vyskytuje stranová asymetrie v glomerulární filtraci nebo parenchymální, vaskulární či urologická abnormalita, která nevylučují dárcovství, je vždy indikována k odběru ledvina s abnormalitou (Lentine, Kasiske et al. 2017).

### **3.4 Současné kontraindikace dárcovství ledviny**

Diabetes mellitus, hypertenze a obezita představují obecné kontraindikace k darování, protože jsou spojeny s pooperačními komplikacemi, se zvýšeným rizikem vzniku a progresu kardiovaskulárních onemocnění a poruch renálních funkcí (Lentine, Kasiske et al. 2017). Pacienti s diabetem mellitem I. typu jsou kontraindikováni k odběru. Dárci s prediabetem nebo diabetem mellitem II. typu by měli být důkladně vyšetřeni a hodnoceni individuálně, nejedná se však o absolutní kontraindikaci k odběru.

Kandidáti s kontrolovanou a medikamentózně léčenou hypertenzí pod 140/90 mmHg s použitím jednoho nebo dvou antihypertenziv, bez orgánového poškození, mohou být akceptováni k dárcovství (Magden, Ucar et al. 2015). Dle Evropské urologické asociace, nekontrolovaná hypertenze je absolutní kontraindikací k odběru ledvin (Kalble, Lucan et al. 2005). Léčená dyslipidémie nepředstavuje kontraindikaci k odběru v závislosti na celkovém stavu dárce (Lentine, Kasiske et al. 2017). Tato jednotlivá kritéria jsou dále podrobena důkladnému výzkumu a postupně dochází k jejich rozšíření. Můžeme tedy říci, že obezita, léčená hypertenze či dyslipidémie v současné době nepředstavují absolutní kontraindikaci k dárcovské nefrektomii (Textor and Taler 2008).

### **3.5 Vliv nefrektomie na funkci ledvin u živých dárců ledvin**

Výsledky studií ukázaly, že přítomnost centrální obezity u živých dárců byla spojena s opožděným nástupem funkce ledviny po transplantaci (Yoon, Choi et al. 2015). V první dekádě po dárcovství se podle publikovaných studií neprokázalo u dárců ledvin zvýšené riziko kardiovaskulárních příhod a celkové mortality (<https://www.ikem.cz/cs/darcovstvi-organu/zivot-sup-2-sup/statistika-ikem/a-3129/>, Ross and Thistlethwaite 2009). Při delším sledování se ukazuje možnost zvýšeného rizika chronické renální insuficience u dárců ledvin (Muzaale, Massie et al. 2014). Jedním z důvodů může být vznik metabolického syndromu (Serrano, Sengupta et al. 2018) a urychlení aterosklerózy (Yildirim, Karahan et al. 2017).

## **4. Význam odběru tukové tkáně při dárcovské 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

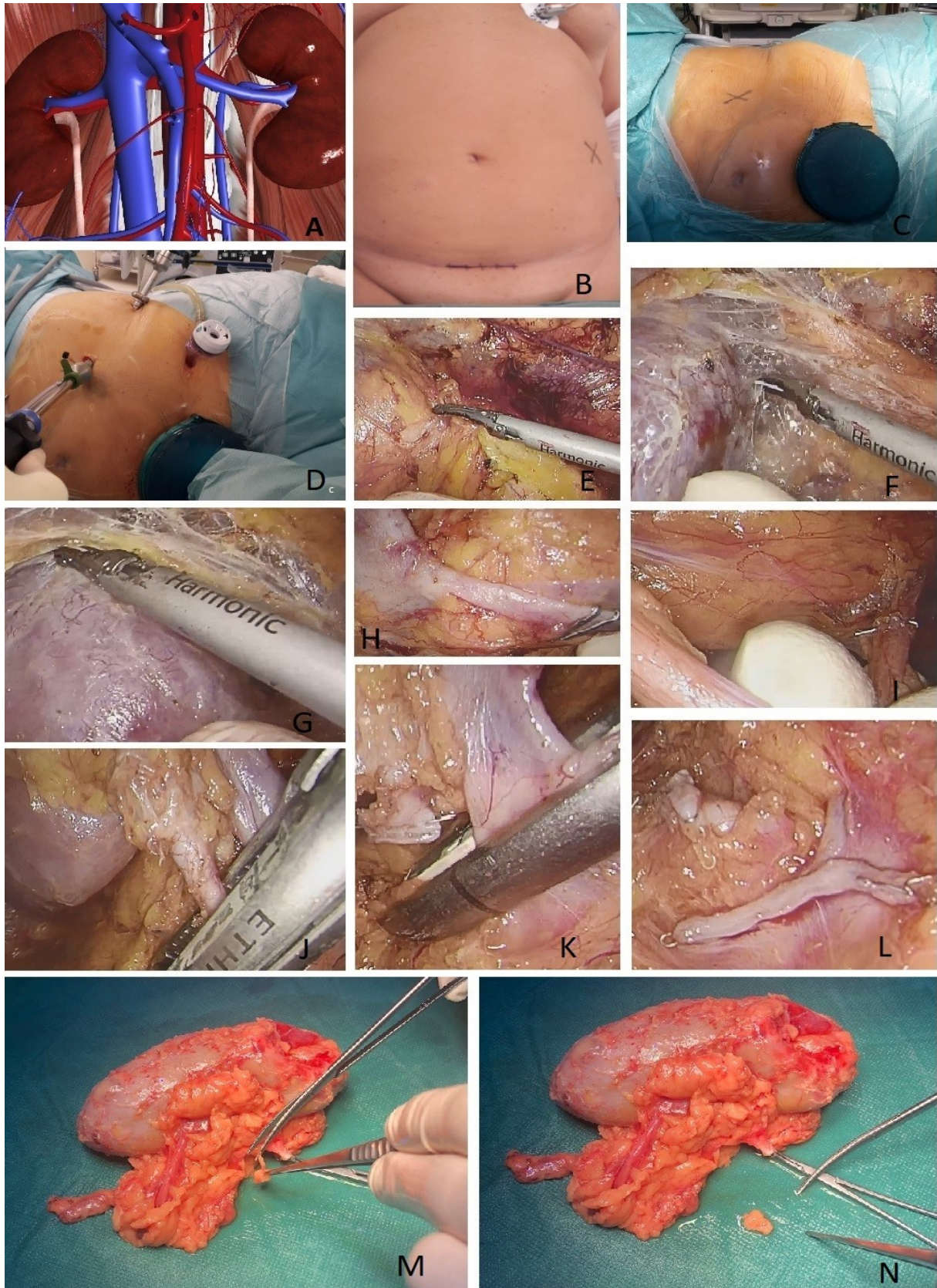
tkání, které mohou přímo ovlivnit aterogenní proces. Dále mohou nepřímo ovlivnit vlastnosti monocytů a jejich vliv na rozvoj aterogeneze (Bays, Ballantyne et al. 2011, Chinetti-Gbaguidi, Baron et al. 2011). Možnost přímého vlivu tukové perivaskulární tkáně a vztah k aterogenezi v přilehlé arterii byl 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- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , 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 vyšetřeni dárci ledvin s rizikovými faktory kardiovaskulárního onemocnění – obezita, hypertenze, dyslipidémie, kteří v rámci guidelines nebyli kontraindikováni.

## **5. 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. 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.

## **5.1 Odběr tukové tkáně u živého dárce ledvin**

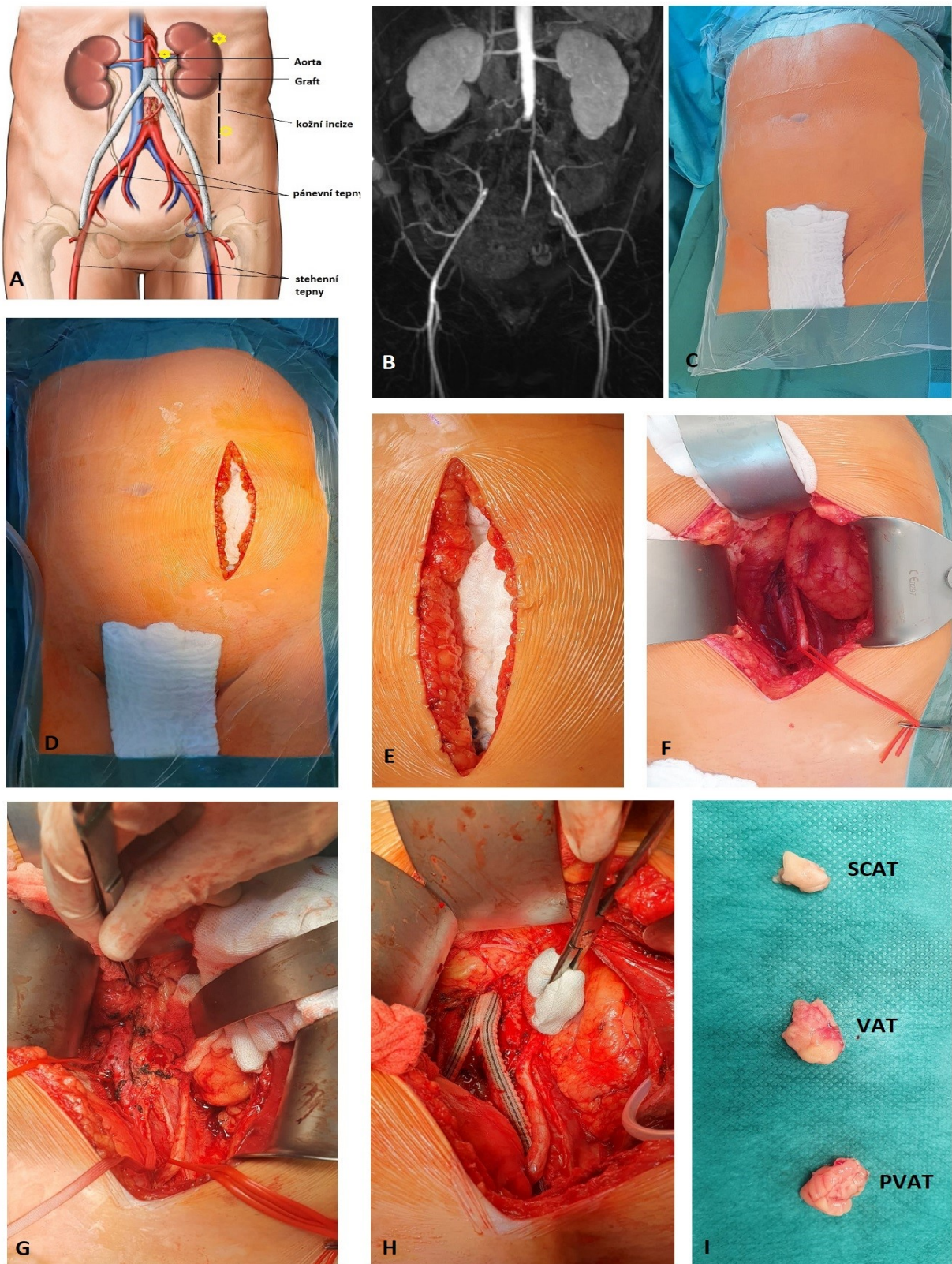
Před výkonem je pacient komplexně poučen o možnosti odběru tukové tkáně k výzkumným účelům. Pokud souhlasí s postupem, vše potvrdí svým podpisem na informovaném souhlase k odběru tukové tkáně. Výkon začíná vždy brzy ráno, aby tuková tkáň odešla co nejrychleji k dalšímu zpracování. Odebírají se 3 vzorky, každý o objemu cca 1 cm<sup>3</sup>. Po napolohování pacienta se začíná incizí nad sponou stydkou – Pfannenstielova incize (viz. Obrázek 2), kde se z podkoží odebere první vzorek tukové tkáně. Postupně se zavedou Gelpport + další pracovní porty. Dále následuje postupná preparace samotné ledviny, která se pomocí harmonického skalpelu odděluje od tukového pouzdra. Část tohoto pouzdra s tukovou tkání se odebere jako druhý vzorek. Nutná je selektivní preparace renální tepny a žíly. Poté následuje přerušení močovodu na úrovni křížení s ilickým svazkem, přerušení tepny a žíly mechanickým staplerem. Následuje vyjmutí ledviny z pacienta a proplach ledviny studeným perfúzním roztokem. Poté následuje odstřížení tuku podél renální arterie a odstřížení kousku samotné renální arterie se staplerem (viz. Obrázek 2). Všechny vzorky jsou odeslány v nativním stavu ve fyziologickém roztoku k dalšímu zpracování.



Obrázek 2: A – model ledvin a cévní anatomie, B – vedení řezu a strannový protokol, C – poloha pacienta s umístěným Gelportem, D – umístění trokarů a Gelportu, E – prnutí Gerotovy fascie, F + G – preparace ledviny, H – klipování ovarické žíly, I – klipování močového, J – přerušeni renální tepny, K – přerušeni renální žíly, L – cévní pedikly, M + N – odštížení PVAT

## **5.2 Odběr tukové tkáně u pacienta s aterosklerotickým postižením**

Stejně jako u dárce ledvin, tak i u pacienta s aterosklerotickým postižením je komplexně probrána problematika odběru tukové tkáně k vědeckým účelům. Podpisem informovaného souhlasu nám dává možnost tukovou tkáň odebrat. Vzorky tukové tkáně se odebírají u pacientů s aterosklerotickým postižením dolních končetin, kteří jsou indikováni k suprainquální cévní rekonstrukci – tzn. kdy jsou především postižené pánevní tepny, ale může to být i distální abdominální aorta. Výkony, které provádíme, jsou nejčastěji bypassové operace. Operace začínáme kožní incizí nejčastěji pararektálním řezem vlevo. V podkoží odebereme první vzorek tukové tkáně. Dále postupujeme extraperitoneálně, oddělujeme tukové pouzdro ledviny a samotnou ledvinu ponecháváme dorzálně. Zde přes Gerotovu fascii odebíráme druhý vzorek. Dále pokračujeme směrem k distální aortě, kterou si musíme vypreparovat k naší proximální anastomózy cévního graftu. Třetí vzorek tukové tkáně odebíráme těsně u odstupe renální arterie z aorty, nejčastěji zleva (viz. Obrázek 3). Všechny vzorky poté odesíláme nativně ve fyziologickém roztoku k dalšímu zpracování.



Obrázek 3: A – schéma anatomických poměrů, žlutě označena místa odběru tukové tkáně, B – předoperační angiografický obraz magnetické rezonance, C – poloha pacienta, D + E - pararektální řez, F – preparace v retroperitoneu (močovod, Gerotova fascie), G – aortální bifurkace, pinzeta ukazuje odstup levé renální tepny, H – suprainguinální rekonstrukce, I – vzorky tukových tkání



## II. VÝZKUMNÁ PRÁCE

Veškerá data prezentována v této práci jsou výsledkem spolupráce Kliniky transplantční chirurgie, Laboratoře pro výzkum aterosklerózy a Pracoviště laboratorních metod nemocnice IKEM Praha. V rámci našeho programu transplantací ledvin od živých dárců bylo umožněno řešení projektů, které byly zaměřeny na výzkum tukové tkáně a její roli v patogenezi aterosklerózy. Živí dárci ledvin představují soubor podrobně vyšetřených jedinců. 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 iniciální fáze aterosklerózy. Od jednoho pacienta se získá v jedné době tuková tkáň z odlišných tělesných kompartmentů, tj. SCAT, VAT a PVAT.

Disertační práce zahrnuje data z pěti publikovaných článků (Přílohy 2-6).

### 1. Hypotézy a cíle:

#### **Charakterizace a srovnání makrofágů izolovaných z lidské podkožní, viscerální a perivaskulární tukové tkáně (Příloha 2)**

**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 (Příloha 3)**

**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 (Příloha 4)**

**Hypotézy:** Výskyt kardiovaskulárních rizikových faktorů (mužské pohlaví, věk, BMI a hypercholesterolemie) 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 (Příloha 5)**

**Hypotézy:** Zvýšení stupně 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 (Příloha 6)**

**Hypotézy:** Míra obezity u žijících dárců ledvin bude negativně ovlivňovat rozvoj časně 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.

## 2. Metodika

### 2.1. Studijní soubor

Antropometrická, klinická a laboratorní data o dárcích a příjemcích byla získána z nemocniční databáze. Zařazení byli všichni dárči 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 <sup>2</sup> )	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 <sup>-1</sup> )	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 <sup>-1</sup> )	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 <sup>-1</sup> )	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 <sup>-1</sup> )	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 <sup>-1</sup> )	1,66 $\pm$ 2,90	1,18 $\pm$ 1,34	n.s.	1,61 $\pm$ 2,33	1,72 $\pm$ 3,67	n.s.

Transplantace u všech párů byla provedena standardní metodou HARS (hand-assisted-retroperitoneoscopic surgery), která je nyní na pracovišti metodou volby. Všichni příjemci byli léčeni podle zavedeného imunosupresivního protokolu bez známek časně rejekce. U žádného z příjemců jsme nesledovali opoždění v rozvoji funkce štěpu ledviny.

## 2.2. Analytické metody

Studijní odběry byly provedeny po 12-ti hodinovém lačnění na operačním sále bezprostředně před podáním anestézie. Cekový cholesterol, triglyceridy a HDL cholesterol byly stanoveny enzymatickou metodou, v případě HDL frakce po precipitaci apolipoprotein B obsahujících částí. High-senzitivity C-reactive protein (HsCRP) byl stanoven immunoturbidimetrickou metodou. Adiponectin byl analyzován pomocí Luminex Assay kit.

Vzorky tukové tkáně byly vždy odebrány po předchozím podepsání zvláštního informovaného souhlasu. Většina dárců ledvin je motivována samotným aktem dárcovství svému příbuznému, proto míra odmítnutí byla velmi nízká. Pro dárce ledviny nepředstavuje odběr tukové tkáně žádné komplikace. Program příbuzenské transplantace je vždy plánován v předstihu, což umožňuje zpracování vzorků během desítek minut po explantaci a tím využití průtokové cytometrie, která vyžaduje zpracování vzorků bezprostředně po odběru.

V rámci standardního operačního postupu byla odebrána viscerální (vně Gerotovy fascie) a perivaskulární (obklopující a. renalis) tuková tkáň. Subkutánní tuková tkáň byla odebrána z podkoží operační rány.

## 2.3. Průtoková cytometrie a sledované markery

Po očištění od makroskopických částí (krevní cévy a fibrózní tkáň) byla tuková tkáň nastříhána na 1 mm<sup>3</sup> díly. Díly tukové tkáně byly natráveny kolagenózou a došlo k separaci stromavaskulární frakce od adipocytů, dále k jejímu očištění centrifugací a filtrování. Po inkubaci s monoklonálními protilátkami jsme pro analýzu fenotypu buněk využili průtokovou cytometrii. Markery použité pro rozlišení jednotlivých subpopulací byly určeny na základě literárních dat. Markerem pro odlišení buněk monocyto-makrofágové řady byl zvolen CD14. Monocyty exprimující CD16, tj. nízkoafinní receptor pro imunoglobuliny byly opakovaně popsány jako prozánětlivé (Ziegler-Heitbrock 2007, Ulrich, Heine et al. 2008, Pamukcu, Lip et al. 2010). Jako další marker prozánětlivých makrofágů jsme na základě publikovaných dat zvolili CD36. V předešlé studii bylo potvrzeno, že kultivace makrofágů v prostředí bohatém na glukózu, palmitát a inzulín, vedla ke specifické polarizaci makrofágů se zvýšením exprese tohoto markeru (Kratz, Coats et al. 2014). Posledním analyzovaným markerem byl CD163, který má protizánětlivé vlastnosti a bývá často užíván k určení M2 makrofágů (Aron-Wisnewsky, Tordjman et al. 2009, Kovacikova, Sengenés et al. 2011).

### 3. Výsledky

#### **Charakterizace a srovnání makrofágů izolovaných z lidské podkožní, viscerální a perivaskulární tukové tkáně (Příloha 2)**

Celkem 52 žijících dárců ledvin (19 mužů a 33 žen, z toho 16 v premenopauzálním věku a 17 v postmenopauzálním věku) bylo zahrnuto do studie. Osm pacientů nesouhlasilo s odstraněním SCAT (pro který podepisovali zvláštní informovaný souhlas), a proto bylo analyzováno pouze 44 vzorků SCAT. Naše studijní skupina byla obecně zdravější než skupina odpovídajícího pohlaví a věku vybraná z velkého reprezentativního vzorku stejné populace (Cifkova, Skodova et al. 2010), a proto ji lze považovat za relativně zdravé jedince. V našem souboru pro dárcovství ledviny byla prevalence lehké hypertenze přibližně 20 %, nadváhy 36 %, obezity 13 % a kouření 33 %. Prevalence zvýšené koncentrace LDL (více než 3 mmol/l) byla 8 %, snížená koncentrace HDL (nižší než 1,0 mmol/l u mužů a 1,3 mmol/l u žen) byla 58 % a hypertriglyceridemie (více než 1,6 mmol/l) byla přítomna u 26 % dárců ledvin.

#### **Statistická analýza**

Naměřené hodnoty byly normálně rozloženy. Významnost rozdílů mezi nimi byla testována vhodným párovým nebo nepárovým t-testem. Všechny testy byly oboustranné a hladina významnosti byla stanovena na  $\leq 0,05$ . Statistické analýzy a korelace byly provedeny biostatistickým programem GraphPad Prism 5.

Muži i ženy byli věkově srovnatelní ( $45,09 \pm 8,98$  a  $46,60 \pm 11,53$  let) (viz. Tabulka 2). Průměrné BMI bylo u mužů  $26,94 \pm 3,74$  kg/m<sup>2</sup> a u žen  $25,17 \pm 3,48$  kg/m<sup>2</sup> ( $p = 0,05$ ); mezi ženami po menopauze a po ní také nebyl významný váhový rozdíl. Hladina celkového a non-HDL cholesterolu byly u mužů a u žen bez významného rozdílu. Ženy po menopauze měly vyšší hladinu celkového i non-HDL cholesterolu než ženy před menopauzou ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,02$ ). Muži měli nižší hladinu HDL cholesterolu než ženy ( $p < 0,01$ ). Mezi hladinami triglyceridů a CRP nebyl mezi skupinami rozdíl. Celkový počet makrofágů/gram se v jednotlivých typech tukové tkáně nelišil – SCAT, VAT and PVAT ( $10,900 \pm 12,250$ ,  $13,200 \pm 10,350$  a  $15,650 \pm 15,100$  makrofágů/g postupně). Makrofágy s pozitivitou CD16 byly více zastoupeny ve VAT v porovnání s SCAT ( $53,4 \pm 13,3$  % vs.  $48,9 \pm 14,3$  %;  $p < 0,02$ ). (viz. Tabulka 2). V případě přítomnosti CD16+ se u makrofágů vyskytoval i CD36+, a to buď v nižší nebo vyšší četnosti (CD36<sup>low</sup> a CD36<sup>high</sup>). Četnost makrofágů s CD16+CD36<sup>high</sup> byla

vyšší ve VAT a PVAT ( $39,4 \pm 13,4$  % a  $38,7 \pm 15,5$  %) než ve SCAT ( $32,7 \pm 13,7$  %,  $p < 0,02$  a  $p < 0,05$ , postupně); mezi VAT a PVAT jsme nesledovali žádný významný rozdíl.

Makrofágy CD16+CD36<sup>high</sup> se podle přítomnosti markeru CD163 v SCAT rozdělily rovnoměrně ( $19,9 \pm 9,5$  % CD163+ a  $14,3 \pm 8,0$  % CD163-), zatímco podíl makrofágů CD163+ v tukové tkáni VAT a PVAT byl výrazně nižší: ( $15,4 \pm 6,8$  % a  $25,5 \pm 11,8$  %) a ( $13,5 \pm 8,1$  % a  $29,2 \pm 12,6$  %). Rozdíl v zastoupení CD16+36<sup>high</sup> CD163- (tedy zánětlivých M1 makrofágů) ve SCAT oproti VAT a PVAT byl vysoce významný (pro obě  $p < 0,0001$ ).

Zastoupení makrofágů CD16+36<sup>low</sup> 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 CD16+36<sup>low</sup>CD163+ významně nižší ve VAT ( $p < 0,05$ ) a PVAT ( $p < 0,005$ ) ve srovnání se SCAT. Většina makrofágů CD16-CD36<sup>low</sup> byla zároveň i CD163+. Zastoupení makrofágů CD16-CD36<sup>low</sup> a CD16-CD36<sup>low</sup>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<sup>high</sup> a nakonec CD16+36<sup>high</sup> CD163-.

Po analýze dat jsme si všimli podstatných rozdílů mezi ženami po menopauze ( $n = 17$ ) a ženami ve věku před menopauzou ( $n = 16$ ). Hraniční věk pro menopauzu byl stanoven na 51 let a menopauza byla ověřena stanovením folikulostimulačního hormonu (FSH  $> 29$  IU/ml). U postmenopauzálních žen jsme zjistily významný rozdíl mezi SCAT a VAT ( $p < 0,005$ ) v zastoupení prozánětlivých makrofágů. Ve srovnání s ženami před menopauzou měly ženy po menopauze větší zastoupení CD16+ makrofágů ve VAT ( $59,0 \pm 12,0$  % vs.  $47,2 \pm 15,1$  %,  $p < 0,02$ ). U žen před menopauzou se zastoupení makrofágů CD16+36<sup>high</sup> v jednotlivých typech tukové tkáně nelišilo. V celé skupině žen jsme analyzovali méně makrofágů CD16+36<sup>high</sup> ve SCAT v porovnání s VAT a PVAT, ve skupině postmenopauzálních žen bylo srovnání ještě statisticky více významné ( $p < 0,005$  a  $p < 0,001$ , v tomto pořadí). Při hodnocení M1 makrofágů vyšlo najevo, že ačkoli bylo zastoupení subpopulace makrofágů CD16+36<sup>high</sup>CD163- nižší ve SCAT v porovnání s VAT a PVAT u obou skupin žen, u žen po menopauze byly rozdíly více markantní ( $p < 0,0005$ ). Navíc jenom v této skupině žen jsme prokázali statisticky významně nižší zastoupení CD16+36<sup>high</sup>CD163- makrofágů ve VAT oproti PVAT ( $p < 0,05$ ). Ve VAT měly postmenopauzální ženy více CD16+36<sup>high</sup>CD163- makrofágů

než ženy před menopauzou ( $p < 0,05$ ). V ostatních typech tukových tkání nebylo porovnání statisticky významné. Co se týká protizánětlivých typů makrofágů CD16-CD36<sup>low</sup>CD163+, ty byly u žen po menopauze více zastoupené ve SCAT oproti VAT. U žen před menopauzou nebyl však tento rozdíl statisticky významný.

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 (Příloha 3)**

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/m<sup>2</sup>. 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/m<sup>2</sup>. 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 nenašly 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 nepozorovali žádný významný rozdíl. Stejně tak i v renálním perivaskulárním tuku (s výjimkou celkového počtu CD14+ makrofágů). Makrofágy CD14+CD16- měli ve velké míře ( $96 \pm 4$  %) zastoupený i další protizánětlivý marker CD163+. Subpopulace protizánětlivých makrofágů CD14+CD16-CD163+ v perirenálním tuku byla vyšší ( $55 \pm 17$  % vs.  $37 \pm 9$  %;  $p < 0,01$ ) u žen v premenopauzálním věku než u žen v postmenopauzálním. Dále jsme zjišťovali zastoupení makrofágů v tukové tkáni v závislosti na věku (viz. Obrázek 4). Našli jsme silnou korelaci mezi poměrem makrofágů CD14+CD16+/CD14+CD16- v perirenální tukové tkáni a věkem v našem souboru žen (viz. Obrázek 4A), ale ne ve skupině mužů (viz. Obrázek 4B). Když jsme sledovali závislost tohoto poměru na věku žen, potvrdili jsme silnou korelaci ve skupině žen po menopauze (viz. Obrázek 4A). V celé studijní skupině jsme nenašli souvislost mezi celkovým počtem makrofágů v žádné z tukových tkání a věkem jedinců.



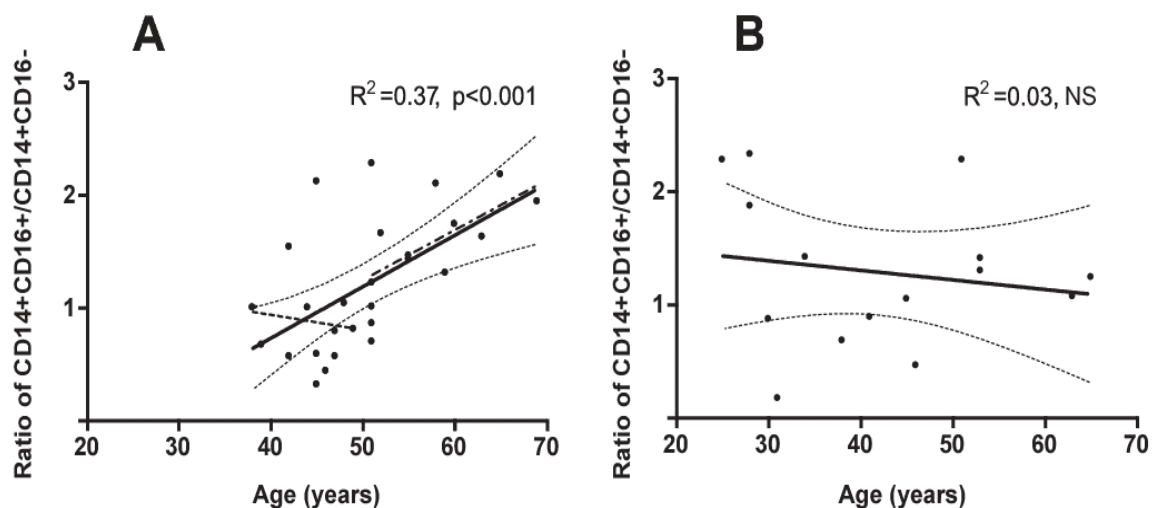
## Statistická analýza

Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnými odchylkami pro spojité veličiny a procenta se směrodatnými odchylkami pro diskrétní veličiny. Srovnání spojitých veličin mezi skupinami bylo provedeno nepárovým t-testem. Chí-kvadrát test byl použit pro kategoriální veličiny. Pro modelování vztahu mezi poměrem studovaných makrofágů a věkem byla použita lineární regrese. Co se týče rozdílu korelačních koeficientů, test rovnosti směrnice nebyl proveden z důvodu malého počtu účastníků. U všech testů byly hodnoty  $p \leq 0,05$  považovány za statisticky signifikantní.

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.



Obrázek 4: Korelace mezi poměrem makrofágů CD14+CD16+/CD14+CD16- a věkem v perirenální tukové tkáni. (A) Všechny ženy: souvislá čára (d), ( $R^2 = 0,37$ ,  $p < 0,001$ , zobrazeno); ženy v premenopauzálním věku,  $n = 14$ : čárkovaná čára (- - -), ( $R^2 = 0,01$ ,  $p = n.s.$ ) a ženy v postmenopauzálním věku,  $n = 14$ : čerchovaná čára (-.-), ( $R^2 = 0,29$ ,  $p < 0,05$ ). (B) Všichni muži:  $R^2 = 0,03$ ,  $p = n.s.$  (Kralova, Poledne et al. 2015)

## **Vztah proporce metabolicky aktivovaných makrofágů k prediktorům kardiovaskulárního rizika (Příloha 4)**

Do studie jsme zařadili celkem 79 pacientů (52 žijících dárců ledvin a 27 pacientů s ischemickou chorobou dolních končetin – peripheral arterial disease (PAD)). Celkem devět pacientů nesouhlasilo s odběrem podkožního tuku, proto bylo do analýzy zahrnuto jen 70 vzorků SCAT. Skupina pacientů s PAD měla celkově vyšší věk, více mužů, více kuřáků, hypertoniků a pacientů s hypercholesterolémií a s léčbou statiny. Ve skupině pacientů s PAD byla očekávaně nižší koncentrace HDL-cholesterolu a vyšší koncentrace vysoce senzitivního C-reaktivního proteinu (hsCRP). Na Obrázku 5 uvádíme dopad prediktorů kardiovaskulárního rizika, které měly statisticky významný vliv na hlavní podmnožiny makrofágů v tukových tkáních.

### **Statistická analýza**

Vzájemné rozdíly, adjustované na všechny předpokládané prediktory, byly získány z jednorozměrné a mnohorozměrné lineární regrese s Bayesovským odhadem podle Metropolis-Hastingova algoritmu, který umožňuje získat z malých souborů podobné závěry, jako kdyby soubory byly velké.

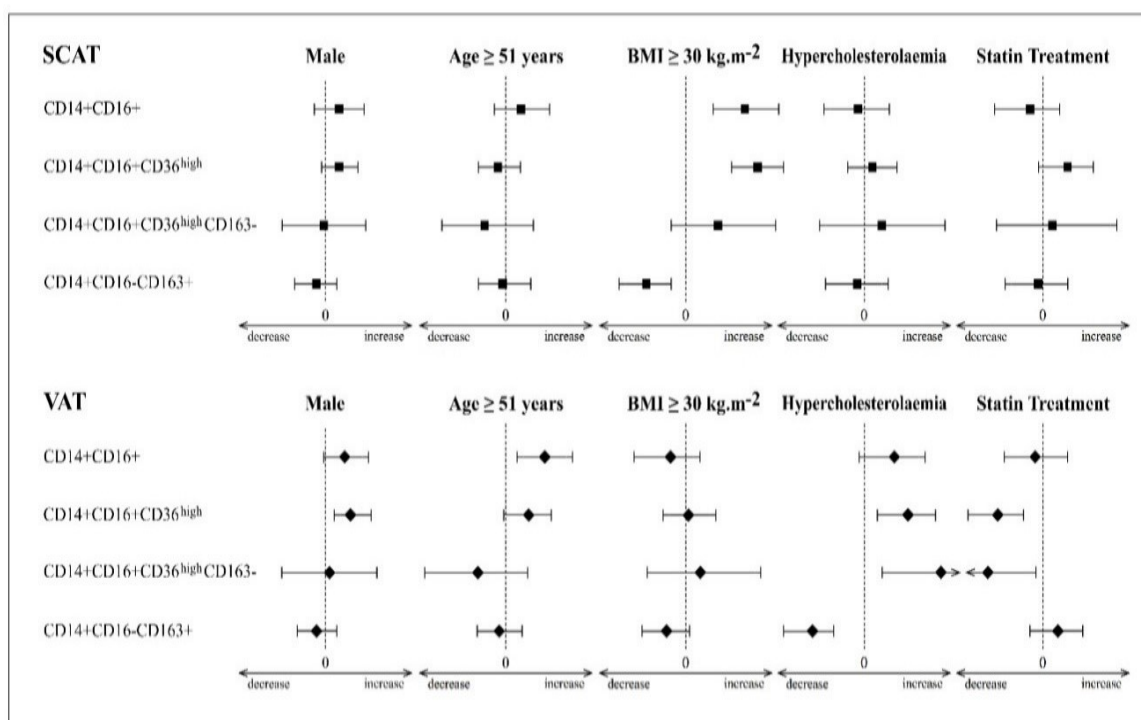
### **Subcutaneous adipose tissue - SCAT**

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/m<sup>2</sup>) 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 5) 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<sup>high</sup> i

CD14+CD16+CD36<sup>high</sup>CD163- (viz. Obrázek 5). Navíc měli jedinci s hypercholesterolémií 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 hypercholesterolémie významně zvyšovaly proporce metabolicky aktivovaných makrofágů (CD14+CD16+CD36<sup>high</sup>) ve SVF izolované z VAT, naopak pouze vysoký BMI (nad 30 kg/m<sup>2</sup>) zvyšoval proporce této subpopulace ve SCAT, vliv ostatních prediktorů CVD zjištěn nebyl.



Obrázek 5: 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 (Příloha 5)**

Celkem jsme analyzovaly 44 vzorků subkutánní SCAT a 52 vzorků viscerální VAT tukové tkáně. V současné době umožňují kritéria pro darování ledviny i zařazení dárců s různě zastoupenými rizikovými parametry kardiovaskulárních onemocnění (mírná hypertenze, dyslipidémie a obezita). Prevalence mírné hypertenze byla v našem souboru 20 %, nadváhy 36 % a obezity 13 %. Zvýšenou plazmatickou koncentraci LDL (více než 3 mmol/l) mělo 8 % jedinců, sníženou plazmatickou koncentraci HDL (méně než 1,0 mmol/l u mužů a méně než 1,3 mmol/l u žen) mělo 58 % jedinců a hypertriglyceridemií (více než 1,6 mmol/l) mělo 26 % jedinců. Celkový počet makrofágů na gram se mezi SCAT a VAT nelišil ( $10\,900 \pm 12\,250$  vs.  $13\,200 \pm 10\,350$ , postupně). Po rozdělení subpopulací makrofágů v tukové tkáni pomocí zvoleného markeru CD16, byla frakce CD16+ makrofágů významně vyšší ve VAT než ve SCAT ( $p < 0,05$ ). Na základě publikovaných dat (Bourlier, Zakaroff-Girard et al. 2008, Aron-Wisnewsky, Tordjman et al. 2009, Kovacikova, Sengenès et al. 2011, Kratz, Coats et al. 2014) a našeho předešlého výzkumu (Kralova Lesna, Poledne et al. 2015, Kralova Lesna, Kralova et al. 2016) jsme definovali vysoce prozánětlivé makrofágy v tukové tkáni, exprimující markery CD14+CD16+CD36<sup>high</sup>. V protikladu makrofágy, které mají marker CD16 negativní a CD163 pozitivní jsme označovali jako protizánětlivé (Stoger, Gijbels et al. 2012, Vogel, Glim et al. 2014).

### **Statistická analýza**

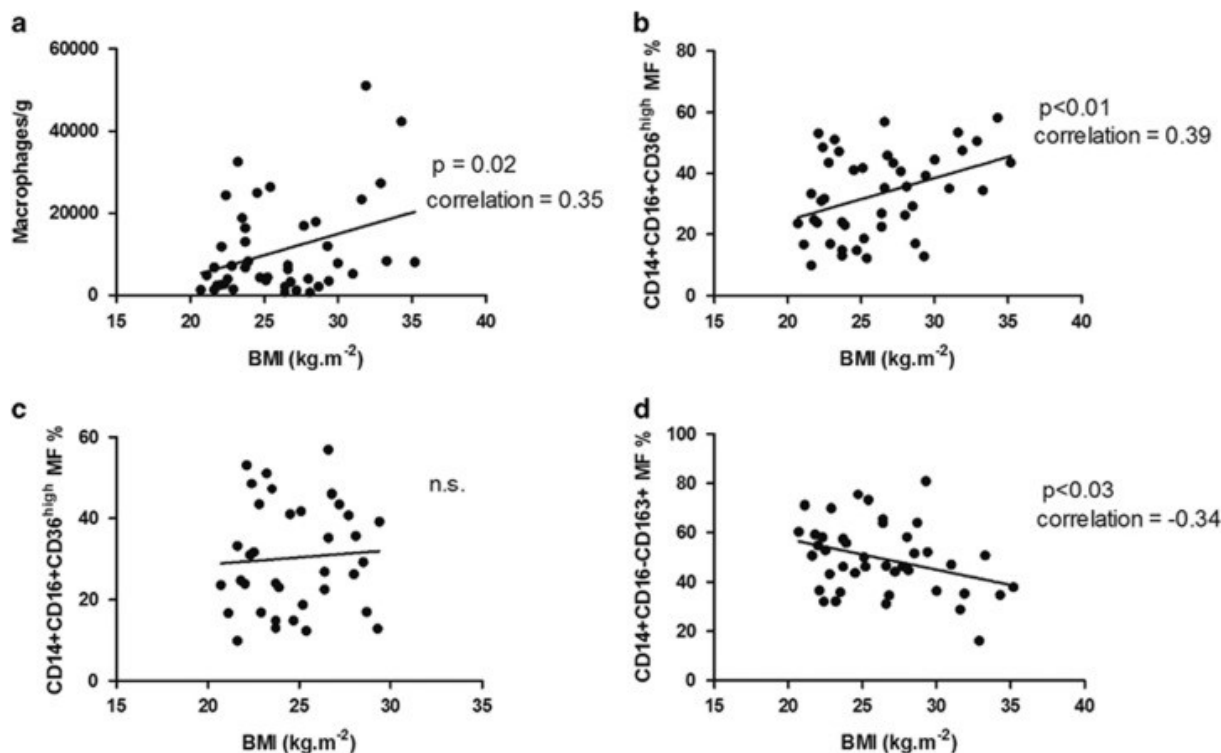
Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou pro spojité veličiny a procenta se směrodatnou odchylkou pro diskrétní veličiny. Srovnání spojitých veličin mezi skupinami byla provedena nepárovým t-testem. Pro modelování vztahu mezi poměrem makrofágů a BMI byla použita lineární regrese. U všech testů byly hodnoty  $p \leq 0,05$  považovány za statisticky signifikantní.

Ve SCAT jsme pozorovali méně makrofágů s fenotypem CD14+CD16+CD36<sup>high</sup> 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 6a). Zastoupení prozánětlivých CD14+CD16+CD36<sup>high</sup> makrofágů také korelovalo s BMI všech účastníků studie ( $p < 0,01$ ) (viz. Obrázek 6b). 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 6c). Podobně i zastoupení protizánětlivých makrofágů (CD14+CD16-CD163+) korelovalo negativně s BMI v celé skupině jedinců ( $p < 0,03$ ) (viz. Obrázek 6d).

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.

<b>Charakteristika makrofágů izolovaných ze SCAT a VAT</b>			
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 <sup>high</sup> (%)	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 6: 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<sup>high</sup> 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 (Příloha 6)

### Srovnání populace živých dárců ledvin s obecnou českou populací

Do studie bylo zařazeno 58 párů pro transplantaci ledviny od žijícího dárce. Naši skupinu účastníků jsme porovnávali s kontrolní reprezentativní skupinou – 1 % vzorek české populace (od 25 do 64 let, n= 3612) vybraných v letech 2007/2008 (viz. Tabulka 5). Průměrný věk dárců byl  $46 \pm 10$  let ( $p=0,465$ ) a průměrný věk příjemců  $42 \pm 13$  let ( $p < 0,001$ ); ve srovnání s kontrolní skupinou – 1 % vzorek české populace  $47,1 \pm 11,4$  let. Průměrné BMI dárců bylo  $25,8 \pm 3,6$  kg/m<sup>2</sup> ( $p=0,006$ ) a BMI příjemců  $25,4 \pm 5,5$  kg/m<sup>2</sup>. Je zřejmé, že žijící dárce v naší skupině byli štíhlejší a celkově zdravější ve srovnání s kontrolní skupinou. Ačkoli prevalence nadváhy a obezity je v české populaci poměrně vysoká.

Hypertenze byla definována jako průměrný systolický tlak (SBP)  $\geq 140$  mmHg, a/nebo průměrný diastolický tlak (DPB)  $\geq 90$  mmHg, nebo současná léčba antihypertenzivy.

Hypertenze dárců ledvin byla přítomná u 18,9 %; 11/58; (p <0,001) a ve skupině příjemců byla více častá než u kontrolního vzorku populace: 81 %; 47/58; (p <0,001).

Dyslipidémie byla definována jako celkový cholesterol  $\geq 5$  mmol/l nebo HDL cholesterol < 1,1 mmol/l nebo současná léčba hypolipidemiky. Dyslipidémie u dárců ledvin byla přítomná u 10,3 %; 6/58; (p <0,001) a všichni byli léčeni statiny. Dyslipidémie u příjemců se vyskytovala u 38 %; 22/58; (p <0,001), a 15 z 22 příjemců bylo léčeno statiny.

Mezi dárci ledvin nebyl nikdo s diabetes mellitus 0 %; 0/58; (p=0,046). Diabetes mellitus je kontraindikací pro dárcovství ledviny. Prevalence diabetu u příjemců byla 18,9 %; 11/58; (p=0,006). Jeden byl léčený pouze dietou, jeden orálními antidiabetiky a 9 příjemců mělo inzulín.

Prevalence kouření se mezi dárci a příjemci nelišila – 34,5 %; 20/58; (p=0,001), ale byla vyšší než u kontrolního vzorku populace.

### **Vliv sledovaných parametrů dárců na časný rozvoj funkce transplantované ledviny**

Data o dárcích a analýzy přežití štěpu byly analyzovány Spearmanovou metodou. Kvalitativní veličiny byly uvedeny jako počty pacientů a procenta, které byly porovnány chí-kvadrát testy, p hodnoty menší než 0,05 byly považovány za signifikantní.

Střední plazmatická hodnota CRP byla 0,68 mg/l (max: 8,66 mg/l, min: 0,33 mg/l). Průměrný počet M1 makrofágů (CD14+CD16+) ve gramu PVAT byl 5940 (max: 41 100, min: 248). Střední plazmatická hodnota adiponektinu byla 411 930 pg/ml (max: 14 217 000, min: 167 300) v plazmě.

Časný rozvoj funkce štěpu měřený jako průměrný vzestup glomerulární filtrace (GFR) prvních sedm dní po transplantaci nekoreloval s BMI žijících dárců ledvin (viz. Obrázek 7).

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 adiponektinu (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 8).

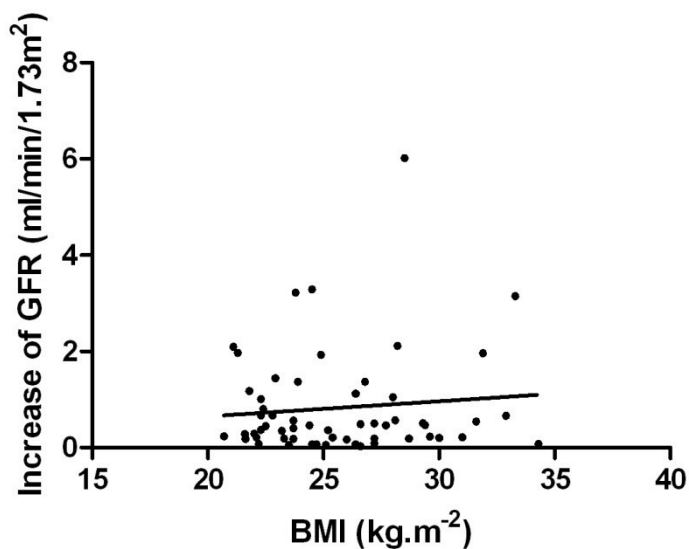
Potvrdili jsme negativní korelaci mezi plazmatickou hladinou adiponektinu a BMI žijících dárců ledvin (viz. Obrázek 9).

Tabulka 5: Srovnání charakteristik žijících dárců a příjemců ledvin s dobře definovanou kontrolní skupinou vybranou jako reprezentativní 1% vzorek české populace (Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. (Cifkova, Skodova et al. 2010)

\*  $p \leq 0,05$

Donor and recipient demographic data	Age (years)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Hypertension	Dyslipidaemia	Diabetes mellitus	Smoking
Czech population sample (n=3612)	47.1 ± 11.4	27.8 ± 5.5	43,50%	69,80%	8,00%	27,00%
Donors (n=58)	46 ± 10	25.8 ± 3.6 *	18.9% (11/58) *	10.3% (6/58) *	0% (0/58) *	34.5% (20/58) *
Recipients (n=58)	42 ± 13 *	25.4 ± 4.5 *	81% (47/58) *	38% (22/58) *	18.9% (11/58) *	34.5% (20/58) *

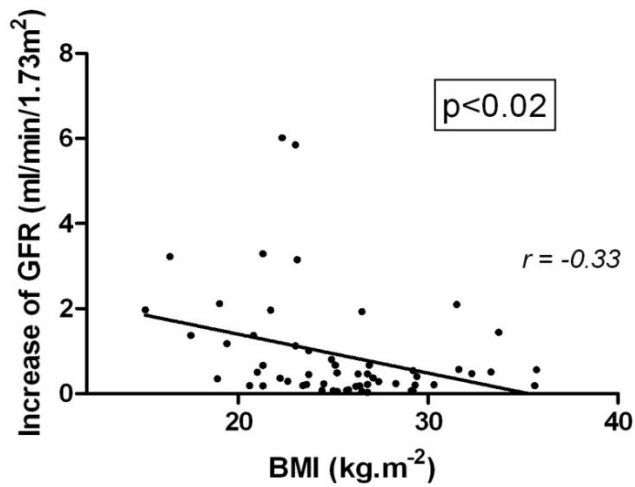
### Correlation of BMI of donors with the average GFR in recipients



Obrázek 7: Korelace mezi BMI žijících dárců ledvin s průměrnou GFR u příjemců

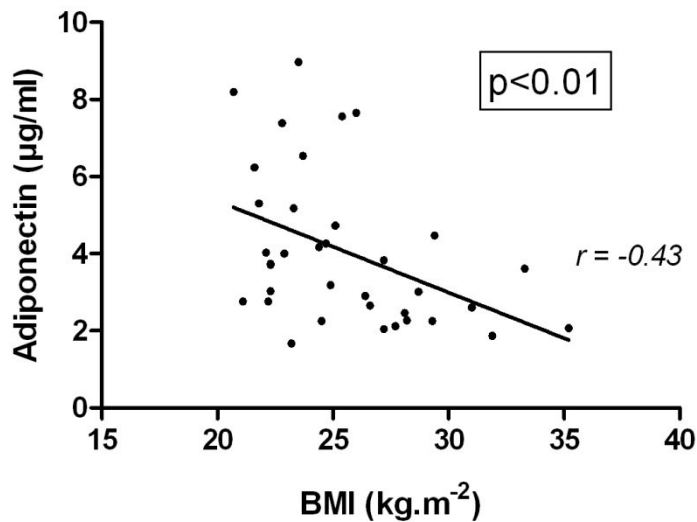


### Correlation of BMI of recipients with the average GFR in recipients



Obrázek 8: Korelace mezi BMI příjemců s průměrnou GFR u příjemců ( $p < 0,02$ ,  $r = -0,33$ ,  $n = 58$ )

### Correlation of BMI with adiponectin concentrations



Obrázek 9: Korelace mezi BMI a plazmatickou koncentrací adiponektinu žijících dárců ledvin ( $p < 0,01$ ,  $r = -0,43$ ,  $n = 58$ )

## 4. Diskuse

### **Charakterizace a srovnání makrofágů izolovaných z lidské podkožní, viscerální a perivaskulární tukové tkáně (Příloha 2)**

Povedlo se nám definovat subpopulace makrofágů v tukové tkáni pomocí zvolených znaků. Shodně ve všech typech tukové tkáně bylo možné rozdělit CD14+ pozitivní makrofágy na základě koexprese 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. Liší se i v distribuci markeru CD36. U makrofágů CD 16+ byla sledována podskupina s velkou intenzitou exprese markeru CD36 (CD36<sup>high</sup>). Na druhou stranu u CD16- makrofágů jsme pozitivitu CD36<sup>high</sup> nezachytili. Skupina makrofágů s nízkou expresí CD36 (CD36<sup>low</sup>) 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<sup>high</sup> subpopulaci byly identifikovány makrofágy neexprimující CD163 (jehož exprese je typická pro protizánětlivé M2 makrofágy).

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<sup>high</sup>) (39,4 a 38,7 % ve VAT, resp. PVAT, oproti 32,7 % ve SCAT).

Makrofágy s expresí markerů CD16+ CD36<sup>high</sup> 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, které 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.

Expresie glykoproteinů CD36 probíhá na monocytech/makrofázích, ale i na povrchu adipocytů a na ostatních buňkách. 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<sup>+</sup> a CD16<sup>-</sup> makrofágy výrazně liší. Předpokládáme, že rozdíly v expresi CD36 jasně potvrzují, že jsme použili vhodnou metodu k vymezení subpopulací makrofágů CD16<sup>+</sup> a CD16<sup>-</sup>.

Receptor CD163 je výhradně exprimovaný na povrchu monocytů/makrofágů. Jeho exprese na makrofázích v tukové tkáni se liší podle jejich lokalizace (viscerální vs. subkutánní) (Zeyda, Farmer et al. 2007, Aron-Wisnewsky, Tordjman et al. 2009). Po úbytku na váze se u mužů prokázala jeho zvýšená exprese na makrofázích v subkutánní tukové tkáni (Aron-Wisnewsky, Tordjman et al. 2009). Podle nové nomenklatury je marker CD163 kategorizován jako protizánětlivý marker M2 makrofágů (Murray, Allen et al. 2014). Prokázali jsme, že všechny makrofágy s CD16<sup>-</sup> byly i CD163<sup>+</sup> ve všech třech typech tukové tkáně. Proto věříme, že populace CD16<sup>-</sup> CD36<sup>low</sup> CD163<sup>+</sup> by měla odpovídat protizánětlivým makrofágům.

Naše skupina žijících dárců ledvin představuje zjevně zdravé jedince. Jejich BMI, prevalence hypertenze a dyslipoproteinémie byly o něco nižší ve srovnání s posledním populačním průzkumem reprezentativního českého populačního vzorku (post-MONICA z roku 2007) (Cifkova, Skodova et al. 2010). Kromě toho byly hladiny cholesterolu a non-HDL cholesterolu v naší skupině přibližně o 17 % nižší než u běžné populace. Kritéria pro vyloučení žijících dárců ledvin se nicméně 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 a 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 (Příloha 3)**

Dále jsme prokázali, že při srovnávání všech žen s muži neexistují v subpopulacích makrofágů v tukové tkáni významné rozdíly. Tyto rozdíly byly zjistitelné 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<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 (Příloha 4)

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<sup>high</sup>CD163+ a CD14+CD16+CD36<sup>low</sup>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<sup>low</sup>CD163+. Tyto údaje jsou obecně v souladu s naší analýzou makrofágů v tukové tkáni u zdravých jedinců; (Kralova Lesna, Poledne et al. 2015) zatímco u mužů nebyl zaznamenán žádný vliv věku, korelace byla prokázána u žen, zejména u žen po menopauze. 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. Lze jej sledovat také u prozánětlivé subpopulace, ale statistický význam byl zde pouze hraniční. Hypercholesterolemie měla zásadní vliv na zastoupení prozánětlivých makrofágů ve VAT. Subjekty s hypercholesterolemií 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. Mnoho studií prokázalo, že tuková tkáň není jen energetickým rezervoárem a endokrinním orgánem, ale hraje velmi

důležitou roli v imunitním systému. 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 ( $> 30 \text{ kg/m}^2$ ) u SCAT, ale žádný vliv ve VAT. I ostatní sledované kardiovaskulární rizikové faktory ovlivnily více zastoupení prozánětlivých makrofágů ve VAT (Fox, Massaro et al. 2007, Exley, Hand et al. 2014). 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 zprostředkován stavem zánětu tukové tkáně. Zdá se, že totéž platí pro hypertenzi. Existují určité limitace studie, které by měly být zmíněny. Nebyli jsme schopni rozlišit mezi účinky hypertenze a antihypertenzivní terapie, protože všichni hypertonici dostávali nějaký typ antihypertenzivní léčby. Zadruhé, na základě našich údajů jsme nebyli schopni prokázat kauzalitu asociace zdokumentované v naší analýze. Vzhledem k širokému spektru kombinací rizikových faktorů (zejména u pacientů s potvrzenou aterosklerózou) jsme nebyli schopni prokázat souvislost mezi rizikovými faktory CVD, léčbou statiny a subpopulacemi prozánětlivých a protizánětlivých makrofágů v tukové tkáni. Naše výsledky také naznačují ambivalenci přechodných subpopulací makrofágů. 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 (Příloha 5)**

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<sup>high</sup>), která pozitivně korelovala s BMI. Dále jsme zjistili negativní korelaci mezi protizánětlivými makrofágy (CD14+CD16-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, Sengenes 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/m<sup>2</sup>) uvedené korelace vymizely. Je zajímavé, že své volná 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<sup>high</sup> 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, inzulinu a palmitátu (Bai and Sun 2015). To může přispívat k inzulinové 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 (Příloha 6)**

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 až body mass index (BMI) > 35 kg/m<sup>2</sup> 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/m<sup>2</sup> (Armstrong 2005). 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 rejekce 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/m<sup>2</sup>. 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 (PVT) při cévním poranění. Tato studie prokázala ochrannou funkci PVT při cévním poranění za bazálních podmínek a vliv dysfunkce PVT vyvolané krátkodobým podáváním vysokotukové diety projevující se zvýšenou tvorbou neointimy po operačním zákroku. Thiazolidindiony (TZDs) jsou známé insulin-senzitizující léky, aktivátory PPAR gama signalizace, snižující glykémii a pozitivně ovlivňující i další složky metabolického syndromu. Pozitivní vliv podávání TZDs snižující riziko vzniku aterosklerózy a restenózy byl prokázán například ve studiích (Choi et al. 2004, Chen et al. 2001, Subramanin et al. 2010). 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.

##### **Cíle projektu**

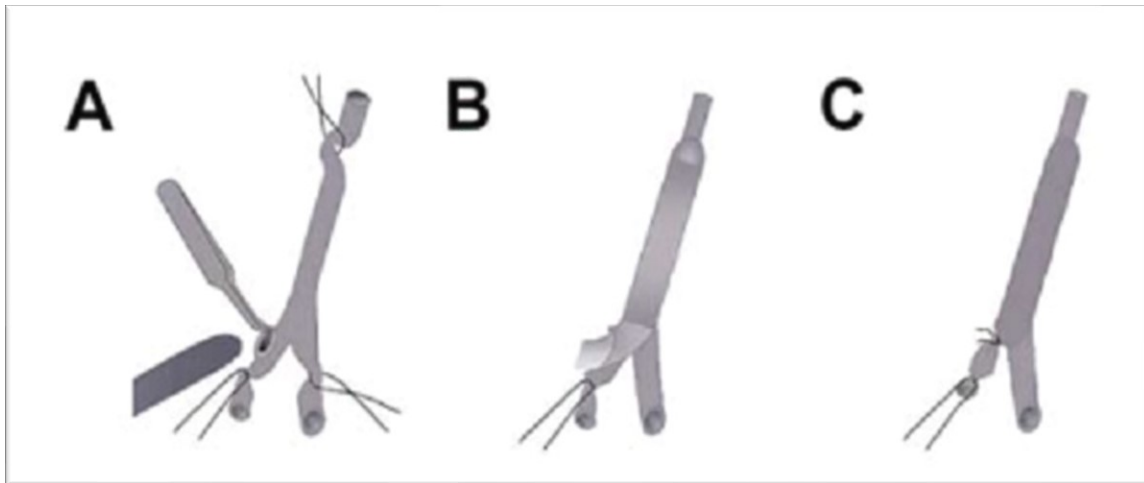
Provádět intervenční studie s využitím zvířecího modelu zaměřené na výzkum úlohy PVT při patogenezi aterosklerózy. Osvojení a zdokonalení mikro-chirurgické práce za použití mikroskopu a mikro-chirurgických nástrojů.

##### **Metodika**

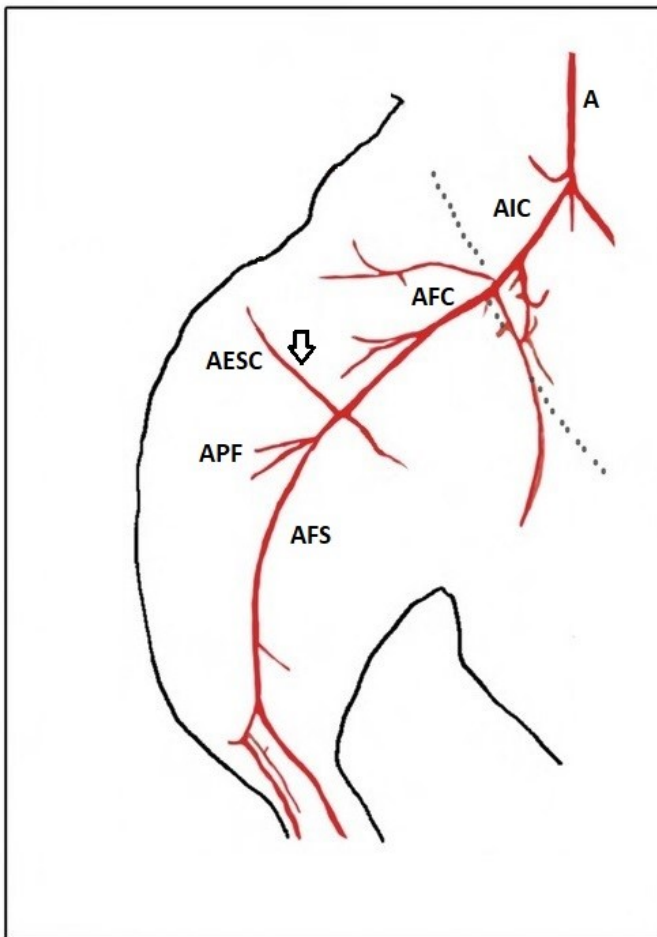
Jako zvířecí model jsme zvolili HHTg potkana – potkan s hereditární hypertriglyceridémií a inzulinovou rezistencí (Vrana, Kazdova et al. 1990). Fenotyp metabolického syndromu se u těchto zvířat projevuje i bez nutričních stimulů, avšak vysokosacharidová dieta tyto příznaky dále umocňuje (Klimes, Vrana 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) (viz. Obrázek 10). Operace byla prováděna za použití operačního mikroskopu (Leica M690). Anestezie zvířat byla provedena pentobarbitalem sodným (65 mg/kg, ip) a na pravé stehenní tepně (viz. Obrázek 11) bylo provedeno mechanické poranění za použití pružinového drátu (0,38mm, C-SF-15-15, COOK) (viz. Obrázek 12). Od arterie byl nejprve opatrně oddělen nerv (viz. Obrázek 13B). Přívod krve do stehenní tepny byl dočasně po dobu operace přerušen proximálně a distálně za použití hedvábné smyčky (viz. Obrázek 13C a 13D). 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 13E). 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 (viz. Obrázek 13F). Kolem poraněné tepny bylo navíc při našich studiích transplantováno cca 0,3 g epididymálního tuku zvířete - donora z kontrolní skupiny (viz. Obrázek 14). Zároveň byl na druhé - párové zadní končetině operovaných příjemců proveden kontrolní zákrok, kdy byla femorální artérie pouze očištěna od okolní tkáně bez poraněné 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  $\mu$ m 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 10: A preparace stehenní tepny + větvi – k zástavě krevního průtoku byly použity hedvábné smyčky a distální ligace svalové větve, B drát 0,38mm zavedený minimálně 5 mm do stehenní tepny směrem k ilické tepně, C ligace proximální části svalové větve + obnova krevního průtoku (Sata, Maejima et al. 2000).

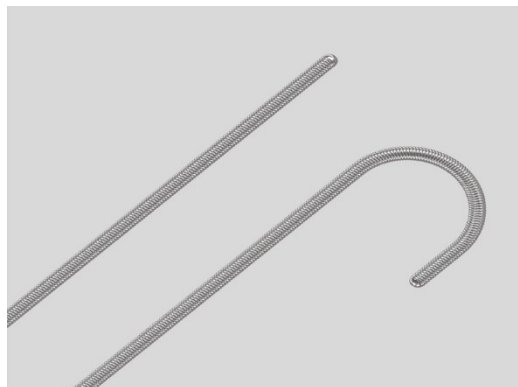


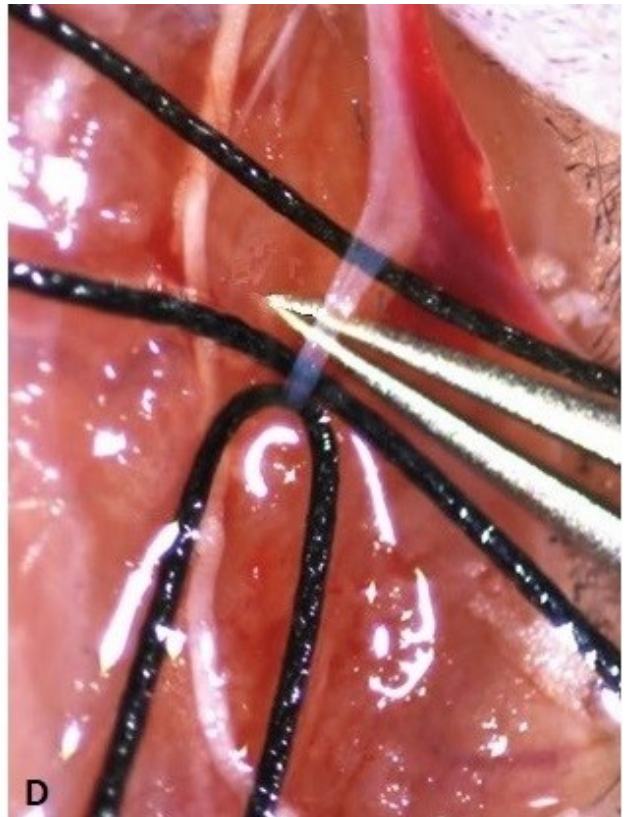
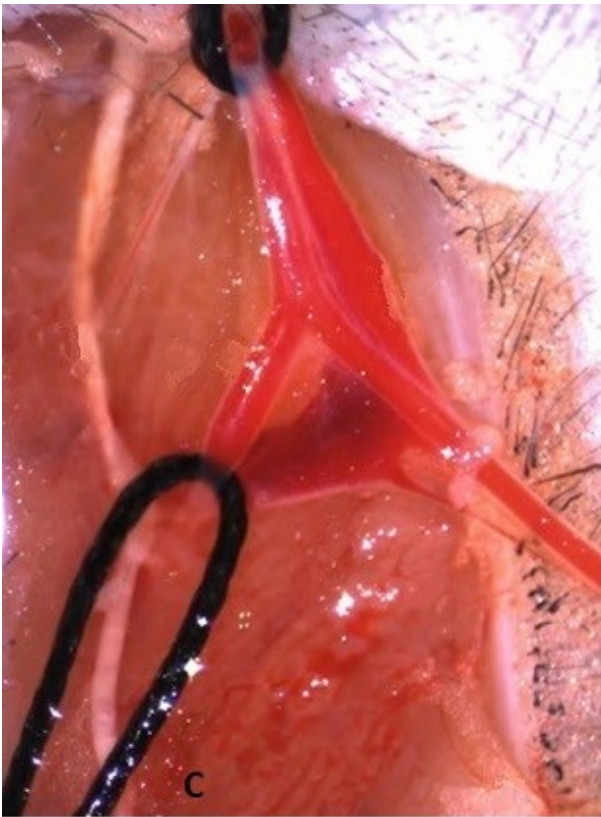
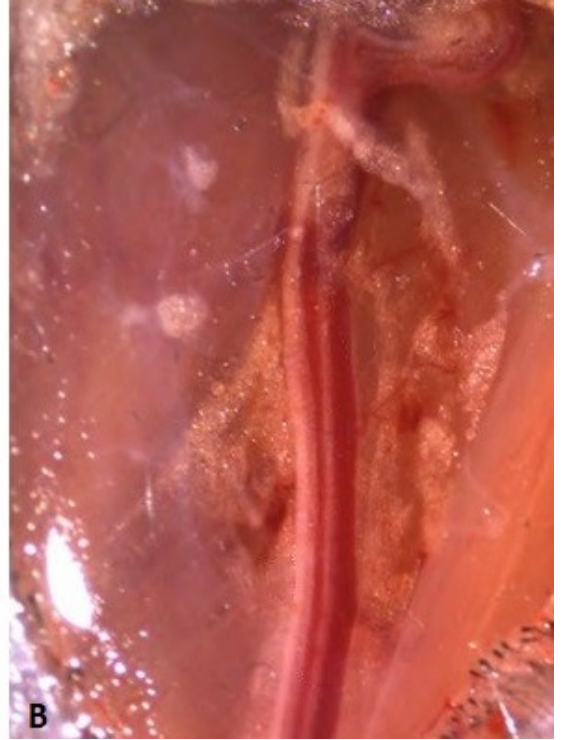
Obrázek 11: náčrt arteriálního stromu pravé nohy potkana

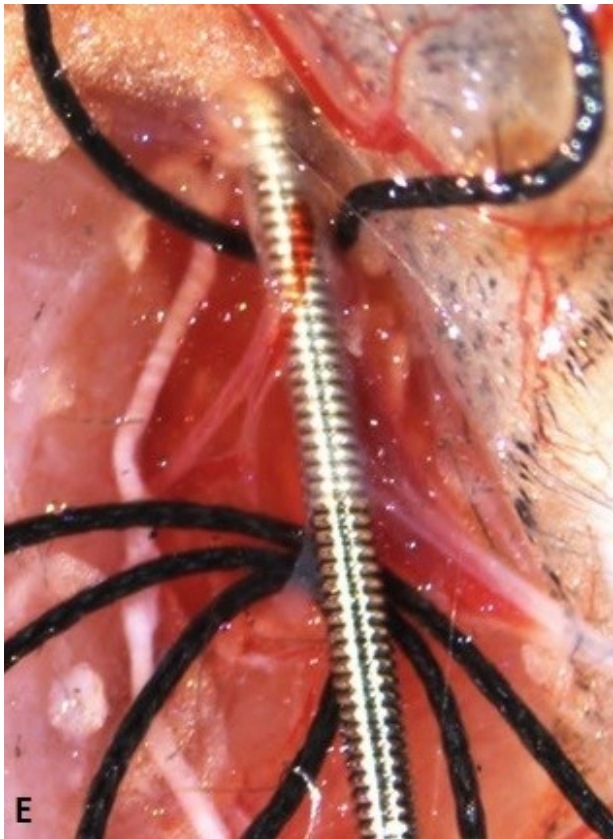
A – aorta, AIC – společná ilická tepna, AFC – společná stehenní tepna, AESC – povrchová epigastrická tepna, APF – hluboká stehenní tepna, AFS – povrchová stehenní tepna, tečkovaná čára označuje tříselný vaz

Šipka označuje přístup pro vložení drátu

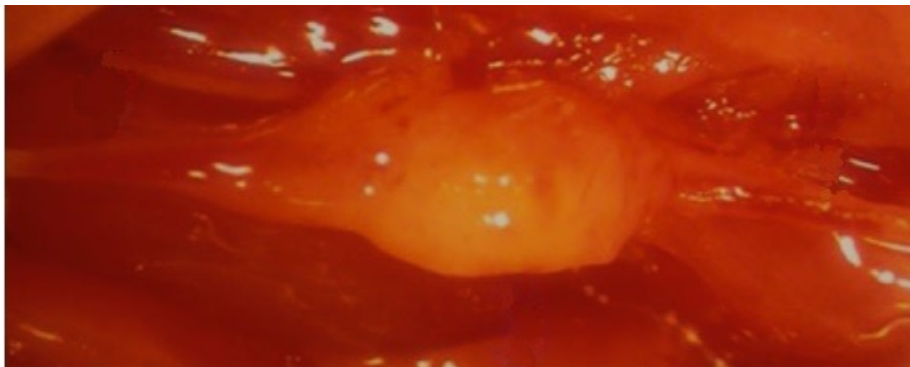
Obrázek 12: drát 0,38mm, COOK







Obrázek 13: A - kožní a podkožní incize, šetrná preparace cévně-nervového stehenního svazku, B - na spodině cévně-nervový stehenní svazek, zleva doprava – nerv, tepna, žíla, C - vypreparovaný cévní strom, D - naložení hedvábných smyček na jednotlivé tepny, E - z arteriotomie v povrchové epigastrické tepny vložení drátu směrem do pánevní tepny, F - ligace epigastrické tepny a obnovení průtoku



Obrázek 14: preparace vhojené tukové tkáně kolem společné stehenní tepny

## Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí Studentova t-testu nebo ANOVA a s užitím post hoc Bonferroniho vícenásobného srovnávacího testu. Rozdíly byly považovány za statisticky signifikantní na hladině  $p \leq 0,05$ . Data jsou vždy prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD).

## 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 (u obou  $p < 0,001$ ) (viz. Tabulka 6).

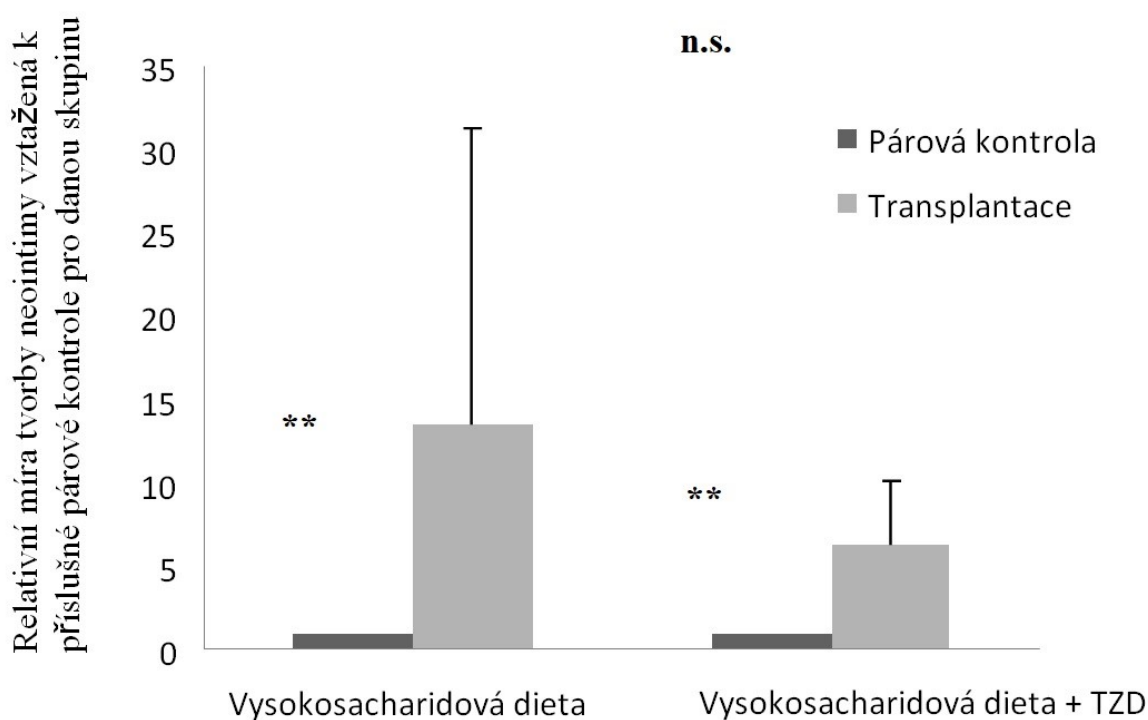
Tabulka 6: Biochemické parametry zvířat

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.);  $p < 0,05$ ( $\phi$ );  $p < 0,01$ ( $\phi \phi$ );  $p < 0,001$ ( $\phi \phi \phi$ )

Sledevané parametry zvířat donorů	Kontrola (n=8)	Vysokosacharidová dieta (n=8)	p	Vysokosacharidová dieta + TZD (n=8)	p
Hmotnost (g)	387,63 $\pm$ 35,95	376,75 $\pm$ 31,63	n.s.	423,38 $\pm$ 23,5	$\phi$
Glukóza (mmol.l <sup>-1</sup> )	8,04 $\pm$ 0,36	8,38 $\pm$ 1,58	n.s.	7,85 $\pm$ 0,9	n.s.
Celkový cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	2,01 $\pm$ 0,23	3,53 $\pm$ 0,35	***	1,66 $\pm$ 0,12	*** $\phi \phi$
TG (mmol.l <sup>-1</sup> )	11,22 $\pm$ 1,65	18,62 $\pm$ 0,53	***	2,26 $\pm$ 0,54	*** $\phi \phi \phi$
HDL cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	0,13 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,07	***	0,85 $\pm$ 0,10	*** $\phi \phi \phi$
LDL cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	neměřitelné	neměřitelné	n.s.	0,12 $\pm$ 0,03	n.s.

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 15). Otázkou je vhodnost použitého modelu HHTg potkana, který byl pro podobné studie použit poprvé.



Obrázek 15: Vliv intervence (vysokosacharidová dieta × vysokosacharidová dieta + TZD) na relativní míru tvorby neointimy na končetině po cévním traumatu; vztažené 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



**Závěr:**

U HHTg potkanů podávání thiazolidindionů snížilo hladinu celkového cholesterolu a triglyceridů v plazmě a významně zvýšilo 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.

## 5. Souhrn hlavních výsledků

Prozánětlivé makrofágy exprimovaly na svém povrchu receptor CD36. Přítomnost prozánětlivých makrofágů byla téměř dvakrát vyšší ve viscerální ( $p < 0,0001$ ) a perivaskulární ( $p < 0,001$ ) tukové tkáni než v podkožní tukové tkáni. Rozdíl byl výraznější v podskupině žen po menopauze. Vyšší podíl makrofágů M1 jsme zaznamenali u postmenopauzálních žen než u žen před menopauzou. Věk, mužské pohlaví a hypercholesterolemie 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<sup>high</sup> v podkožní tukové tkáni pozitivně korelovaly s vyšším indexem tělesné hmotnosti ( $p < 0,01$ ). Časná funkce štěpu ledviny, měřená jako průměrné zvýšení GFR v prvních sedmi dnech po transplantaci, nekorelovala s BMI žijících dárců ledvin. Nenašli jsme žádnou souvislost mezi časnou funkcí štěpu ledviny a zastoupením makrofágů M1 v dárcovské perirenální tukové tkáni ani plazmatickou hladinou adiponektinu nebo CRP. Potvrdili jsme negativní korelaci mezi BMI příjemců a průměrným nárůstem GFR v prvních sedmi dnech po transplantaci ( $p < 0,02$ ,  $r = -0,325$ ,  $N = 58$ ).

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 TZDs 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 5× nižší ( $p < 0,001$ ). Hladina HDL cholesterolu byla ve skupině s TZD významně vyšší než v ostatních skupinách ( $p < 0,001$ ). 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

## 6. Závěry disertační práce

Prispěli 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 významně zvýšilo hladinu HDL cholesterolu. Míra tvorby neointimy po vaskulárním inzultu 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. Hlavně pokud se jedná 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.

## Summary of main outcomes

Pro-inflammatory macrophages express high scavenger receptor CD36 expression. The levels of pro-inflammatory macrophages were almost twice as high in visceral ( $p < 0.0001$ ) and perivascular ( $p < 0.0001$ ) adipose tissues as they were in subcutaneous tissue. Difference was more pronounced in the subgroup of postmenopausal women. We observed a higher proportion of M1 macrophages in older women than that of younger women. Increased age, male gender and hypercholesterolaemia were positively associated with the M1 macrophages in visceral adipose tissue. Their levels were relevantly decreased by statin therapy. Total macrophage numbers in subcutaneous adipose tissue ( $p < 0.02$ ) increased with increasing body mass index; a similar increase was seen in the proportion in proinflammatory macrophages CD14+CD16+CD36<sup>high</sup> ( $p < 0.01$ ).

Early renal graft function, measured as an average increase in GFR in the first seven days posttransplantation, did not have any correlation to donor BMI. We were unable to find any association between early renal graft function and the percentage of M1 macrophages in donor perirenal adipose tissue, adiponectin or plasma CRP. We confirmed a negative correlation between recipient BMI and an average increase in GFR in the first seven days posttransplantation ( $p < 0.02$ ,  $r = -0.325$ ,  $N = 58$ ).

Plasma cholesterol and triglycerides levels were significantly increased in the HHTg group of rats after a high-carbohydrate diet (both  $p < 0.001$ ) compared to the control group. Plasma cholesterol and triglycerides levels were significantly reduced ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ) and HDL cholesterol was increased ( $p < 0.001$ ) in the HHTg group of rats treated with TZD, compared to the group of rats on a high-carbohydrate diet. Compared to the control group, the level of total cholesterol in plasma was also significantly lower ( $p < 0.001$ ) and the level of triglycerides was almost 5 times lower ( $p < 0.001$ ). We did not confirm the hypothesis that fat transplantation of animals added to the diet with TZD would increase the rate of vascular remodeling after vascular injury compared to a group of animals treated with a high-carbohydrate diet alone.

## 7. Conclusions

We obtained detailed information regarding M1 and M2 macrophage phenotypes in human adipose tissue. This work has described in detail the significance of the CD36 marker when analyzing macrophages of adipose tissue. We managed to demonstrate a relationship between metabolically activated macrophages with high CD36 expression and cardiovascular risk predictors. We also reported that statins had a decreasing effect on proinflammatory macrophages, which would explain the statins protective effect on the vessels. For postmenopausal women, a higher proportion of percentage proinflammatory macrophages in the visceral adipose tissue may be related to their elevated 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.

Administration of TZD in HHTg rats reduced plasma levels of total cholesterol and triglycerides and increased HDL cholesterol. The rate of neointima formation after vascular injury was not affected by thiazolidinedione administration. The results of the intervention study in HHTg rats did not confirm our hypothesis of the protective role of PPAR gamma signaling in neointima formation after vascular injury under conditions affected by metabolic syndrome. Most of the published data that indicate a link between adipose tissue and atherosclerosis are derived from experimental studies in animal models. The living kidney donor transplantation program offers an opportunity to support research projects that focus on adipose tissue and its role in the pathogenesis of atherosclerosis in humans. Exclusion criteria for living kidney donors have been slightly modified to accept individuals with certain risk factors for cardiovascular disease (mild hypertension, dyslipidaemia and obesity). The living kidney donor represents an ideal model for studying pathogenetic mechanisms involved in the development of atherosclerosis. This work is the first phase in a long-term project that aims to reveal 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.

## 8. Seznam použitých zkratek

**ATM:** adipose tissue macrophages

**BMI:** body mass index

**CD:** cluster of differentiation

**CVD:** cardiovascular disease

**DBP:** diastolic blood pressure

**FSH:** follicle-stimulating hormone

**GFR:** glomerular filtration rate

**HARS:** hand-assisted-retroperitoneoscopic surgery

**HDL:** high density lipoprotein

**hsCRP:** high-sensitivity C-reactive protein

**IL-1 $\beta$ :** interleukin 1 beta

**IL-6:** interleukin 6

**IL-10:** interleukin 10

**LDL:** low density lipoprotein

**MCP-1:** monocyte chemoattractant protein-1

**PAD:** peripheral artery disease

**postW:** women of postmenopausal age

**preW:** women of premenopausal age

**PVAT:** perivascular adipose tissue

**SBP:** systolic blood pressure

**SCAT:** subcutaneous adipose tissue

**SVF:** stromal vascular fraction

**TGF- $\beta$ :** transforming growth factor beta

**TNF  $\alpha$ :** tumor necrosis factor alfa

**VAT:** visceral adipose tissue

## 9. Seznam příloh

### Příloha č. 1:

Odběr tukové tkáně při dárcovské nefrektomii; chirurgický model pro výzkum aterosklerózy  
Filip Thieme, Libor Janoušek, Anna Králová, Soňa Čejková, Ivana Králová Lesná, Rudolf  
Poledne, Jiří Froněk, *Rozhledy v chirurgii*. 2019, **98**(12), 476-480. ISSN 0035-9351.

### Příloha č. 2:

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. IF 3,79

### Příloha č. 3:

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. IF 3.94

### Příloha č. 4:

I. Kralova Lesna, M. Petras, S. Cejkova, A. Kralova, J. Froněk, L. Janousek, F. Thieme, T.  
TYII, 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. 5:

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) e 264. IF 2.74

### Příloha č. 6:

F. Thieme, L. Janoušek, J. Froněk, A. Králová, S. Čejková, I. Králová Lesná, R. Poledne, The  
effect of ectopic fat on graft function after living kidney transplantation, *Physiological  
research* 64(3) (2015) 411-417. IF 1,618.

## 10. Publikační činnost autora

### ČLÁNEK ODBORNÝ

#### 2020

1. 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

#### 2019

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. **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.

#### 2018

6. 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.
7. **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.
8. 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.



9. 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.

#### **2017**

10. 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.
11. 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.

#### **2016**

12. 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.

#### **2015**

13. **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.
14. 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.
15. 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.

#### ČLÁNEK JINÝ

#### **2017**

1. ČEJKOVÁ, S., KRÁLOVÁ LESNÁ, I., FRONĚK, J., JANOUŠEK, L., KRÁLOVÁ, A., ŽDYCHOVÁ, J., **THIEME, F.**, POLEDNE, R. Erratum to: Pro-inflammatory gene expression in adipose tissue of patients with atherosclerosis (vol 66, pg 633, 2017). *Physiological research*. 2017, **66**(5), 897. ISSN 0862-8408.

## PŘÍSPĚVEK VE SBORNÍKU

**2018**

1. TEYSSLER, P., SUTORIS, K., THIEME, F. Praktické zkušenosti se zevní fixací u syndromu diabetické nohy. *Syndrom diabetické nohy*. Praha, CZ, 30.11.2018 - 30.11.2018. Zorg. CD IKEM. In: *Kazuistiky v diabetologii*. 2018, **16**(Supl. 1), 17-19, abstr. č. 07. ISSN 1214-231X. e-ISSN 1214-231X.

## ABSTRAKT

**2019**

1. SIXTA, B., SUTORIS, K., THIEME, F. Indikace a kontraindikace tenotomií a elongací šlach v rámci terapie syndromu diabetické nohy. *Mezioborová spolupráce při léčbě ran a kožních defektů : XVII. celostátní kongres*. Pardubice, CZ, 24.01.2019 - 25.01.2019. Zorg. Česká společnost pro léčbu rány. *Léčba ran*. 2019, **6**(1), 26-27. ISSN 2336-520X.
2. ČEJKOVÁ, S., KUBÁTOVÁ, H., THIEME, F., JANOUŠEK, L., FRONĚK, J., POLEDNE, R., KRÁLOVÁ LESNÁ, I. Does inflammation in perivascular adipose tissue affect the adjacent arterial wall?. *87th Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS)*. Maastricht, NL, 26.05.2019 - 29.05.2019. Zorg. European Atherosclerosis Society. *Atherosclerosis*. 2019, **287**(August), E244-E245. ISSN 0021-9150. e-ISSN 1879-1484.
3. DUBSKÝ, M., BÉM, R., JIRKOVSKÁ, A., NĚMCOVÁ, A., HAZDROVÁ, J., FEJFAROVÁ, V., WOSKOVÁ, V., SUTORIS, K., THIEME, F., SKIBOVÁ, J. Impact of Severe Diabetic Kidney Disease on the Effect of Autologous Cell Therapy in Diabetic Patients with Chronic Limb-Threatening Ischemia. *8th International Symposium on the Diabetic Foot*. Hague, NL. 22.05.2019 - 25.05.2019. In: *8th International Symposium on the Diabetic Foot : abstracts*. B.m.n., 2019, s. 16, O7.2.
4. CHLUPÁČ, J., MARADA, T., MALÝ, Š., THIEME, F., NOVOTNÝ, R., PANTOFLÍČEK, T., SUTORIS, K., VYŠOHLÍD, R., LIPÁR, K., JANOUŠEK, L., FRONĚK, J. Aorto-iliac endarterectomy: Alternate surgical technique. *44th Czech Angiology Dayes 2019*. Prague, CZ, 28.02.2019 - 02.03.2019. Zorg. Czech Society of Angiology. *Kazuistiky v angiologii*. 2019, **6**(1), 13. ISSN 2336-2790.
5. SUTORIS, K., SIXTA, B., THIEME, F., FRONĚK, J., TEYSSLER, P. Kdy lze chirurgicky vyléčit osteomyelitis a kdy recidivuje infekce?. *Syndrom diabetické nohy : mezioborové sympozium s mezinárodní účastí*. Praha, CZ, 29.11.2019 - . . Zorg. CD IKEM. *Kazuistiky v diabetologii*. 2019, **17**(Supl. 1), 12-13. ISSN 1214-231X.
6. HAZDROVÁ, J., BÉM, R., NĚMCOVÁ, A., FEJFAROVÁ, V., JIRKOVSKÁ, A., WOSKOVÁ, V., SUTORIS, K., THIEME, F., DUBSKÝ, M. Assessment of Systemic Vasculogenesis After Autologous Cell Therapy of Ischemic Diabetic Foot. *8th International Symposium on the Diabetic Foot*. Hague, NL. 22.05.2019 - 25.05.2019. In: *8th International Symposium on the Diabetic Foot : abstracts*. B.m.n., 2019, s. 15, O7.1.
7. HUSÁKOVÁ, J., BÉM, R., FEJFAROVÁ, V., NĚMCOVÁ, A., WOSKOVÁ, V., JIRKOVSKÁ, A., SUTORIS, K., THIEME, F., LOVÁSOVÁ, V., DUBSKÝ, M. Význam komplexního vyšetření

a pečlivý odběr anamnézy u pacienta se syndromem diabetické nohy. Poster. *Syndrom diabetické nohy : mezioborové sympozium s mezinárodní účastí*. Praha, CZ, 29.11.2019 - . . Zorg. CD IKEM. *Kazuistiky v diabetologii*. 2019, **17**(Supl. 1), 25, abstr. č. P2. ISSN 1214-231X.

8. HUSÁKOVÁ, J., BÉM, R., FEJFAROVÁ, V., NĚMCOVÁ, A., WOSKOVÁ, V., JIRKOVSKÁ, A., SUTORIS, K., THIEME, F., LOVÁSOVÁ, V., DUBSKÝ, M. Význam komplexního vyšetření a pečlivý odběr anamnézy u pacienta se syndromem diabetické nohy. Poster. *Syndrom diabetické nohy*. Praha, CZ, 29.11.2019 - 29.11.2019. *Kazuistiky v diabetologii*. 2019, **22**(Supl. 1), 25, P2. ISSN 1214-231X.

## 2018

9. HAZDROVÁ, J., BÉM, R., FEJFAROVÁ, V., NĚMCOVÁ, A., WOSKOVÁ, V., JIRKOVSKÁ, A., SUTORIS, K., THIEME, F., DUBSKÝ, M. Zhojení chronického defektu paty u transplantovaného pacienta pomocí metod moderní terapie. Poster. *Syndrom diabetické nohy*. Praha, CZ, 30.11.2018 - 30.11.2018. Zorg. CD IKEM. *Kazuistiky v diabetologii*. 2018, **16**(Supl. 1), 30-31, abstr. č. P1. ISSN 1214-231X.
10. ČEJKOVÁ, S., KUBÁTOVÁ, H., KRÁLOVÁ LESNÁ, I., FRONĚK, J., THIEME, F., POLEDNE, R. The effect of adipose tissue and stromal vascular fraction derived cytokines on monocyte adhesiveness to the endothelium. *86th Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS)*. Lisbon, PT, 05.05.2018 - 08.05.2018. Zorg. AIM Group International. *Atherosclerosis*. 2018, **275**(August), E47-E47. ISSN 0021-9150. e-ISSN 1879-1484.
11. THIEME, F., MARADA, T., JANOUŠEK, L., FRONĚK, J. The aortocaval fistula - a rare complication of abdominal aortic aneurysm - a case report. *4th Congress of the European Society for Vascular Medicine. 43rd Czech Angiology Days 2018*. Prague, CZ, 18.03.2018 - 20.03.2018. Zorg. European Society for Vascular Medicine. *Kazuistiky v angiologii*. 2018, **5**(1), 61. ISSN 2336-2790.
12. ČEJKOVÁ, S., KUBÁTOVÁ, H., THIEME, F., JANOUŠEK, L., FRONĚK, J., POLEDNE, R., KRÁLOVÁ LESNÁ, I. Vliv viscerální tukové tkáně na adhezi monocytů k endotelu. *XXII. kongres o ateroskleróze*. Olomouc, CZ, 06.12.2018 - 08.12.2018. *Vnitřní lékařství*. 2018, **64**(Supl. 2), 2S5, abstr. č. 08US. ISSN 0042-773X.

## 2017

13. POLEDNE, R., KRÁLOVÁ LESNÁ, I., PETRÁŠ, M., FRONĚK, J., KRÁLOVÁ, A., THIEME, F., ČEJKOVÁ, S., PÍTHA, J. Proinflamační stav viscerální tkáně může vysvětlit pleiotropní vliv statinů. *20. kongres o ateroskleróze*. Špindlerův Mlýn, CZ, 08.12.2016 - 10.12.2016. Zorg. Česká společnost pro aterosklerózu. *Atheroreview*. 2017, **2**(1), 58. ISSN 2464-6555. e-ISSN 2464-6563.
14. ČEJKOVÁ, S., KUBÁTOVÁ, H., KRÁLOVÁ LESNÁ, I., THIEME, F., FRONĚK, J., POLEDNE, R. The effect of adipose tissue products on monocyte adhesivity to the endothelium. *85th Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS)*. Prague, CZ, 23.04.2017 - 26.04.2017. Zorg. European Atherosclerosis Society. *Atherosclerosis*. 2017, **263**(August), E132, abstr. no. PO068. ISSN 0021-9150. e-ISSN 1879-1484.
15. KRÁLOVÁ LESNÁ, I., KRÁLOVÁ, A., ČEJKOVÁ, S., FRONĚK, J., PETRAS, M., THIEME, F., JANOUŠEK, L., POLEDNE, R. Human adipose tissue accumulation is connected with pro-inflammatory changes in subcutaneous rather than visceral adipose tissue. *85th Congress of the*

*European Atherosclerosis Society (EAS)*. Prague, CZ, 23.04.2017 - 26.04.2017. Zorg. European Atherosclerosis Society. *Atherosclerosis*. 2017, **263**(August), E72, abstr. no. SAG117. ISSN 0021-9150. e-ISSN 1879-1484.

16. CHLUPÁČ, J., THIEME, F., KOVÁČ, J., FRONĚK, J., JANOUŠEK, L. Angioplasty/stenting of extracranial arteries from surgically exposed common carotid artery. *42nd Czech Angiology Days*. Prague, Czech Republic, 23.02.2017 - 25.02.2017. Zorg. Czech Society of Angiology. *Kazuistiky v angiologii*. 2017, **4**(1), 22. ISSN 2336-2790.
17. KRÁLOVÁ LESNÁ, I., ČEJKOVÁ, S., KRÁLOVÁ, A., FRONĚK, J., THIEME, F., JANOUŠEK, L., SEKERKOVÁ, A., POLEDNE, R. Vliv rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění na fenotyp makrofágu v lidské tukové tkáni. *20. kongres o ateroskleróze*. Špindlerův Mlýn, CZ, 08.12.2016 - 10.12.2016. Zorg. Česká společnost pro aterosklerózu. *Atheroreview*. 2017, **2**(1), 58. ISSN 2464-6555. e-ISSN 2464-6563.

### **2016**

18. POLEDNE, R., KRÁLOVÁ LESNÁ, I., PETRÁŠ, M., FRONĚK, J., KRÁLOVÁ, A., THIEME, F., ČEJKOVÁ, S., PÍTHA, J. Proinflamační stav viscerální tkáně může vysvětlit pleiotropní vliv statinů. *20. kongres o ateroskleróze*. Špindlerův Mlýn, CZ, 08.12.2016 - 10.12.2016. *Vnitřní lékařství*. 2016, **62**(Suppl. 5), 5S7. ISSN 0042-773X.
19. KRÁLOVÁ LESNÁ, I., ČEJKOVÁ, S., KRÁLOVÁ, A., FRONĚK, J., THIEME, F., JANOUŠEK, L., SEKERKOVÁ, A., POLEDNE, R. Vliv rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění na fenotyp makrofágů v lidské tukové tkáni. *20. kongres o ateroskleróze*. Špindlerův Mlýn, CZ, 08.12.2016 - 10.12.2016. *Vnitřní lékařství*. 2016, **62**(Suppl. 5), 5S6. ISSN 0042-773X.

### **2013**

20. **THIEME, F.**, OLIVERIUS, M., FRONĚK, J. NPWT (Negative Pressure Wound Therapy) u transplantovaných nemocných se sekundárním hojením ran. *40. česko-slovenský chirurgický kongres s mezinárodní účastí. 6. kongres chirurgie jater, žlučových cest a pankreatu*. Plzeň, CZ. 11.09.2013 - 13.09.2013. Zorg. Česká chirurgická společnost ČLS JEP. In: *40. česko-slovenský chirurgický kongres s mezinárodní účastí. 6. kongres chirurgie jater, žlučových cest a pankreatu : Sborník abstraktů přednášek*. Plzeň: Euroverlag, 2013, s. 142, č. abstr. 099. ISBN 978-80-7177-977-80.

## **PŘEDNÁŠKA NEBO POSTER**

### **2020**

1. **THIEME, F.**, JANOUŠEK, L. Typy cévních operací, operační přístupy. *Řešení traumat v cévní chirurgii*. Praha, CZ. 27.02.2020 - 27.02.2020. Zorg. Aesculap Akademie.
2. **THIEME, F.**, CHLUPÁČ, J., JANOUŠEK, L., FRONĚK, J. Viscerální debranching a stentgraft aorty u akutní rupturované thorakoabdominální výdutě. Poster. *Angio Lednice 2020 : 26. česko-slovenské angiologické sympozium s postgraduální tematikou*. Lednice, CZ. 30.08.2020 - 31.08.2020. Zorg. Česká angiologická společnost.

### **2019**

3. **THIEME, F.**, JANOUŠEK, L. Typy cévních operací, operační přístupy. *Řešení traumat v cévní chirurgii*. Praha, CZ. 07.02.2019 - 07.02.2019. Zorg. Aesculap Akademie a IKEM.

4. **THIEME, F., LIPÁR, K., CHLUPÁČ, J., JANOUŠEK, L., FRONĚK, J.** Protézoduodenální píštěl - když rozhoduje čas. 25. *česko-slovenské angiologické sympozium*. Lednice, CZ. 12.06.2019 - 14.06.2019.

**2017**

5. **THIEME, F., LIPÁR, K., CHLUPÁČ, J., JANOUŠEK, L., FRONĚK, J.** Revaskularizace a. Iliaca interna pro gluteální ischémii po endovaskulární náhradě aneurysmatu aorty jako výkon simultánní s transplantací ledviny. 23. *česko-slovenské angiologické sympozium*. Lednice, CZ. 14.06.2017 - 15.06.2017. Zorg. Česká angiologická společnost.

**MUDr. Filip Thieme, Scopus (5.3.2021):**  
 16 publikací (15 originálních článků a 1 erratum), 101 citací, *h*-index: 6

## Citation overview

[Back to document results](#)

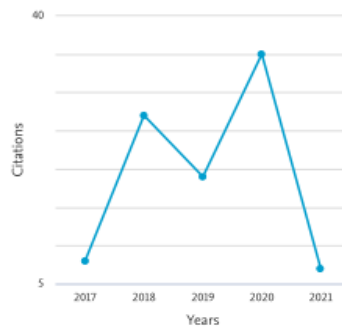
[Export](#) [Print](#)

This is an overview of citations for the documents you've selected.

Document *h*-index : 6 [View \*h\*-graph](#)

**16 cited documents** [+ Add to list](#)

Date range: 2017 to 2021  Exclude self citations of all authors  Exclude citations from books [Update](#)



Sort on: [Citation count \(descending\)](#)

Page  Remove

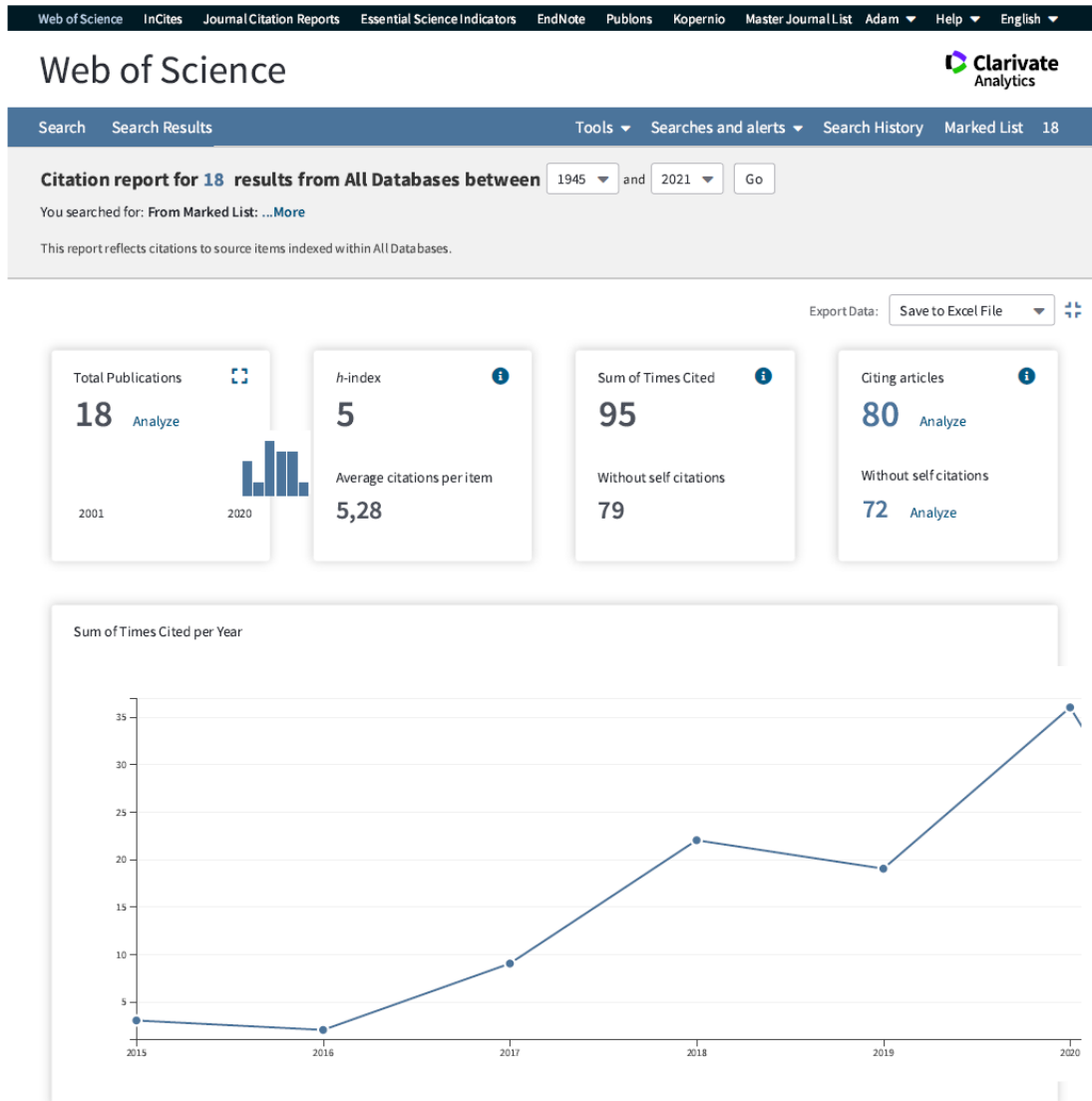
Documents	Citations	<2017	2017	2018	2019	2020	2021	Subtotal	>2021	Total
	<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>27</b>	<b>19</b>	<b>35</b>	<b>7</b>	<b>96</b>	<b>0</b>	<b>101</b>
<input type="checkbox"/> 1 Characterisation and comparison of adipose tissue macrophage...	2016		5	9	10	8	2	34		34
<input type="checkbox"/> 2 Human adipose tissue accumulation is associated with pro-inf...	2017			5	5	5	1	16		16
<input type="checkbox"/> 3 Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macroph...	2018			6	1	5	1	13		13
<input type="checkbox"/> 4 Macrophage subsets in the adipose tissue could be modified b...	2015	4	2	4		2		8		12
<input type="checkbox"/> 5 Pro-inflammatory gene expression in adipose tissue of patien...	2017			2	2	4		8		8
<input type="checkbox"/> 6 Polarization of macrophages in human adipose tissue is relat...	2020					4	2	6		6
<input type="checkbox"/> 7 Current vascular allograft procurement, cryopreservation and...	2019				1	3		4		4
<input type="checkbox"/> 8 Organization model for allotransplantations of cryopreserved...	2018			1		2		3		3
<input type="checkbox"/> 9 The effect of cytokines produced by human adipose tissue on ...	2019					1	1	2		2
<input type="checkbox"/> 10 Macrophage phenotypes in the adipose tissue of postmenopausa...	2015	1	1					1		2
<input type="checkbox"/> 11 Sharp liver excision under hepatic vascular exclusion in cas...	2018					1		1		1
<input type="checkbox"/> 12 [Odb&#283;y tukové tkán&#283;p&#283;p&#345;j dárcovské...	2019							0		0
<input type="checkbox"/> 13 The Superiority of Removable Contact Splints in the Healing ...	2019							0		0
<input type="checkbox"/> 14 [Aorto-ilická endarterektomie: staro-nová metoda?, Aorto-ili...	2018							0		0
<input type="checkbox"/> 15 Erratum: Pro-inflammatory gene expression in adipose tissue ...	2017							0		0
<input type="checkbox"/> 16 The effect of ectopic fat on graft function after living kid...	2015							0		0

## MUDr. Filip Thieme, Web of Science (5.3.2021):

18 publikací (13 originálních článků, 1 erratum, 4 konferenční abstrakta), 95 citací, 79 citací bez auto-citací, *h*-index: 5

5. 3. 2021

Web of Science [v.5.35] - Citation Report



## 11. Seznam použité literatury

- Ahmadi, A. R., J. A. Lafranca, L. A. Claessens, R. M. Imamdi, I. J. JN, M. G. Betjes and F. J. Dor (2015). "Shifting paradigms in eligibility criteria for live kidney donation: a systematic review." Kidney Int **87**(1): 31-45.
- 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.
- Aron-Wisnewsky, J., J. Tordjman, C. Poitou, F. Darakhshan, D. Hugol, A. Basdevant, A. Aissat, M. Guerre-Millo and K. Clement (2009). "Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss." J Clin Endocrinol Metab **94**(11): 4619-4623.
- Babaev, V. R., L. A. Gleaves, K. J. Carter, H. Suzuki, T. Kodama, S. Fazio and M. F. Linton (2000). "Reduced atherosclerotic lesions in mice deficient for total or macrophage-specific expression of scavenger receptor-A." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(12): 2593-2599.
- Bai, Y. and Q. Sun (2015). "Macrophage recruitment in obese adipose tissue." Obes Rev **16**(2): 127-136.
- Baker, M., N. Gaukrodger, B. M. Mayosi, H. Imrie, M. Farrall, H. Watkins, J. M. Connell, P. J. Avery and B. Keavney (2005). "Association between common polymorphisms of the proopiomelanocortin gene and body fat distribution: a family study." Diabetes **54**(8): 2492-2496.
- 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.
- Becker, B. N. and A. R. Nissenson (2018). "Greater access to transplantation should be a priority: A view of the Dialysis PATIENTS Demonstration Act." Am J Transplant.
- Bjorntorp, P. (1990). "'Portal' adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes." Arteriosclerosis **10**(4): 493-496.
- 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.
- 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.
- Catala, V., T. Marti, J. M. Diaz, E. Cordeiro, J. Samaniego, A. Rosales and P. De La Torre (2010). "Use of multidetector CT in presurgical evaluation of potential kidney transplant recipients." Radiographics **30**(2): 517-531.
- Cejkova, S., I. Kralova Lesna, J. Froněk, L. Janousek, A. Kralova, J. Zdychova and R. Poledne (2017). "Pro-inflammatory gene expression in adipose tissue of patients with atherosclerosis." Physiol Res **66**(4): 633-640.
- Cifkova, R., Z. Skodova, J. Bruthans, J. Holub, V. Adamkova, M. Jozifova, M. Galovcova, P. Wohlfahrt, A. Krajcoviechova, Z. Petrzkilova and V. Lanska (2010). "Longitudinal trends in cardiovascular mortality and blood pressure levels, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech population from 1985 to 2007/2008." J Hypertens **28**(11): 2196-2203.
- Cinti, S. (2002). "Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ." J Endocrinol Invest **25**(10): 823-835.
- Duvnjak, L. and M. Duvnjak (2009). "The metabolic syndrome - an ongoing story." J Physiol Pharmacol **60 Suppl 7**: 19-24.
- 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.
- Exley, M. A., L. Hand, D. O'Shea and L. Lynch (2014). "Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity." J Endocrinol **223**(2): R41-48.



Febbraio, M., D. P. Hajjar and R. L. Silverstein (2001). "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism." *J Clin Invest* **108**(6): 785-791.

Ferrara, D., F. Montecucco, F. Dallegri and F. Carbone (2019). "Impact of different ectopic fat depots on cardiovascular and metabolic diseases." *J Cell Physiol* **234**(12): 21630-21641.

Fox, C. S., 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. and C. J. O'Donnell (2007). "Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study." *Circulation* **116**(1): 39-48.

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.

Freedland, E. S. (2004). "Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review." *Nutr Metab (Lond)* **1**(1): 12.

Fronek, J. P., R. W. Chang and M. A. Morsy (2006). "Hand-assisted retroperitoneoscopic living donor nephrectomy: first UK experience." *Nephrol Dial Transplant* **21**(9): 2674-2675.

Galkina, E. and K. Ley (2007). "Leukocyte influx in atherosclerosis." *Curr Drug Targets* **8**(12): 1239-1248.

Gao, Y. J. (2007). "Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction." *Curr Pharm Des* **13**(21): 2185-2192.

Gao, Y. J., C. Lu, L. Y. Su, A. M. Sharma and R. M. Lee (2007). "Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide." *Br J Pharmacol* **151**(3): 323-331.

Geissmann, F., C. Auffray, R. Palframan, C. Wirrig, A. Ciocca, L. Campisi, E. Narni-Mancinelli and G. Lauvau (2008). "Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses." *Immunol Cell Biol* **86**(5): 398-408.

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.

Greif, M., A. Becker, F. von Ziegler, C. Leberer, 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.

Han, J., X. Zhou, T. Yokoyama, D. P. Hajjar, A. M. Gotto, Jr. and A. C. Nicholson (2004). "Pitavastatin downregulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36." *Circulation* **109**(6): 790-796.

Helantera, I., E. Honkanen, J. Huhti, H. Isoniemi, H. Jalanko, M. Lempinen, M. Miettinen, A. Nordin, R. Tertti and S. Makela (2017). "Living donor kidney transplantation." *Duodecim* **133**(10): 937-944.

Hevia, V., V. Gomez, S. Alvarez, V. Diez-Nicolas, A. Fernandez and F. J. Burgos (2015). "Orthotopic kidney transplant: a valid surgical alternative for complex patients." *Curr Urol Rep* **16**(1): 470.

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.

<https://www.ikem.cz/cs/darcovstvi-organu/zivot-sup-2-sup/statistika-ikem/a-3129/>.

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.

Chawla, A., K. D. Nguyen and Y. P. Goh (2011). "Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease." *Nat Rev Immunol* **11**(11): 738-749.

Chen, Y., 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 and R. L. Silverstein (2019). "Mitochondrial Metabolic Reprogramming by CD36 Signaling Drives Macrophage Inflammatory Responses." *Circ Res* **125**(12): 1087-1102.

Chinetti-Gbaguidi, G., M. Baron, M. A. Bouhlef, 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.

- Cho, K. Y., H. Miyoshi, S. Kuroda, H. Yasuda, K. Kamiyama, J. Nakagawara, M. Takigami, T. Kondo and T. Atsumi (2013). "The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery." *J Stroke Cerebrovasc Dis* **22**(7): 910-918.
- 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.
- 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.
- Jonasson, L., J. Holm, O. Skalli, G. Bondjers and G. K. Hansson (1986). "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque." *Arteriosclerosis* **6**(2): 131-138.
- 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.
- Karastergiou, K. and V. Mohamed-Ali (2010). "The autocrine and paracrine roles of adipokines." *Mol Cell Endocrinol* **318**(1-2): 69-78.
- Kasiske, B. L. (1998). "The evaluation of prospective renal transplant recipients and living donors." *Surg Clin North Am* **78**(1): 27-39.
- 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.
- 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.
- 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* **20**(4): 256-60
- Klimcakova, E., B. Roussel, Z. Kovacova, M. Kovacikova, M. Siklova-Vitkova, M. Combes, J. Hejnova, P. 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.
- Klimes I., A. Vrana, J. Kunes., E. Sebkova, 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
- 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.
- Kralova, A., I. Kralova Lesna and R. Poledne (2014). "Immunological aspects of atherosclerosis." *Physiol Res* **63** Suppl 3: S335-342.
- Kralova Lesna, I., A. Kralova, S. Cejkova, J. Fronek, M. Petras, A. Sekerkova, F. Thieme, L. Janousek and R. Poledne (2016). "Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue." *J Transl Med* **14**(1): 208.
- Kralova Lesna, I., R. Poledne, J. Fronek, 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.
- Kralova Lesna, I., P. Suchanek, E. Brabcova, J. Kovar, H. Malinska and R. Poledne (2013). "Effect of different types of dietary fatty acids on subclinical inflammation in humans." *Physiol Res* **62**(2): 145-152.
- Kratz, M., 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 and L. Becker (2014). "Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages." *Cell Metab* **20**(4): 614-625.

- 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.
- Kuman, M. (2015). "[Solid organ transplantation in the Czech Republic]." *Vnitr Lek* **61**(7-8): 741-746.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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). "KDIGO Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Care of Living Kidney Donors." *Transplantation* **101**(8S Suppl 1): S1-S109.
- 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.
- Magden, K., F. B. Ucar, A. Velioglu, H. Arikan, S. C. Yegen, S. Tuglular and I. C. Ozener (2015). "Donor Contraindications to Living Kidney Donation: A Single-Center Experience." *Transplant Proc* **47**(5): 1299-1301.
- Matsuzawa, Y. (2006). "The metabolic syndrome and adipocytokines." *FEBS Lett* **580**(12): 2917-2921.
- 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.
- Mothe-Satney, I., C. Filloux, H. Amghar, C. Pons, V. Bourlier, J. Galitzky, P. A. Grimaldi, C. C. Feral, A. Bouloumie, E. Van Obberghen and J. G. Neels (2012). "Adipocytes secrete leukotrienes: contribution to obesity-associated inflammation and insulin resistance in mice." *Diabetes* **61**(9): 2311-2319.
- Murray, J. E. and B. A. Barnes (1968). "Human kidney transplantation." *J Am Med Womens Assoc* **23**(11): 985-990.
- Murray, J. E., N. L. Tilney and R. E. Wilson (1976). "Renal transplantation: a twenty-five year experience." *Ann Surg* **184**(5): 565-573.
- 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.
- Muzaale, A. D., A. B. Massie, M. C. Wang, R. A. Montgomery, M. A. McBride, J. L. Wainright and D. L. Segev (2014). "Risk of end-stage renal disease following live kidney donation." *JAMA* **311**(6): 579-586.
- Nakashima, Y., T. N. Wight and K. Sueishi (2008). "Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans." *Cardiovasc Res* **79**(1): 14-23.
- Novotny, R., T. Marada, J. Chlupac, O. Viklicky and J. Froncek (2018). "Simultaneous living donor orthotopic renal transplantation and bilateral nephrectomy for recurrent renal cell carcinoma and renal failure: case report and review of literature." *Res Rep Urol* **10**: 69-73.
- Nozaki, S., H. Kashiwagi, S. Yamashita, T. Nakagawa, B. Kostner, Y. Tomiyama, A. Nakata, M. Ishigami, J. Miyagawa, K. Kameda-Takemura and et al. (1995). "Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects." *J Clin Invest* **96**(4): 1859-1865.
- 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.

Ozdemir-van Brunschot, D. M., G. G. Koning, K. C. van Laarhoven, M. Ergun, S. B. van Horne, M. M. Rovers and M. C. Warle (2015). "A comparison of technique modifications in laparoscopic donor nephrectomy: a systematic review and meta-analysis." *PLoS One* **10**(3): e0121131.

Pamukcu, B., G. Y. Lip, A. Devitt, H. Griffiths and E. Shantsila (2010). "The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease." *Ann Med* **42**(6): 394-403.

Park, Y. M. (2014). "CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis." *Exp Mol Med* **46**: e99.

Qatanani, M. and M. A. Lazar (2007). "Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu." *Genes Dev* **21**(12): 1443-1455.

Qi, X. Y., S. L. Qu, W. H. Xiong, O. Rom, L. Chang and Z. S. Jiang (2018). "Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: a double-edged sword." *Cardiovasc Diabetol* **17**(1): 134.

Reddy, P., D. Lent-Schochet, N. Ramakrishnan, M. McLaughlin and I. Jialal (2019). "Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes." *Clin Chim Acta* **496**: 35-44.

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.

Reilly, S. M. and A. R. Saltiel (2017). "Adapting to obesity with adipose tissue inflammation." *Nat Rev Endocrinol* **13**(11): 633-643.

Ricciarelli, R., J. M. Zingg and A. Azzi (2000). "Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells." *Circulation* **102**(1): 82-87.

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.

Rohatgi, A., 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 and P. W. Shaul (2014). "HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events." *N Engl J Med* **371**(25): 2383-2393.

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.

Ross, L. F. and J. R. Thistlethwaite, Jr. (2009). "Long-term consequences of kidney donation." *N Engl J Med* **360**(22): 2371; author reply 2372.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis is an inflammatory disease." *Am Heart J* **138**(5 Pt 2): S419-420.

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.

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

Ryden, M., P. Petrus, D. P. Andersson, G. Medina-Gomez, E. Escasany, P. Corrales Cordon, I. Dahlman, A. Kulyte and P. Arner (2019). "Insulin action is severely impaired in adipocytes of apparently healthy overweight and obese subjects." *J Intern Med* **285**(5): 578-588.

Sanchez-Gurmaches, J. and D. A. Guertin (2014). "Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed." *Nat Commun* **5**: 4099.

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 and 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* **32**(11): 2097-2104.

Serrano, O. K., B. Sengupta, A. Bangdiwala, D. M. Vock, T. B. Dunn, E. B. Finger, T. L. Pruett, A. J. Matas and R. Kandaswamy (2018). "Implications of excess weight on kidney donation: Long-term consequences of donor nephrectomy in obese donors." *Surgery* **164**(5): 1071-1076.

- 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.
- 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.
- Spoto, B., E. Di Betta, F. Mattace-Raso, E. Sijbrands, A. Vilardi, 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.
- Strydom, H. C. (1989). "Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults." Arteriosclerosis **9**(1 Suppl): I19-32.
- Strydom, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **92**(5): 1355-1374.
- Strydom, H. C., A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Arterioscler Thromb **14**(5): 840-856.
- Stoger, J. L., M. J. Gijbels, S. van der Velden, M. Manca, C. M. van der Loos, E. A. Biessen, M. J. Daemen, E. Lutgens and M. P. de Winther (2012). "Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis." Atherosclerosis **225**(2): 461-468.
- 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.
- Szasz, T. and R. C. Webb (2012). "Perivascular adipose tissue: more than just structural support." Clin Sci (Lond) **122**(1): 1-12.
- 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
- 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.
- Textor, S. and S. Taler (2008). "Expanding criteria for living kidney donors: what are the limits?" Transplant Rev (Orlando) **22**(3): 187-191.
- 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.
- 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.
- Trayhurn, P. (2005). "Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue." Endocrinology **146**(3): 1003-1005.
- Ulrich, C., G. H. Heine, M. K. Gerhart, H. Kohler and M. Girndt (2008). "Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients." Am J Transplant **8**(1): 103-110.
- Vague, J. (1947). "[Not Available]." Presse Med **55**(30): 339.
- Van den Bossche, J. and D. L. Saraber (2018). "Metabolic regulation of macrophages in tissues." Cell Immunol **330**: 54-59.
- van Furth, R., Z. A. Cohn, J. G. Hirsch, J. H. Humphrey, W. G. Spector and H. L. Langevoort (1972). "[Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line]." Bull World Health Organ **47**(5): 651-658.

- Vogel, D. Y., J. E. Glim, A. W. Stavenuiter, M. Breur, P. Heijnen, S. Amor, C. D. Dijkstra and R. H. Beelen (2014). "Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared." Immunobiology **219**(9): 695-703.
- Vrana A., L. Kazdova (1990). „The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia.“ Transplant Proc 1990 22(6): 2579
- Wadstrom, J., A. Biglarnia, H. Gjertsen, A. Sugitani and J. Fronck (2011). "Introducing hand-assisted retroperitoneoscopic live donor nephrectomy: learning curves and development based on 413 consecutive cases in four centers." Transplantation **91**(4): 462-469.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796-1808.
- 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.
- Widmer, J. D., A. Schlegel, P. Kron, M. Schiesser, J. G. Brockmann and M. K. Muller (2018). "Hand-assisted living-donor nephrectomy: a retrospective comparison of two techniques." BMC Urol **18**(1): 39.
- www.ikem.cz. (2020). "<https://www.ikem.cz/cs/darcovstvi-organu/zivot-sup-2-sup/statistika-ikem/a-3129/>." from <https://www.ikem.cz/cs/darcovstvi-organu/zivot-sup-2-sup/statistika-ikem/a-3129/>.
- Yildirim, M., M. Karahan, H. F. Kucuk, T. Demir, H. Demir, H. Turan, A. Yavuz and E. Ari (2017). "Increased Oxidative Stress in Living Kidney Donors: Correlation of Renal Functions With Antioxidant Capacity." Transplant Proc **49**(3): 407-410.
- Yoon, Y. E., K. H. Choi, K. S. Lee, K. H. Kim, S. C. Yang and W. K. Han (2015). "Impact of metabolic syndrome on postdonation renal function in living kidney donors." Transplant Proc **47**(2): 290-294.
- Yudkin, J. S., E. Eringa and C. D. Stehouwer (2005). ""Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease." Lancet **365**(9473): 1817-1820.
- 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.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation." J Leukoc Biol **81**(3): 584-592.