

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů
Studijní obor: Fyziologie živočichů a člověka



Aneta Rybová

Charakterizace tukových dep v okolí srdce u GPR10+NPFF2R KO obézních myší
Characterization of adipose tissues in the vicinity of heart of GPR10+NPFF2R KO obese
mice

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Kristina Bardová, Ph.D.

Praha, 2025

Poděkování

Velké poděkování náleží mé školitelce Mgr. Kristině Bardové, Ph.D. za poskytnutí příležitosti být pod jejím vedením, za všechny odborné rady, konzultace, čas a trpělivost, kterou se mnou měla. Můj vděk patří i celému týmu z Oddělení biologie tukové tkáně FGÚ AV ČR a MUDr. Miladě Halaškové za její odborné histologické oko a zápal pro histologii, který mi s radostí předala. V neposlední řadě také děkuji své rodině za podporu během studia. Projekt byl podpořen Národním institutem pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

.....
Aneta Rybová

Abstrakt

V posledních letech dochází ke stále výraznějšímu nárůstu výskytu kardiovaskulárních onemocnění, což podtrhuje naléhavou potřebu spolehlivých prediktivních metod pro včasnou identifikaci rizikových pacientů a umožnění adekvátní intervence. Jedním z významných faktorů přispívajících k rozvoji srdečních onemocnění je tuková tkáň naakumulovaná v těsné blízkosti srdce. Epikardiální tuk vzhledem k přímému kontaktu s myokardem a koronárními arteriemi má potenciál ovlivňovat srdeční zdraví a progresi onemocnění. Podobně perivaskulární tuk, obklopující cévní zásobení srdce, může významně ovlivňovat zdraví aorty. Intramyokardiální tuk je znám svou schopností infiltrovat myokard, zatímco nadměrné množství perikardiálního a parakardiálního tuku může mít rovněž negativní dopad, pokud se hromadí v okolí srdce ve větším rozsahu. Každé z těchto tukových dep vykazuje své specifické vlastnosti a mechanismy interakce se srdcem, které mohou být jak protektivní, tak i škodlivé. Z tohoto důvodu je nezbytné studovat tato unikátní tuková depa pomocí vhodného modelového organismu. Přestože myši mají v porovnání s lidmi jen velmi omezené množství epikardiálního tuku, cílem této práce bylo zjistit, zda kombinace faktorů jako je obezita, pokročilý věk a genetické modifikace (GPR10+NPF2R2 KO) může stimulovat nárůst nebo změnu morfologie tukové tkáně v okolí srdce.

Klíčová slova: Epikardiální tuková tkáň, intramyokardiální tuková tkáň, perivaskulární tuková tkáň, perikardiální tuková tkáň, parakardiální tuková tkáň, stárnutí, obezita, GPR10+NPF2R2 KO myši

Abstract

Recently, the global population has become increasingly vulnerable to cardiovascular diseases, emphasizing the urgent need for reliable predictive methods to identify high-risk patients and enable timely intervention. One of the culprits contributing to heart disease is the accumulation of adipose tissue in close proximity to the heart. Epicardial fat has a potential to influence cardiac health and disease progression due to its direct contact with the myocardium and coronary arteries. Similarly, perivascular fat, which envelops the heart's vasculature, can significantly affect the aorta. Intramyocardial fat is known for its capacity to infiltrate the cardiac muscle itself, while excessive pericardial and paracardial fat may also have detrimental effects when present in big quantities around the heart. Each of these fat depots exhibits distinct characteristics and mechanisms by which they may either support or harm our hearts. Therefore, it is crucial to study these unique adipose depots using an appropriate model organism. Although mice are quite lacking in terms of epicardial fat, we aimed to assess whether a combination of factors – such as obesity, advanced age, and genetic modifications (GPR10+NPPFR2 KO) – could stimulate the development or morphological changes of adipose tissue in the vicinity of the heart.

Key words: Epicardial adipose tissue, intramyocardial adipose tissue, perivascular adipose tissue, pericardial adipose tissue, paracardial adipose tissue, ageing, obesity, GPR10+NPPFR2 KO mice

Seznam použitých zkratk

AS = aortální stenóza

ATP = adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)

BAT = hnědá tuková tkáň (z anglického brown adipose tissue)

BMI = index tělesné hmotnosti (z anglického body mass index)

CAD = onemocnění koronárních arterií (z anglického coronary artery disease)

CD11c+ = integrin alfa X

CLS = z anglického crown-like structures

CRP = C-reaktivní protein (C-reactive protein)

CT = výpočetní tomografie (z anglického Computed Tomography)

DM2T = diabetes mellitus 2. typu (z anglického diabetes mellitus type 2)

EAT = epikardiální tuková tkáň (z anglického epicardial adipose tissue)

EAT-EV = extracelulární vezikuly odvozené z EAT (z anglického EAT-derived extracellular vesicles)

FS = fibrilace síní

GLUT4 = glukózový transportér typu 4 (z anglického glucose transporter-4)

GPR10 = receptor spřažený s G proteinem 10 (z anglického G protein coupled receptor 10)

gWAT = gonadální bílá tuková tkáň (z anglického gonadal white adipose tissue)

HFD = dieta s vysokým obsahem tuku (z anglického high-fat diet)

HDL = lipoprotein s vysokou hustotou (z anglického high density lipoprotein)

iBAT = interskapulární hnědá tuková tkáň (z anglického interscapular brown adipose tissue)

IGF-1 = inzulínu podobný růstový faktor-1 (z anglického insulin-like growth factor-1)

IL = interleukin

IR = inzulínová rezistence

IMAT = intramyokardiální tuková tkáň (z anglického intramyocardial adipose tissue)

ISCH = ischemická choroba srdeční

KO = geneticky modifikovaný s pomocí vyřazeného genu (z anglického knockout)

KVO = kardiovaskulární onemocnění

LA = levá předsíň (z anglického left atrium)

LDL = lipoprotein s nízkou hustotou (z anglického low density lipoprotein)

LV = levá srdeční komora (z anglického left ventricle)

M1 = klasicky aktivované makrofágy (classically activated macrophages)

M2 = alternativně aktivované makrofágy (alternatively activated macrophages)

MAC-2 = makrofágový antigen 2 (z anglického macrophage antigen 2)

MAOa = monoaminoxidázy A

MCP1 = monocytární chemotaktický protein (z anglického monocyte chemoattractant protein 1)

MK = mastné kyseliny

mRNA = messengerová ribonukleová kyselina (z anglického messenger ribonucleic acid)

NE = norepinefrin (norepinephrine)

NK buňky = lymfocyt „přirozený zabíječ“ (z anglického natural killers)

NO = oxid dusnatý (z anglického nitric oxide)

NPFFR2 = neuropeptidový FF receptor 2

OPN = osteopontin

PAT = perikardiální tuková tkáň (z anglického pericardial adipose tissue)

pCF = parakardiální tuková tkáň (z anglického paracardial fat)

PKC- β = proteinkináza C β (protein kinase C β)

PPAR- α = peroxisomový proliferátor aktivovaný receptor α (z anglického peroxisome proliferator-activated receptor α)

PrAT = peritoneální tuková tkáň (z anglického peritoneal adipose tissue)

PRDM14 = protein obsahující PR doménu 14 (z anglického PR-domain containing protein 14)

PTH = parathormon (parathyroid hormone)

PVAT = perivaskulární tuková tkáň (z anglického perivascular adipose tissue)

RA = pravá předsíň (z anglického right atrium)

ROS = reaktivní kyslíkové radikály (z anglického reactive oxygen species)

RV = pravá srdeční komora (z anglického right ventricle)

SAMs = makrofágy asociované se sympatickými neurony (z anglického sympathetic neuron – associated macrophages),

SCFA = mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z anglického short chain fatty acids)

scWAT = subkutánní bílá tuková tkáň (z anglického subcutaneous white adipose tissue)

Slc6a2 = norepinefrinový transportér (z anglického Soluter Carrier Family 6 Member 2)

SS = srdeční selhání

T3 = trijodtyronin (triiodothyronine)

T4 = tyroxin (thyroxine)

TAG = triacylglycerol (triacylglyceride)

TGF- β = transformující růstový faktor β (z anglického transforming growth factor β)

TH = hormon štítné žlázy (z anglického thyroid hormone)

TNF- α = faktor nádorové nekrózy (z anglického tumor necrosis factor α)

tPVAT = thorakální perivaskulární tuková tkáň (z anglického thoracal perivascular adipose tissue)

Treg = regulační T-lymfocyty (z anglického regulatory T cells)

UCP1 = odpráhuující protein 1 (z anglického uncoupling protein 1)

VAT = viscerální tuková tkáň (z anglického visceral adipose tissue)

WAT = bílá tuková tkáň (z anglického white adipose tissue)

WC = obvod pasu (z anglického waist circumference)

WHR = poměr obvodu pasu k obvodu boků (z anglického waist-hip ratio)

WT = myš s nezměněným genotypem (kontrolní myš), (z anglického wild type)

ZD = západní dieta

Obsah

ÚVOD	1
1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
1.1. TYPY A FUNKCE TUKOVÉ TKÁNĚ.....	2
1.2. LOKALIZACE TUKOVÝCH DEP	8
1.3. TUKOVÁ DEPA KOLEM SRDCE.....	13
1.4. STÁRNUTÍ.....	21
1.5. RIZIKO PŘÍTOMNOSTI NADMĚRNÉHO MNOŽSTVÍ EAT.....	28
2. CÍLE PRÁCE	32
3. METODY A MATERIÁL	33
3.1. SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ.....	33
3.2. SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ.....	33
3.3. LABORATORNÍ ZVÍŘATA	34
3.4. ANATOMICKÁ VSUVKA.....	34
4. PRAKTICKÁ ČÁST	36
4.1. POSTUP PRAKTICKÉ ČÁSTI.....	36
4.2. BARVENÍ HEMATOXYLINEM EOSINEM.....	37
4.3. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ NA DETEKCI UCP1	39
4.4. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ NA DETEKCI MAKROFÁGŮ, MAC-2	42
4.5. VÝPOČETNÍ TOMOGRAFIE.....	45
4.6. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	46
5. VÝSLEDKY	47
5.1. VLIV GENOTYPU NA TĚLESNOU HMOTNOST.....	47
5.2. LOKALIZACE ADIPOCYTŮ	50
5.3. VELIKOST ADIPOCYTŮ VE VYBRANÝCH DEPECH	55
5.4. ZASTOUPENÍ UCP1+ BUNĚK V ANALYZOVANÝCH DEPECH	58
5.5. ZASTOUPENÍ MAC-2+ CLS V ANALYZOVANÝCH DEPECH.....	61
6. DISKUZE	67
6.1. ÚVOD.....	67
6.2. JE MYŠÍ MODEL VHODNÝ PRO STUDIUM TUKOVÉ TKÁNĚ V OKOLÍ SRDCE?	67
6.3. VISCERÁLNÍ VS SUBKUTÁNNÍ TUK: FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JEJICH UKLÁDÁNÍ.....	68
6.4. LOKALIZACE A VELIKOST ADIPOCYTŮ ASOCIOVANÝCH SE SRDCEM	68
6.5. ANALÝZA UCP1 EXPRESE V SRDEČNÍ TUKOVÉ TKÁNI U STARÉHO A OBÉZNIHO MYŠÍHO MODELU	71
6.6. ANALÝZA PŘÍTOMNOSTI CLS V SRDEČNÍ TUKOVÉ TKÁNI U MYŠÍHO MODELU	72
6.7. PATOFYZIOLOGIE A ZDRAVOTNÍ RIZIKA – IMPLIKACE TUKOVÉ TKÁNĚ KOLEM SRDCE	76
Závěr	78
Seznam literatury a zdrojů	79

ÚVOD




Tuková tkáň představuje největší metabolicky aktivní “orgán” v lidském těle, který přispívá k regulaci energetické homeostázy. Zároveň je tato tkáň typická svou endokrinní a parakrinní aktivitou a dokáže ovlivňovat imunitní odpověď. Její vliv se však neomezuje na systémovou úroveň, ale zasahuje i do funkce jednotlivých orgánů. Orgánem, na který se tato práce zaměřovala, bylo srdce. V asociaci s kardiovaskulárním systémem je nutné rozlišovat jednotlivá tuková depa v jeho blízkosti, jelikož se odlišují nejen konkrétní anatomickou lokalizací, ale i funkčními vlastnostmi. Toto rozlišení je zvláště důležité při interpretaci výsledků experimentálních studií, což v mnoha pracích bohužel není dodržované. I mezi druhy existují morfologické a funkční rozdíly v distribuci či charakteru tukových dep asociovaných se srdcem. Je známo, že zvýšený objem epikardiální tukové tkáně je spojen se zvýšeným rizikem rozvoje kardiovaskulárního onemocnění, ale i jiná depa, jako je intramyokardiální, perivaskulární, perikardiální, nebo parakardiální mohou přispívat k rozvoji aterosklerózy, myokardiální steatózy, arytmií a srdečního selhání. Výzkum tohoto specifického tuku je proto nezbytný pro hlubší pochopení jeho role v patofyziologii srdce.

V této práci jsme se zaměřili na podrobnou charakterizaci tukových dep asociovaných se srdcem u geneticky modifikovaného myšičího modelu GPR10+NPFFR2 KO (dKO) ve srovnání s kontrolními WT jedinci. Obě skupiny zahrnovaly obézní a staré myši, čímž byl modelován stav zvýšeného kardiometabolického rizika. Předpokládali jsme, že dKO myši budou vykazovat zvýšenou akumulaci tukové tkáně v různých srdečních vrstvách. Analýza byla zaměřena na přesné anatomické vymezení jednotlivých dep, morfologické znaky adipocytů (velikost, unilokulární vs multilokulární charakter), přítomnost zánětlivých *crown-like* struktur a celkovou kvantifikaci tukové tkáně mezi genotypy. Výsledky této práce mohou přispět k validaci tohoto modelu jako vhodného nástroje pro výzkum srdečního tuku v kontextu obezity a kardiovaskulárních onemocnění.

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1. TYPY A FUNKCE TUKOVÉ TKÁNĚ

Z histologického pohledu je tuková tkáň klasifikována jako tkáň pojivová, která je prostoupena nervovou tkání a krevními cévami. Tvořena je několika buněčnými typy. Kromě preadipocytů, fibroblastů, imunitních buněk a endoteliálních buněk vystylajících cévy, které do tukové tkáně zasahují (Chun, 2021), tvoří hlavní složku adipocyty. Všechny adipocyty však nejsou stejné. Liší se jak morfologicky, tak funkčně (tabulka č. 1). Například uniloculární adipocyty slouží jako zásobárna energie, či termoizolace, zatímco hnědé tukové buňky zajišťují termogenezi. Tuková tkáň v organismu obecně plní i další role. Poskytuje mechanickou ochranu (ať už v podobě viscerálního tuku ochraňuje vnitřní orgány, nebo slouží jako přímá mechanická ochrana v podobě subkutánního tuku uloženého na patách jako tlumič nárazů při chůzi). Tuková tkáň se také podílí na hormonální regulaci a ovlivňuje příjem potravy.

	bílý adipocyt	hnědý adipocyt	běžový adipocyt
			
počet mitochondrií	nízká	vysoká	vysoká
lipidová kapénka	velká uniloculární	malá multiloculární	malá multiloculární
UCPI	-	+	+/-
lokalizace u dospělé myši	WAT depa	interskapulární BAT (také axilární, cervikální, paravertebrální, perirenální)	indukovatelné ze scWAT chladem a adrenergní stimulací
lokalizace u dospělého člověka	WAT depa	supraklavikulární, axilární, cervikální, paravertebrální	indukovatelné chladem a adrenergní stimulací
funkce	zásobárna energie, lipogeneze, lipolýza, glukózový uptake, sekrece adipokinů	termogeneze, spotřeba lipidů a glukózy, sekrece adipokinů	termogeneze, spotřeba lipidů a glukózy

Tabulka č. 1 – Rozdíly mezi jednotlivými typy adipocytů (převzato a upraveno z (An, Cho, Yoon, 2023)).

1.1.1. BÍLÁ TUKOVÁ TKÁŇ

Bílá tuková tkáň (WAT) plní v organismu především funkci energetického rezervoáru. Adipocyty mají kulatý tvar a obsahují jedinou velkou lipidovou kapénku, která zabírá až 90 % objemu buňky. Tato lipidová kapénka je tvořena triacylglyceroly (TAG) a estery cholesterolu. Jádro buňky je vlivem přítomnosti kapénky vytlačeno k periférii cytoplazmy, čímž se zdeformuje. Jeví se proto na histologických řezech ploše, ne kulatě. V době energetického deficitu jsou lipidy v kapénkách mobilizovány a hydrolyzovány, čímž se uvolňují volné mastné kyseliny (MK) jako zdroj energie (Giordano, Frontini, Cinti, 2016).

WAT plní také důležitou roli v regulaci energetické homeostázy organismu. Mezi nejhlavnější hormony patří leptin, který je adipocyty produkován a vylučován s cílem informovat organismus o stavu svých energetických zásob. Leptin působí na nucleus arcuatus v hypotalamu, kde aktivuje anorexigenní dráhy. Tím podporuje pocit sytosti a reguluje příjem potravy, čímž přispívá k udržení metabolické rovnováhy (Goncalves, Machado *et al.*, 2017).

Objem WAT se v průběhu života mění. U dospělých jedinců se množství bílé tukové tkáně obvykle zvyšuje s věkem, což je spojeno s přibýváním hmotnosti a redistribucí tuku. Avšak u velmi starých jedinců dochází ke snížení množství WAT, což je pravděpodobně důsledkem katabolických procesů spojených s pokročilým věkem a zhoršenou schopností ukládat energii (Goncalves, Machado *et al.*, 2017).

Bílá tuková tkáň není pouze pasivním úložištěm energie, ale hraje zásadní úlohu v komplexní regulaci metabolismu a energetické rovnováhy. Změny v množství a funkci WAT, zejména ve stáří, mohou významně ovlivnit metabolické zdraví a jsou proto důležitým aspektem studia metabolických a endokrinních funkcí lidského těla.

1.1.2. HNĚDÁ A BÉŽOVÁ TUKOVÁ TKÁŇ

Ve srovnání s WAT je hnědá tuková tkáň (BAT) více vaskularizovaná a má lepší adrenergní inervaci, což podporuje její metabolickou aktivitu. Adipocyty BAT mají menší cytoplazmatické lipidové kapénky a větší počet mitochondrií, což tkáni dodává charakteristické makroskopické hnědé zbarvení. Tato odlišnost v buněčné struktuře podtrhuje primární funkci BAT, kterou je generování tepla spíše než skladování energie (Wang, Xu, Li, 2022; Goncalves, Machado *et al.*, 2017). Tato schopnost je důležitá zejména při vystavení nízkým teplotám, kdy BAT přispívá k udržování tělesné teploty prostřednictvím netřesové termogeneze. Proces je zprostředkován proteinem UCP1 (z anglického uncoupling protein 1), který v mitochondriích disociuje oxidativní fosforylaci od produkce adenosintrifosfátu (ATP).

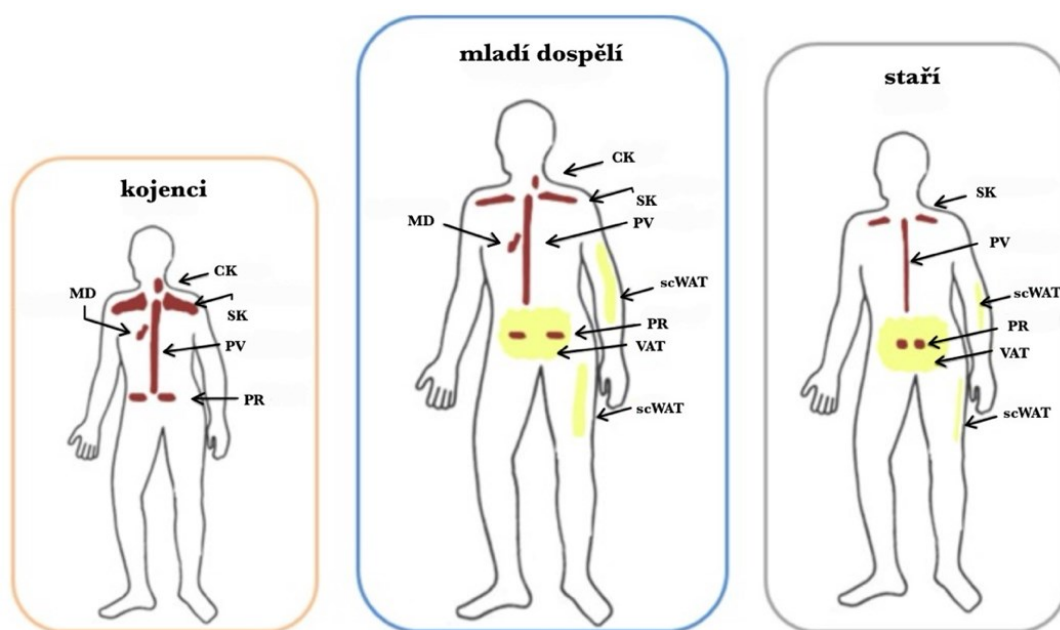
Energie uvolněná při oxidaci lipidů se přeměňuje na teplo (Giordano, Frontini, Cinti, 2016; Darcy, Tseng, 2019).

Běžové adipocyty, které jsou fenotypově na pomezí mezi WAT a BAT (mají multilokulární charakter, avšak menší počet lipidových kapének ve srovnání s BAT), hrají roli v ochraně proti metabolickým onemocněním a obezitou (indukovanou zvýšeným příjmem kalorií). Tyto adipocyty přispívají ke zvýšené metabolické aktivitě a podporují energetickou rovnováhu. S věkem však dochází k morfologickým změnám nejen v běžové tukové tkáni, ale i v BAT. Změny zahrnují především zvýšení unilokularity adipocytů, což vede ke snížení jejich metabolické aktivity. Tím se snižuje jejich schopnost poskytovat ochranu před obezitou a metabolickými dysfunkcemi (Goncalves, Machado *et al.*, 2017).

1.1.3. VÝSKYT A FUNKCE HNĚDÉ TUKOVÉ TKÁNĚ

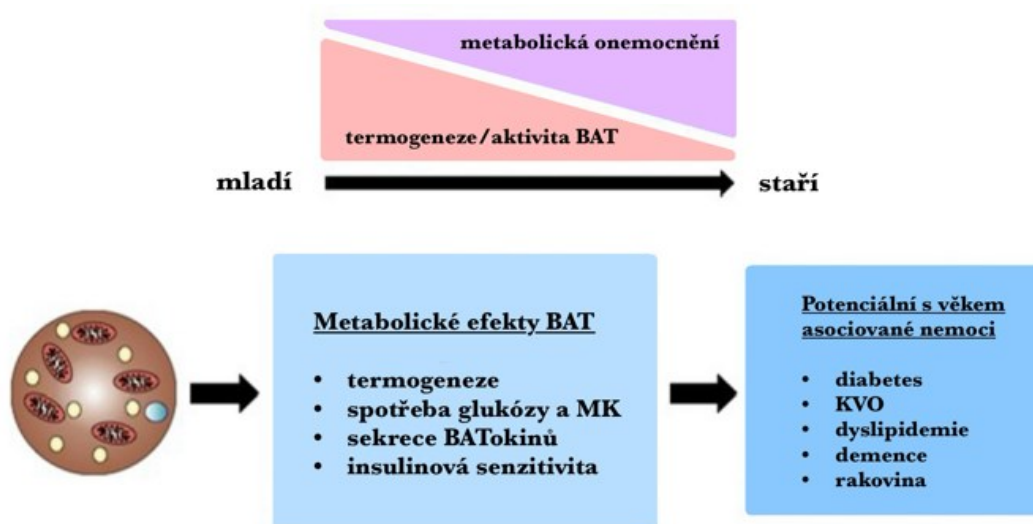
Hnědá tuková tkáň je v porovnání s lidmi výrazněji zastoupena u myši, což souvisí s jejich vyššími tepelnými ztrátami v důsledku velkého specifického povrchu a nedostatečné tepelné izolace. Vzhledem ke své malé tělesné velikosti jsou myši závislé na endogenní produkci tepla, kterou pomáhá zajišťovat BAT. Na rozdíl od lidí, kteří jsou adaptováni na odvádění přebytečného tepla, spíše než na jeho aktivní produkci.

Specifická depa unikátní pro myši model zahrnují supraspinální, infraskapulární a interskapulární oblast, zatímco s lidmi sdílejí depa cervikální, supraklavikulární, axilární, paravertebrální a perirenální. U člověka je interskapulární BAT přítomna výhradně v novorozeneckém období, přičemž s věkem dochází k její involuci (obr. č. 1) (Sidossis, Kajimura, 2015).



Obr. č. 1 – Výskyt BAT v jednotlivých depch v závislosti na věku (převzato a upraveno z (Zoico, Rubele *et al.*, 2019)). CK, klavikulární; SK, supraklavikulární; PV, paravertebrální; PR, perirenální; MD, mediastinální.

Hnědá tuková tkáň svou aktivitou přispívá k fyziologickému stárnutí. Primární roli zde představuje právě termogenní aktivita, která napomáhá regulovat energetickou bilanci a metabolismus. BAT funguje jako metabolický „sink“, který spotřebovává cirkulující glukózu a lipidy pro oxidaci. Tento proces nejen napomáhá správné termoregulaci, ale také zlepšuje plazmatický obrat (clearance) TAG, čímž snižuje riziko vzniku diabetu 2. typu (DM2T) a kardiovaskulárních onemocnění (KVO) (Darcy, Tseng, 2019; Bartelt, Bruns *et al.*, 2011). Proto má smysl cílit na indukci hnědnutí v tukové tkáni – ať už pomocí chladové adaptace, cvičení (metabolity – laktát), transkripčních faktorů (např. protein obsahující PR doménu 14 (PRDM14), peroxisomový proliferátor aktivovaný receptor α (PPAR- α), UCP1), hormonů (např. hormony štítné žlázy (TH), parathormon (PTH), leptin, melatonin), mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) (např. butyrát, acetát, propionát), diety (např. kapsaicin, rybí olej, skořice, kurkumin, extrakt ze zeleného čaje, ...) nebo transplantace (Ghesmati, Rashid *et al.*, 2023).



Obr. č. 2 – Metabolické efekty BAT (převzato a upraveno z (Darcy, Tseng *et al.*, 2019)).

Další funkce, které jsou typické pro hnědou tukovou tkáň, jsou autokrinní, parakrinní a endokrinní aktivita (schéma na obr. č. 2). Studie ukázaly, že transplantace BAT může zlepšit glykémii u modelů diabetu 1. typu (Gunawardana, Piston, 2015) i DM2T indukovaného dietou s vysokým obsahem tuků (HFD). Transplantace vede ke zvýšení energetického výdeje, zlepšení glukózové tolerance, metabolismu lipidů a zmírnění inzulínové rezistence (Liu, Wang *et al.*, 2015). Jedním z prvních hormonů stimulovaných transplantací BAT je plazmatický inzulínu podobný růstový faktor-1 (IGF-1), který má adipogenní a protizánětlivé účinky a podporuje regeneraci zdravých adipocytů ve WAT (Gunawardana, Piston, 2015). Dále BAT transplantace zvyšuje hladiny adiponektinu, podporuje expresi beta-3 adrenergních

receptorů v epididymálním a subkutánním depu u myši a snižuje cirkulující hladiny volných T3 (trijodtyronin) a T4 (tyroxin, tetrajodtyronin), což celkově přispívá k aktivaci endogenní BAT (Liu, Wang *et al.*, 2015).

Transplantace BAT zvyšuje sympatickou aktivitu nejen v endogenní BAT, ale také v dalších metabolicky aktivních tkáních, jako jsou WAT, srdce a svaly. “TransBATace” tak vede ke zvýšené spotřebě O₂, oxidaci MK v endogenní hnědé tukové tkáni a lepšímu využití glukózy. To vše přispívá k reverzi obezity, prevenci nárůstu hmotnosti, zlepšení hepatické steatózy a inzulínové senzitivity (Zhu, Spicer *et al.*, 2014).

Přestože indukce funkce BAT není „záračným“ mechanismem, i tak je z terapeutického hlediska považována za perspektivní cíl pro podporu zdraví, a to díky svému vlivu na energetický výdej a metabolismus. Aktivace BAT společně s chladovou expozicí a fyzickou aktivitou představuje slibnou strategii pro zlepšení kvality života a prodloužení jeho délky (Darcy, Tseng, 2019, Ghesmati, Rashid *et al.*, 2023). Celkově lze říci, že transplantace a aktivace BAT mají značný potenciál v prevenci a léčbě obezity a metabolických dysfunkcí, což z ní činí významný terapeutický nástroj zejména ve stárnoucí populaci.

1.1.4. ADIPOKINY

Tuková tkáň (a to bílá i hnědá) představuje aktivní endokrinní orgán se schopností produkovat široké spektrum signálních molekul, které ovlivňují systémovou homeostázu a metabolické procesy. Tyto molekuly, obecně označované jako cytokiny, jsou v případě produkce adipocyty nazývány adipokiny (tabulka č. 2). Ačkoli nejsou syntetizovány výhradně v tukové tkáni, adipokiny hrají zásadní roli v modulaci fyziologických i patologických procesů v organismu. Jejich účinky jsou obzvláště významné v lokalitách, kde tuková tkáň přiléhá k orgánovým strukturám, neboť zde dochází k lokálnímu uvolňování adipokinů s potenciálně protektivním nebo naopak patologickým účinkem.

Adipokiny mohou vykazovat jak prozánětlivé, tak protizánětlivé vlastnosti. Mezi prozánětlivé adipokiny patří monocytní chemotaktický protein 1 (MCP1), který stimuluje infiltraci a aktivaci makrofágů v tukové tkáni. Aktivované makrofágy následně produkují tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a interleukin-6 (IL-6), které se podílejí na rozvoji chronického zánětu spojeného s obezitou (Ibrahim, 2010).

Leptin je jeden z nejvýznamnějších adipokinů, neboť funguje jako senzor energetických zásob organismu a reguluje příjem potravy, angiogenezi, hematopoézu a imunitní odpověď. V rámci imunomodulace leptin ovlivňuje jak vrozenou, tak adaptivní

imunitní reakci – například zvyšuje cytotoxicitu NK (*natural killers*) buněk a stimuluje aktivaci granulocytů, makrofágů a dendritických buněk. Současně se leptin podílí na proliferaci a migraci endoteliálních buněk, podporuje agregaci trombocytů a indukuje arteriální trombózu, čímž zvyšuje kardiovaskulární riziko u obézních jedinců (Ibrahim, 2010).

Naopak adiponektin působí protektivně, neboť vykazuje antiaterogenní, protizánětlivé, vazodilatační a antioxidační vlastnosti. Inhibuje expresi adhezivních molekul ve vaskulárním endotelu, potlačuje transformaci makrofágů na pěnové buňky a stimuluje produkci protizánětlivého IL-10. Adiponektin rovněž podporuje hnědnutí subkutánní bílé tukové tkáně (scWAT) a zvyšuje oxidaci lipidů ve svalech (Weisberg, McCann, 2003). Jeho hladiny jsou však výrazně sníženy u jedinců s abdominální obezitou (Ibrahim, 2010).

IL-6 patří mezi regulátory zánětlivé odpovědi. Jeho produkce ve WAT přispívá k zvýšení vaskulárního zánětu, inhibici inzulínové signalizace a stimulaci syntézy C-reaktivního proteinu (CRP), který je důležitým markerem systémového zánětu (Ibrahim, 2010).

TNF- α vykazuje protiatrogenní vlastnosti, podílí se na progresi vaskulárního zánětu a inzulínové rezistence (IR), přičemž jeho hladiny úzce korelují s přítomností abdominální obezity (Ibrahim, 2010). TNF- α a IL-6 rovněž zvyšují genovou expresi leptinu, zatímco adiponektin tyto změny inhibuje (Ibrahim, 2010).

Dalším významným regulátorem metabolických procesů je oxid dusnatý (NO), který může být produkován v BAT. NO hraje zásadní roli v regulaci adipogeneze, jelikož inhibuje proliferaci a diferenciaci preadipocytů. Kromě toho působí parakrinně na vaskulární buňky BAT, čímž podporuje vaskularizaci této tkáně a zlepšuje její perfuzní kapacitu (Ghesmati, Rashid *et al.*, 2023).

ADIPOKINY	FUNKCE
MCP1	obecně prozánětlivý, stimuluje infiltraci a aktivaci makrofágů
TNF- α	obecně prozánětlivý, podílí se na rozvoji chronického zánětu a inzulínové rezistence
IL-6	obecně prozánětlivý, podílí se na rozvoji chronického zánětu, stimuluje syntézu CRP
leptin	nejvýznamnější funkce jsou udržování energetické homeostázy, regulace příjmu potravy, současně může zvyšovat riziko KVO

Adiponektin	protektivní adipokin, prozánětlivé a antioxidační vlastnosti, indukuje vazodilataci, podporuje hnědnutí scWAT
NO	Protektivní adipokin, podporuje vaskularizaci a vazodilataci, zlepšuje perfuzní kapacitu BAT

Tabulka. č. 2 – Seznam a funkce vybraných adipokinů. Adipokiny vyobrazené červeně jsou převážně označovány jako prozánětlivé, adipokiny označené zeleně jsou označovány jako protektivní.

Celkově lze adipokiny považovat za klíčové mediátory metabolické homeostázy a zánětlivých procesů, jejichž dysregulace je úzce spjata s rozvojem obezity, metabolického syndromu a KVO.

1.1.5. SHRnutí

Tuková tkáň je specifický typ pojivové tkáně s významnou metabolickou a endokrinní funkcí. Dělí se na WAT a BAT, které se liší morfologií, funkcí a metabolickou aktivitou. WAT slouží především jako energetický rezervoár a podílí se na hormonální regulaci, BAT naopak hraje klíčovou roli v termogenezi a energetickém metabolismu. S věkem dochází ke změnám v distribuci a funkci tukové tkáně, což může ovlivnit metabolické zdraví a přispívat k rozvoji obezity či metabolických onemocnění. Aktivace BAT a indukce hnědnutí WAT jsou proto zkoumány jako možné terapeutické strategie. Tuková tkáň se rovněž podílí na patogenezi aterosklerózy prostřednictvím produkce adipokinů, což zdůrazňuje její komplexní roli v regulaci organismu.

1.2. LOKALIZACE TUKOVÝCH DEP

Bílá tuková tkáň je v organismu distribuována do dvou hlavních oblastí: subkutánní a viscerální. U myši je scWAT primárně lokalizována v posteriorní inguinální a v anteriorní axilární oblasti, zatímco u lidí se nachází převážně v abdominální, femorální a gluteální oblasti, přičemž gluteální distribuce je výraznější u žen než u mužů. Viscerální tuková tkáň (VAT) se u myši vyskytuje zejména v perigonadální oblasti (epidymální depo u samců, periovariální u samic, kde slouží hlavně jako polštářek ochraňující reprodukční orgány a jako zásobárna lipidů), perirenálně a v menší míře mesentericky a omentálně. Vzhledem k tomu, že mesenterická a omentální depa jsou u myši zanedbatelná, je ve výzkumu nejčastěji využíváno perigonadální depo. Naproti tomu u lidí gonadální bílá tuková tkáň (gWAT) téměř chybí a viscerální tuk se místo do gWAT primárně ukládá do omentální, mesenterické, perirenální a perikardiální oblasti. Omentální VAT chrání orgány v oblasti břišní dutiny

a slouží jako mechanická ochrana před infekcí, jelikož obsahuje četné makrofágy, B a T lymfocyty. Mesenterické depo obklopuje střeva a jeho funkce je u lidí i myši podobná depu omentálnímu (Chusyd, Wang *et al.*, 2016; Borgeson, Boucher *et al.*, 2022).

1.2.1. SUBKUTÁNNÍ TUKOVÁ TKÁŇ

scWAT tvoří u myši 51 % celkového tělesného tuku (Giordano, Cinti *et al.*, 2022) a u lidí přibližně 80 % celkového tělesného tuku. V době zvýšeného příjmu kalorií a jejich nedostatečném výdeji slouží scWAT jako fyziologický pufr, který přebytečnou energii ukládá. Kapacita scWAT však není neomezená. S věkem nebo při obezitě se schopnost adipocytů expandovat snižuje, a zároveň se nevytváří dostatek nových tukových buněk. Jakmile dojde k naplnění kapacity scWAT, začne se lidem přebytečný tuk akumulovat do jiných oblastí, včetně VAT, jater a myokardu. U myši je dominantním depem hlavně perigonadální VAT, ale tuk se u nich může ukládat i do perirenálních oblastí (Goncalves, Machado *et al.*, 2017; Borgeson, Boucher *et al.*, 2022).

1.2.2. VISCERÁLNÍ TUKOVÁ TKÁŇ

Zastoupení VAT se výrazně liší v závislosti na pohlaví. U hlodavců autoři studie udávají, že u samců tvoří VAT přibližně 80 % (scWAT v tomto případě 20 %), a u samic okolo 60 % (Clegg, Brown *et al.*, 2006). VAT tvoří u člověka přibližně 10-20 % celkového tělesného tuku u mužů a 5–8 % u žen, přičemž s přibývajícím věkem její podíl narůstá. Od scWAT se liší vyšším počtem adipocytů, které dosahují větší velikosti. U myši i lidí je tkáň intenzivněji vaskularizovaná a inervovaná a obsahuje větší počet imunitních buněk (Ibrahim, 2010). Z tohoto důvodu je VAT částečně označována jako tkáň s výrazně prozánětlivým profilem. Tento pohled však zdaleka nepostihuje celou složitost její role v organismu, jelikož VAT obsahuje i regulační T-lymfocyty (Treg), které zánětlivé procesy tlumí. Treg přispívají k rovnováze mezi klasicky a alternativně aktivovanými makrofágy, přičemž produkcí IL-10 snižují expresi zánětlivých genů a dokáží navrátit fyziologickou expresi glukózovému transportéru, čímž podporují transport glukózy přes glukózový transportér typu 4 (GLUT-4) a zlepšují inzulinovou senzitivitu (Li, Spallanzani, Mathis, 2019).

1.2.3. BUNĚČNÉ TYPY VE VISCERÁLNÍ TUKOVÉ TKÁNI

Ve viscerální tukové tkáni se nachází různorodá populace buněk, zahrnující: preadipocyty (představují prekurzory zralých adipocytů), mezenchymální kmenové buňky (schopné diferenciaci na osteoblasty, chondrocyty, myoblasty a buňky pojivové tkáně, včetně

adipocytů), dále buňky imunitního systému (neutrofilní granulocyty, lymfocyty a makrofágy, o nichž bude v této kapitole zmínka – obecně platí, že u obézních jedinců dochází ke zvýšené infiltraci makrofágů, které produkují prozánětlivé cytokiny, jako jsou TNF- α , IL-6, IL-8). Kromě toho jsou v tukové tkáni přítomné také endoteliální buňky vystýlající cévní struktury a klíčovou buněčnou složku této tkáně tvoří zralé adipocyty (Chun, 2021).

Obézní jedinci vykazují zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů a ačkoli se předpokládalo, že tyto molekuly jsou produkovány primárně viscerálními adipocyty, tato hypotéza nezohledňuje komplexní buněčné interakce v tukové tkáni. Autoři Weisberg, McCann a kol. na myším modelu ukazují, že počet makrofágů v tukové tkáni pozitivně koreluje s indexem tělesné hmotnosti (BMI) a velikostí adipocytů, a současně potvrdili, že právě makrofágy by mohly být hlavním zdrojem prozánětlivých mediátorů (Weisberg, McCann *et al.*, 2003). Adipocyty však stále přispívají k produkci zánětlivých cytokinů, nicméně s přítomností makrofágů se jejich koncentrace o to víc zvyšuje, což dále přispívá k patologickým následkům obezity.

Principem může být zvýšená hypertrofie adipocytů. Jakmile adipocyt dosáhne své maximální hypertrofické kapacity, jeho funkční schopnosti se začnou omezovat. V tukové tkáni se začne výrazně produkovat MCP1, který zajistí rekrutaci monocytů z krevního řečiště. Odtud monocyty diapedézou migrují přímo do tukové tkáně, kde podléhají diferenciaci na CD11c⁺ prozánětlivé makrofágy (CD11c = integrin alfa X). CD11c⁺ makrofágy se shlukují v okolí umírajících adipocytů, kde tvoří tzv. “*crown-like structures*” (CLS). Jejich hlavní funkcí je mrtvé adipocyty fagocytovat (včetně jejich lipidových kapének), přičemž tento proces vede k přeměně makrofágů na pěnové buňky. Ačkoliv jsou pěnové buňky typicky spojovány s patologickými stavy (jakým je např. ateroskleróza) fagocytóza takto poškozených adipocytů může plnit i benefiční roli. Umožní odstranění dysfunkčních adipocytů, čímž vytváří prostor pro diferenciaci nových, zdravých adipocytů. Studie autorů Strissel, Stancheva a kol. prokázala, že infiltrace prozánětlivých makrofágů není mezi jednotlivými tukovými depy rovnoměrná. Například inguinální (subkutánní) depo u myši vykazuje výrazně vyšší rezistenci vůči makrofágové infiltraci v porovnání s epididymálním nebo intraabdominálním (viscerálním) depem. Tento rozdíl může být dán vyšší mírou hypertrofie adipocytů právě ve viscerálních oblastech. Další studie autorů Medrikova, Jilkova a kol. toto tvrzení také potvrzuje. V subkutánních depech dosahuje makrofágová infiltrace u samců krměných HFD přibližně 2 %, ale 12 % v gWAT. U myši na standardní dietě byla infiltrace makrofágy zanedbatelná (téměř nulová) (Medrikova, Jilkova, Bardova *et al.*, 2011). Obecně lze tedy konstatovat, že viscerální tuková depo vykazují vyšší susceptibilitu

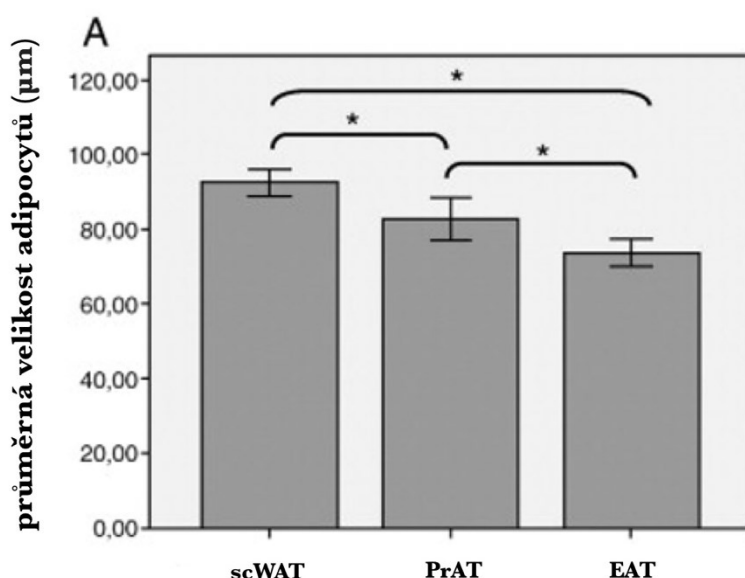
k infiltraci CD11c+ prozánětlivými makrofágy a akumulaci prozánětlivých cytokinů (Strissel, Stancheva *et al.*, 2007). Makrofágy proto významně ovlivňují zánětlivé prostředí ve VAT.

Komplexita VAT naznačuje také jisté paradoxy. U myších samců se v porovnání se samicemi vyskytovalo více Treg. Tato adaptace by mohla představovat ochranný mechanismus, který brání rozvoji viscerálního zánětu a metabolických komplikací. Nicméně pokud byli samci krmeni HFD, pak vykazovali zvýšenou akumulaci CD11c+ makrofágů v tukové tkáni, a zároveň se u nich rozvíjela glukózová intolerance, IR a hyperinzulinemie (Pettersson, Waldén *et al.*, 2012). Tyto výsledky vyvolávají otázky, proč přítomnost většího počtu Treg buněk ve VAT u neobézních samců nevede k efektivnější ochraně před zánětem a metabolickými komplikacemi. A také, pokud by platila hypotéza, že zvýšený zánět stimuluje expanzi Treg buněk (jako je tomu např. u alergických reakcí), proč u obézních myších samců nedochází k nárůstu Treg (a tím i k větší přítomnosti alternativně aktivovaných M2 makrofágů)?

Tato složitá dynamika mezi prozánětlivými a protizánětlivými procesy ve VAT nejen reflektuje roli této tkáně v metabolickém zdraví, ale také otevírá prostor nových možností pro terapeutické využití. Cílená expanze Treg v tukové tkáni by mohla představovat perspektivní přístup ke zmírnění zánětlivého prostředí a prevenci metabolického syndromu (Pettersson, Waldén *et al.*, 2012).

1.2.4. VELIKOST ADIPOCYTŮ JAKO ROZHODUJÍCÍ FAKTOR

Jak již bylo uvedeno, u myši se ve viscerálním depu nachází adipocyty o větší velikosti v porovnání s depem subkutánním, avšak u lidí je tento vztah opačný (subkutánní adipocyty bývají větší než viscerální). Přesto u obou organismů platí, že expanze scWAT je spojena s nižším metabolickým rizikem než expanze VAT (Borgeson, Baucher *et al.*, 2022; Johnson, Hirsch 1972). Co se týče zvýšené velikosti viscerálních adipocytů, tak zde platí, že buňky s vyšší velikostí vykazují sníženou citlivost na inzulín a omezenou schopnost efektivně ukládat volné MK a TAG, což vede k jejich ektopickému ukládání. Tento proces přispívá k rozvoji metabolických poruch, kam patří hyperglykemie, hyperinzulinemie a hypertriglyceridemie, a tím zvyšuje riziko vzniku diabetu a dalších metabolických onemocnění (Ibrahim, 2010). Patogeneze těchto stavů není ovlivněna pouze celkovým objemem tukové tkáně, ale zásadní roli zde hraje také velikost adipocytů a distribuce tukové tkáně v organismu. Velikost adipocytů a jejich lokalizace jsou klíčovými faktory určující protektivní či patogenní roli tukové tkáně.



Graf č. 1 – Průměrná velikost adipocytů u scWAT, PrAT a EAT u lidských pacientů (převzato a upraveno z (Bambace, Telesca et al., 2011)). scWAT, subkutánní bílá tuková tkáň; PrAT, peritoneální tuková tkáň, EAT, epikardiální tuková tkáň.

Jako příklad uvedu epikardiální tukovou tkáň (EAT je specifický podtyp VAT). Obsahuje adipocyty, které jsou signifikantně menší než adipocyty nacházející se v subkutánní nebo peritoneální tukové tkáni (PrAT) (zástupce viscerálního depa) (graf č. 1 u lidských pacientů). Velikost adipocytů v EAT je významným indikátorem patologických změn, neboť pozitivně koreluje s IR, vyšším zastoupením prozánětlivých cytokinů a negativně s expresí mRNA adiponektinu. Podobný vztah je pozorován i u scWAT, kde větší adipocyty souvisejí s vyšším rizikem vzniku IR a s konvergencí k zánětlivému fenotypu (Bambace, Telesca et al., 2011).

Velikost adipocytů i množství sekrece proinflamatorních molekul je variabilní mezi jednotlivými depy. Adipocyty v PrAT, které jsou u lidí menší než adipocyty scWAT, vykazují i přes svoji menší velikost vyšší sekreci prozánětlivých cytokinů. Tento paradox podtrhuje komplexnost vztahů mezi velikostí adipocytů a jejich metabolickou a endokrinní aktivitou (Bambace, Telesca et al., 2011). Diferenciace mezi jednotlivými tukovými depy je proto zásadní pro pochopení jejich role v metabolických a kardiovaskulárních onemocněních.

U zdravých lidí je obecně pozorováno, že subkutánní adipocyty zauímají větší velikost než adipocyty ve viscerálních depech, což je spojeno s nižším metabolickým rizikem. Velikost adipocytů je úzce spjata s celkovou tělesnou hmotností jedince. Expanze jak scWAT, tak VAT vede k nárůstu metabolického rizika, přičemž větší velikost adipocytů zvyšuje pravděpodobnost rozvoje metabolických poruch. Nicméně, velikost adipocytů není jediným determinantem rizika – jejich lokalizace do konkrétních oblastí také hraje klíčovou roli, jelikož viscerální depa jsou více spojována s patologickými následky.

1.2.5. SHRUTÍ

WAT se dělí na scWAT a VAT, přičemž obě hrají odlišnou roli v metabolismu a zánětlivých procesech. scWAT tvoří za fyziologického stavu u obou modelů většinu tělesného tuku a slouží jako primární energetický rezervoár, avšak při nadbytku energie se její kapacita vyčerpá a přebytečný tuk se přesouvá do VAT nebo se ukládá ektopicky. VAT obsahuje větší a metabolicky aktivnější adipocyty, je intenzivněji vaskularizovaná a má vyšší zastoupení imunitních buněk. U obézních jedinců dochází ke zvýšené infiltraci makrofágů a produkci prozánětlivých cytokinů, což přispívá k rozvoji IR a metabolických poruch. Tyto procesy mohou regulovat imunitní buňky, zejména Treg lymfocyty, které mohou zánět tlumit a zlepšovat inzulínovou senzitivitu. Celkový metabolický stav organismu také významně ovlivňuje distribuce tuku do konkrétních dep.

1.3. TUKOVÁ DEPA KOLEM SRDCE

Tuková tkáň plní řadu fyziologických funkcí, které významně ovlivňují srdce. Slouží jako energetická zásobárna, mechanická ochrana, termoizolační vrstva a zároveň ovlivňuje kardiomyocyty svou endokrinní (přes krevní oběh) a parakrinní (pasivní difuzí přes intersticiium a cytoplasmatické membrány) činností.

Energetická funkce tukové tkáně spočívá v ukládání TAG, které mohou být mobilizovány jako zdroj energie pro kardiomyocyty, jelikož až 70 % ATP produkce v srdci pochází právě z oxidace MK. Nadměrná akumulace lipidů však může vést k lipotoxickým a prozánětlivým účinkům, které přispívají k poškození kardiomyocytů, rozvoji srdeční hypertrofie a dysfunkce (Iacobellis, 2021; Salans, Cushman, Weismann, 1973).

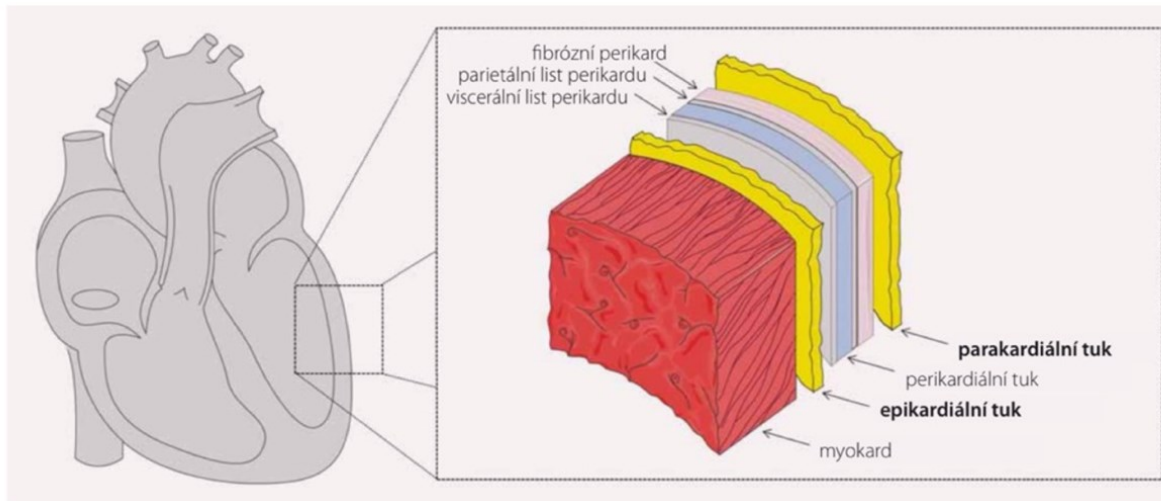
Tuková tkáň je lokalizována také v blízkosti cév, kde napomáhá udržovat jejich elasticitu během pulzujícího pohybu při systole a diastole. Tuk zde působí jako poddajná vrstva, která umožňuje cévám volnou roztažnost při pulzní vlně, což by v případě přítomnosti rigidnějšího vaziva nebylo možné (Lu, Jiang *et al.*, 2022).

Přestože má tuk obklopující srdce převážně unilokulární charakter, některé studie naznačují přítomnost UCP1 aktivní tkáně v epikardiálním depu, což by mohlo svědčit o její termogenní aktivitě. Nicméně, jak upozorňují ve své studii autoři Sack, Fain a kol., myokardiální kontrakce je dostatečným tepelným zdrojem (Sack, Fain *et al.*, 2013).

Tuková tkáň zároveň představuje endokrinní a parakrinní orgán, který ovlivňuje energetickou homeostázu, metabolismus glukózy, inzulínovou senzitivitu a zánětlivé procesy prostřednictvím sekrece adipokinů.

1.3.1. ANATOMICKÉ ROZLIŠENÍ TUKOVÉ TKÁNĚ KOLEM SRDCE

Tuková tkáň obklopující srdce se obecně řadí mezi VAT. V rámci konkrétní oblasti výskytu rozlišujeme tuk kolem srdce mezi intramyokardiální (IMAT), epikardiální, perikardiální (PAT), parakardiální (pCF) či perivaskulární (PVAT) (obr. č. 3, Histologický preparát č. 1 v kapitole 3.4.).



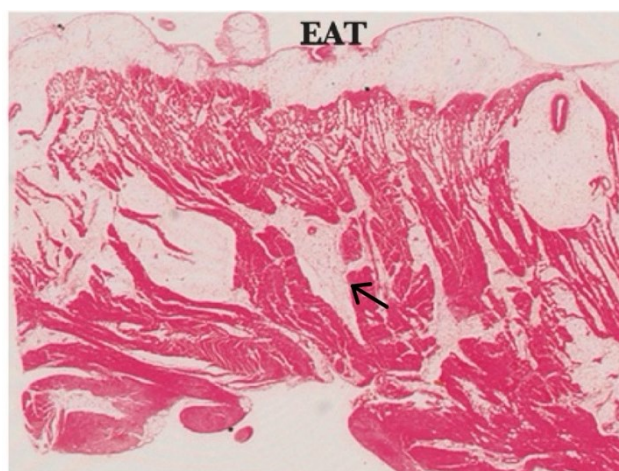
Obr. č. 3 – Schéma umístění EAT, PAT a pCF (převzato od (Souček, Novák, 2018)).

PAT je v publikacích zabývajících se lidskými pacienty často definována jako kombinace EAT a pCF, přestože se tyto tkáně liší jak embryologicky, tak anatomicky. Ačkoli EAT a PAT tvoří jen malé procento celkového tělesného tuku, jejich lokální parakrinní účinky mohou mít významný vliv na srdce a případný rozvoj KVO (EAT přímo přiléhá k myokardu, tudíž je úzce spojen i s vývojem KVO) (Mahabadi, Massaro *et al.*, 2009). Oproti tomu PAT a pCF jsou odděleny od myokardu vrstvami perikardu a mají odlišný embryonální původ. Zatímco EAT vzniká ze splanchnopleurického mezodermu a nachází se mezi myokardem a viscerálním perikardem, PAT pochází z thorakálního mezenchymu a leží mezi viscerálním a parietálním perikardem. pCF je také odvozen z thorakálního mezenchymu a nachází se za fibrózní vrstvou perikardu (Petrosino, Longenecker *et al.*, 2021; Yamaguchi, Cavallero *et al.*, 2015; Souček, Novák, 2018).

1.3.2. INTRAMYOKARDIÁLNÍ TUKOVÁ TKÁŇ

IMAT se nachází přímo v srdeční svalovině, kde plní fyziologickou roli jako zdroj energie a mechanická opora. Přesto tvoří méně než 1 % celkové hmotnosti srdce (Szczeplaniak, Dobbins *et al.*, 2003). Adipocyty v této tkáni se interkalují mezi kardiomyocyty, nezpůsobují zánětlivé reakce a nepřekážejí v srdeční funkci (obr. č. 4) (Kim, Choe, 2007).

S přibývajícím věkem dochází k postupnému nárůstu množství IMAT, což lze pozorovat zejména v pravé komoře (RV) srdce, méně často v komoře levé (LV) (Kim, Choe, 2007; Kimura, Matsuo *et al.*, 2010). U starších jedinců IMAT postupně infiltruje myokard od epikardu směrem k endokardu, což je považována za fyziologickou součást procesu stárnutí (viz obr. 4) (Kimura, Matsuo *et al.*, 2010; Lorin de la Grandmaison, Le Bihan, Durigon, 2001). Pokud dojde k excesivní akumulaci tukové tkáně, adipocyty mechanicky oddělují svalová vlákna, avšak kardiomyocyty nenahrazují (výjimkou je situace, kdy poškozený myokard např. v důsledku infarktu myokardu podléhá nahrazení fibrotickou tkání) (Kimura, Matsuo *et al.*, 2010).



Obr. č. 4 – Ukázka fyziologické akumulace IMAT (převzato a upraveno z (Kimura, Matsuo *et al.*, 2010)). Na obr. můžeme kromě EAT vidět i IMAT (šipka), který nezapříčiňuje zánět ani fibrotizaci tkáně. Barveno H&E, zvětšení 40x.

U obézních jedinců může dojít k nadměrné akumulaci tuku v myokardu, což vede k srdeční steatóze. Tento stav způsobuje funkční poškození srdce a může vyvolat srdeční selhání (SS) (van der Meer, Hammer *et al.*, 2007). Navíc, vzhledem k nízké regenerační schopnosti srdeční tkáně, dochází během stárnutí k poklesu počtu plně funkčních kardiomyocytů, zatímco objem IMAT narůstá (Olivetti, Melissari *et al.*, 1991; Tansey, Aly, Sheppard, 2005).

1.3.2. PERIKARDIÁLNÍ TUKOVÁ TKÁŇ

Díky přímé návaznosti EAT na myokard je pravděpodobné, že EAT představuje důležitější depo v rozvoji srdečních onemocnění (Kim, Kim *et al.*, 2021), než PAT. Nicméně, studie autorů Rosito, Massaro a kol., 2008 ukázala rozdílné role EAT a PAT: zatímco EAT byl spojen s kalcifikací koronárních tepen, PAT souvisel s kalcifikací abdominální aorty, což podtrhuje rozdílné parakrinní účinky těchto tukových dep. U této studie však může být problém v definici, protože zkoumaný perikardiální tuk byl pravděpodobně perivaskulární.

Z tohoto důvodu bych ráda zmínila, že je nutné klást důraz na správné určení tukového depa, které sledujeme.

Přestože se EAT jeví jako hlavní hráč v patogenezi KVO, měření množství PAT zůstává užitečné díky jeho potenciálu sloužit jako biologický marker akumulace viscerálního tuku. Snadno se díky využití výpočetní tomografie (CT) kvantifikuje, což následně usnadňuje reprodukovatelnost studií (Rosito, Massaro *et al.*, 2008; Cheng, Dey *et al.*, 2010). Studie autorů Kim, Kim a kol. ukázala, že osoby s vyšší akumulací PAT byly staršího věku, častěji muži, konzumovaly vyšší množství alkoholu a cigaret, trpěly hypertenzí, DM2T, dyslipidemií, měly zvýšené hodnoty glukózy a cholesterolu v krvi a celkově měly vyšší riziko výskytu KVO (Kim, Kim *et al.*, 2021). Co se týče prevalence ischemické choroby srdeční (ISCH), z porovnávaných hodnot: BMI, obvod pasu (WC), množství PAT a VAT je PAT nejvíc asociovaná s výskytem ISCH, ale také se strukturálními a funkčními změnami srdce (Mahabadi, Massaro *et al.*, 2009; Kim, Kim *et al.*, 2021).

Studie autorů Hua, Chen a kol. ukazuje důležitost přesného umístění PAT. Autoři analyzovali lokalizaci PAT samostatně kolem LV i RV. Obě komory jsou vystaveny stejným systémovým faktorům, avšak lokální účinky PAT mohou být odlišné v závislosti na její poloze. Autoři udávají, že akumulace PAT je vyšší u RV v porovnání s LV, přičemž množství tukové tkáně nemusí korelovat s BMI – u obézních pacientů byl pozorován nižší obsah PAT než u pacientů s normálním BMI. Tento nálezn podporuje hypotézu, že konkrétní lokalizace tuku může být důležitější než jeho celkový objem. Autoři také nepotvrdili korelaci funkce LV se sérovými biologickými markery typu IL-6 a CRP, které bývají zvýšené u obézních jedinců a jsou spojovány se zánětem. To naznačuje, že působení tukové tkáně na LV je spíše z lokálního PAT, než z distálně naakumulované tukové tkáně (kde ještě závisí, zda se jedná o obezitu subkutánní, nebo viscerální) (Hua, Chen *et al.*, 2014).

Nahromadění PAT je spojeno s patologiemi, jako jsou např. hypertrofie LV a diastolická dysfunkce, a celkově představuje riziko alterace struktury LV. Což znamená, že by PAT mohla sloužit jako nový marker pro diagnostiku remodelace srdce (Kim, Kim *et al.* 2021).

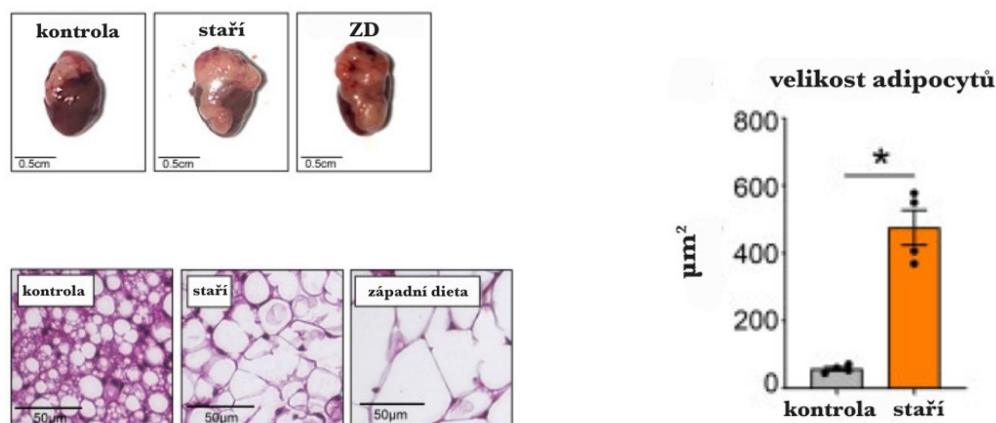
Vysoká přítomnost PAT ovlivňuje srdeční funkci i mechanicky, prostřednictvím ventrikulární interdependence. Tento jev popisuje situaci, kdy roztažení jedné komory ovlivňuje roztažitelnost komory druhé. U pacientů s vysokým obsahem PAT může docházet k restrikci expanze a kontrakce komory v důsledku omezeného prostoru v perikardiu, což ovlivní srdeční činnost (Zamani, 2024; Shaver, Reddy *et al.*, 2001).

Kvantifikace a další výzkum PAT tedy zůstávají důležitými oblastmi kardiovaskulárního výzkumu, včetně nutnosti správné nomenklatury jednotlivých srdečních tukových dep.

1.3.3. PARAKARDIÁLNÍ TUKOVÁ TKÁŇ

pCF představuje v dnešní době méně prozkoumané tukové depo, jejíž význam by neměl být přehlížen. Mnoho autorů pCF spojuje s PAT a EAT do jednoho srdečního depa, ačkoliv se depa liší v anatomické lokalizaci. pCF je odděleno od myokardu dvěma vrstvami perikardu a obklopuje srdce z jeho vnější strany (Souček, Novák, 2018).

Tuková tkáň obecně slouží nejen jako zásobárna energie, ale také jako sekreční orgán, který ovlivňuje lokální a systémový metabolismus. U obézních jedinců prochází pCF maladaptivní remodelací, která vede ke zvětšení velikosti adipocytů, změnám v sekrečním profilu tkáně směrem k inflamatornímu fenotypu, ke snížení mitochondriálního počtu a ke zhoršení metabolické flexibility. Tyto procesy pak zvyšují riziko rozvoje KVO, včetně vyššího rizika onemocnění koronárních artérií (CAD) (Petrosino, Longenecker *et al.*, 2021; Haberka, Machnik *et al.*, 2019; Ueda, Shiga *et al.*, 2018).



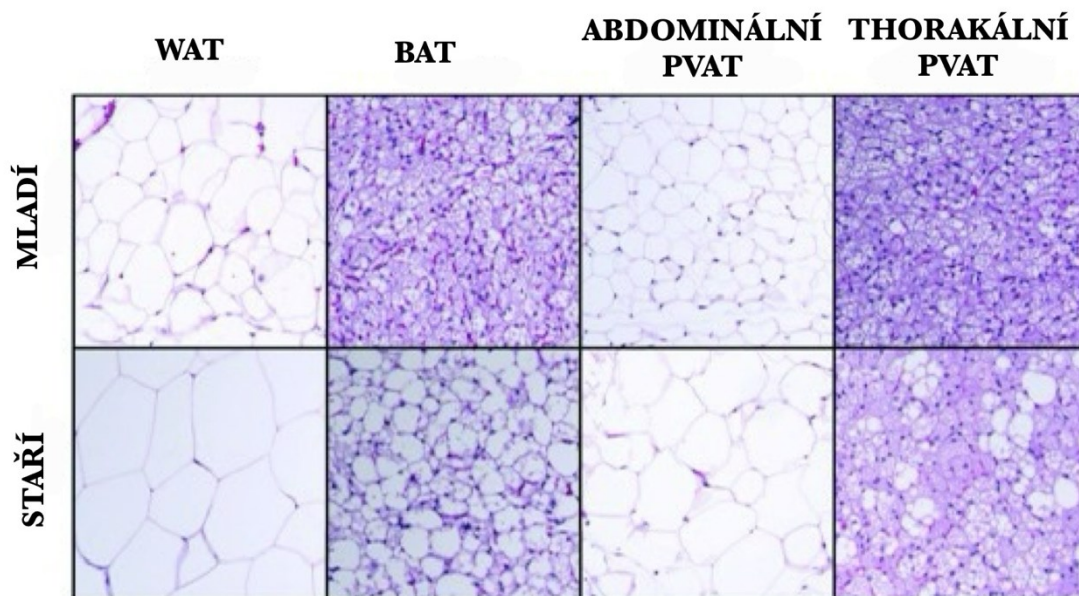
Graf č. 2 – Histologická analýza parakardiální tukové tkáně (převzato a upraveno z (Petrosino, Longenecker *et al.*, 2021)). ZD, západní dieta. Tkáň pro přípravu histologických preparátů byly odebírány z šestiměsíčních myši (kontrola), dvacetiměsíčních myši (staří) a skupina ZD byla šest měsíců stará a dvanáct týdnů krmena ZD.

Nárůst pCF je u myši asociován se stárnutím a s konzumací HFD. Objem pCF také pozitivně koreluje s WC a BMI a u lidí je jeho zvýšený objem nejčastěji spojován s obezitou. Studie autorů Petrosino, Longenecker a kol. histologickými technikami prokázala změnu parakardiálních adipocytů, kdy u obézních jedinců převažují unilokulární adipocyty oproti smíšenému výskytu multilokulárních i unilokulárních adipocytů v kontrolních vzorcích (graf č. 2) (Petrosino, Longenecker *et al.*, 2021).

Tyto nálezy podtrhují důležitost parakardiálního tuku jako regulátoru kardiometabolického zdraví prostřednictvím prozánětlivého fenotypu. Ačkoliv se pCF liší od jiných tukových dep asociovaných se srdcem, je stále často zaměňován s EAT či PAT. Zvýšený objem pCF pozitivně koreluje s obezitou, vyšším BMI a WC, přičemž adipocyty mění svůj fenotyp v závislosti na věku, či dietní intervenci.

1.3.4. PERIVASKULÁRNÍ TUKOVÁ TKÁŇ

PVAT obklopuje cévní systém, což má následky jak mechanické, tak humorální (ať již díky difuzi adipokinů k cévní stěně, nebo *vasa vasorum*). Nejen, že poskytuje vaskulatuře mechanickou ochranu, ale přes parakrinní a endokrinní mechanismy reguluje vaskulární tonus a ovlivňuje fyziologické i patologické procesy v cévní stěně. Zdravá PVAT vykazuje protektivní účinky, včetně antikontraktilního efektu zprostředkovaného pomocí adiponektinu, NO aj. vasodilatačních adipokinů, čímž podporuje optimální funkci cévního endotelu. Nicméně její dysfunkce, spojená s metabolickými poruchami, hypertenzí, obezitou nebo stárnutím, se významně podílí na rozvoji vaskulárních onemocnění, zejména aterosklerózy (Queiroz, Sena, 2020).



Obr. č. 5 – Histologické porovnání thorakální a abdominální PVAT (převzato a upraveno z (Padilla, Jenkins et al., 2013)). Histologické snímky zachycují epididymální WAT, subskapulární BAT, abdominální a thorakální PVAT u mladších a starších potkanů. Barvení H&E. 10x zvětšeno.

Periaortální adipocyty zaujímají u člověka uniloculární fenotyp (Gao, Zeng et al., 2005), avšak PVAT u hlodavců vykazuje variabilitu v morfologii a funkci podle toho, v jaké oblasti aorty se nachází. Thorakální PVAT (tPVAT) má u hlodavců multiloculární charakter, zatímco v abdominální části aorty najdeme adipocyty uniloculární (viz obr. č. 5). tPVAT

produkuje protizánětlivé cytokiny a mRNA pro UCP1, zatímco abdominální PVAT se vyznačuje tvorbou prozánětlivých molekul, jako jsou leptin, TNF- α a IL-6 (Padilla, Jenkins *et al.*, 2013).

Stárnutí, obezita aj. patologické procesy způsobují významné strukturální a funkční změny PVAT, zejména zvýšení objemu PVAT, hypertrofii adipocytů, přesun fenotypu od multilokulárního na unilokulární, a s tím i změnu v sekreci cytokinů proinflamatorním směrem. Zvýšená produkce prozánětlivých adipokinů přispívá k rozvoji aterosklerotických změn, vaskulární hypertenze, oxidativního stresu, remodelace cévní stěny a dalších KVO: konkrétní senescentní změny zahrnují hypertrofii subintimy a medie – tj. ztlustění cévní stěny, hromadění kolagenu, degeneraci elastinu a kalcifikaci, čímž cévní stěna ztrácí svou pružnost (Queiroz, Sena, 2020).

Tuková tkáň, včetně PVAT, obsahuje kromě adipocytů i další buněčné populace, které mohou mít dalekosáhlejší důsledky na organismus. Jednou z buněčných populací jsou makrofágy, konkrétně makrofágy asociované se sympatickými neurony (SAMs), které ovlivňují metabolismu norepinefrinu (NE). SAMs jsou schopny vychytávat NE prostřednictvím transportéru Solute Carrier Family 6 Member 2 (Slc6a2) a následně jej degradovat pomocí enzymu monoaminoxidázy A (MAOA), avšak samy nejsou schopny NE syntetizovat (Pirzgalska, Seixas *et al.*, 2017). Aktivace sympatického nervového systému vede ke zvýšení transportu NE do SAMs a změně jejich fenotypu k prozánětlivým směrem. Vychytávání NE má také vliv na cévní tonus, neboť omezuje dostupnost NE pro hladkou svalovinu cév, což snižuje vazokonstrikční odpověď (Ayla-Lopez, Jackson *et al.*, 2015; Queiroz, Sena, 2020).

1.3.5. EPIKARDIÁLNÍ TUKOVÁ TKÁŇ

EAT představuje specifickou formu viscerálního tuku, která se u myšího modelu téměř nevyskytuje. U člověka tvoří přibližně 20 % hmotnosti srdce a může pokrývat až 80 % jeho povrchu (Antonopoulos, Antoniadis, 2017). Největší akumulace je v oblasti *sulcus atrioventricularis* a *interventricularis* a podél hlavních větví koronárních arterií (Conte, Petraglia, *et al.*, 2022; Sedmera, Bardova *et al.*, připravuje se 2025). S přibývajícím věkem dochází k jejímu ztlušťování. U osob starších 65 let je EAT o 22 % větší ve srovnání s mladšími jedinci, přičemž nárůst je výraznější u žen (+17 %) (Abbara, Desai *et al.*, 2006).

Histologicky se epikardiální adipocyty jeví unilokulárně, avšak studie autorů Sack, Fain a kol. prokázala expresi genu pro UCP1. Zda má EAT významnou termogenní aktivitu, zůstává otázkou, nicméně pravděpodobnější funkcí je tepelná izolace a mechanická ochrana

srdečních struktur před tenzí a torzí způsobenou srdečními kontrakcemi a pulsací cév, jelikož o tvorbu tepla se postará samotná činnost kardiomyocytů (Sacks, Fain *et al.*, 2013).

Díky sdílené mikrocirkulaci s myokardem EAT nejen poskytuje energii pracujícím kardiomyocytům ve formě volných MK, ale zároveň chrání srdce před jejich nadměrnou expozicí tím, že je ukládá (Venteclef, Guglielmi *et al.*, 2015). Tímto způsobem může omezovat lipotoxické účinky MK, které by mohly přispívat k rozvoji srdeční dysfunkce.

EAT je také aktivním endokrinním a parakrinním orgánem. Komunikuje s myokardem prostřednictvím sekrece adipokinů, ale tento mechanismus může mít i patologické následky, zejména pokud EAT vykazuje prozánětlivý fenotyp (což je patrné u pacientů s obezitou a diabetem). Mezi epikardiální adipocyty interkalují imunitní buňky, které produkují prozánětlivé cytokiny (zejména TNF- α a IL-6), a tím přispívají k rozvoji aterosklerotických procesů. Nicméně parakrinní a endokrinní komunikace probíhá také “opačným směrem”, tedy mezi srdcem a EAT, pomocí tzv. “*reverse signaling*”. Tento fenomén byl pozorován u pacientů s koronární aterosklerózou a SS, u kterých kvůli výskytu KVO dochází ke změně genové exprese v EAT směrem k prozánětlivému fenotypu (Shimabukuro, Hirata *et al.*, 2013; Burgeiro, Fuhrmann *et al.*, 2016). Proteomická analýza autorů Salgado-Somoza, Teijeira-Fernández a kol. navíc odhalila zvýšenou expresi redoxních proteinů, ve srovnání se scWAT, což naznačuje adaptaci EAT na zvýšený lokální oxidativní stres, pravděpodobně jako reakce na signály z myokardu (Salgado-Somoza, Teijeira-Fernández *et al.*, 2010).

Další významnou funkcí EAT je její úloha v srdeční automacii. EAT může infiltrovat do subepikardiálních vrstev a narušit elektro-mechanickou integritu kardiomyocytů, což může iniciovat vznik arytmií. Její objem je navíc považován za rizikový faktor pro rozvoj fibrilace síní (FS). U obézních jedinců EAT často hypertrofuje, což vede k mechanickému utlačování srdečních struktur (Mahajan, Lau *et al.*, 2015).

Proto je zvýšený objem EAT často asociován s vyšším kardiovaskulárním rizikem. Avšak problém vidím v jeho interpretaci v klinických studiích. Například studie autorů Mahabadi, Lehmann a kol. analyzovala vztah mezi objemem EAT a výskytem FS. Pokud byl měřen pouze absolutní objem EAT, byla nalezena silná asociace s FS. Avšak při zahrnutí velikosti levé síně (LA) tato souvislost ztratila na signifikanci, což naznačuje, že samotný objem EAT nemusí být nezávislým prediktorem FS (Mahabadi, Lehmann *et al.*, 2014).

Další aspekt, který komplikuje hodnocení EAT, je jeho nerovnoměrná distribuce kolem srdce. Regionální depa EAT se liší svým proteomem, transkriptomem a metabolickými vlastnostmi v závislosti na své lokalizaci. Například EAT obklopující LA se svými

vlastnostmi liší od EAT v okolí koronárních arterií, což může mít rozdílný dopad na srdeční fyziologii i patogenezi KVO (Iacobellis, 2022).

1.3.5. SHRNUTÍ

Tukovou tkáň obklopující srdce rozdělujeme na několik specifických dep, které se v literatuře mezi sebou často zaměňují. Každé z jednotlivých dep však vykazuje někdy podobné, ale někdy i charakteristické fyziologické i patologické vlastnosti. pCF je spojována se stárnutím a obezitou, přičemž její objem s věkem narůstá. PAT je častější u starších mužů se zhoršeným životním stylem a její zvýšený objem koreluje s prevalencí ISCH a se strukturálními i funkčními změnami srdce. EAT, vzhledem ke své anatomické blízkosti myokardu a koronárním arteriám, zásadně ovlivňuje srdeční funkci, avšak její studium u myších modelů je náročnější. IMAT se u starších jedinců vyskytuje fyziologicky, přičemž adipocyty nutně neoddělují svalová vlákna a nemusí vést ke zhoršení srdeční funkce. PVAT vykazuje morfologické a funkční rozdíly v závislosti na své lokalizaci v rámci cévního systému, přičemž se významně liší mezi hrudní a abdominální oblastí.

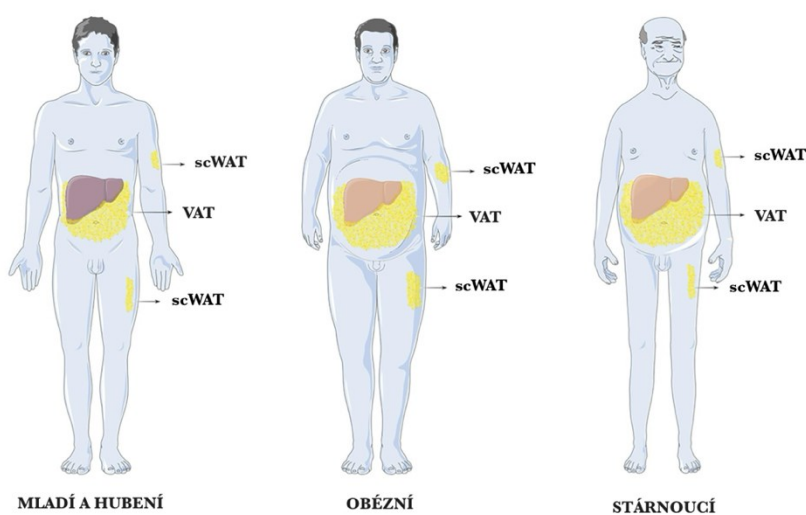
1.4. STÁRNUTÍ

Stárnutí je komplexní proces definován jako postupné, časově závislé zhoršování funkcí tkání a orgánů, které je doprovázeno změnami v tělesné kompozici, struktuře a funkci orgánů, energetickém metabolismu a endokrinních systémech (Owesny, Grune *et al.*, 2023).

1.4.1. VLIV STÁRNUTÍ NA TUKOVOU TKÁŇ

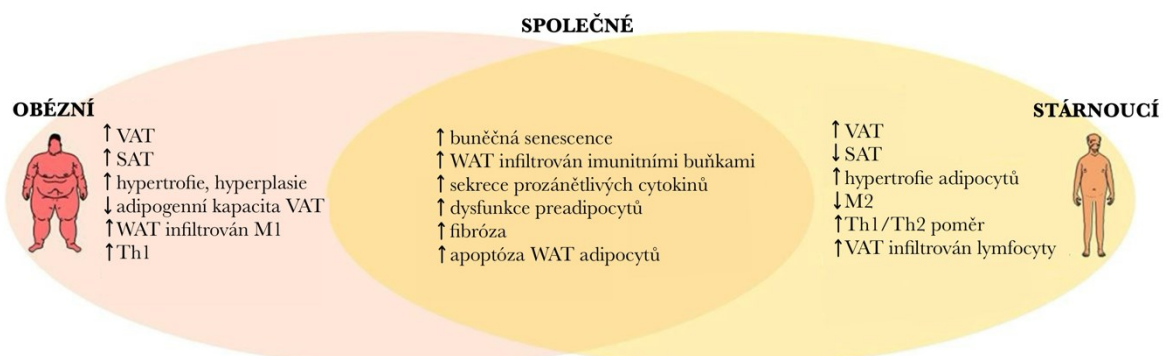
Tuková tkáň, která je největším endokrinním orgánem a klíčovým regulátorem energetické bilance, s přibývajícím věkem ztrácí svou funkčnost a stává se zdrojem chronických zánětlivých procesů, které dále ovlivňují zdraví celého organismu (Liu, Wu *et al.*, 2020). S přibývajícím věkem se tuková tkáň ze scWAT redistribuje do jiných oblastí (obr. č. 6) a kvůli přebytečnému hromadění MK ve formě TAG dochází k hypertrofii subkutánních adipocytů. Buňky však hypertrofovat nedovedou věčně, a tak se MK ukládají do viscerálních/ektopických dep. (Výraz “ektopické depo” je souhrnné označení pro oblast buněk netukového původu, která za fyziologického stavu obsahuje pouze omezený počet adipocytů. Během vysokého kalorického příjmu se oblasti zvětšují, což vede k přebytečné akumulaci tukových buněk v srdci, játrech, intraabdominálním (viscerálním) depu, pankreatu nebo kosterní svalovině.) (Gustafson, Smith, 2015; Lakowa, Trieu *et al.*, 2015). Z tohoto důvodu můžeme pozorovat redistribuci tukové tkáně – podkožní tuková tkáň se zmenšuje, zatímco viscerální narůstá.

Následkem hypertrofie je kromě redistribuce tuku i hypoxie adipocytů. Hypoxie spouští zánětlivé procesy, v jejichž důsledku adipocyty začínají produkovat větší množství prozánětlivých cytokinů, které rekrutují do místa zánětu imunitní buňky (Zhang, Ou *et al.*, 2023). Klasicky aktivované M1 makrofágy dále zvyšují produkci zánětlivých mediátorů. Tento stav, v angličtině označovaný jako „*low-grade systemic inflammation*“, postupně zasahuje i vzdálené orgány a přispívá k rozvoji metabolických onemocnění (Darsy, Tseng, 2019; Zoico, Rubele *et al.*, 2019).



Obr. č. 6 – Redistribuce tukové tkáně v závislosti na věku a obezitě (převzato a upraveno z (Reyes-Farias, Fos-Domenech *et al.*, 2021)).

Během stárnutí dochází také k útlumu funkce BAT (viz kapitola 1.3.1.), která ztrácí své termoregulační schopnosti snížením UCP1 aktivity, což přispívá k narušení metabolické rovnováhy a k dalšímu ukládání energie ve formě viscerálního tuku (další důsledky stárnutí viz obr. č. 7) (Wang, Xu, Li, 2022). Zároveň vytvořený zánět, doprovázený zvýšenou produkcí reaktivních kyslíkových forem (ROS), poškozuje mitochondrie a omezují respirační funkce buněk (Darcy, Tseng, 2019).



Obr. č. 7 – Společné znaky stárnutí a obezity (převzato a upraveno z (Reyes-Farias, Fos-Domenech *et al.*, 2021)).

Regulace zánětlivých procesů v tukové tkáni, podpora mitochondriálních funkcí nebo ovlivnění redistribuce tuku by mohly být účinnými strategiemi v boji proti metabolickým poruchám spojeným se stárnutím. Fyzická aktivita například dokáže zmenšit velikost adipocytů snížením obsahu lipidů v buňkách, zlepšit mitochondriální aktivitu a podpořit celkovou metabolickou rovnováhu (Gollisch, Brandauer, 2008).

1.4.2. VLIV EPIKARDIÁLNÍ TUKOVÉ TKÁNĚ NA STÁRNOUCÍ ORGANISMUS

Jak už bylo zmíněno, stárnutí je komplexní biologický proces, který je charakterizován změnami v tělesné kompozici, včetně redistribuce tukové tkáně. Tento proces je spojen s nárůstem viscerálního tuku, který přispívá k indukci *low-grade inflammation* – chronického, nízkostupňového zánětu, jenž hraje roli v patofyziologii KVO. V rámci VAT představuje EAT významnou tkáň v kardiovaskulárním systému. Díky své anatomické poloze přímo obklopuje myokard a koronární cévy a svou metabolickou aktivitou ovlivňuje srdeční tkáň prostřednictvím endokrinní, parakrinní a vasokrinní signalizace. Zvýšené množství EAT je spojováno s vyšším rizikem ISCH, FS, SS a kalcifikací koronárních cév. Tento negativní vliv je obzvláště výrazný u starších osob, kde dochází k progresivní akumulaci VAT i EAT, což z nich činí významné rizikové faktory kardiovaskulárních komplikací (Conte, Petraglia *et al.*, 2022).

EAT není pouhou zásobárnou energie, ale je vysoce metabolicky aktivní tkání, která produkuje široké spektrum prozánětlivých cytokinů a dalších mediátorů ovlivňujících srdeční tkáň. Mezi typické patří interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18), TNF- α , CRP a transformující růstový faktor beta (TGF- β). Tyto mediátory indikují výskyt zánětlivého mikroprostředí, které poškozuje tkáň a vede k jejich degeneraci, podporuje progresi aterosklerózy, myokardiální fibrózy a endoteliální dysfunkce koronárních cév. Studie autorů Gritsenko, Green a kol. poukázala na korelaci mezi tloušťkou EAT a hladinami prozánětlivých cytokinů, což dokládá její aktivní úlohu v patogenezi KVO (Gritsenko, Green *et al.*, 2020).

Zvýšený objem EAT přímo koreluje s hypertrofií LV, což potvrzuje význam této tkáně v patogenezi SS a diastolické dysfunkce. Se zvětšujícím se objemem EAT dochází k mechanickému tlaku na myokard, což může ovlivňovat diastolickou relaxaci srdeční svaloviny. Dalším mechanismem může být systémová souvislost, kdy vyšší objem EAT koreluje s větším množstvím VAT a vyšší celkovou tělesnou hmotností, což vede k větší srdeční zátěži. Také prozánětlivé a lipotoxické faktory produkované EAT podporují

myokardiální fibrózu, hypertrofii kardiomyocytů a endoteliální dysfunkci (Iacobellis, Ribaldo *et al.*, 2004; Iacobellis, Corradi, Sharma 2005; Iacobellis, Bianco, 2011). Studie autorů Austys, Dobrovolskij a kol. navíc prokázala pozitivní korelaci mezi hypertenzí a objemem EAT i u osob s fyziologickou tělesnou hmotností (Austys, Dobrovolskij *et al.*, 2019).

EAT úzce souvisí s metabolickým syndromem a IR. Studie autorů Mazzoccoli, Dagostino a Greco ukázala, že starší jedinci mají signifikantně vyšší objem EAT, přičemž tento nárůst souvisí s obezitou, vyšším množstvím VAT, dyslipidemií (vysoké množství lipoproteinu s nízkou hustotou (LDL), nízké množství lipoproteinu s vysokou hustotou (HDL), hypertriglyceridémie), arteriální hypertenzí, zvýšenými hladinami inzulínu a nižší inzulínovou senzitivitou. Pohlaví také hraje roli – muži mají v průměru více EAT než ženy (Mazzoccoli, Dagostino, Greco, 2012).

Asociace mezi EAT a metabolickým syndromem byla prokázána i ve studii autorů Kalmpourtzidou a kol. U pacientů s tloušťkou EAT >8 mm existuje pozitivní korelace s hladinami glukózy. Tato souvislost je klinicky významná, neboť IR, jakožto součást metabolického syndromu, přispívá k rozvoji hyperglykemie, endoteliální dysfunkce a proaterogenních změn, čímž dále posiluje roli EAT jako markeru kardiometabolického rizika. Zvýšený objem EAT může negativně ovlivňovat metabolismus glukózy, což vede k progresivnímu narušení glukózové tolerance, rozvoji IR a vzniku hyperglykemie. Dochází k aktivaci zánětlivých procesů a zvýšené stimulaci cévní stěny, což urychluje tvorbu aterosklerotických změn a může přispět i k rozvoji DM2T prostřednictvím poškození přívodných arterií k Langerhansovým ostrůvkům), čímž dochází k začarovanému kruhu metabolických a kardiovaskulárních dysfunkcí. Bez ohledu na to, zda se jedná o fyziologické nebo patologické stárnutí, obě formy jsou spojeny se změnami v distribuci tělesného tuku, včetně akumulace EAT. Monitorování EAT tak může představovat užitečný nástroj pro predikci rizika vzniku KVO, popř. jejich progresu (Kalmpourtzidou, Napoli *et al.*, 2024).

Z klinického hlediska byla zvýšená tloušťka EAT (>7 mm) spojena s častějším výskytem arteriální hypertenze, hyperlipidemie a hypertrofie LV. Současně studie Nabati, Favaedi a kol. identifikovala významnou asociaci mezi objemem EAT a kalcifikací aortální chlopně, což naznačuje její roli v progresi aortální stenózy (AS) (Nabati, Favaedi *et al.*, 2018). Bylo také prokázáno, že vyšší objem EAT je spojen s těžší formou koronární stenózy, což potvrzuje jeho úzký vztah k aterosklerotickým procesům (Iacobellis, Bianco, 2011).

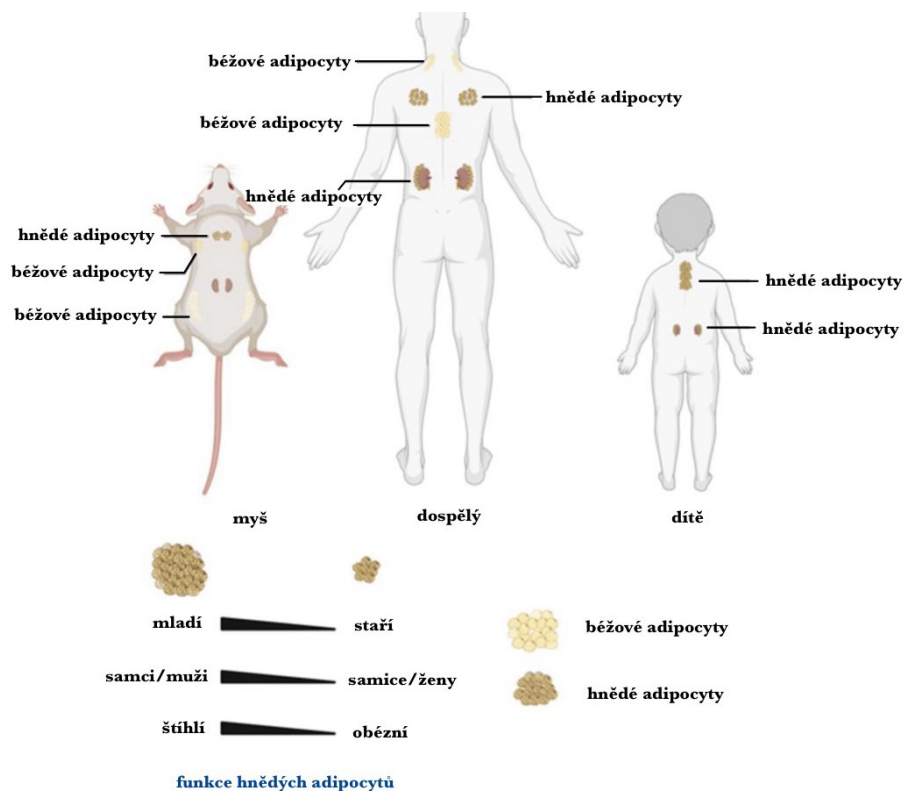
Jednou z výhod EAT jako markeru kardiometabolického rizika je možnost neinvazivního měření pomocí echokardiografie, jejíž výhody představují dostupnost, spolehlivost a reprodukovatelnost. Studie autorů Malavazos, Di Leo a kol. prokázala, že tloušťka EAT koreluje s objemem IMAT, která přímo ovlivňuje funkci srdce. To umožňuje včasnou identifikaci pacientů se zvýšeným rizikem KVO (Malavazos, Di Leo *et al.*, 2010).

EAT je metabolicky aktivní orgán, který hraje klíčovou roli v patogenezi KVO u stárnoucí populace. Její vazba na *low-grade inflammation*, IR, hypertrofii LV a aterosklerózu podtrhuje její význam jako markeru kardiometabolického rizika. Monitorování EAT může přispět k časně identifikaci rizikových pacientů a potenciálně sloužit jako terapeutický cíl při strategiích zaměřených na redukci VAT, zlepšení inzulinové senzitivity a snížení zánětlivé aktivity. Cílená redukce EAT by mohla představovat nový přístup v prevenci a léčbě KVO spojených se stárnutím.

1.4.3. VLIV STÁRNUTÍ NA HNĚDOU TUKOVOU TKÁŇ

Příčiny věkem podmíněného úbytku BAT zahrnují atrofické a funkční změny tkáně, včetně redukce objemu BAT (obr. č. 8) snížení mitochondriální funkce, poklesu exprese UCP1, změn v sympatické a endokrinní signalizaci. To vše vede ke snížení termogenní kapacity organismu (Zoico, Rubele *et al.*, 2019). Tento proces je doprovázen tzv. „zběláváním“ BAT, při kterém dochází k expanzi bílých tukových dep, akumulaci unilokulárních lipidových kapének v adipocytech, a tudíž zvětšení jejich průměru na úkor původních multilokulárních struktur (Goncalves, Machado *et al.*, 2017).

Stárnutí, obdobně jako obezita, je rovněž doprovázeno zvýšenou infiltrací makrofágů a nadměrnou akumulací TAG, což dále urychluje “zbělávání” BAT. Důsledkem těchto změn je omezená schopnost BAT reagovat na chladovou stimulaci, což je způsobeno poklesem exprese UCP1 a sníženou proliferační kapacitou buněk (Gao, Jiang, Wu, 2019). Tento s věkem asociovaný pokles termogenní aktivity je částečně způsoben zvýšenou produkcí prozánětlivých mediátorů a aktivací prozánětlivých imunitních buněk v tukové tkáni, jejichž přítomnost se s věkem zvyšuje a činí tak aktivaci UCP1 náročnější. Například MCP1 aktivuje M1 makrofágy, které produkují TNF- α (faktor inhibující expresi UCP1) podporující apoptózu adipocytů a narušující adrenergní signalizaci nezbytnou pro aktivaci BAT (Sakamoto, Nitta *et al.*, 2016). Čili “zbělávání” BAT poznáme pomocí infiltrace inflamatorních imunitních buněk do hnědé tukové tkáně, snížením počtu mitochondrií a intracelulárních lipidových kapének a sníženou expresí UCP1.



Obr. č. 8 – Výskyt tukových dep, které obsahují hnědé a béžové adipocyty (převzato a upraveno z (Zhang, He et al., 2022)).

U mladých a starých hlodavců může být rozdíl v aktivitě BAT způsoben hypertrofií nebo hyperplazií adipocytů, přičemž bylo prokázáno, že chladová expozice vyvolává u mladých jedinců v BAT výrazně vyšší buněčnou proliferaci než u starých (až 20násobně vyšší efektivita proliferace po chladové adaptaci). To naznačuje, že BAT ve stáří ztrácí schopnost proliferace. Nabízela by se tudíž hypotéza, že tento jev může být důsledkem změn v sympatické signalizaci. Jelikož NE ovlivňuje aktivitu a proliferaci adipocytů v BAT, tudíž alterace v sympatické signalizaci u starších hlodavců může ovlivnit proliferaci v tkáni (Florez-Duquet, McDonald, 1998).

Termogeneze v BAT je regulována sympatickým nervovým systémem. Dalo by se očekávat, že snížení sympatické aktivity s věkem povede k redukci aktivity BAT. Nicméně, autoři Florez-Duquet a McDonald ukazují, že s věkem se aktivita sympatického systému naopak zvyšuje. To naznačuje, že problém nespočívá v samotné nervové signalizaci, ale spíše v postreceptorových mechanismech odpovědi BAT na NE. U starých hlodavců byl po podání NE zaznamenán úbytek netřesové termogeneze v porovnání s mladými jedinci, což ukazuje na poruchy v signálních drahách nezbytných pro aktivaci UCP1. S věkem dochází i k poklesu denzity β -adrenergních receptorů, což může dále přispívat k nižší aktivitě BAT (Florez-Duquet, McDonald, 1998).

Kromě NE ovlivňují produkci UCP1 i další hormony, včetně kortikosteroidů, inzulinu a TH. Kortikosteron má inhibiční efekt na expresi UCP1, zatímco inzulin stimuluje

jeho produkci prostřednictvím aktivace sympatického nervového systému. TH jsou rovněž klíčové pro regulaci UCP1, avšak jejich účinek vyžaduje opět současnou přítomnost sympatického signálu (Florez-Duquet, McDonald, 1998).

Celkově lze říci, že změny související se stárnutím BAT, včetně snížení termogenní aktivity, zánětlivých procesů a poklesu termogenně aktivních adipocytů, představují významný faktor ovlivňující metabolické zdraví a schopnost organismu adaptovat se na chladové podmínky ve vyšším věku. Zpomalení těchto změn by mohlo mít terapeutický potenciál při prevenci metabolických onemocnění spojených se stárnutím a obezitou.

1.4.4. VLIV WAT A BAT NA KARDIOVASKULÁRNÍ ZDRAVÍ

Ateroskleróza je chronické onemocnění tepen spojené se zánětlivými změnami a ukládáním lipidů do cévní stěny. Nové poznatky naznačují, že významným faktorem je také tuková tkáň a její hormonální aktivita. Adipokiny, jako leptin a adiponektin, ovlivňují zánět a funkci cév, čímž mohou urychlovat aterosklerotické změny.

Formace ateromu je komplexní proces zahrnující klíčové buněčné a molekulární mechanismy. K zásadním momentům patří vazba a penetrace lymfocytů na vaskulární endotel, proliferace a migrace buněk hladké svaloviny do intimy cévní stěny a transendoteliální migrace makrofágů, které vedou k jejich akumulaci v aterosklerotickém plátu. Tento proces je spojen s obliterací cévy, tvorby trombů a sklerotizací, kdy ostré nánosy ateromu mohou způsobit poškození krevních destiček a tvorbu fibrinu (aktivní forma koagulačního faktoru I), což dále zvyšuje riziko trombózy (Tousoulis, Psarros *et al.*, 2014).

Zvířecí modely ukazují, že tuková tkáň, zejména sekretovaný leptin, hraje významnou roli v progresi koronární aterosklerózy. U prasat s metabolickým syndromem bylo prokázáno, že zvýšené hladiny leptinu v tukové tkáni obklopující koronární arterie zhoršují endoteliální dysfunkci tím, že snižují produkci NO prostřednictvím proteinkinázy C β (PKC- β), která fosforyluje endoteliální NO syntázu. Tuková tkáň, jako aktivní endokrinní orgán, produkuje řadu adipokinů, které ovlivňují patogenní mediátory aterogeneze, včetně chemotaxe, zánětu a endoteliální dysfunkce. Zvýšený objem PVAT a s ní spojená hypoadiponektinémie a chronický zánět představují silné rizikové faktory pro rozvoj koronární aterosklerózy. Riziko vzniku ICHS však není dáno pouze zvýšením prozánětlivých cytokinů, ale také snížením ochranných protizánětlivých adipokinů, zejména adiponektinu, jehož nízké hladiny jsou spojeny s vyšší pravděpodobností vzniku aterosklerotických změn (Payne, Borbouse *et al.*, 2011).

1.4.5. SHRnutí

Stárnutí je komplexní biologický proces charakterizovaný změnami v tělesné kompozici, metabolické aktivitě a funkci orgánů, přičemž významně ovlivňuje tukovou tkáň. Dochází k redistribuci tuku se zvýšením VAT, což přispívá k rozvoji tzv. *low-grade inflammation*, metabolické dysfunkci a kardiovaskulárním komplikacím. Hypertrofie adipocytů, ektopická akumulace lipidů a zánětlivá aktivace imunitních buněk přispívají k nárůstu IR, endoteliální dysfunkce a aterosklerózy. Zvláště pak přispívá EAT, která svou endokrinní a parakrinní aktivitou negativně ovlivňuje srdeční tkáň a přispívá k hypertrofii LV, fibróze myokardu a progresi koronárních onemocnění. Současně dochází ke snížení funkce BAT, což dále narušuje energetickou homeostázu. Klinicky je zvýšený objem EAT asociován s vyšším rizikem SS, ICHS a metabolického syndromu, což zdůrazňuje jeho význam jako markeru kardiometabolického rizika.

1.5. RIZIKO PŘÍTOMNOSTI NADMĚRNÉHO MNOŽSTVÍ EAT

EAT představuje specifickou oblast viscerálního tuku, která svou anatomickou blízkostí významně ovlivňuje myokard, a to nejen mechanicky, ale také prostřednictvím přímého vlivu na buněčné procesy. Nadměrná akumulace EAT je spojena se srdeční dysfunkcí, steatózou a zvýšeným rizikem výskytu KVO a její množství se zvyšuje s narůstajícím věkem a obezitou.

1.5.1. OBEZITA JAKO SYSTÉMOVÝ RIZIKOVÝ FAKTOR

Obezita je multifaktoriální onemocnění, které je charakteristické změnami v tělesné kompozici, funkci orgánů, zánětlivých markerech a energetickém metabolismu (Wang, Liao, 2012). Metabolické změny úzce spojeny s obezitou jsou např. hyperlipidemie, hyperglykemie, IR, hyperinzulinemie, hypertenze, DM2T a další. Tyto komorbidity zvyšují riziko KVO (Calligaris, Lecanda *et al.*, 2013), proto je nutné správně diagnostikovat pacienty a vyhnout se případnému riziku dopadu obezity na jejich zdraví.

Podle Světové zdravotnické organizace je obezita definována jako abnormální akumulace tukové tkáně vedoucí k poškození zdraví. Nejčastěji se klasifikuje pomocí BMI (Owesny, Grune, 2023), který však neposkytuje přesné informace o poměru tukové a netukové hmoty. Z tohoto důvodu je vhodnější využít poměr obvodu pasu k obvodu boků (WHR), které lépe vystihuje množství VAT (Lee, Pedley *et al.*, 2018). Proto je lepším markerem viscerální obezity než BMI a zároveň prediktorem metabolického profilu, tudíž poskytuje spolehlivější obraz o zdravotním stavu pacienta. Přesto je i toto měření omezeno svou schopností přesně kvantifikovat viscerální tuk, zejména u morbidně obézních

nebo starších jedinců, kde může být měření ovlivněno nadbytkem scWAT (Mazzocoli, Dagostino *et al.*, 2012).

1.5.2. PROČ JE NUTNÉ SLEDOVAT VAT

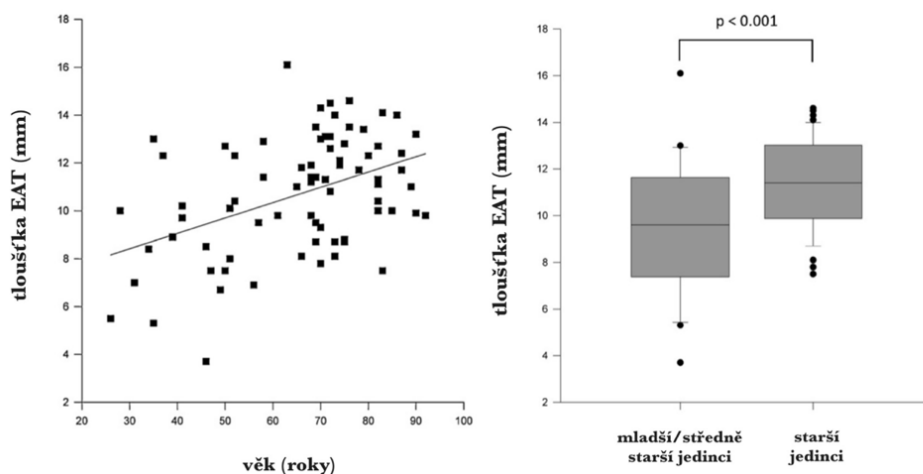
Nejrizikovější skupiny pacientů pro akumulaci viscerální tukové tkáně jsou obézní a stárnoucí populace. Stárnutí je přirozený proces spojený s řadou změn, včetně zvýšeného hromadění VAT. VAT je zdrojem prozánětlivých a profibrotických molekul – jako příklad bych chtěla uvést osteopontin (OPN), jehož hladiny se během stárnutí zvyšují. OPN podporuje proliferaci fibroblastů a přispívá k depozici extracelulární matrix v srdeční tkáni, což vede k hypertrofii a fibrotizaci. Studie autorů Sawaki a kol. ukázala, že odstranění VAT může snížit fibrotizaci a obnovit srdeční funkci (Sawaki, Czibik *et al.*, 2018).

OPN je jen jedna z mnoha molekul, které viscerální tuk produkuje a alteruje tak fyziologické funkce v srdeční tkáni. Je nezbytné si uvědomit, že VAT ovlivňuje organismus primárně svou anatomickou přítomností – nepůsobí pouze systémově, ale lokálně (Lima-Martínez, Blandenier *et al.* 2012). Na rozdíl od scWAT, kde expanze probíhá především hyperplasií adipocytů, je růst VAT charakterizován především hypertrofickým zvětšováním buněk, která může (jak bylo uvedeno v kapitole 1.2.3) podporovat infiltraci prozánětlivých markofágů. Navíc, musíme brát v potaz i žilní drenáž VAT – viz “portální teorie”, kterou pomohli potvrdit autoři studie Rytka, Wueest a kol. Zatímco scWAT odvádí své metabolické produkty (jako jsou adipokiny nebo volné MK) do systémové cirkulace prostřednictvím duté žíly, VAT je u lidí napojena na portální oběh (u myši tvoří největší VAT depo gonadální tuk, který na portální oběh napojen není – ale autoři zde transplantovali epididymální tukové depo do mesenteria, které už na portální oběh napojen je). Důsledkem tohoto uspořádání dochází k přímému exponování jater vyšším koncentracím volných MK a prozánětlivých cytokinů (pocházejících jak z VAT, tak z gastrointestinálního traktu), což má zásadní dopady na jaterní metabolismus, včetně rozvoje IR (Rytka, Wueest *et al.*, 2010). Proto každé viscerální depo představuje lokální modulační efekt na danou oblast, jelikož se nachází v blízkosti jednotlivých orgánů. Proto má pro organismus VAT mnohem významnější patofyziologické následky než nadměrná akumulace scWAT.

1.5.3. PROČ EAT PŘEDSTAVUJE RIZIKO

EAT vytváří specifickou oblast viscerálního tuku, která přímo obklopuje srdeční struktury a ovlivňuje kardiovaskulární funkce. Její množství a distribuce se liší mezi jedinci v závislosti na genetických faktorech, etnicitě, pohlaví a věku, avšak přesné mechanismy, které tyto rozdíly určují, zůstávají dosud nejasné. Studie autorů Mazzocoli, Dagostino a kol. ukázala,

že množství EAT přímo koreluje s mírou obezity a zároveň se s věkem zvyšuje, což naznačuje pozitivní vztah mezi stárnutím a tloušťkou EAT (graf č. 3) (Mazzoccoli, Dagostino *et al.*, 2012).



Graf č. 3 – Množství EAT se zvyšuje s narůstajícím věkem (převzato a upraveno z (Mazzoccoli, Dagostino *et al.*, 2012)).

Obezita a stárnutí přispívají nejen k nárůstu EAT, ale i k jeho potenciálním patologickým účinkům na kardiovaskulární systém. Excesivní množství MK dopravovaných do myokardu přetíží jeho kapacitu pro oxidaci MK, které se začnou do myokardu ukládat (nehledě na infiltraci adipocytů do myokardu) a výsledkem je dysfunkce kardiomyocytů a srdeční steatóza (Iacobellis, 2023). Narušená oxidace MK, a tedy i zvýšená akumulace MK, může vést k hypertrofii LV. Pokročilé změny, jako je fibróza a apoptóza kardiomyocytů, mohou narušit diastolickou relaxaci a plnění srdce, což v konečném důsledku ovlivňuje i jeho systolickou funkci. Tyto stavy byly pozorovány u morbidně obézních pacientů, u nichž je zvýšený objem EAT spojen se zvětšením LV a RV a poškozením diastolického plnění a relaxací (Iacobellis, Ribaudó *et al.*, 2004). Naopak jedinci se subkutánní obezitou mají menší objem EAT a jejich LV změny nejsou tak výrazné. Jelikož se EAT nachází i v oblasti předsíní a oušek, může jeho nadměrná akumulace představovat fyzickou překážku, což zabrání efektivní dilataci předsíní a ovlivní plnění komor (Iacobellis, 2023).

EAT upravuje srdeční funkci nejen mechanicky, ale také prostřednictvím svého přímého vlivu na buněčné procesy. Významným objevem v tomto směru byla práce autorů Shaihov-Teper, Ram a kol., která jako první prokázala vliv EAT na vznik FS prostřednictvím extracelulárních vezikul odvozených z EAT (EAT-derived extracellular vesicles, EAT-EV). Extracelulární vezikuly jsou membránou obalené struktury vylučované různými buňkami obsahující proteiny, nukleové kyseliny a lipidy. Některé z těchto molekul mají prozánětlivé, profibrotické a proarytmogenní vlastnosti, které podporují atriální myopatii a FS, což dále

potvrzuje roli EAT nejen jako energetického zásobníku, ale i jako aktivního účastníka patogeneze srdečních onemocnění (Shaihov-Teper, Ram *et al.*, 2021).

Tento komplexní vztah mezi EAT, metabolickými změnami a srdeční funkcí zdůrazňuje potřebu přesnějšího hodnocení EAT jako prediktoru kardiovaskulárního rizika. Porozumění jeho fyziologickým a patologickým vlastnostem by mohlo přispět k vývoji nových terapeutických strategií zaměřených na prevenci srdečních komplikací spojených s obezitou.

1.5.4. SHRNUTÍ

EAT představuje specifickou formu viscerálního tuku, který přímo obklopuje srdeční struktury a významně ovlivňuje jejich funkci. Obezita a stárnutí přispívají k její akumulaci, což je spojeno s metabolickými a strukturálními změnami v myokardu, včetně kardiomyocytární dysfunkce, srdeční steatózy, hypertrofie LV a fibrózy. Mechanismy působení EAT zahrnují nejen mechanický vliv na srdeční tkáň, ale také produkci prozánětlivých a profibrotických faktorů, které podporují rozvoj srdečních obtíží. Působení EAT je lokální a hodnocení jeho nadměrné akumulace, vzhledem k úzkému propojení mezi EAT a metabolickými poruchami, by mohlo být výhodné při determinaci kardiovaskulárního rizika u jednotlivých pacientů.

2. CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce se zaměřuje na experimentální studium tukové tkáně v okolí srdce u myšího modelu. Experimenty byly prováděny na inbredních kontrolních a dKO myších, které byly vybrány na základě předchozí studie prokazující jejich predispozici k hromadění tukové tkáně (Morgan, Shekhar *et al.*, 2024) a tedy i k vyšší náchylnosti pro rozvoj obezity (Pražienková, Funda *et al.*, 2021). Hlavní cíle práce jsou následující:

1. Zavedení experimentálního modelu – ověřit, zda je použitý model starých, obézních a geneticky modifikovaných myší vhodný pro studium tukové tkáně v okolí srdce.
2. Identifikace specifických anatomických oblastí, ve kterých dochází k excesivní akumulaci tukové tkáně asociované se srdcem u modelového organismu.
3. Zhodnocení morfologických změn tukové tkáně u modelového organismu ve smyslu analýzy velikosti buněk, úbytku multilokulárních, či nárůstu unilokulárních adipocytů v konkrétních depech, přítomnosti zánětu v tukové tkáni a určení, ve kterých oblastech se zánět nejčastěji vyskytuje.

3. METODY A MATERIÁL

3.1. SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ

Automatické pipety	Gilson, Francie
HistoCore Arcadia C	Leica Biosystems, ČR
Micro CT/PET Albira	Bruker Corp., USA
Microtom Leica RM2255	Leica Biosystems, ČR
Mikroskop Olympus BX53	Olympus, Japonsko
Mini centrifuga	Cleaver Scientific, Anglie
pH metr	Schoeller Instruments, s.r.o., ČR
PMOD	Technologies LLC, Švýcarsko
Software GraphPad prism	GraphPad Software, USA
Software NIS elements AR	Nicon, Japonsko
Termokomora	Robbins Scientific Corp, USA
Třepačka WT 12	Biometra, Německo
Váha OHAUS Pioneer PA114C	OHAUS, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Záznamové zařízení Olympus DP74	Olympus, Japonsko

3.2. SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

ABC kit	Vector, USA
Citrátový pufr	Sigma-Aldrich s.r.o., USA
DAB (3,3'-diaminobenzidin) tablety D4418-50SET	Sigma-Aldrich s.r.o., USA
Dako Pen S2002	Dako Denmark A/S, Dánsko
Etanol	Penta, ČR
H ₂ O ₂	Penta, ČR
Koňské sérum S-2000	Vector, USA
Kozí sérum S-1000	Vector, USA
Metanol	Penta, ČR
Montovací médium	Sigma-Aldrich s.r.o., USA
PBS pufr	Sigma-Aldrich s.r.o., USA
Purifikovaná mac-2 monoklonální protilátka proti myši	Cedarlane Labs, Kanada
Sekundární protilátka BA-100 proti králičímu IgG	Vector, USA
Sekundární protilátka BA-2000 proti myšimu IgG	Vector, USA

Tween P-1379	Sigma-Aldrich, s.r.o., USA
UCP1 C4/98	Připravena v naší laboratoři (Teodoro, Zouhar <i>et al.</i> , 2014)
Vodný roztok eozinu	Sigma-Aldrich s.r.o., USA
Vodný roztok hematoxylinu	Sigma-Aldrich s.r.o., USA
Xylen	Penta, ČR

3.3. LABORATORNÍ ZVÍŘATA

Pro experimentální část studie bylo použito celkem šest samic laboratorních myši, z toho tři myši WT a tři myši dKO. Bylo prokázáno, že dKO myši mají vyšší predispozici k rozvoji obezity v porovnání s WT jedinci (Morgan, Shekhar *et al.*, 2024) a zároveň NPFFR2 KO myši vykazují narušenou termogenní odpověď BAT během excesivního příjmu kalorií (Zhang, Ip *et al.*, 2018).

Myši se narodily v Centru PIGMOD (CPP) ve Vestci a ve věku 3 měsíců byly importovány do zvěřince Akademie věd ČR. Po celou dobu experimentu byla zajištěna manipulace se zvířaty v souladu se zásadami 3R (Replacement, Reduction, Refinement). Myši byly chovány za standardních podmínek při teplotě chovu 23 ± 2 °C, světelný režim: 12/12 hodin. Myši byly krmeny standardní dietou a ve věku 4-5 měsíců byl zahájen jiný dietní režim – HFD, který trval 7 měsíců. Krmivo bylo připraveno podle složení – viz tabulka č. 3. Myši byly chovány v jednotlivých klecích samostatně ($n = 6$) a nebyla jim omezena dostupnost vody ani potravy. Hmotnost myši byla zaznamenávána měsíc před začátkem dietní intervence a 4 měsíce během konzumace HFD. Poté byly naposledy zváženy před usmrcením. Důvodem bylo dosažení plató fáze, kdy myši na váze již nepřibíraly.

Živina	Obsah (% kcal)
Tuky	60
Sacharidy	27
Bílkoviny	13

Tabulka č. 3 – Složení HFD; viz Morgan, Shekhar *et al.*, 2024.

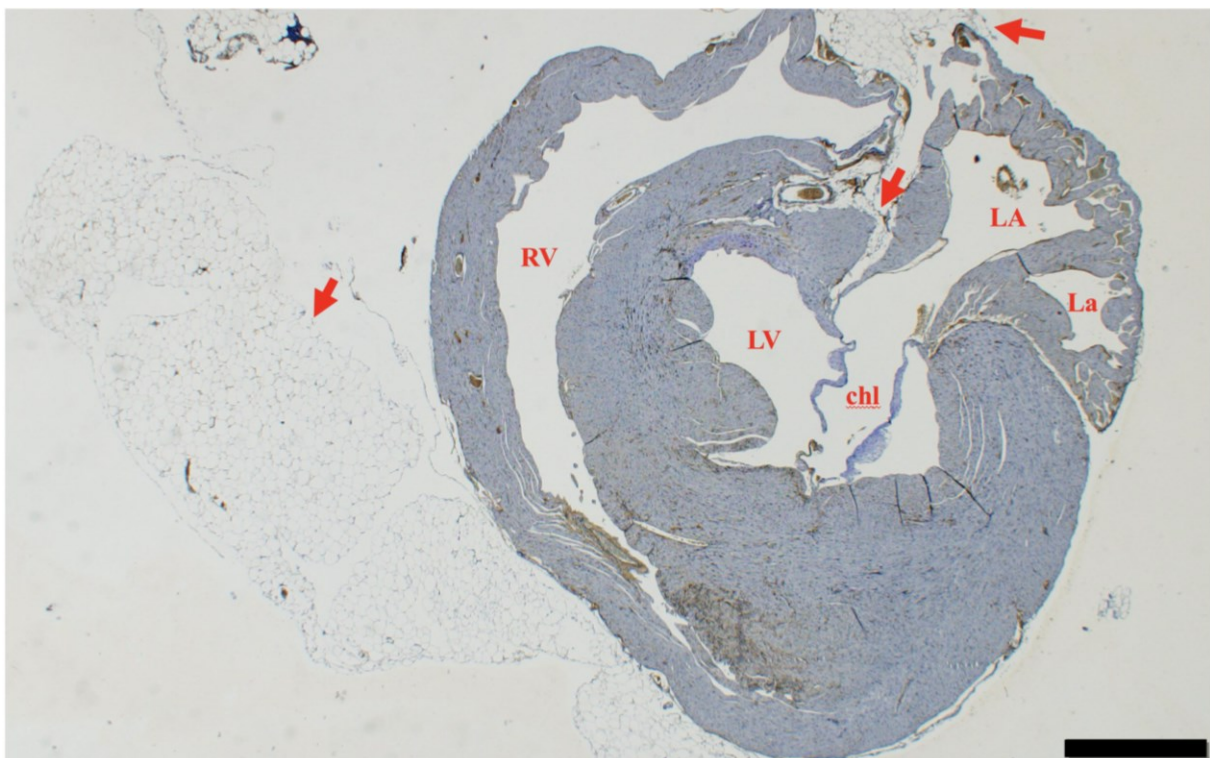
3.4. ANATOMICKÁ VSUVKA

Před rozborem získaných výsledků je nutné vyjasnit metodiku identifikace a klasifikace jednotlivých typů tukových dep – EAT, IMAT, PVAT, PAT a pCF.

V rámci této studie nebyla pCF hodnocena, neboť při extrakci srdce nebyl tento tuk zahrnut do analýzy. PAT byla definována jako tuková tkáň, která nezasahovala do myokardu ani na něj nenaléhala; zahrnovala tedy veškerou tukovou tkáň mimo oblast kardiomyocytů

a jejich bezprostředního okolí. PVAT byla definována jako tuk přiléhající k cévním strukturám bez ohledu na to, zda se jednalo o aortu, žíly nebo koronární arterie. Pokud nebylo možné mikroskopicky odlišit EAT od PVAT, tuk v okolí koronárních cév byl kategorizován jako PVAT. EAT byla hodnocena jako tuková tkáň přiléhající přímo k myokardu, přičemž její distální hranici směrem od myokardu tvořila membránová struktura. Pokud se tuková tkáň nacházela za touto membránou a byla vzdálena od myokardu, byla klasifikována jako PAT. IMAT byla definována jako jakákoli tuková tkáň uvnitř myokardu, která nebyla asociována s cévními strukturami.

Precizní anatomická identifikace jednotlivých tukových dep byla klíčovým aspektem tohoto experimentu. Vzhledem k často nejednoznačné terminologii v odborné literatuře považují za nezbytné zahrnout podrobný popis metodologie hodnocení těchto tkání.



Histologický preparát č. 1 – Popis srdce a tkání s ním asociovaných. Tuková depa byla analyzována s důrazem na co nejpřesnější lokalizaci výskytu, včetně rozlišení konkrétních dep i vztahu k srdečním strukturám. Šipky ukazují na tukovou tkáň, chl, chlopně; La, levé ouško; LA, levá předsíň; LV, levá komora; RV, pravá komora. Imunohistochemické barvení MAC-2, přítomnost antigenu je zvýrazněna hnědou barvou. Zvětšení 20x, měřítko 1 mm.

4. PRAKTICKÁ ČÁST

Před odběrem tkání byly všechny myši nejprve zváženy a následně podrobeny zobrazovacímu vyšetření. Zobrazení bylo provedeno pomocí CT skeneru Bruker Albira za celkové inhalační anestezie indukované isofluranem. Po ukončení měření byly myši eutanazovány podstřížením krčních cév. Bezprostředně poté byla provedena pitva, při níž bylo odebráno srdce, gonadální, inguinální a interskapulární tuková tkáň. Všechny tkáně byly zváženy a následně fixovány v 10 % neutrálním roztoku formalinu. Před vložením do fixačního roztoku bylo srdce uprostřed příčně rozpůleno. Po dokončení fixace byly vzorky zality do parafinových bloků, ze kterých byly následně připraveny 3 μm tenké histologické řezy. Tkáňové řezy byly vytvořeny pomocí rotačního mikrotomu Leica RM2235 (Leica Biosystems, ČR). Z každého vzorku byly nejprve získány dva řezy o tloušťce 3 μm , které byly umístěny na jedno podložní sklíčko a zahrnuty do analýzy. Následně bylo odříznuto 10 řezů, které k vyhodnocení použity nebyly. Tento postup byl cyklicky opakován, přičemž po každé sérii 10 řezů byly opět odebrány dva 3 μm řezy a přeneseny na další podložní sklíčko pro analýzu.

4.1. POSTUP PRAKTICKÉ ČÁSTI

Pro histologické zpracování bylo použito celkem šest vzorků srdce ($n = 6$), které byly krájeny v celém rozsahu s cílem získat 3D pohled na morfologii orgánu. U vzorků tukové tkáně byla analyzována čtyři depa – gonadální tuková tkáň (gWAT), subkutánní tuková tkáň (scWAT) a interskapulární hnědá tuková tkáň (iBAT), přičemž z každého z nich byla připravena tři histologická sklíčka. Následně byly provedeny tři typy histologického barvení umožňující detailní analýzu buněčné struktury a přítomnosti specifických markerů. Barvení hematoxylinem a eosinem (H&E) bylo použito nejen k posouzení celkové histologické struktury vzorků, ale i k určení konkrétní lokalizace srdečního tuku, a pro vyhodnocení velikosti adipocytů. Imunohistochemické barvení na UCP1 sloužilo k detekci buněk exprimujících UCP1, markeru hnědé tukové tkáně, a imunohistochemické barvení na MAC-2 (galektin-3) umožnilo identifikaci makrofágů v tukové tkáni. Sklíčka se vzorky byla vybírána systematicky, viz tabulka č. 4.

	H&E	UCP1	MAC-2
Srdce	1	2	3
	4	5	6
	7	8	9
	10	11	12

	13	14	15
	16	17	18
	19	20	21
	22	23	24
	25	26	27
	28	29	30
	31	32	33
	34	35	36
	37	38	39
	40	41	42
	43	44	45
gWAT	1	2	3
scWAT	1	2	3
iBAT	1	2	3

Tabulka č. 4 – Proces výběru sklíček na histologická barvení.

Jedno podložní sklíčko obsahovalo 4 řezy srdeční tkáně nebo 2 řezy tukové tkáně (iBAT, scWAT, gWAT). Počet pořízených snímků na jeden řez srdeční tkáně byl variabilní v závislosti na množství přítomné tukové tkáně v daném depu. Pro analýzu bylo použito 6 myší a aplikovány 3 typy histologického barvení.

V případě srdeční tkáně bylo v průměru pořízeno 155 snímků na jedno barvení u jednoho srdce, což odpovídá v průměru 930 snímkům pro všech 6 srdcí (155 x 6). Celkový počet snímků pro všechna barvení (3 x 930) činil přibližně 2790.

U vzorků iBAT, scWAT a gWAT byly použity pro každou tkáň 3 sklíčka (tj. jedno pro každé barvení). Přičemž každé sklíčko obsahovalo 2 řezy a každý řez byl snímán 3x. To odpovídá 18 snímkům na jedno depo u všech barvení a celkem 54 snímkům pro iBAT, scWAT a gWAT dohromady. Po sečtení všech snímků ze srdeční a tukové tkáně byl celkový počet získaných snímků v průměru "zhruba" 2898.

4.2. BARVENÍ HEMATOXYLINEM EOSINEM

H&E barvení je nejčastěji používanou histologickou metodou, která umožňuje detailní vizualizaci tkáňových struktur. Principem této metody je selektivní barvení buněčných složek na základě jejich chemických vlastností. Hematoxylin působí jako bazické barvivo, které má afinitu ke kyselým strukturám. Proto se např. DNA v buněčných jádrech po barvení

jeví tmavě fialově. Naproti tomu eosin je kyselé barvivo, které barví bazické struktury, jako je například cytoplazma, nebo kolagen. Proto tyto struktury vidíme na vzorku růžově.

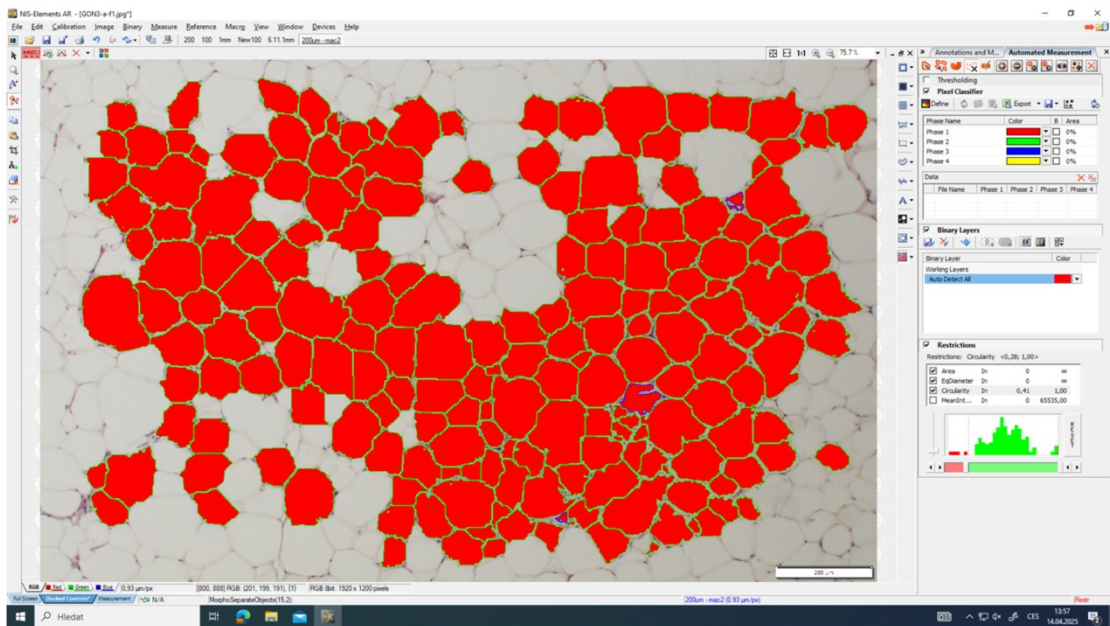
POUŽITÉ ROZTOKY

Xylen (Penta, ČR)
96% etanol, 75% etanol, 50% etanol (Penta, ČR)
vodný roztok hematoxylinu (Gill III Hematoxylin Labonord) (Merck KGaA, Německo)
Vodný roztok eosinu (Aqueous Eosin-Y Labonord) (Merck KGaA, Německo)
Montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium) (Merck KGaA, Německo)

Vzorky byly postupně deparafinovány a hydratovány. Nejprve byly inkubovány 2× po 15 minutách v xylenu, následně po dobu 10 minut v 96%, 75% a 50% etanolu. Poté byly vzorky opláchnuty destilovanou vodou (2 min) a inkubovány v hematoxylinu po dobu 5 minut. Následovalo další opláchnutí vodou a inkubace v eosinu po dobu 10 minut. Po finálním oplachu byly vzorky krátce dehydratovány pomocí vzestupné alkoholové řady v 50%, 75% a 96% etanolu a po usušení zamontovány v montovacím médiu.

Vyhodnocení vzorků bylo provedeno pomocí světelného mikroskopu Olympus BX56 (Olympus, Japonsko), přičemž digitální snímky byly získány prostřednictvím kamerového systému DP74 (Olympus, Japonsko). Jedno podložní sklíčko obsahovalo 4 řezy srdce nebo 2 řezy tukové tkáně (iBAT, scWAT, gWAT). Počet pořízených snímků na jeden řez srdečních tkání byl variabilní v závislosti na množství přítomné tukové tkáně v daném depu. V případě srdeční tkáně bylo v průměru pořízeno 155 snímků na jedno barvení u jednoho srdce, což odpovídá v průměru 930 snímkům pro všech 6 srdcí. U vzorků iBAT, scWAT a gWAT bylo pro H&E barvení použito jedno podložní sklíčko se 2 řezy. Každý řez byl snímán 3×, tj. 6 snímků na podložní sklíčko a 18 snímků pro iBAT, scWAT a gWAT pro H&E barvení.

Pořízené snímky byly následně zpracovány pomocí softwaru NIS Elements AR (Nikon, Japonsko), kde byla měřena a zaznamenávána velikost jednotlivých adipocytů pomocí automatického prahování. Nekompletní adipocyty z důvodu přesažení obrazu snímku nebyly v případě analýzy velikosti adipocytů hodnoceny, stejně jako objekty s velikostí pod 100 μm^2 z důvodu potenciálně špatné vyhodnocovací schopnosti programu u takto malých buněk. Navíc nemůžeme vyloučit ani možnost, že by takto malé adipocyty byly výrazně poškozené (viz obr. č. 9).



Obr. č. 9 – Průběh histologické analýzy pomocí programu NIS Elements. Příklad vyhodnocení velikosti adipocytů. Vyhodnocení probíhalo pomocí automatického prahování.

4.3. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ NA DETEKCI UCP1

Imunohistochemické barvení je používáno k vizualizaci specifických antigenů v tkáních. Princip spočívá v navázání primární protilátky na cílový antigen, přičemž detekce může být dále zesílena pomocí sekundární protilátky a vhodného vizualizačního systému. V tomto kroku experimentu bylo imunohistochemické barvení použito k detekci UCP1 pro následnou analýzu jeho zastoupení v tkáních. Pro úspěšnou detekci bylo nutné obnovit antigeny maskované během fixace formaldehydem, minimalizovat nespecifické vazby a zajistit dostatečnou citlivost barvení.

Nejprve byly vzorky deparafinovány a rehydratovány pomocí xylenu a sestupné alkoholové řady (viz krok v kapitole 4.2.) Následně byly vloženy do citrátového pufru, který slouží k obnově antigenicity (= obnovit schopnost působit jako antigen). Fixace formaldehydem totiž vytváří kovalentní vazby mezi proteiny, což může maskovat epitopy a bránit vazbě protilátek. Tepelný “antigen-retrieval” (při 95 °C) v citrátovém pufru tyto vazby rozrušuje, čímž umožňuje přístup protilátek k cílovému antigenu. Aby se zabránilo nespecifické peroxidázové aktivitě, která by mohla generovat falešně pozitivní signály v pozdějších krocích barvení (během použití DAB), byl použit 3% roztok peroxidu vodíku (H₂O₂) v metanolu. Pro zvýšení dostupnosti protilátek v tkáni byl aplikován Tween, který snižuje povrchové napětí a umožňuje lepší penetraci protilátek do tkáně. K blokování nespecifických vazebných míst bylo použito 10% kozí sérum, čímž minimalizujeme riziko nespecifické vazby primární protilátky.

Následně byly vzorky inkubovány s primární protilátkou (anti-UCP1), která je specifická pro cílový antigen UCP1. Pro vazbu na primární protilátku a zesílení signálu byla použita sekundární biotinylovaná protilátka vyrobená, v našem případě, v koze proti králičímu IgG. Biotinová značka umožňuje následnou vazbu avidinu (obsaženým v ABC kitu), čímž dochází ke zvýšení citlivosti detekce. ABC kit obsahuje jak avidin, tak peroxidázu. Avidin má vysokou afinitu k biotinu, což umožňuje vytvoření stabilních avidin-biotin komplexů s navázanou peroxidázou, čímž se významně zesiluje signál barvení a zvýší citlivost detekce. V závěrečném kroku byl aplikován DAB (3,3'-diaminobenzidin), který při interakci s peroxidázou generuje hnědé zbarvení (následek oxidace DAB) v místech výskytu proteinu UCP1. To vše umožňuje snadnou detekci a analýzu UCP1 pozitivních buněk pod světelným mikroskopem.

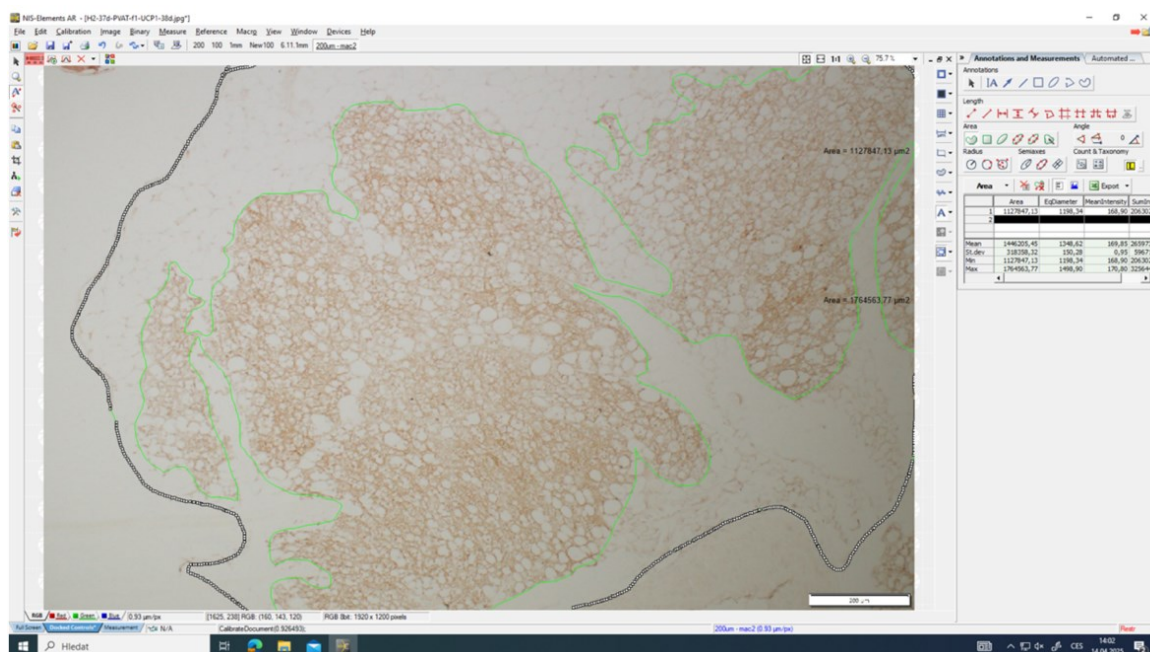
POUŽITÉ ROZTOKY

Xylen (Penta, ČR)		
96%, 75%, 50% etanol (Penta, ČR)		
Citrátový pufr (pH = 6) (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)		
30% H ₂ O ₂ (Penta, ČR)		
100% metanol (Penta, ČR)		
PBS (pH = 7,4):		
NaCl	1.06504	24 g (Merck KGaA, Německo)
KCl	P3911	1,2 g (Merck KGaA, Německo)
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O KH ₂ PO ₄	716590	8,4 g (Merck KGaA, Německo)
KH ₂ PO ₄	795488	0,6 g (Merck KGaA, Německo)
Kozí sérum S-1000 (Vector, USA)		
Primární protilátka C4/98, vyvinuta v králíkovi proti myšímu fúznímu proteinu, připravena v naší laboratoři podle Teodoro, Zouhar <i>et al.</i> , 2014.		
Sekundární protilátka BA-1000 proti králičímu IgG, vyvinuta v koze (Vector, USA)		
ABC kit PK-6100 (Vector, USA)		
DAB (3,3' – diaminobenzidin) tablety D4168 (Merck KGaA, Německo)		
Montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium) (Merck KGaA, Německo)		

Vzorky byly nejprve deparafinovány a rehydratovány pomocí xylenů a sestupné alkoholové řady. Tento proces zahrnoval inkubaci v xylenů 2x na 15 min, následovanou 10 min inkubacemi v 96%, 75% a 50% etanolu. Poté byly vzorky na 5 minut vloženy do destilované vody a následně přeneseny do citrátového pufru (pH 6,0), kde byly inkubovány

při teplotě 95 °C po dobu 30 minut, přičemž po 15 minutách byl pufr vyměněn. Po vychladnutí byly vzorky opláchnuty v destilované vodě po dobu 5 minut. Následovalo ponechání vzorků v 3% roztoku H₂O₂ v metanolu po dobu 10 minut. Následně byly přeneseny do 0,1% roztoku Tweenu v PBS na 20 minut. Poté následovalo opláchnutí v PBS (2x na 15 min) a následná inkubace v 10% kozím séru (ředěno v PBS) v boxu se zvýšenou vlhkostí po dobu 30 min. Dále byla bez oplachu aplikována primární protilátka (anti-UCP1), která byla ředěna v PBS obsahující 1% kozí sérum v koncentraci 1:4000. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C v boxu se zvýšenou vlhkostí. Následující den byly vzorky dvakrát opláchnuty v PBS (15 minut) a následně inkubovány se sekundární biotinylovanou protilátkou (ředěnou v PBS v koncentraci 1:200) po dobu jedné hodiny, opět v boxu se zvýšenou vlhkostí. Po inkubaci byly vzorky opět opláchnuty v PBS (2x po 15 minutách) a mezi tím byl připraven roztok pomocí ABC kitu (smícháním 20 µl roztoku A, 20 µl roztoku B a 1960 µl PBS), což bylo následně aplikováno na vzorky, které byly inkubovány v boxu se zvýšenou vlhkostí po dobu jedné hodiny. Následoval opět oplach v PBS (2x na 15 min), poté byla provedena inkubace vzorků s DAB (2 tablety rozpuštěné v 5 ml H₂O), přičemž doba inkubace se pohybovala od 1 do 6 minut v závislosti na intenzitě vývoje hnědé barvy. Vzorky byly průběžně kontrolovány pod mikroskopem pro optimalizaci doby barvení. Po dosažení požadované intenzity barvení byly vzorky vloženy do destilované vody a postupně dehydratovány ve vzestupné alkoholové řadě (50%, 75% a 96% etanol, pokaždé po dobu 10 minut). Po usušení byly vzorky zamontovány v montovacím médiu.

Mikroskopická analýza byla provedena na světelném mikroskopu Olympus BX56 (Olympus, Japonsko) a digitální snímky byly zaznamenány pomocí kamerového systému Olympus DP74 (Olympus, Japonsko). Během analýzy jednotlivých řezů byla určována co nejpřesnější lokalizace tukových dep. Pro kvantitativní analýzu zastoupení UCP1 pozitivní tkáně na digitálně pořízených histologických snímcích byl použit software NIS Elements AR (Nikon, Japonsko). Pomocí tohoto softwaru byla u každého snímku měřena plocha odpovídající BAT a WAT, resp. UCP1 pozitivních a negativních adipocytů (viz obr. 10).



Obr. č. 10 – Průběh histologické analýzy pomocí programu NIS Elements. Příklad vyhodnocení zastoupení UCPI+ adipocytů. Vyhodnocení probíhalo jako určení plochy výskytu BAT vůči ploše celkového tuku na snímku.

4.4. IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ NA DETEKCI MAKROFÁGŮ, MAC-2

Imunohistochemické barvení je metoda sloužící k vizualizaci specifických antigenů v tkáňových řezech. Jeho principem je vazba primární protilátky na cílový antigen, přičemž detekce může být zesílena použitím sekundární protilátky a vhodného vizualizačního systému. V této části experimentu bylo imunohistochemické barvení použito k detekci MAC-2 (galektinu-3), což je marker asociovaný s makrofágy. *Mac-2* gen je exprimován ve vysokých hodnotách u aktivovaných makrofágů a jeho proteinový produkt je exportován z cytozolu do extracelulárního média. Proto se barvení MAC-2 používá ke studiu přítomnosti a distribuce makrofágů v různých tkáních, včetně tukové tkáně, při hodnocení zánětlivých procesů. Může nám proto pomoci určit rozsah infiltrace makrofágy, resp. tvorbu CLS struktur. Nicméně, Mac-2 antigen je protein vázající se obecně na glykované proteiny vyskytující se i na jiných buňkách – např. monocitech, lymfocytech, neutrofilních granulocytech, endoteliálních buňkách, nebo i často v našem případě na erytrocytech. Proto jsme jako další rozlišovací znak používali tvarové rozlišení CLS.

Vzorky byly nejprve deparafinovány, protože parafin obklopující tkáň zabraňuje průniku roztoků a protilátek. Xylen slouží k jeho odstranění, zatímco alkoholové řady umožňují postupnou rehydrataci tkáně a odstranění zbytků rozpouštědel. Závěrečné ponoření do destilované vody zajistí, že tkáň je plně hydratovaná a připravená na další kroky barvení.

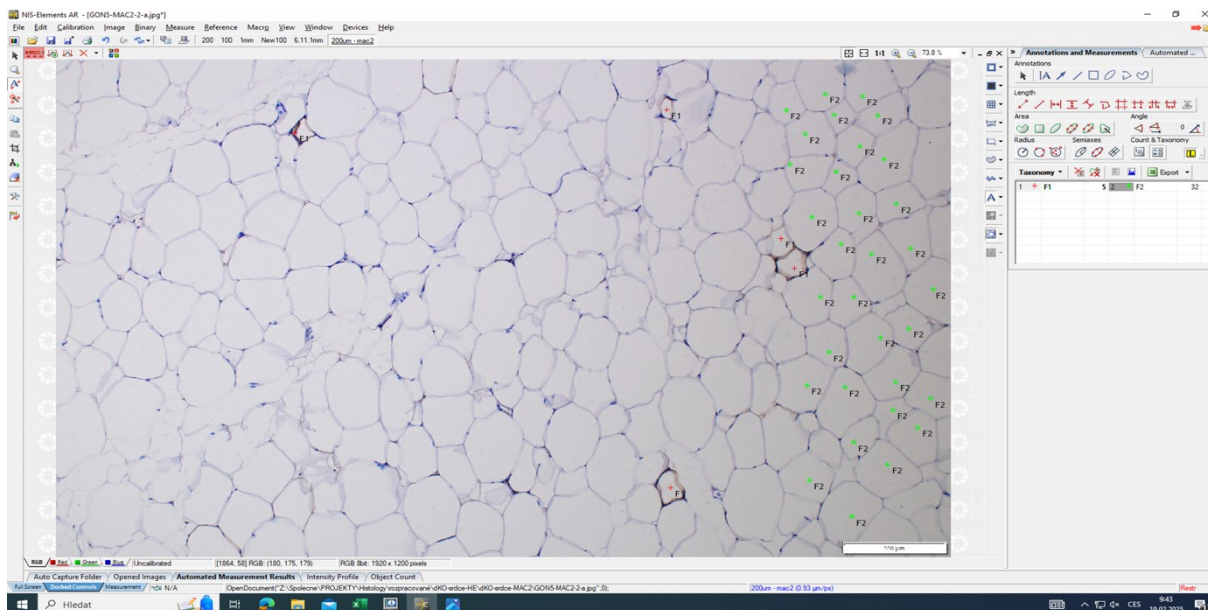
I u tohoto barvení potřebujeme blokovat endogenní peroxidázovou aktivitu, která, pokud je přítomná v tkáni, může při použití DAB generovat falešně pozitivní signály. Proto je vzorek ošetřen H₂O₂, který tuto aktivitu inhibuje. Dalším krokem je inkubace vzorků, v tomto případě, s koňským sérem, které obsahuje proteiny blokující nespecifická vazebná místa v tkáni, čímž se minimalizuje nespecifická vazba protilátek a zajišťuje vyšší přesnost detekce. Primární protilátka (anti-MAC-2/galectin-3) je specifická pro cílový antigen a váže se na něj. Následná sekundární protilátka, která byla (v tomto případě) vyvinuta v koni proti myšimu IgG, má na sobě navázaný biotin, což umožňuje další zesílení signálu. Biotin v sekundární protilátce se váže na avidin obsažený v ABC kitu, čímž vznikají avidin-biotin komplexy s navázanou peroxidázou. S peroxidázou reaguje DAB, což vede k tvorbě hnědé sraženiny v místech výskytu cílového proteinu. Tím je umožněna snadná vizualizace sledovaného antigenu pod mikroskopem. Pro lepší orientaci v tkáni je vzorek ještě inkubován v hematoxylinu, který barví buněčná jádra modře. Tento krok nejen usnadňuje morfologickou analýzu tkáně, ale zároveň poskytuje kontrast k hnědému signálu DAB, čímž zvyšuje celkovou čitelnost preparátu.

POUŽITÉ ROZTOKY

Xylen (Penta, ČR)		
96%, 75%, 50% etanol (Penta, ČR)		
30% H ₂ O ₂ (Penta, ČR)		
100% metanol (Penta, ČR)		
PBS (pH = 7,4):		
NaCl	1.06504	24 g (Merck KGaA, Německo)
KCl	P3911	1,2 g (Merck KGaA, Německo)
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	716590	8,4 g (Merck KGaA, Německo)
KH ₂ PO ₄	795488	0,6 g (Merck KGaA, Německo)
Koňské sérum S-2000 (Vector, USA)		
Primární protilátka Cedarlane CL8942AP, proti MAC-2/galectin-3 (Cedarlane Labs, Kanada)		
Sekundární protilátka BA-2000 proti myšimu IgG (Vector, USA), vyvinuta v koni		
ABC kit PK-6100 (Vector, USA)		
DAB (3,3' – diaminobenzidin) tablety D4168 (Merck KGaA, Německo)		
Vodný roztok hematoxylinu (Gill III Hematoxylin Labonord) (Merck KGaA, Německo)		
Montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium) (Merck KGaA, Německo)		

Vzorky byly nejprve deparafinovány a rehydratovány pomocí xylenu a sestupné alkoholové řady. Tento proces zahrnoval inkubaci v xylenu 2x na 15 min, následovanou 10 min inkubacemi v 96%, 75% a 50% etanolu. Poté byly vzorky na 5 minut vloženy do destilované vody. Následovala inkubace v 1% roztoku H₂O₂ v metanolu po dobu 30 minut a oplach v PBS, 2x na 15 min. V dalším kroku byly vzorky inkubovány po dobu 30 minut s koňským sérem (1:50 ředěné v PBS) v prostředí se zvýšenou vlhkostí při pokojové teplotě. Poté byla bez oplachu aplikována primární protilátka proti MAC-2 (ředěná v PBS v poměru 1:4000), která se nechala inkubovat přes noc při 4 °C v boxu se zvýšenou vlhkostí. Následující den byly vzorky ponechány v PBS (2x po dobu 15 minut) a inkubovány se sekundární protilátkou proti myššímu IgG (ředění 1:200 v PBS) po dobu 30 minut v boxu se zvýšenou vlhkostí. Poté následovalo další dvojité opláchnutí v PBS (2x 15 minut) a mezi tím byl připraven roztok pomocí ABC kitu (smícháním 20 µl roztoku A, 20 µl roztoku B a 1960 µl PBS). Vzorky byly po oplachu v PBS inkubovány s ABC kitem, opět v prostředí se zvýšenou vlhkostí, po dobu 30 minut. A poté, naposledy, dvakrát opláchnuty v PBS (2x 15 minut). Následně, po dobu 1 minuty a 30 sekund, byl aplikován DAB (2 tablety DAB rozpuštěné v 5 ml H₂O). Po ukončení inkubace byly vzorky opláchnuty v destilované vodě a obarveny hematoxylinem po dobu 40 sekund. Vzorky byly kontrolovány pod mikroskopem pro optimalizaci doby barvení (platí pro DAB i hematoxylin). Po závěrečném oplachu v destilované vodě byly vzorky dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou (v 50%, 75% a 96% etanolu, pokaždé po 10 minutách). Nakonec byly vzorky usušeny a zamontovány v montovacím médiu.

Mikroskopická analýza byla provedena na světelném mikroskopu Olympus BX56 (Olympus, Japonsko) a záznamového zařízení Olympus DP74 (Olympus, Japonsko). Vyhodnocení digitálních snímků probíhalo pomocí softwaru NIS Elements AR (Nikon, Japonsko). Analýza se zaměřovala na kvantifikaci přítomných makrofágů v jednotlivých tukových depech (pomocí nástroje “*taxonomy*”), přičemž byl zaznamenáván poměr CLS k adipocytům jako indikátor zánětlivé odpovědi v tkáni. Za MAC-2+ CLS byly považovány pouze ty adipocyty, které byly alespoň z 50 % obklopeny souvislou vrstvou makrofágů (viz obr. č. 11, hnědé zbarvení).



Obr. č. 11 – Průběh histologické analýzy pomocí programu NIS Elements. Příklad vyhodnocení MAC-2+ CLS (na obrázku hnědou barvou). Vyhodnocení probíhalo určením počtu CLS struktur vůči počtu adipocytů na snímku.

4.5. VÝPOČETNÍ TOMOGRAFIE

Výpočetní tomografie je zobrazovací metoda, jejímž principem je rotace zdroje rentgenového záření kolem sledovaného objektu. Záření je schopno procházet tkáněmi, které ho pohlcují, a jeho zbytková intenzita je zachycována detektorem umístěným na opačné straně od zdroje. Jakmile zdroj záření dokončí jednu celou rotaci, získaná data jsou převedena do počítače, který na základě matematických algoritmů rekonstruuje 2D virtuální řezy organismu o tloušťce 1-10 mm (tomografické snímky). Tento proces se opakuje v několika rovinách, dokud není získán dostatečný počet řezů pro vytvoření 3D obrazu sledovaného objektu. Výsledný CT obraz je založen na rozdílné schopnosti tkání absorbovat rentgenové záření. Např. kostní tkáň, s vyšším obsahem minerálů, absorbuje záření ve výrazně vyšším množství v porovnání s měkkými tkáněmi s vysokým podílem vody. Míra absorpce záření je kvantifikována v Hounsfieldových jednotkách (HU), které jsou standardizovány vůči hodnotám pro vzduch (-1000 HU) a vodu (0 HU) (Jung, 2021).

Před zobrazovacím vyšetřením byly myši zváženy a následně v inhalační anestezii pomocí isofluranu (1-3% objemu vzduchu) podrobeny CT skenování pomocí Micro CT/PET Albira (Bruker Corp., USA). Rekonstrukce obrazových dat byla provedena v programu PMOD (PMOD Technologies LLC, Švýcarsko), kde bylo pomocí automatického prahování vyhodnoceno množství tukové tkáně v srdeční oblasti.

4.6. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v softwaru GraphPad Prism (GraphPad Software, USA), který byl zároveň použit pro tvorbu grafů. K posouzení statistické významnosti rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl aplikován nepárový studentský T-test, či lineární regrese. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. K posouzení statistické významnosti rozdílů mezi jednotlivými tukovými depy byla aplikována dvoucestná ANOVA. Hladina statistické významnosti byla opět stanovena na $p < 0,05$.

Analýza histologických preparátů ve světelném mikroskopu zahrnovala na identifikaci tukových dep s důrazem na jejich přesnou lokalizaci v rámci srdeční tkáně. Obrazová data byla kvantifikována pomocí softwaru NIS Elements AR (Nikon, Japonsko), přičemž byla hodnocena velikost adipocytů, procentuální zastoupení UCP1 tkáně a celkový počet adipocytů, včetně přítomnosti makrofágů v jednotlivých tukových oblastech. Výsledky byly zprůměrovány pomocí aritmetického průměru a byla stanovena směrodatná odchylka.

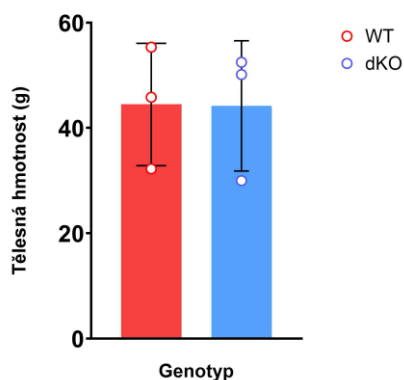
Dále byla vyhodnocena průměrná tělesná hmotnost myší, hmotnost jednotlivých tukových dep, průměrná velikost adipocytů, procentuální zastoupení UCP1 pozitivní tkáně a celkový počet buněk mezi dKO a WT myši. I v tomto případě byly výsledné hodnoty uvedeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

5. VÝSLEDKY

V této části jsou prezentovány výsledky analýzy tukových dep v jednotlivých experimentálních skupinách (WT vs dKO). Hodnocené parametry zahrnují tělesnou hmotnost myši, hmotnost jednotlivých tukových dep, velikost adipocytů v jednotlivých depech, zastoupení UCP1 aktivní tkáně a přítomnost MAC-2 pozitivních buněk.

5.1. VLIV GENOTYPU NA TĚLESNOU HMOTNOST

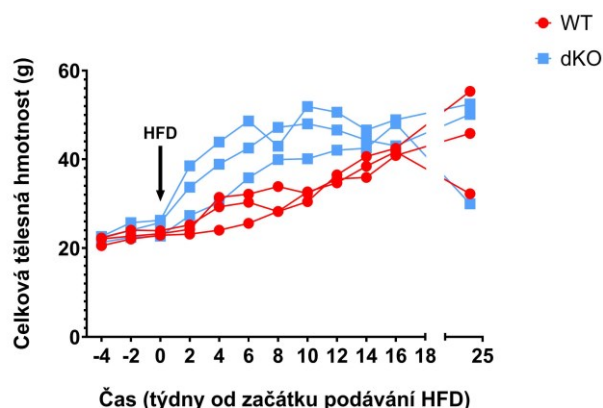
Experimenty byly prováděny na dKO myších, které byly 12 měsíců staré. HFD jim byla podávána po dobu sedmi měsíců až do dne disekce. Cílem práce bylo posoudit vliv genotypu na tělesnou hmotnost a distribuci tukové tkáně. Současně byla analyzována korelace mezi tělesnou hmotností a hmotností viscerální a subkutánní tukové tkáně. Bylo předpokládáno, že dKO myši budou mít vyšší podíl tukové tkáně, zejména ve viscerální oblasti, a tudíž budou vykazovat zvýšenou predispozici k rozvoji obezity.



Graf č. 4 – Porovnání celkové tělesné hmotnosti (g) mezi genotypy. Vliv genotypu na celkovou tělesnou hmotnost nebyl statisticky signifikantní (nepárový T-test).

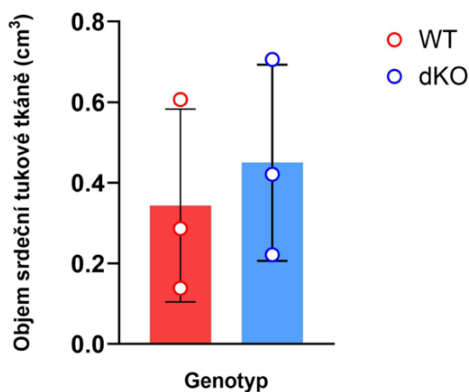
Analýza tělesné hmotnosti neprokázala statisticky významné rozdíly mezi WT a dKO skupinou (graf č. 4), tudíž hypotéza o predispozici dKO myši k vyššímu obsahu tukové tkáně a vyšší tělesné hmotnosti nebyla potvrzena. Obě skupiny vykazovaly srovnatelné hodnoty celkové tělesné hmotnosti, což naznačuje, že genotyp dKO myši nemusí být hlavním faktorem pro rozvoj a zachování obezity v takto vysokém věku. U dvou jedinců, WTH3 a dKOH4, byla zaznamenána ve starším věku nižší tělesná hmotnost (30 g a 32 g) v porovnání s ostatními subjekty, ačkoliv byly všechny krmeny HFD. Tento náleznaznačuje možnou souvislost mezi nižší tělesnou hmotností a starším věkem, což by z důvodu katabolických procesů spojených s pokročilým věkem a zhoršenou schopností ukládat energii mohlo vést k nižší hmotnosti jedinců. Protože když se podíváme na graf č. 5, vidíme, že během HFD ze začátku nabíraly na hmotnosti stejně intenzivně, jako ostatní subjekty. Existuje také možnost, že genotyp ovlivňuje spíše dynamiku nárůstu tělesné hmotnosti než její konečnou

hodnotu (graf č. 5), kdy byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi WT a dKO skupinou. Nelze vyloučit existenci plató fáze, kdy myši po dosažení určitého bodu dosáhnou maximální tělesné hmotnosti bez ohledu na genetické predispozice.



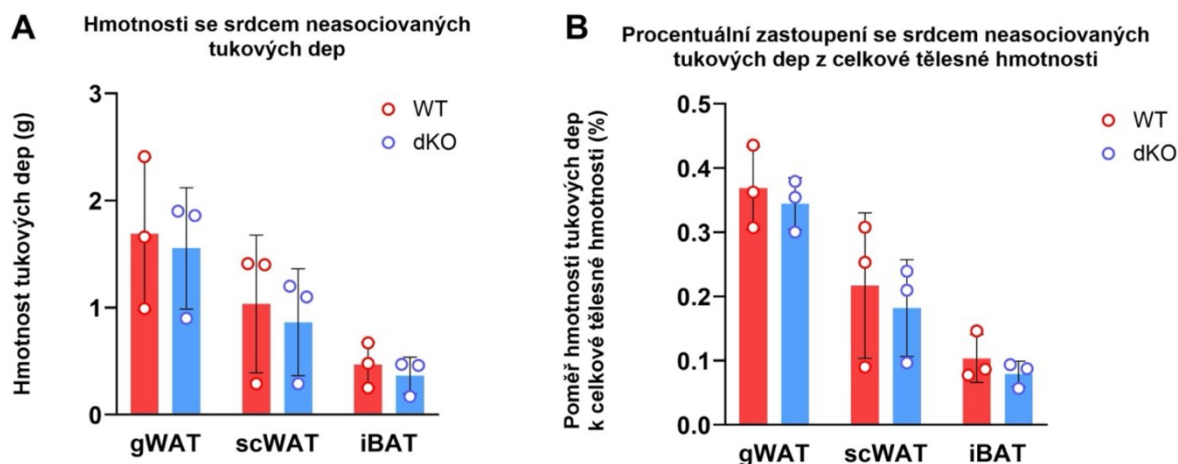
Graf č. 5 – Nárůst tělesné hmotnosti v průběhu dietní intervence. U dKO myši jsme prokázali signifikantní nárůst hmotnosti v porovnání s WT myši. Po dosažení plató fáze u obou kmenů však obezita příliš nepostupuje. Šipka ukazuje na počátek HFD. Pomocí statistického testu dvoucestná ANOVA jsme potvrdili vliv genotypu na nárůst hmotnosti v čase ($p < 0,001$). Data z paralelně probíhající studie (Morgan, Shekhar et al., 2024).

Před usmrcením byla experimentální zvířata podrobena mikro-CT skenování s cílem zjistit množství tukové tkáně asociované se srdcem u WT a dKO skupiny. Průměrný objem srdeční tukové tkáně dosahoval u dKO skupiny vyššího trendu (viz graf č. 6) ve srovnání s WT skupinou, avšak výsledek nebyl statisticky signifikantní. Při pohledu na individuální hodnoty lze pozorovat poměrně vysokou míru variability v rámci obou skupin, kdy nejvyšší hodnota byla detekována u jedince dKOH1, naopak nejnižší objem byl naměřen u myši WTH3 a dKOH4. Tyto dvě myši měly nejnižší tělesnou hmotnost ze všech sledovaných jedinců. Výsledky naznačují, že tato variabilita, a tedy i množství tukové tkáně kolem srdce, by mohlo být ovlivněno (spíše než genotypem) stupněm obezity.



Graf č. 6 – Objem srdeční tukové tkáně měřený pomocí CT. Pomocí nepárového T-testu jsme neprokázali signifikantní rozdíl mezi skupinami.

Po usmrcení experimentálních zvířat byly odebrány čtyři tkáně – srdce, scWAT, gWAT a iBAT (který byl použit pouze jako pozitivní kontrola pro přítomnost UCP1 pozitivních buněk). Následně byla provedena analýza hmotnosti jednotlivých tukových dep, až na tuková depa asociovaná se srdcem. U těchto dep analýza hmotnosti provedena být nemohla z důvodu rizika poškození vazby na srdeční struktury. Cílem této analýzy bylo zjistit, zda genetická modifikace ovlivňuje ukládání tukové tkáně a její distribuci mezi viscerální a subkutánní oblasti.



Graf č. 7 – Zastoupení vybraných dep tukové tkáně mezi genotypy. Na grafu A vidíme trend k vyšší hmotnosti gWAT ve srovnání se scWAT, včetně vyššího procentuálního zastoupení gWAT v organismu na grafu B. Rozdíl mezi skupinami však nebyl statisticky významný (nepárový T-test).

Výsledky analýzy neprokázaly statisticky významné rozdíly v hmotnosti tukové tkáně mezi WT a dKO skupinou (graf č. 7). Obě skupiny vykazovaly srovnatelnou hmotnost tukových dep. Tento náleznaznačuje, že samotný genotyp není hlavním determinantem ani celkového množství tělesného tuku, ani jeho ukládání do konkrétních oblastí. Přestože jsme očekávali, že dKO myši budou mít vyšší predispozici k obezitě, tato hypotéza se po dosažení platů fáze tělesné hmotnosti nepotvrdila.

Dále byl u obou skupin pozorován trend k vyšší hmotnosti gWAT ve srovnání se scWAT (graf č. 7). dKO myši vykazovaly tendenci k nižší hmotnosti u obou tukových dep ve srovnání s WT myšmi. Tento trend zůstal zachován i po normalizaci dat na celkovou tělesnou hmotnost, avšak rozdíly mezi skupinami opět nebyly statisticky významné. Nález odpovídá očekávání, že se zvyšujícím věkem a progresí obezity dochází k redistribuci tukové tkáně a preferenčnímu ukládání tuku do viscerálních oblastí na úkor subkutánní tukové tkáně. Výsledky také naznačují, že tato redistribuce není ovlivněna genotypem, ale spíše kombinací faktorů jako jsou věk a nadměrný energetický příjem.

Mezi experimentálními zvířaty se nacházejí i individuální rozdíly. Myši s nižší celkovou tělesnou hmotností vykazovaly nižší hmotnosti jednotlivých tukových dep (graf č. 7). Tento jev byl patrný u jedinců v obou genetických skupinách. Důsledkem může být opět vysoký věk myši, jelikož z důvodu katabolických procesů jim nemusí efektivně narůstat jak tělesná hmotnost, tak ani hmotnost konkrétních tukových dep. I tak se u štíhlejších jedinců hromadil tuk více ve viscerálních oblastech. Všechna experimentální zvířata byla v pokročilém věku. Takže i když nebyla podle definice obézní, byla stará. Důsledkem věkem podmíněných změn v organismu může dojít také k redistribuci tukové tkáně a může hrát určitou roli v ukládání tuku v preferenčních lokalitách.

Tudíž věk (společně s energetickým příjmem) může být podstatným faktorem nejen pro nárůst celkové tělesné hmotnosti a akumulaci tukové tkáně, ale i pro redistribuci tuku do konkrétních tukových dep.

5.2. LOKALIZACE ADIPOCYTŮ

Vzorky srdcí s okolními tkáněmi a tukových tkání byly histologicky zpracovány (viz kapitola 4.1.). Po barvení H&E byly jednotlivé řezy analyzovány pomocí světelného mikroskopu (Olympus BX53). Hlavním cílem analýzy bylo identifikovat přítomnost adipocytů a určit jejich distribuci a asociaci s jednotlivými srdečními oddíly (pravá předsíň, pravá komora, levá předsíň, levá komora (RA, RV, LA, LV)), případně s cévním zásobením. Přestože PVAT nebyla detailně rozlišena dle anatomické lokalizace (periaortální, perikoronární, kolem dolní/horní duté žíly, plicních tepen či plicních žil), histologická analýza odhalila přítomnost unilokulárních i multilokulárních adipocytů, což svědčí o heterogenním složení této tukové tkáně.

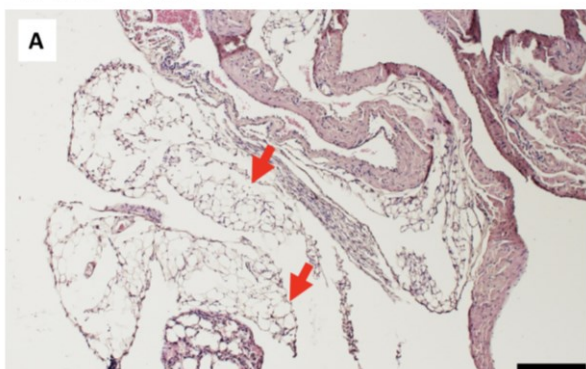
Pro kvantifikaci velikosti adipocytů byly pořízeny digitální snímky pomocí záznamového zařízení Olympus DP74 (Olympus, Japonsko), které byly následně analyzovány pomocí softwaru NIS Elements. Pro každý snímek byla vypočtena plocha průřezu adipocytu, která se používá jako marker jeho velikosti. Jak ukazuje tabulka č. 5, ne u všech pozorovaných subjektů byla přítomna stejná/všechna tuková depa. Vzhledem k tomu, že jednotlivé řezy srdce a okolní tkáně byly od sebe vzdálené 3–30 μm (viz kapitola 4), je pravděpodobné, že pokud adipocyty v konkrétní oblasti při histologické analýze nebyly zaznamenány, opravdu je tkáň postrádala.

		dKOH1	dKOH4	dKOH6	WTH2	WTH3	WTH5
1. metabolicky významná tuková depa							
	gWAT	6073,41	4690,91	8306,74	6334,01	5276,65	5968,22
	scWAT	5442,22	2077,57	6342,75	7148,39	4139,99	3295,89
	iBAT	1326,32	952,11	2671,19	2270,54	1162,79	2581,77
2. tuková depa u pravé poloviny srdce							
	RA EAT	1045,41	655,08	2693,38		679,85	
	RA IMAT			1239,67			
	RA pAT	3182,36		1683,49	2365,39	1156,41	
	RV EAT	1249,91					
	RV IMAT	862,49		2491,19			
	RV pAT	4331,38	307,62		3077,14	392,75	
3. tuková depa u levé poloviny srdce							
	LA EAT					566,35	
	LA IMAT						
	LA pAT	1105,33		1730,05	1538,47	815,19	
	LV EAT			2397,67		307,90	927,37
	LV IMAT	1994,16	559,29			290,97	1564,28
	LV pAT		587,86	2686,94	1780,31	174,41	1665,21
4. tuk - perivaskulární							
	PVAT	1496,09	362,16	819,89	438,08	467,43	672,72

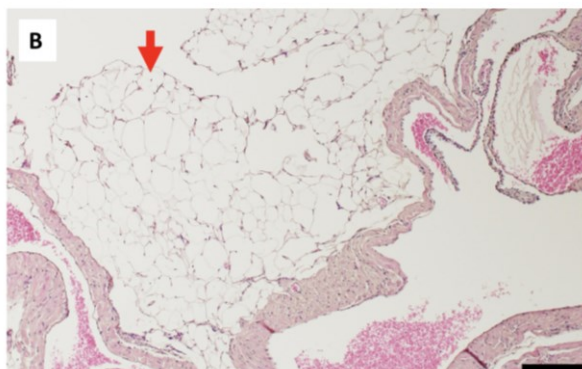
Tabulka č. 5 – Výskyt tukových dep včetně velikosti adipocytů. Modře jsou označeny lokality, ve kterých byla přítomnost tukové tkáně zaznamenána, včetně průměrné plochy průřezu jako indikace velikosti uniloculárního adipocytu. Červenou barvou jsou vyznačeny oblasti, kde tuková tkáň detekována nebyla. Tyto výsledky naznačují existenci preferenčního ukládání tuku do specifických anatomických oblastí. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v μm^2 .

Výsledky ukázaly, že vyšší tělesná hmotnost je asociována s větší velikostí adipocytů ve většině tukových dep (Histologický preparát č. 2). Výjimku tvořily myši s výrazně nižší tělesnou hmotností (WTH3, dKOH4), které měly adipocyty menší. Průměrná velikost adipocytů byla ve všech měřených depech (kromě scWAT a iBAT) nesignifikantně vyšší u dKO myši ve srovnání s WT, a to i včetně EAT a IMAT.

WTH3 - PVAT



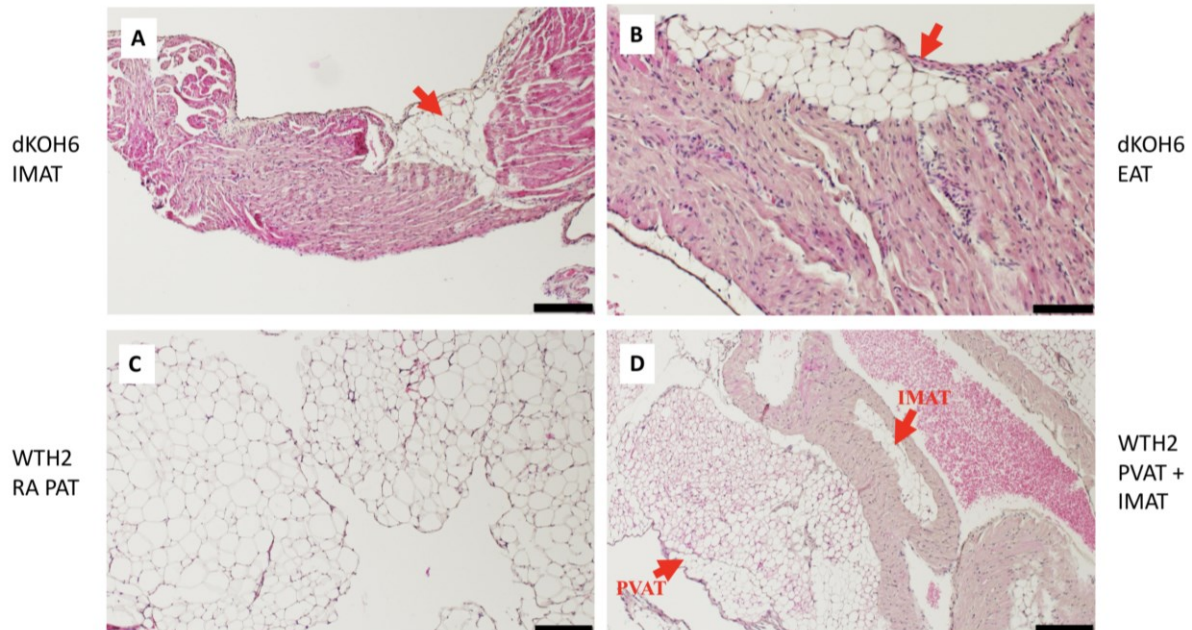
dKOH1 - PVAT



Histologický preparát č. 2 – Porovnání velikosti adipocytů mezi genotypy na příkladu PVAT depa. Snímek A zobrazuje histologický preparát PVAT u myši s nižší tělesnou hmotností. Její tělesná hmotnost byla nižší ve srovnání s myši dKOH1, jejíž PVAT je vyobrazena na snímku B. Z obou preparátů je patrné, že adipocyty (šipky) u dKOH1 dosahovaly větších rozměrů než u WTH3. 100x zvětšení. Měřítka 200 μm . Barvení H&E.

5.2.1. IMAT

IMAT se obecně vyskytuje nejčastěji v RV, následně v LV, zejména v oblasti apexu. Překvapivě u našich vzorků u WT myši nebyla přítomnost IMAT v RV prokázána. Možným vysvětlením by mohla být absence EAT v této oblasti, jelikož u jedinců, u nichž byla IMAT zaznamenána, byla ve stejné oblasti přítomna i EAT. Tento vztah naznačuje, že velikost EAT by mohla být prediktorem výskytu IMAT (viz Histologický preparát č. 3, kde se nachází IMAT i EAT u stejného jedince).

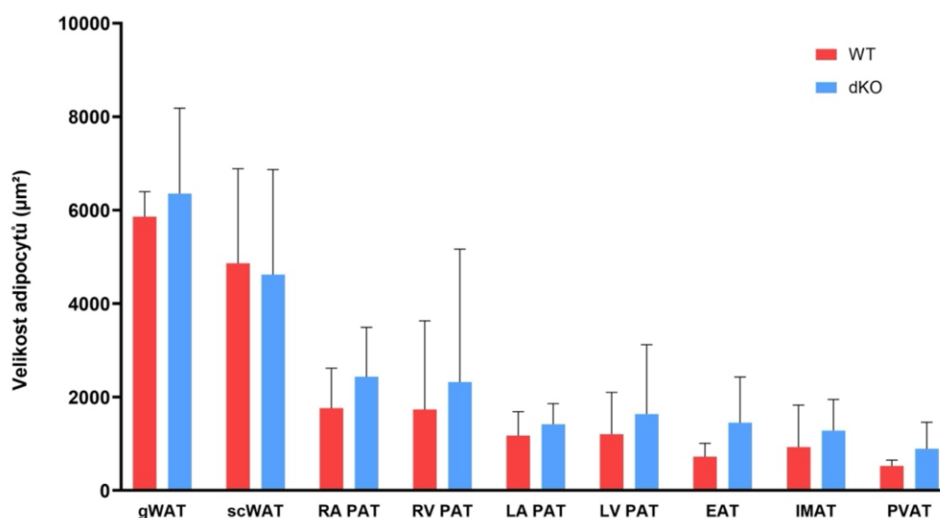


Histologický preparát č. 3 – Porovnání míry infiltrace a velikosti adipocytů u stejných jedinců v rozdílných depech. Snímek B zachycuje EAT u dKO myši. Na obr. A je znázorněna IMAT u stejného jedince, přičemž nedochází k agresivní infiltraci adipocytů do myokardu, což je patrné i na snímku D u WT myši (označeno šipkou IMAT). Adipocyty v IMAT dosahují menší velikosti v porovnání s RA PAT na snímku C, přestože se jedná o stejného jedince. 100x zvětšení u snímků A, B, C, měřítko 200 μm , 200x zvětšení u snímku B, měřítko 100 μm . Barvení H&E.

U jedinců s nižší tělesnou hmotností byla IMAT detekována výhradně v LV. Adipocyty v této oblasti dosahovaly menších velikostí v porovnání s obézními jedinci. Tento náleznaznačuje, že u štíhlejších jedinců se IMAT může vyskytovat z důvodu staršího věku. Adipocyty nedosahují velkých velikostí (hodnoty v tabulce č. 5), tudíž by se nemuselo jednat o excesivní akumulaci tukové tkáně do tohoto depa, jelikož takto malé adipocyty v nízkém počtu nemusí narušovat činnost myokardu (viz Histologický preparát č. 3).

Přítomnost intramyokardiálních adipocytů byla častější u dKO myši a výskyt byl zaznamenán nejen v LV, ale i v RA a RV. Ačkoliv průměrná velikost adipocytů nedosahovala u dKO myši statisticky významně vyšší velikosti v porovnání s WT jedinci, zaznamenali jsme určitý trend (graf č. 8). Tento nálezn by byl v souladu s hypotézou, že dKO

myši mají vyšší tělesnou hmotnost a tím pádem i větší a početnější adipocyty. Jelikož mezi dKO a WT jedinci nebyl pozorován významný rozdíl v celkové tělesné hmotnosti, je možné, že na preferenční ukládání tuku v intramyokardiálních oblastech má vliv genotyp.

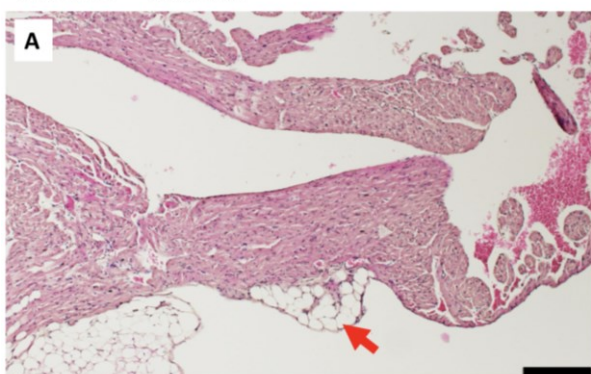
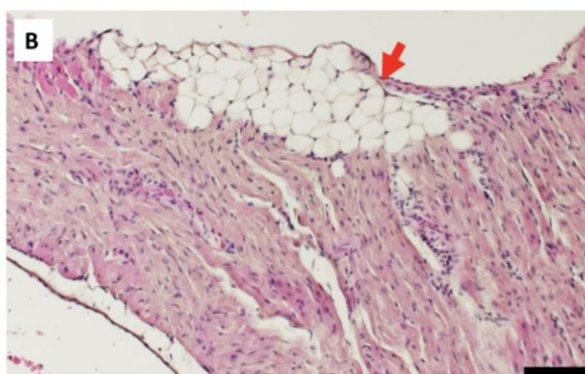


Graf č. 8 – Zastoupení tukové tkáně mezi genotypy ve všech měřených depech. Můžeme z grafu zaznamenat trend vyšší velikosti adipocytů u dKO skupiny, avšak rozdíl mezi genotypy nebyl u žádného z tukových dep statisticky významný (nepárový T-test). Dále byla na porovnání rozdílů mezi jednotlivými depy použita dvoucestná ANOVA, kde opět výsledek nebyl signifikantní.

5.2.2. EAT

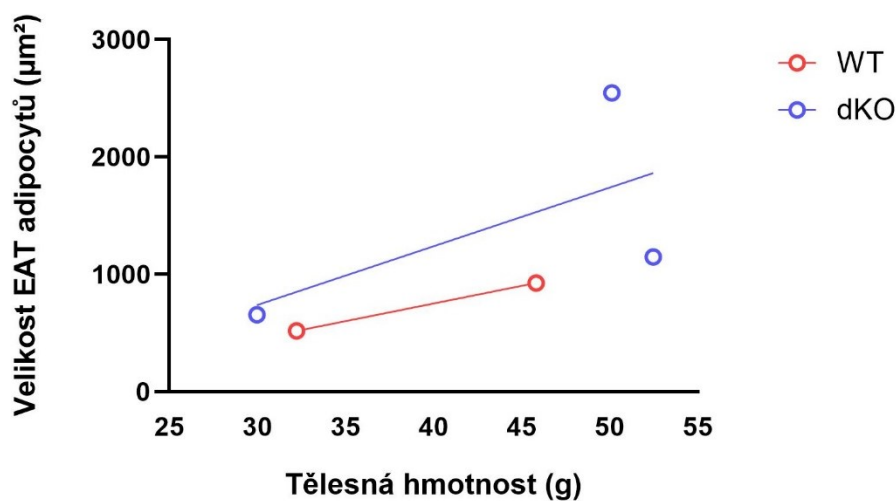
EAT byla také častěji přítomna u dKO myši, zejména v pravé části srdce (RA, RV). Byla však detekována i v LV, kde adipocyty dosahovaly větších rozměrů ($2397,67 \mu\text{m}^2$) jak u dKO, tak u WT myši v porovnání s pravostrannými srdečními oddíly. Tento rozdíl v distribuci a velikosti adipocytů mezi levou a pravou stranou srdce může naznačovat rozdílné mechanismy ukládání tuku v jednotlivých částech srdce. U dKO myši byla pozorována tendence k větší velikosti adipocytů i v těchto depech (viz Histologický preparát č. 4)

Podobně jako IMAT byla EAT detekována i u jedinců s nižší tělesnou hmotností. U těchto myši byly adipocyty menší ve srovnání s jedinci s vyšší hmotností (graf č. 9). Nicméně, malá velikost adipocytů v EAT u štíhlejších myši (velikost se pohybovala od $307,90 \mu\text{m}^2$ do $679,85 \mu\text{m}^2$; hodnoty viz tabulka č. 5) naznačuje, že tato tkáň neplní primárně zásobní funkci, ale pravděpodobně se podílí na metabolické a regulační aktivitě.

dKOH1 – RA EAT**dKOH6 – RA EAT**

Histologický preparát č. 4 – EAT u dKO jedinců. Histologické snímky zobrazují epikardiální adipocyty v RA u dKO jedinců (vyznačeno šipkou). 100x zvětšení u snímku A, měřítko 200 μm ; 200x zvětšení u snímku B, měřítko 100 μm . Barvení H&E.

Alternativní hypotézou může být tvrzení, že množství EAT není primárně determinováno procentuálním zastoupením tělesného tuku, ani genotypem, ani celkovou hmotností jedince, ale je přítomen jako fyziologická struktura. U lidí je EAT detekovatelné i u hubených osob a patologicky působí v období zvýšeného zastoupení celkového tělesného tuku, kdy se množství EAT zvyšuje.

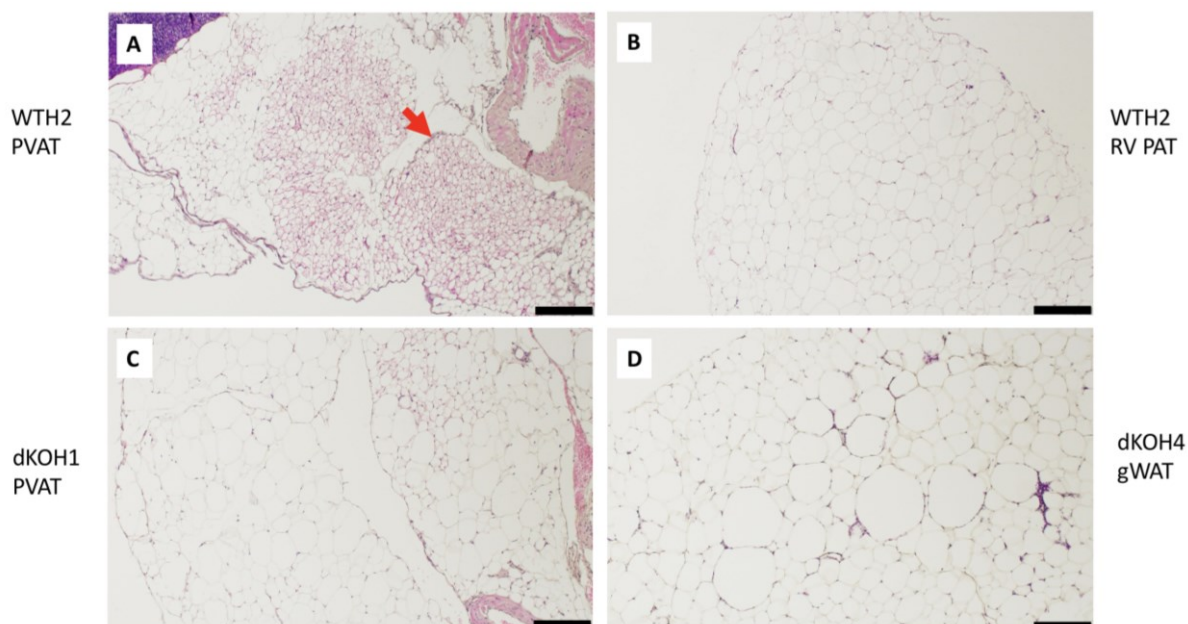


Graf č. 9 – Závislost velikosti epikardiálních adipocytů na tělesné hmotnosti myši. Graf znázorňuje trend pozitivní korelace mezi tělesnou hmotností a velikostí epikardiálních adipocytů u WT a dKO skupiny. Statistické testy (lineární regrese) neprokázaly signifikantní rozdíl mezi genotypy, ani vliv tělesné hmotnosti na velikost adipocytů.

5.2.2. DALŠÍ TUKOVÁ DEPA KOLEM SRDCE

Největší adipocyty v oblasti srdce byly zaznamenány v PAT, zejména v pravé části srdce (RV PAT, Histologický preparát č. 5, snímek B). To může souviset se skutečností, že perikardiální depa obsahovalo nejvíce unilokulárních adipocytů, a to zejména v porovnání s PVAT, kde čím

blíže byly řezy kmeni aorty, tím vyšší byl podíl multilokulárních adipocytů (viz Histologický preparát č. 5, snímek A).



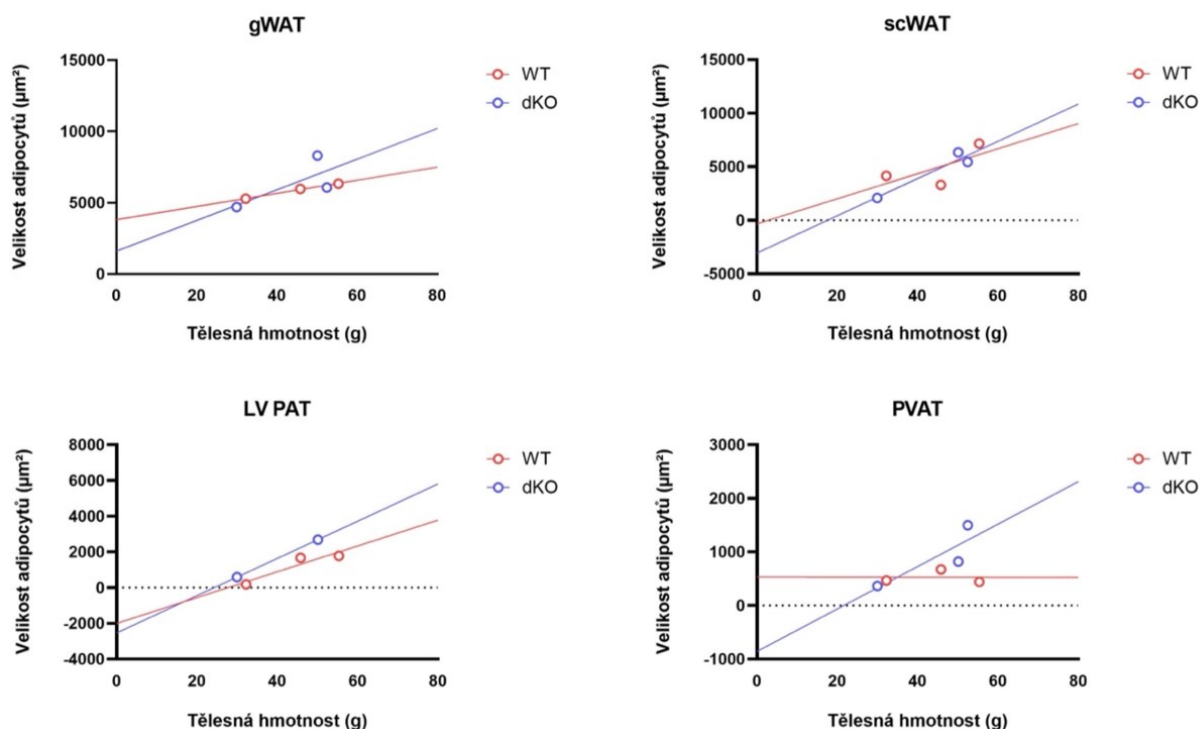
Histologický preparát č. 5 – Porovnání velikosti a fenotypu adipocytů. Na snímku B jsou uniloculární adipocyty v oblasti RV PAT, zatímco snímek A ukazuje přítomnost multilokulárních adipocytů (šipka) v PVAT u téhož jedince, které dosahují menších velikostí. Velikost adipocytů mezi WT a dKO jedinci se v PVAT vizuálně liší, jak je patrné ze snímků A a C, přičemž u dKO jedinců uniloculární adipocyty dosahují větších rozměrů. Přesto se jejich celková velikost jeví menší v porovnání s jinými viscerálními depy, jako je např. gWAT, zobrazen na snímku D. 100x zvětšení, měřítko 200 μ m. Barvení H&E.

PVAT vykazovala odlišné charakteristiky ve srovnání s ostatními tukovými depy. U dKO myši se uniloculární adipocyty v PVAT jeví větší než u WT myši (viz Histologický preparát č. 5, snímek A, C), avšak celková velikost buněk dosahovala v tomto depu nižšího trendu ve srovnání s jinými tukovými depy (viz Histologický preparát č. 5, snímek C, D, graf č. 8). Tento rozdíl může souviset s vyšším zastoupením multilokulárních adipocytů v PVAT u WT myši, zatímco dKO myši vykazují trend ke zvětšování adipocytů. To naznačuje, že velikost adipocytů v PVAT může být více ovlivněna genotypem než tělesnou hmotností. Pokud by mezi WT a dKO myšmi existoval signifikantní rozdíl, což naše data nepotvrzují (nepárový T-test; $p > 0,05$), genetický profil by mohl hrát roli v regulaci PVAT.

5.3. VELIKOST ADIPOCYTŮ VE VYBRANÝCH DEPECH

Analýza grafů odhalila rozdílné trendy mezi WT a dKO myšmi ve vztahu mezi tělesnou hmotností a velikostí adipocytů v jednotlivých tukových depech (graf č. 10). Pro hodnocení byla vybrána čtyři tuková depa tak, aby splňovala podmínku, že alespoň u pěti myši ze šesti byla v těchto depech detekována tuková tkáň. U dKO skupiny byl pozorován vzestupný trend, kdy při zvyšující se tělesné hmotnosti se zvětšovaly i adipocyty. Tento efekt byl výraznější

než u WT myší, u nichž nebyl trend mezi tělesnou hmotností a velikostí adipocytů v některých depech vůbec zaznamenán (graf č. 10, PVAT). Strmost regresních přímek mezi skupinami naznačuje rozdíly ve velikosti buněk, přičemž u dKO myší docházelo k nesignifikantnímu, ale výraznějšímu nárůstu velikosti adipocytů v porovnání s WT skupinou.



Graf č. 10 – Velikost adipocytů v porovnání s tělesnou hmotností myší ve vybraných depech. Porovnání velikosti adipocytů mezi WT a dKO skupinou nebyla ani u jednoho vybraného tukového depa statisticky signifikantní (lineární regrese, podmínka $p < 0,05$), až na PVAT, kde rozdíl mezi genotypy byl pomocí lineární regrese prokázán jako signifikantní ($p < 0,05$).

S nárůstem tělesné hmotnosti stoupá velikost adipocytů v důsledku akumulace MK v lipidových kapénkách. Pozorovali jsme rozdíly ve velikosti adipocytů mezi štíhlejšími a obézními jedinci (viz graf č. 10 a tabulka č. 6). Z našich dat vyplývá, že štíhlejší myši měly o 25 % menší velikosti adipocytů a o 50 % nižší hmotnost VAT než obézní jedinci, a zároveň menší adipocyty jak v gWAT, tak v PAT. Tato zjištění podporují hypotézu, že s rostoucím objemem VAT dochází k vyšší akumulaci tuku v okolí srdce.

Skupina	Váha gWAT (g)	Velikost gWAT adipocytů (μm^2)	Velikost LV pAT adipocytů (μm^2)	Velikost RV pAT adipocytů (μm^2)
obézní myši	1,9575	6670,59	2044,1521*	3704,26*
štíhlejší myši	0,945	4983,78	381,14*	350,19*

Tabulka č. 6 – Průměrná velikost adipocytů u myši s odlišnou tělesnou hmotností bez ohledu na genotyp. Štíhlejší myši měly o 25 % menší adipocyty ve srovnání s obézními jedinci. Obézní (dKO1, WTH2, WTH5, dKOH6), štíhlejší (WTH3, dKOH4), detailní hodnoty v tabulce č. 5). Statisticky významné výsledky označeny * (nepárový T-test, $p < 0,5$).

Z předchozích analýz vyplývá, že mezi WT a dKO skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v tělesné hmotnosti. Přesto WT myši obecně vykazovaly tendenci k menší velikosti adipocytů v porovnání s dKO jedinci. Při detailnějším pohledu na individuální subjekty lze pozorovat, že štíhlejší myši (bez závislosti vlivu genotypu) měly menší adipocyty, zatímco u obézních myši se vyskytovaly adipocyty o větší velikosti (Histologický preparát č. 6). Tento jev podporuje hypotézu, že vyšší tělesná hmotnost pozitivně koreluje s větší velikostí adipocytů bez ohledu na genotyp.

dKOH4 - scWAT



dKOH1 - scWAT

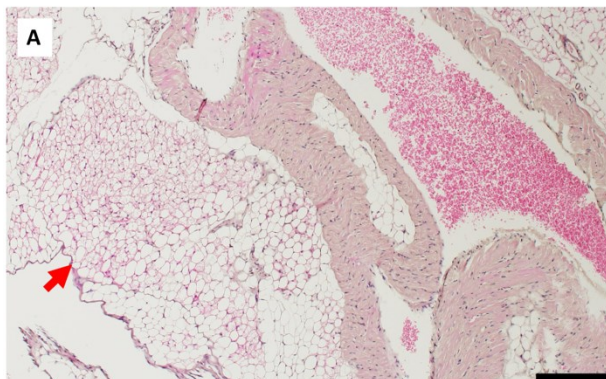


Histologický preparát č. 6 – Velikost adipocytů v závislosti na tělesné hmotnosti. Na snímku A vidíme velikost subkutánních adipocytů u myši, která vážila 29,98 g. Na snímku B vidíme velikost adipocytů ve stejném depu u myši, která vážila 52,48 g. Obě myši byly genotypem dKO. Mezi adipocyty přesto můžeme pozorovat rozdíl ve velikosti. 100x zvětšení, měřítko 200 μm . Barvení H&E.

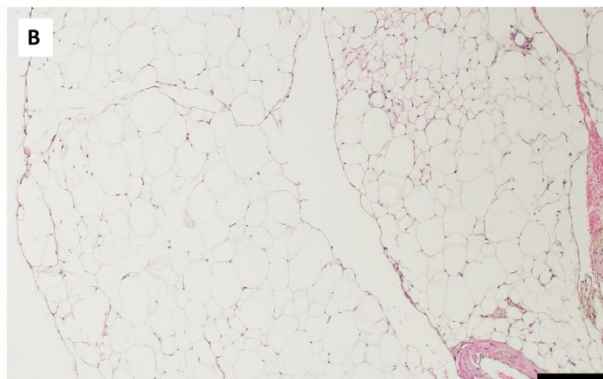
Naopak u PVAT byl mezi genotypy rozdíl zaznamenán. Zatímco u WT myši zůstávala velikost adipocytů konstantní bez ohledu na tělesnou hmotnost, u dKO myši docházelo k jejich zvětšování se zvyšující se tělesnou hmotností (graf č. 10). Tento rozdíl by mohl souviset s rozdílným zastoupením multilokulárních adipocytů a odlišnou termoregulační kapacitou mezi genotypy. WT myši si pravděpodobně udržují vyšší podíl multilokulárních adipocytů v PVAT pro zachování termogeneze. Zatímco u dKO myši by mohlo docházet

k jejich přeměně na unilokulární adipocyty s následným zvětšováním jejich velikosti při nárůstu tělesné hmotnosti (viz Histologický preparát č. 7).

WTH2 – PVAT + IMAT



dKO1 - PVAT



Histologický preparát č. 7 – Fenotypická variabilita perivaskulárních adipocytů v závislosti na genotypu. U WT myši (snímek A) je patrné vysoké zastoupení multilokulárních adipocytů (šipka). Naproti tomu u dKO myši (snímek B) jsou multilokulární adipocyty přítomny v menším množství, přičemž převažují adipocyty unilokulární. Zvětšení 100x, měřítko 200 μ m. Barvení H&E.

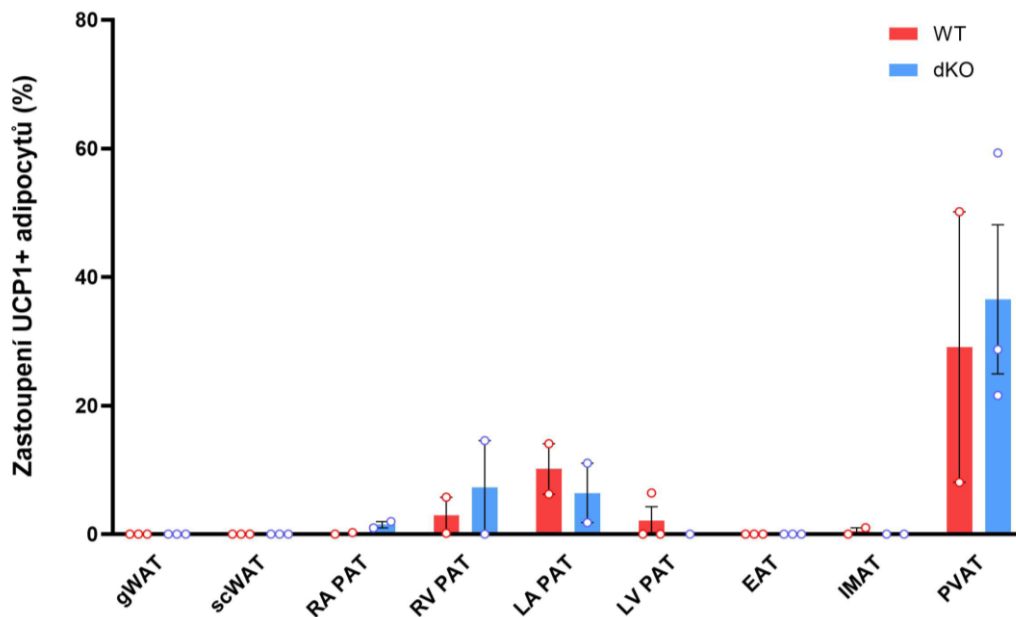
Mezi analyzovanými tukovými depy byly nejčastěji detekovány PVAT a PAT v LV, což naznačuje, že tyto oblasti představují primární místa akumulace tuku v myším srdci. Přítomnost adipocytů ve zmíněných depech u většiny sledovaných myši podporuje hypotézu, že PVAT a LV PAT hrají klíčovou roli ve fyziologii a patofyziologii organismu jako dvě nejhodněji zastoupená tuková srdeční depa.

5.4. ZASTOUPENÍ UCP1+ BUNĚK V ANALYZOVANÝCH DEPECH

Po imunohistochemickém barvení byly vzorky analyzovány pomocí světelné mikroskopie s cílem co nejpřesněji lokalizovat tukovou tkáň v konkrétních anatomických oblastech. U konkrétních dep byly pořízeny mikroskopické snímky. Následná kvantifikace snímků byla provedena pomocí softwaru NIS Elements, který umožnil stanovení poměru mezi UCP1-positivní a UCP1-negativní tkání v jednotlivých tukových depech.

Celková analýza ukázala, že výskyt UCP1+ buněk byl ve většině zkoumaných oblastí nízký (graf č. 11). Dominantní depo představuje PVAT, kde zastoupení UCP1+ buněk dosahovalo 29,1 % u WT a 36,5 % u dKO myši. Také jsme zaznamenali trend k vyššímu zastoupení UCP1+ buněk u dKO myši ve srovnání s WT skupinou, ale výsledky nenabývaly statisticky významných hodnot. Skutečnost, že ze všech tukových dep asociovaných se srdcem představuje právě PVAT dominantní depo obsahující UCP1+ adipocyty naznačuje významnost PVAT pro organismus, když zůstává multilokulární tkáň zachována navzdory

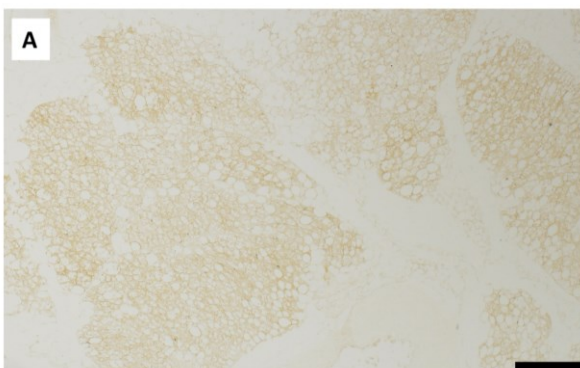
progresi obezity a věku, na rozdíl od klasických BAT dep (např. iBAT), jejichž objem se s věkem a obezitou snižuje.



Graf č. 11 – Procentuální zastoupení UCP1 aktivní tkáně ve všech měřených depech. Mezi genotypy není statisticky signifikantní rozdíl v přítomnosti UCP1+ buněk v jednotlivých depech (nepárový T-test), ani pokud porovnáme přítomnost UCP1+ adipocytů mezi jednotlivými depy (dvoucestná ANOVA, kde opět výsledek nebyl signifikantní).

gWAT a scWAT nevykazovala žádnou detekovatelnou UCP1 aktivitu (graf č. 11). Což odpovídá literárním údajům naznačujícím, že WAT neobsahuje hnědé ani béžové adipocyty ve významném množství. Tento výsledek potvrzuje uniloculární charakter těchto dep a absenci přímé termogenní funkce. Termogenní funkci u myši představují jiná depa, než gWAT nebo scWAT (viz Histologický preparát č. 8).

WTH2 - PVAT



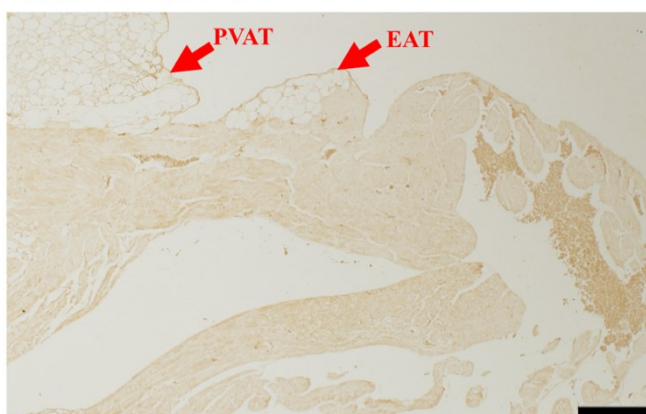
dKO1 - scWAT



Histologický preparát č. 8 – Histologické zobrazení ne/přítomnosti UCP1 aktivní tkáně. Na preparátu A jsou patrné multiloculární UCP1+ adipocyty v PVAT depu, která vykazovala nejvyšší pozitivitu UCP1 ze všech analyzovaných tukových dep. Tento preparát lze porovnat s preparátem B, který pochází ze subkutánního depa, kde byla zaznamenána 0% přítomnost UCP1+ adipocytů. 100x zvětšení, měřítko 200 μ m. Imunohistochemické barvení na přítomnost UCP1 proteinu, který je vizualizován hnědým zbarvením.

Z analýzy dat vyplývá, že s rostoucím věkem a tělesnou hmotností dochází k poklesu zastoupení UCP1+ adipocytů. Přestože v některých tukových depech byla jejich přítomnost zaznamenána, jejich podíl zůstával nízký. U myši je EAT obecně považována za obtížně detekovatelné tukové depo a dosud nebylo jednoznačně prokázáno, že by obsahovalo UCP1+ adipocyty. Existují však studie u lidí, které na základě mRNA analýz naznačovaly možnost přítomnosti UCP1+ adipocytů v EAT (Nedergaard, Cannon, 2013), avšak přímý důkaz pomocí imunohistochemie chyběl. Vzhledem k tomu, že pracujeme s myším modelem, který obsahuje minimální množství EAT, je její detekce včetně případné přítomnosti UCP1+ adipocytů náročná. Zde jsme však mohli potvrdit výskyt EAT u dKO i WT modelu. Ve všech subjektech byla pozorována absence UCP1+ adipocytů v EAT (viz Histologický preparát č. 9). Tento nálezn podporuje tvrzení, že EAT neplní termogenní funkci. Tudíž je pravděpodobné, že pracovní myokard sám o sobě vytváří dostatečné množství tepla.

dKOH1 – RA EAT



Histologický preparát č. 9 – EAT jako UCP1 negativní tkáň. Preparát zahrnuje PVAT a EAT. Je patrné, že PVAT obsahuje multilokulární adipocyty, zatímco v EAT jejich přítomnost nebyla zaznamenána. 100x zvětšení, měřítko 200 μ m. Imunohistochemické na přítomnost UCP1 proteinu, který je vizualizován hnědým zbarvením.

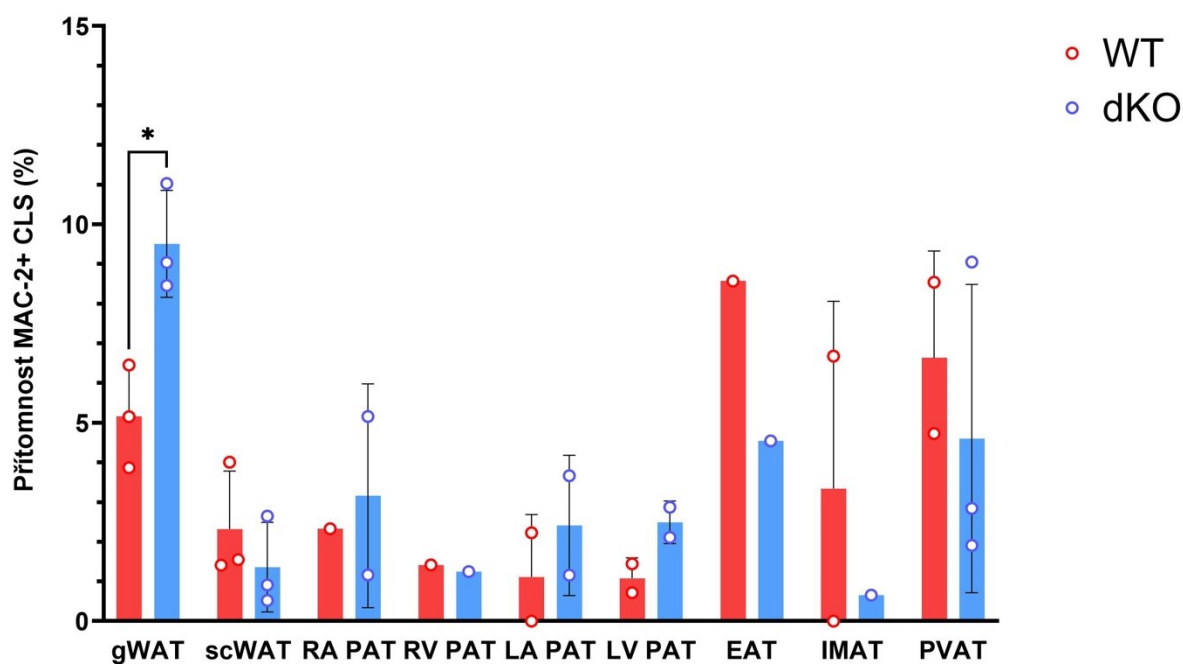
Mírné zastoupení UCP1+ adipocytů bylo detekováno také v PAT, zejména v oblastech RV a LA (graf č. 11). Tento nálezn by mohl být částečně ovlivněn technickými faktory souvisejícími s histologickým zpracováním vzorků, kdy mohlo dojít k odtržení části perivaskulárního tuku a při vyhodnocení se mohl jevit jako PAT. Přesto však v ostatních srdečních tukových depech byla přítomnost UCP1+ buněk minimální.

Většina srdeční tukové tkáně byla tedy detekována u modelu geneticky modifikovaných starých myši na HFD jako unilokulární a pravděpodobně plní spíše metabolickou a strukturální funkci než funkci termogenního depa. Zároveň tento výsledek podporuje hypotézu, že s narůstající obezitou a věkem jedince dochází ke snížení podílu UCP1 aktivních adipocytů, neboť tyto myši vykazovaly celkově nižší zastoupení

UCP1+ tkáň. Celkově analýza metabolicky významných tukových dep ukázala rozdíly v zastoupení UCP1+ buněk mezi jednotlivými tukovými depy. Nejvyšší UCP1 pozitivita byla zaznamenána v PVAT, zatímco ostatní depa se vyznačovala převážně unilokulární morfologií.

5.5. ZASTOUPENÍ MAC-2+ CLS V ANALYZOVANÝCH DEPECH

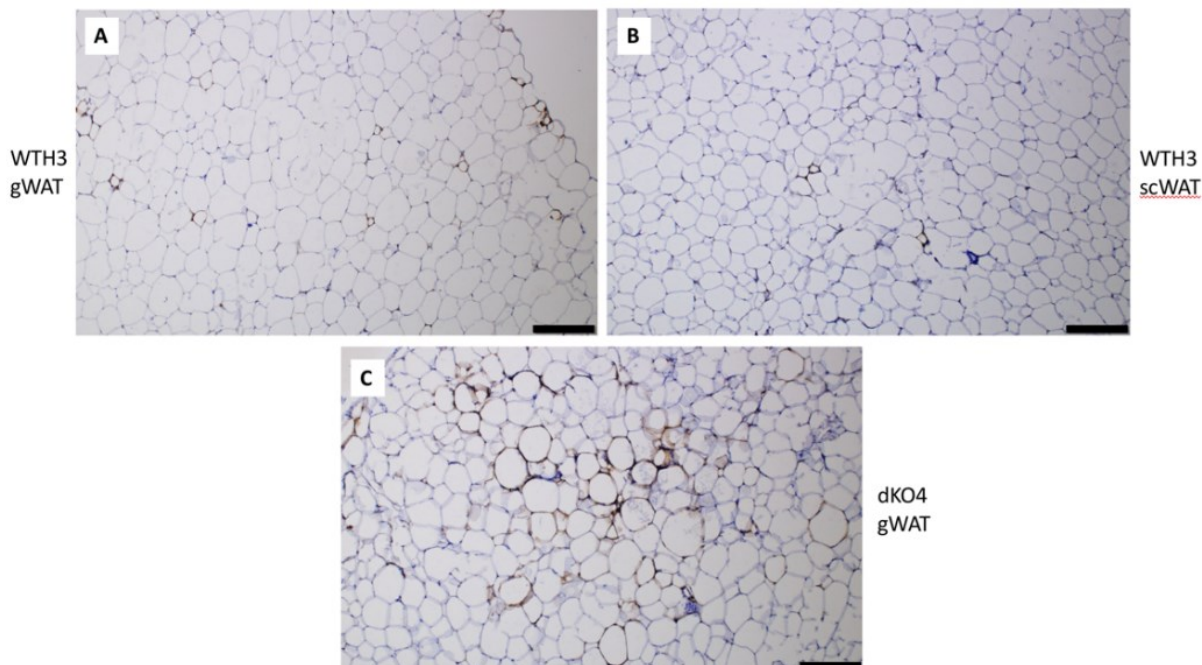
Kvantifikace zánětlivé odpovědi byla provedena na základě detekce MAC-2 pozitivních buněk (makrofágů) vmezeřených mezi adipocyty. Mac-2 antigen je protein vázající se na cukerné zbytky vyskytující se na makrofázích (ale i jiných buňkách – např. monocytch, lymfocytch, neutrofilních granulocytech nebo endoteliálních buňkách). Pomocí softwaru bylo určeno procentuální zastoupení MAC-2+ CLS (nekroticky/apoptoticky umírajících adipocytů obklopených makrofágy, jejichž úkolem je adipocyty zřagocytovat) vzhledem k celkovému počtu adipocytů v jednotlivých tukových depech.



Graf č. 12 – Přítomnost MAC-2+ CLS ve všech měřených tukových depech. Nepárový *T* test, $p < 0,05$ u porovnání genotypů v gWAT. U ostatních dep se mezi genotypy neprokázal statisticky významný rozdíl (nepárový *T*-test), ani při porovnání přítomnosti MAC-2+ CLS v rámci jednotlivých tukových dep (dvoucestná ANOVA).

Graf č. 12 znázorňuje zastoupení MAC-2+ CLS v jednotlivých tukových depech opět u dvou experimentálních skupin, dKO a WT. Zastoupení MAC-2+ CLS je vyjádřeno v procentech z celkového počtu buněk v daném depu. Nejvyšší podíl MAC-2+ CLS byl zaznamenán v gWAT, přičemž dKO jedinci vykazovali vyšší infiltraci makrofágů ve srovnání s WT skupinou (viz Histologický preparát č. 10, snímek A, C). Tento náleznaznačuje, že u dKO myši může docházet k zesílené zánětlivé odpovědi ve VAT, případně může záviset

i na dynamice nárůstu hmotnosti – viz tendence dřívějšího nástupu obezity u dKO jedinců v kapitole 5.1. Porovnáním hodnot mezi gWAT a scWAT bylo zjištěno, že viscerální depa vykazují vyšší trend k potenciálnímu rozvoji zánětu než subkutánní depa (viz Histologický preparát 10, snímek A, B), i v rámci jednoho jedince.

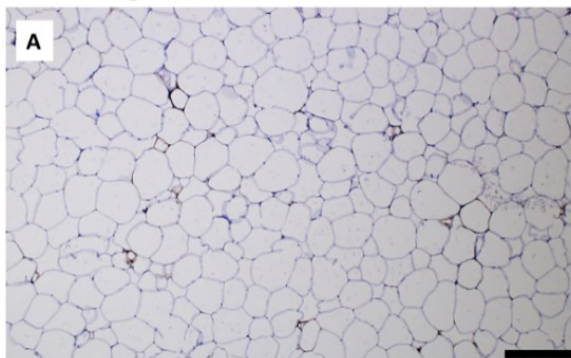


Histologický preparát č. 10 – Množství MAC-2+ CLS v rámci vybraných tukových dep. U WT jedinců jsme zaznamenali nižší přítomnost MAC-2+ CLS oproti dKO (snímek A a C), tudíž se u nich vyskytovala nižší míra zánětu. Na snímku A a B vidíme porovnání mezi viscerálním a subkutánním depem u stejného jedince. Množství MAC-2+ CLS je u viscerálního depa vyšší. Měřitko 200 μ m. Imunohistochemické barvení MAC-2, přítomnost antigenu je zvýrazněna hnědou barvou.

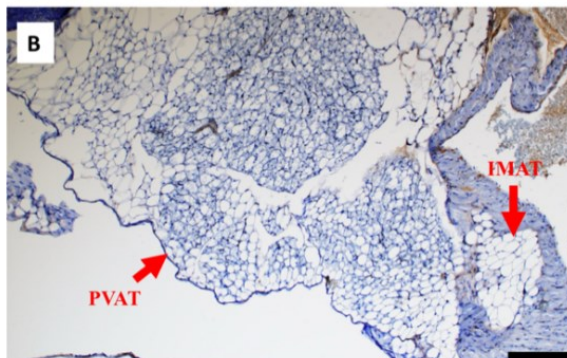
Při interpretaci výsledků v některých depech, zejména právě v EAT a IMAT, je nutná opatrnost. Kvantifikace MAC-2 pozitivních buněk byla prováděna na základě jejich poměru k celkovému počtu adipocytů. Avšak v těchto depech bylo adipocytů výrazně méně než v jiných sledovaných oblastech, např. v PAT. Z tohoto důvodu mohlo dojít k nadhodnocení relativního zastoupení makrofágů, tudíž i přítomnosti zánětu. Proto je vhodné zaměřit se především na srovnání mezi WT a dKO v rámci jednotlivých dep, spíše než na přímé porovnání množství zánětu mezi jednotlivými depy (Histologický preparát č. 11).

Nejpřesnější stanovení zánětlivého profilu bylo možné v gWAT, scWAT a PAT, kde bylo zastoupení adipocytů dostatečné pro spolehlivý výpočet relativní přítomnosti makrofágů. Naproti tomu v EAT, IMAT a PVAT byla analýza komplikovanější.

WTH2 - gWAT



WTH2 – PVAT + IMAT

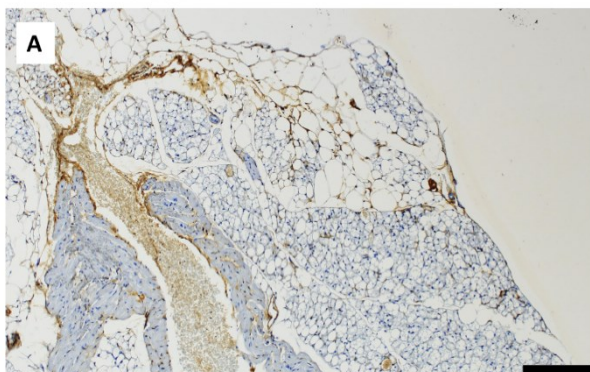


Histologický preparát č. 11 – Ukázka analýzy viscerálních dep. Šipka na snímku B ukazuje na IMAT, který v porovnání s gWAT na snímku A obsahuje podstatně méně adipocytů. To může nadhodnocovat poměr MAC-2+ buněk k celkovému množství adipocytů v daném depu. Snímek B obsahuje PVAT depo (šipka), ve kterém mají adipocyty multilokulární charakter. Z důvodu jejich fenotypu opět nebylo možné kvalitně analyzovat míru MAC-2+ buněk v porovnání se snímek A. 100x zvětšení, měřítko 200 μ m. Imunohistochemické barvení MAC-2, přítomnost antigenu je zvýrazněna hnědou barvou.

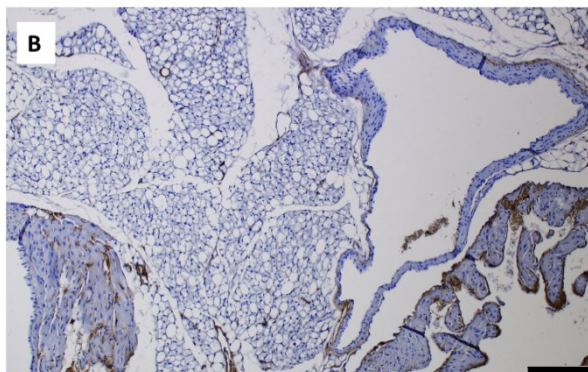
Všechny subjekty nevykazovaly přítomnost tukové tkáně ve všech měřených depech, a kromě obsazení relativně nízkého počtu adipocytů v EAT a IMAT, PVAT navíc zahrnovalo jak uniloculární, tak multiloculární adipocyty. Kvantifikace makrofágů byla provedena pouze na uniloculárních buňkách, což mohlo ovlivnit výsledné hodnoty zánětu. Proto je i zde, u PVAT, vhodné zaměřit se spíše na srovnání mezi WT a dKO než na absolutní hodnoty.

V ostatních depech, zahrnujících scWAT, PVAT a PAT, byly rozdíly mezi experimentálními skupinami méně výrazné. PVAT vykazoval mírně vyšší zastoupení MAC-2+ buněk u WT jedinců ve srovnání s dKO myši (Histologický preparát č. 12), což by mohlo naznačovat odlišné regulační mechanismy zánětlivé odpovědi mezi genotypy v okolí cév. Jak už bylo výše zmíněno, PVAT je z velké části multiloculární tukové depo. Proto je i zde vhodné porovnávat genotypy než konkrétní procentuální hodnoty.

WTH2 - PVAT

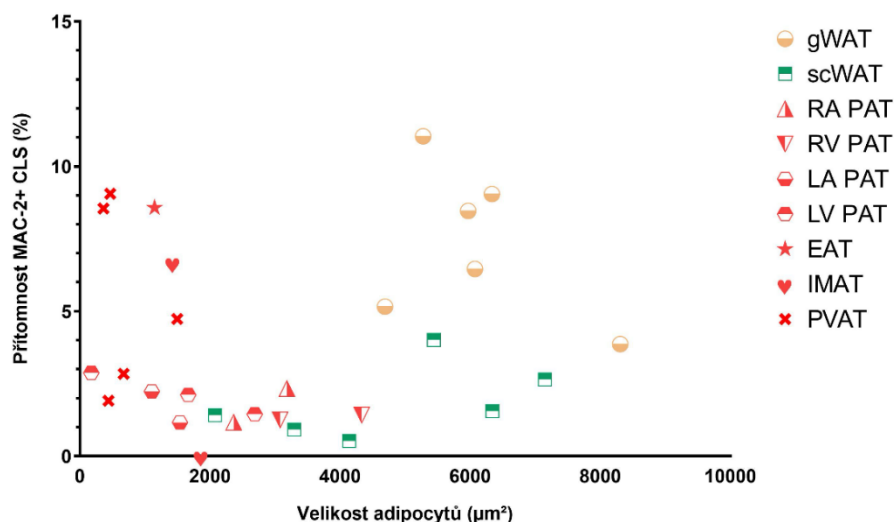


dKOH6 - PVAT



Histologický preparát č. 12 – Výskyt MAC-2+ buněk u WT a dKO myši v PVAT. Snímek A u WT jedince obsahuje více MAC-2+ CLS v porovnání se snímek B u dKO myši. 100x zvětšení, měřítko 200 μ m. Imunohistochemické barvení MAC-2, přítomnost antigenu je zvýrazněna hnědou barvou.

Tyto výsledky zdůrazňují roli tukové tkáně jako imunometabolického orgánu a ukazují, že její zánětlivý stav není homogenní napříč celým organismem, ale je specifický pro jednotlivé anatomické oblasti.

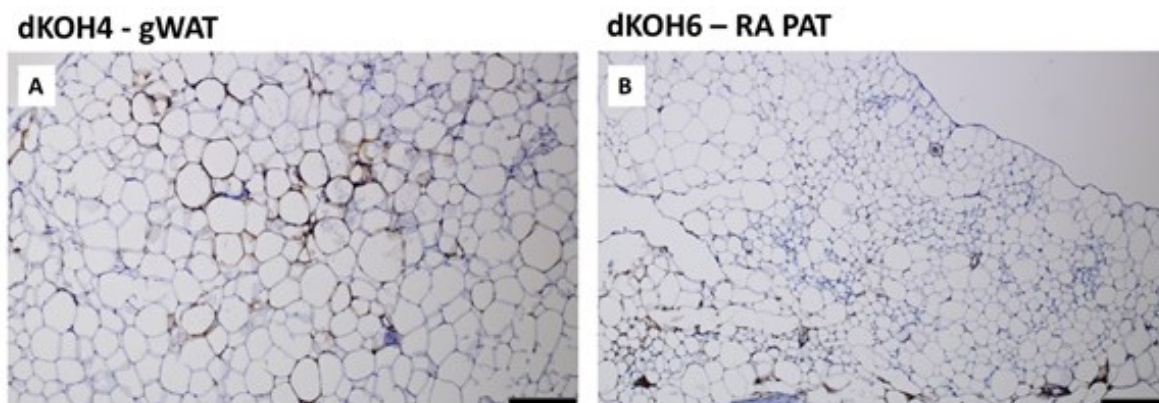


Graf č. 13 – Vztah mezi velikostí adipocytů a intenzitou zánětu v rámci měřených dep. Lineární regrese, $p > 0,05$ u všech dep kromě LV PAT, tam $p < 0,05$.

Graf č. 13 znázorňuje vztah mezi velikostí adipocytů a intenzitou zánětu, přičemž zánětlivý stav tukové tkáně je reprezentován přítomností MAC-2+ CLS. S akumulací MK v adipocytu dochází ke zvětšování jeho lipidové kapénky. Adipocyt má omezenou kapacitu expanze, a při dosažení kritické velikosti podléhá buněčnému stresu, což může vést k jeho apoptotické nebo nekrotické buněčné smrti. Tento proces iniciuje imunitní odpověď, při níž dochází k infiltraci makrofágů, které fagocytují umírající adipocyty. Makrofágy formují CLS, dochází k produkci prozánětlivých cytokinů a rozvoji zánětlivé reakce. Z tohoto důvodu jsme analyzovali souvislost mezi velikostí adipocytů a mírou zánětlivé odpovědi s cílem ověřit hypotézu, zda větší adipocyty vykazují vyšší zánětlivý profil. Zjistili jsme, že z hodnocených tukových dep nevyplývá pozitivní korelace mezi velikostí adipocytů a intenzitou zánětlivé odpovědi.

Na grafu č. 13 jsou znázorněna jak viscerální, tak subkutánní depa s tím, že stejnou barvou jsou označena všechna měřená srdeční depa. U tukové tkáně obklopující srdce byla zaznamenána vyšší infiltrace makrofágů i v místech s menšími adipocyty (PVAT, EAT, IMAT), tudíž z grafu vyplývá negativní trend mezi velikostí adipocytů a intenzitou zánětu, resp. nezáleží jen na velikosti adipocytů, ale také na konkrétním místě výskytu. V případě PVAT je však nutné vzít v úvahu metodologické omezení spočívající v analýze výhradně uniloculárních adipocytů, což mohlo ovlivnit výsledné hodnoty zánětlivé odpovědi. U EAT a IMAT mohou být výsledky zkresleny nízkým celkovým počtem adipocytů, nicméně

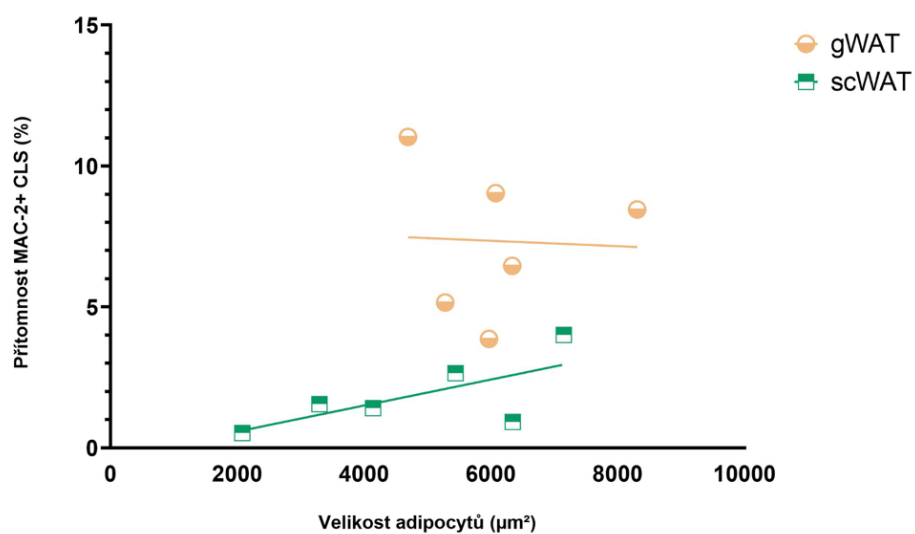
přítomnost MAC-2+ buněk byla v těchto depech prokazatelná. To naznačuje, že tuková depa s menšími adipocyty mohou podléhat vyšší infiltraci imunitních buněk.



Histologický preparát č. 13 – Výskyt MAC-2+ buněk u gonadálního depa a depa asociovaného se srdcem. Na snímku A vidíme vyšší přítomnost MAC-2+ CLS a větší velikost adipocytů oproti PAT na snímku B. 100x zvětšení, měřítko 200 μ m. Imunohistochemické barvení MAC-2, přítomnost antigenu je zvýrazněna hnědou barvou.

S adipocyty asociovanými se srdečními strukturami byly porovnány gWAT a scWAT, které vykazovaly vyšší celkovou míru zánětlivé infiltrace (viz Histologický preparát č. 13). Nicméně, největší adipocyty v gWAT a scWAT nevykazovaly nejvyšší míru infiltrace makrofágů, což bylo v rozporu s očekáváním. V případě scWAT byl pozorován pozitivní trend mezi velikostí adipocytů a mírou infiltrace MAC-2+ buněk, avšak u gWAT tento trend nebyl patrný. V grafu č. 14 jsme nerozlišovali dKO a WT jedince, analýza se soustředila pouze na vztah mezi velikostí adipocytů a mírou zánětu. Na základě našich výsledků jsme zjistili, že gWAT vykazuje vyšší prozánětlivý profil v porovnání se scWAT. Zánětlivý stav v scWAT je převážně závislý na velikosti adipocytů. Konkrétně, s rostoucí velikostí subkutánních adipocytů můžeme pozorovat zvyšující se trend přítomnosti zánětu. Naopak u gWAT jsme v rámci jednotlivých jedinců neidentifikovali pozitivní korelaci ani trend mezi velikostí adipocytů a mírou zánětu. Ačkoliv jsou adipocyty v gWAT větší než v scWAT, výsledky analýzy nevykazují korelaci napříč jedinci.

Výsledky této analýzy poukazují na roli tukové tkáně jako imunometabolického orgánu a ukazují, že zánětlivý stav adipocytů není homogenní napříč jednotlivými tukovými depy. Nejvyšší míra zánětu byla pozorována v PVAT, EAT a gWAT. Což naznačuje, že tyto tkáně mohou představovat významný zdroj prozánětlivých cytokinů. Zvýšený zánět v PVAT může mít důsledky pro kardiovaskulární zdraví, jelikož přímo obklopuje myokard a cévní struktury, zatímco vysoká infiltrace makrofágů v gWAT může přispívat k rozvoji metabolického syndromu a souvisejících komorbidit.



Graf č. 14 – Vztah mezi velikostí adipocytů a intenzitou zánětu v rámci měřených dep.
 Lineární regrese, $p > 0,05$ u všech dep kromě LV PAT, tam $p < 0,05$.

6. DISKUZE

6.1. ÚVOD

S rostoucí prevalencí KVO asociovaných s obezitou a stárnutím se zvyšuje nejen potřeba identifikace markerů sloužících jako ukazatele kardiovaskulárního rizika, ale i potřeba vývoje nových terapeutických strategií cílených na tyto patologie.

Studium tukové tkáně asociované se srdcem představuje klíčový krok k pochopení její role ve fyziologických i patologických procesech. Pro detailní analýzu její funkce, interakci s kardiovaskulárním systémem a vlivu na srdeční strukturu a činnost je nezbytné využití vhodného experimentálního modelu. Odborná literatura přináší četné důkazy o negativním dopadu EAT na kardiovaskulární zdraví. Klinické studie potvrzují její významnou přítomnost u lidí (Mazurek, Zhang *et al.*, 2003) a naznačují, že po dosažení určitého objemu (> 5 mm) může EAT nabývat patologického charakteru. Vzhledem k tomu, že se jedná o metabolicky aktivní tkáň s přímým vlivem na srdeční funkce, je nezbytné zaměřit se na strategie její modulace – ať už prostřednictvím redukce tělesné hmotnosti nebo farmakologických intervencí.

Výskyt EAT nemusí být přímo závislý na věku, BMI, WHR ani WC, tedy na celkovém procentuálním zastoupení tělesného tuku. Tato tuková tkáň je přítomná jak u obézních, tak u štíhlých jedinců, přičemž patologické důsledky její existence úzce souvisí s jejím objemem. Čím větší množství EAT, tím výraznější je její negativní dopad na organismus. Na základě těchto skutečností jsme si kladli otázky: Jakým způsobem EAT a další tuková depa asociovaná se srdcem u našeho myšího modelu fungují – resp. kde se nejvíce ukládají? V jakých depech dosahují adipocyty největších velikostí? Jaká je jejich morfologie? Jsou tato tuková depa u myší skutečně přítomna? Obsahují multilokulární, případně UCP1+ adipocyty? Dochází u nich k zánětlivým procesům? A především – je myší model vhodný pro studium tuku kolem srdce, pokud mají být získané poznatky aplikovatelné na lidský organismus?

6.2. JE MYŠÍ MODEL VHODNÝ PRO STUDIUM TUKOVÉ TKÁNĚ V OKOLÍ SRDCE?

Studium tukové tkáně v okolí srdce je významné pro pochopení jejího vlivu na kardiovaskulární systém, zejména v souvislosti s obezitou, stářím a výskytem metabolických poruch. Přestože myší model může poskytnout určité poznatky o ukládání perikardiálního tuku, mnohem významnější dopad na lidský organismus má tuk epikardiální a využití myšího modelu pro studium EAT představuje limitaci. Důvodem jsou anatomické

a funkční rozdíly mezi hlodavci a lidmi, které ovlivňují jak distribuci, tak i vlastnosti tukové tkáně v okolí srdce. Proto jsme se snažili najít lepší myší model, který byl nejen geneticky modifikovaný (dKO), ale myši zahrnuté do experimentu byly rok staré a dlouhodobě (7 měsíců) krmené HFD. Ani s touto intervencí se nám nepodařilo prokázat významnost myšího modelu při studiu EAT. Naakumulovaného epikardiálního tuku měly i takto vybrané myši stále velmi omezené množství a dva jedinci, pravděpodobně vlivem věku, již ztráceli na hmotnosti.

6.3. VISCERÁLNÍ VS SUBKUTÁNNÍ TUK: FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JEJICH UKLÁDÁNÍ

Na základě předchozích porovnání jsme předpokládali, že dKO myši budou vykazovat vyšší celkové množství tukové tkáně, a to zejména vzhledem k jejich rychlejšímu nárůstu tělesné hmotnosti při podávání HFD ve srovnání s WT jedinci. Tento předpoklad se však nepotvrdil. Výsledky analýzy celkové tělesné hmotnosti a hmotnosti jednotlivých tukových dep naznačují, že genotyp neovlivňuje celkové množství akumulace tukové tkáně, ale především dynamiku nárůstu tělesné hmotnosti. Jakmile jedinci dosáhnou plató fáze, k dalšímu nárůstu hmotnosti již nedochází.

Významnou roli zde sehrává také energetický příjem, což má důležité implikace i pro lidskou populaci, kde nadměrná kalorická zátěž nejen zvyšuje celkový objem tukové tkáně, ale přispívá také k jejímu viscerálnímu ukládání (Lakowa, Trieu *et al.*, 2015), což může nepříznivě působit na kardiovaskulární zdraví. Naše data potvrzují podobný jev i u myší, kdy viscerální depa (zejména gWAT) vykazovala trend k větší velikosti adipocytů a vyšší hmotnosti než depa subkutánní. Tento trend byl patrný i u starších štíhlejších jedinců (WTH3, dKOH4), u kterých došlo k úbytku celkové tělesné hmotnosti, avšak viscerální depa si u nich zachovávala stále vyšší hmotnost v porovnání se scWAT. To naznačuje, že i když nižší tělesná hmotnost ovlivňuje celkové množství VAT, stáří zůstává významným faktorem jeho akumulace.

6.4. LOKALIZACE A VELIKOST ADIPOCYTŮ ASOCIOVANÝCH SE SRDCEM

V rámci našeho výzkumu jsme analyzovali myší model dKO s cílem zjistit, zda tento genotyp ovlivňuje tělesnou hmotnost jedince a zda je vhodným modelem pro studium lidského tuku kolem srdce. Jelikož jsme zaznamenali, že se s přibývajícím věkem a progresí obezity redistribuuje tuková tkáň preferenčně do viscerálních oblastí, včetně VAT kolem srdce, bylo

naším cílem zjistit, zda tento proces souvisí s daným genotypem, a zda se VAT bude zvýšeně ukládat i v epikardiálním depu. Na základě získaných dat jsme však nezaznamenali žádný signifikantní vliv genotypu na redistribuci tukové tkáně. Tento proces byl spíše determinován kombinací faktorů, jako je věk a nadměrný energetický příjem – resp. nadměrná tělesná hmotnost. U lidí je známo, že vyšší věk a obezita zvyšují pravděpodobnost akumulace EAT. U WT ani dKO myši jsme však tento jev neprokázali.

6.4.1. CHARAKTERIZACE EAT U MYŠÍ: ANATOMICKÉ A FUNKČNÍ ODLIŠNOSTI OD LIDSKÉHO MODELU

EAT představuje specifickou formu viscerálního tukového depa, která se u myši vyskytuje ve velmi omezené míře. Zatímco u člověka tvoří přibližně 20 % hmotnosti srdce a může pokrývat až 80 % jeho povrchu (Antonopoulos, Antoniadis, 2017), u myši je její výskyt minimální. U člověka je EAT distribuována především v oblasti *sulcus atrioventricularis* a podél koronárních cév směrem k apexu srdce (Mazurek, Zhang *et al.*, 2003). U myši je přítomnost EAT omezena výhradně na atrioventrikulární brázdou, kde se vyskytuje pouze ve velmi malém množství. Toto množství zůstává konstantní a nezvyšuje se ani při celkovém nárůstu objemu tukové tkáně v jiných tukových depech (Mazurek, Zhang *et al.*, 2003; Sedmera, Bardova *et al.*, manuskript v přípravě). Tato výrazná odlišnost v distribuci EAT naznačuje, že myší model není optimální pro studium této specifické tukové tkáně. V rámci našeho experimentu se nepodařilo jednoznačně určit, zda byla EAT lokalizována v oblasti atrioventrikulární brázdy. Její přítomnost byla zaznamenána, avšak ve výrazně menším rozsahu ve srovnání s lidským modelem. Distribuce EAT nebyla kontinuální a nejčastěji byla zaznamenána v oblasti RA (= nejčastější výskyt nikoliv ve smyslu výskytu kontinuální vrstvy pokrývající celý povrch komor, jak by tomu bylo u lidského srdce, ale ve smyslu, že nejvyšší počet jedinců mělo tuk uloženo v epikardiální vrstvě v RA – viz tabulka č. 5). Stále platí, že EAT byla spíše ojedinělým nálezem.

Další rozdíly byly pozorovány také v distribuci EAT mezi pravou a levou srdeční komorou. Zatímco u lidí EAT pokrývá myokard RV ve třikrát větším rozsahu než myokard LV (Corradi, Maestri *et al.*, 2004), což může být způsobeno buď hypertrofií epikardiálních adipocytů v okolí RV, nebo faktem, že RV má menší tloušťku myokardu v porovnání s LV, tudíž se tím ovlivní i samotný poměr obsahu myokardu k obsahu tuku. V našich výsledcích pozorovaných na myších se však tento konkrétní poměr nepotvrdil.

Přestože je detekce EAT u myši obecně obtížná, v rámci našeho experimentu jsme její přítomnost zaznamenali. Naše data naznačila, že průměrná velikost epikardiálních adipocytů nabývala u dKO modelu vyššího trendu ve srovnání s WT. I tak si ale epikardiální adipocyty zachovávaly menší velikost v porovnání s ostatními tukovými depy (výjimkou multilokulárního PVAT – viz graf č. 8). Analýza velikosti epikardiálních adipocytů ukázala vzrůstající trend v závislosti na celkovém podílu tělesného tuku. Histologické snímky však zároveň odhalily přítomnost EAT u štíhlejších jedinců, což naznačuje, že celkové množství tuku není jediným determinantem výskytu EAT. Výsledky podporují hypotézu, že i věk může představovat významný faktor podporující akumulaci tuku do epikardiální oblasti. Přesto u obézních a starých myši pozorujeme namísto expanze EAT především expanzi PAT a dalších viscerálních tukových dep (gWAT). Což naznačuje, že stárnutí nevede k akumulaci EAT ve stejné míře jako u lidí a tuk se hromadí převážně v jiných oblastech.

6.4.2. CHARAKTERIZACE OSTATNÍCH DEP ASOCIOVANÝCH SE SRDCEM

IMAT tvoří u lidí méně než 1 % celkové hmotnosti srdce (Szczeplaniak, Dobbins *et al.*, 2003) a s věkem jeho přítomnost narůstá. Adipocyty této tkáně se interkalují mezi kardiomyocyty, přičemž nemusí nutně vyvolávat zánětlivé reakce ani zásadně ovlivňovat srdeční funkci (Kim, Choe, 2007). V rámci našeho experimentu byla IMAT nejméně zastoupeným tukovým depem, kdy ani u starších a obézních myši nebylo pozorováno dostatečné množství IMAT, které by mohlo zásadně ovlivnit srdeční funkci. Distribuce IMAT mezi jednotlivými srdečními oddíly byla variabilní. V RA byla IMAT detekována pouze u jednoho jedince (dKOH6), v RV u dvou, v LV u čtyř a v LA nebyl přítomen. Z hlediska genotypu bylo IMAT častější u dKO jedinců, což odpovídá jejich vyšší predispozici k viscerálnímu ukládání tuku. U myši WTH2 nebylo nalezeno IMAT, ale ani EAT, což naznačuje možnou souvislost mezi přítomností obou tukových dep. Pozorovali jsme, že u myši, u nichž bylo detekováno EAT, se objevovala i IMAT, a to bez ohledu na tělesnou hmotnost jedince. Tento jev naznačuje, že EAT může ovlivňovat infiltraci adipocytů do myokardu, avšak vzhledem k minimální přítomnosti EAT u myši není pravděpodobné, že by měla zásadní dopad na srdeční funkci.

V našem experimentu jsme identifikovali přítomnost PVAT u všech zkoumaných jedinců, což naznačuje, že myši model může být vhodný pro studium PVAT z hlediska přítomnosti tukové tkáně. Nicméně, existují zásadní rozdíly mezi lidmi a myšmi ve velikosti PVAT adipocytů a množství tukových kapének v tukových buňkách, což může mít důsledky pro rozvoj KVO. U myši PVAT vykazuje, na rozdíl od lidského modelu, převážně

multilokulární charakter (a to i u modelu starých, obézních myší na HFD), což může implikovat zvýšené protektivní účinky na cévní endotel a naznačuje, že remodelace této tkáně směrem k BAT je žádoucí (Gao, Zeng *et al.*, 2005; Padilla, Jenkins *et al.*, 2013). Navzdory těmto rozdílům lze myší model využít ke studiu strukturálních změn PVAT, například ke kvantifikaci zvýšení objemu tukové tkáně, hypertrofie adipocytů, ztráty UCP1 aktivity, či měření přítomnosti adipokinů, včetně jejich vlivu na kardiovaskulární systém, rozvoj aterosklerózy, hypertenze či remodelaci cévní stěny (Queiroz, Sena, 2020).

Zvýšené množství VAT u lidí úzce koreluje s vyšším WC a rizikem metabolických a kardiovaskulárních komplikací. Se zvyšujícím se objemem VAT a scWAT roste pravděpodobnost akumulace tuku v oblasti srdce, což může vést k patologickým změnám srdeční funkce (Goncalves, Machado *et al.*, 2017). Naše data ukazují trend nárůstu podílu VAT se zvyšující se tělesnou hmotností. Myši s vyšší velikostí gonadálních (viscerálních) adipocytů mají vyšší velikost perikardiálních adipocytů, tj. dochází k vyšší akumulaci tuku v okolí srdce. Studie autorů Hua, Chen a kol. uvádí, že akumulace PAT je vyšší v RV než v LV, přičemž její množství nemusí přímo korelovat s BMI (Hua, Chen *et al.*, 2014). Naše data tento fenomén potvrzují (viz tabulka č. 6). Adipocyty v LV a RV PAT byly u štíhlejších myší přibližně 5–10× menší než u obézních jedinců, což naznačuje, že tělesná hmotnost významně koreluje s velikostí perikardiálních adipocytů.

Jelikož je EAT považována za hlavní faktor v patogenezi srdečních onemocnění, včetně ICHS, FS, SS, kalcifikace koronárních tepen, aterosklerózy a metabolického syndromu, studium EAT by mělo představovat prioritu na rozdíl od PVAT či jiných tukových dep. Vzhledem k výrazným rozdílům v objemu a distribuci EAT mezi myším a lidským modelem se však myší model jeví jako nevhodný pro komplexní studium těchto patologických procesů. Na rozdíl od EAT jsou PVAT a PAT v našem myším modelu velmi dobře detekovatelné a vykazují variabilitu odpovídající různým metabolickým stavům.

6.5. ANALÝZA UCP1 EXPRESE V SRDEČNÍ TUKOVÉ TKÁNI U STARÉHO A OBÉZNÍHO MYŠÍHO MODELU

V rámci této studie jsme se zaměřili na analýzu tukové tkáně asociované se srdcem u starých a obézních myší s cílem zjistit, zda v této lokalitě dochází ke ztrátě UCP1 pozitivitu.

Výsledky ukázaly, že ze všech sledovaných srdečních tukových dep vykazovalo nejvyšší zastoupení UCP1+ adipocytů PVAT. PVAT tak představovalo oblast s nejvyšším podílem BAT charakteristik v porovnání s ostatními srdečními depy. Nicméně,

při histologickém porovnání adipocytů v BAT a PVAT se zdá, že PVAT adipocyty jsou větší než typické BAT adipocyty a svou morfologií odpovídají spíše běžovým adipocytům.

Naopak v scWAT ani gWAT jsme u starých a obézních jedinců neidentifikovali žádné UCP1+ adipocyty a stejný fenomén jsme mohli zaznamenat i v případě EAT. Histologicky se epikardiální adipocyty prezentují jako unilokulární buňky, avšak studie autorů Sack, Fain a kol. prokázala v EAT expresi mRNA pro UCP1 a naznačují její potenciální termogenní aktivitu. Přesto zůstává otázkou, zda EAT k termogenezi přispívá, nebo zda její primární funkcí je poskytovat tepelnou izolaci, mechanickou ochranu a signalizaci pomocí endokrinních a parakrinních molekul (Sack, Fain *et al.*, 2013). Naše analýza se proto zaměřila na imunohistochemické zobrazení UCP1+ buněk a neprokázala přítomnost UCP1+ adipocytů v EAT u myšního modelu. Toto zjištění indikuje minimální či zcela absentní termogenní aktivitu této tkáně. Produkce tepla je pravděpodobně zajišťována spíše aktivitou kardiomyocytů než epikardiálními adipocyty.

6.6. ANALÝZA PŘÍTOMNOSTI CLS V SRDEČNÍ TUKOVÉ TKÁNI U MYŠÍHO MODELU

Z dosavadních studií zabývajících se kvantifikací makrofágové infiltrace víme, že je možné pozorovat přítomnost makrofágů v tukové tkáni pomocí myšního modelu. V této práci jsme se však soustředili na identifikaci přítomnosti makrofágů i v jiných tukových oblastech, s důrazem na tuková depa asociovaná se srdcem. S přibývajícím věkem dochází ke zvýšené infiltraci prozánětlivých buněk do tukové tkáně (Zhang, Ou *et al.*, 2023).

Sledování vlivu zánětlivých procesů na EAT je u myši značně limitováno minimální přítomností adipocytů v tomto depu. Ačkoli existují studie zabývající se zánětem tukové tkáně u myši, většina z nich se orientuje na jiná viscerální depa, zejména gWAT (Weisberg, McCann *et al.*, 2003; Medrikova, Jilkova *et al.* 2011). Je prokázáno, že viscerální tuková depa obsahují více prozánětlivých buněk ve srovnání s ostatními tukovými depy. V souladu s těmito poznatky jsme v našem experimentu zaznamenali u WT jedinců dvojnásobně a u dKO jedinců až šestnásobně vyšší množství MAC-2+ CLS ve viscerálním depu v porovnání se scWAT. Analýza dat ukázala, že u dKO zvířat dochází ve viscerálním depu k téměř dvojnásobně vyšší zánětlivé odpovědi v porovnání s WT jedinci, což potvrzuje zvýšený zánětlivý profil tohoto konkrétního tukového depa.

Tato data naznačují, že ačkoliv je obezita významným faktorem ovlivňujícím velikost adipocytů a distribuci tukové tkáně, samotná velikost buněk nemusí být hlavním determinantem celkového množství zánětlivého procesu v tkáni. Závisí také na místě výskytu

konkrétního depa, které analyzujeme. To podporuje hypotézu o komplexním vztahu mezi metabolickým zdravím, tělesnou hmotností a distribucí tukové tkáně, jehož pochopení je klíčové pro porozumění patofyziologie kardiometabolických onemocnění.

6.6.1. ZÁNĚT A MAKROFÁGY

Makrofágy přítomné v tukové tkáni vykazují dynamickou odpověď na změny v energetické bilanci, zejména na hladovění a úbytek hmotnosti. Pozorovali jsme, že štíhlejší myši vykazovaly vyšší podíl MAC-2+ CLS (makrofágů) ve VAT (gWAT) ve srovnání s obézními jedinci (viz graf č. 13). Autoři Kosteli, Sugaru a kol. uvádí, že kalorická restrikce u myši krmených HFD vedla k počátečnímu nárůstu infiltrace makrofágů, který byl následně redukován při delším trvání hmotnostní redukce. Obezita je induktorem aktivace imunitního systému a imunitních buněk, včetně makrofágů, které produkují prozánětlivé cytokiny, čímž přispívají k rozvoji systémového zánětu. Lze očekávat, že pokud obezita indukuje aktivaci makrofágů, pak by snížení počtu adipocytů v důsledku redukce hmotnosti mělo vést k poklesu makrofágové infiltrace. Nicméně, studie autorů Kosteli, Sugaru a kol. neprokázala pozitivní korelaci mezi infiltrací makrofágů a redukcí počtu adipocytů během hubnutí. To naznačuje, že akumulace makrofágů není přímým důsledkem poklesu počtu adipocytů, ale souvisí s jinými metabolickými procesy. Protože při snižování hmotnosti se nemění počet adipocytů, ale jejich velikost (Kosteli, Sugaru *et al.*, 2010).

U hlodavců s rostoucí tělesnou hmotností byla podle autorů Kosteli, Sugaru a kol. (2010) pozorována pozitivní korelace mezi velikostí adipocytů a množstvím makrofágů. Naše výsledky tuto souvislost potvrdily jen částečně. Analýza velikosti adipocytů bez ohledu na hmotnost myši ukázala, že v gWAT tato korelace neplatí (viz graf č. 14). Na druhé straně naše data ukazují, že u jedinců s většími lipidovými kapénkami v scWAT dochází k vyšší infiltraci makrofágů (viz graf č. 14). Tento nálezný proto vyvolává otázku, jaké faktory kromě velikosti adipocytů ovlivňují makrofágovou infiltraci.

Srovnání tělesné hmotnosti a stupně zánětu naznačuje, že zvýšená lipolytická aktivita souvisí s vyšší akumulací makrofágů, jak jsme pozorovali v gWAT (graf č. 14) (který vykazuje vyšší lipolytickou aktivitu než scWAT (Hoffstedt, Arner *et al.*, 1997)). Konkrétně, přítomnost MAC-2+ CLS dosahovala u štíhlejších myši 8,09 %, zatímco u obézních 6,96 %. Ačkoli tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní, naznačuje určitý trend. Nejvyšší infiltrace makrofágů byla podle autorů Kosteli, Sugaru a kol. zaznamenána v době maximální lipolýzy, kdy byly v cirkulaci přítomny nejvyšší hladiny volných MK. To podporuje hypotézu,

že lipolýza stimuluje akumulaci makrofágů, které následně uvolněné MK fagocytují (Kosteli, Sugaru *et al.*, 2010).

U obézních jedinců se často nacházejí makrofágy obsahující mnohočetné lipidové kapénky nebo velké multinukleární makrofágy s unilokulární lipidovou kapénkou. Hladovění bylo spojeno se zvýšenou tvorbou lipidových kapének v makrofázích, což naznačuje, že během energetického deficitu dochází k adaptaci makrofágů na zvýšenou fagocytózu MK. Tento proces pravděpodobně představuje součást koordinované odpovědi na negativní energetickou bilanci, která vede ke snížení extracelulárních koncentrací volných MK a chrání adipocyty před lipotoxicitou. Na základě těchto poznatků byla navržena hypotéza, že negativní energetická bilance vede k mobilizaci TAG zásob a aktivaci lipolýzy, což v počáteční fázi hubnutí u obézních jedinců vyvolává zvýšenou makrofágovou infiltraci. Výsledky naznačují, že během iniciální fáze hmotnostní redukce dochází k nárůstu počtu makrofágů, avšak nejedná se o CD11c+ prozánětlivé makrofágy, které tvoří CLS. Tento fakt naznačuje, že makrofágová odpověď na akutní lipolýzu není nutně spojena se zvýšeným zánětem, jelikož nedochází k indukci M1 makrofágů (CD11c+), která je typická pro obezitu a chronickou expozici volným MK (Kosteli, Sugaru *et al.*, 2010). V naší studii jedinec s nejnižší tělesnou hmotností (dKOH4) vykazoval nejvyšší podíl makrofágové infiltrace, resp. přítomnosti MAC-2+ CLS, dosahující 11 % v gWAT. Je však důležité poznamenat, že naše analýza se zaměřovala pouze na MAC-2+ makrofágy, tudíž nebyla provedena diferenciace mezi M1 a M2 subpopulacemi.

Celkově lze konstatovat, že lokální lipidové fluktuace jsou klíčovým regulátorem rekrutace makrofágů do tukové tkáně. Jakmile jsou makrofágy v tukové tkáni přítomny, plní roli pufračního systému, který snižuje lokální koncentrace lipidů a přispívá k udržení homeostázy lipidového metabolismu.

6.6.2. AKTIVACE MAKROFÁGŮ

Lipolýza v tukové tkáni probíhá v několika formách, které se liší svou regulací a fyziologickou funkcí. Bazální lipolýza představuje kontinuální uvolňování volných MK z adipocytů i v absenci negativní energetické bilance. Její intenzita je zvýšená u obézních jedinců a pozitivně koreluje s velikostí adipocytů. Naproti tomu stimulovaná lipolýza je hormonálně a autonomně řízený proces, při němž dochází k mobilizaci lipidů z tukové tkáně v reakci na negativní energetickou bilanci. Tento proces mobilizuje lipidy z tukové tkáně pro systémové využití jako energetický substrát. Obézní jedinci vykazují vyšší úroveň bazální lipolýzy, což je spojeno se zvýšenou infiltrací makrofágů v tukové tkáni v porovnání

s hubenými jedinci. U obézních jedinců, u kterých dochází k redukci hmotnosti, dochází současně ke zvýšení jak bazální lipolýzy, tak lipolýzy stimulované. Což vede k výraznému nárůstu celkové lipolýzy a následně i k vyšší infiltraci makrofágů, jejichž úkolem je regulace lokálních koncentrací volných MK (Jacobson, Smith 1972; Marin, Andersson *et al.*, 1992; Kosteli, Soguru *et al.*, 2010). Naše analýza ukázala rozdílné vztahy mezi velikostí adipocytů a infiltrací makrofágů v závislosti na typu tukové tkáně. V gWAT byl pozorován mírně negativní trend mezi velikostí adipocytů a intenzitou zánětu (větší adipocyty → nižší přítomnost MAC-2+ CLS), zatímco v scWAT byl tento trend opačný (větší adipocyty → vyšší přítomnost MAC-2+ CLS). U tukových dep asociovaných se srdcem byl zánět udržován pod hladinu 5 % (podobně jako scWAT) i co se týče adipocytů s velikostí přesahující 2000 μm^2 . Avšak EAT, IMAT a PVAT vykazovala zánět vyšší (7–9 %), i když se velikost adipocytů pohybovala pod 2000 μm^2 . Potenciálně by tedy mohla tato depa představovat oblasti s vyšší lipolytickou aktivitou, což u EAT autoři Marchington a Caroline (1990) potvrdili.

Experimentální studie ukázaly, že deplece makrofágů vede ke zvýšení lipolýzy a uvolňování volných MK, což naznačuje, že makrofágy hrají aktivní roli v tlumení lipolýzou indukovaného uvolňování lipidů. Tyto experimenty byly provedeny na gWAT a analyzované makrofágy nebyly CD11c+, tudíž se v tomto kontextu jednalo o alternativně aktivované M2 makrofágy. Viscerální tuková depa vykazují vyšší bazální lipolýzu a vyšší obsah makrofágů než subkutánní depa (Marin, Andersson *et al.*, 1992; Kosteli, Soguru *et al.*, 2010). Tento trend potvrzují i naše data, která ukazují vyšší infiltraci makrofágů v gWAT v porovnání se scWAT.

Hypertrofie adipocytů (akcelerovaná obezitou) vede ke zvýšené apoptotické a nekrotické smrti buněk. Tento proces je významným stimulem aktivace makrofágů a pravděpodobně představuje další mechanismus, který přispívá k jejich akumulaci v tukové tkáni a formaci CLS (Cinti, Mitchell *et al.*, 2005). Růst adipocytů je zároveň spojen se sníženou lokální perfuzí tkáně, což vede ke vzniku oblastí s mikrohypoxií. Tento stav aktivuje zánětlivé signální dráhy, které se podílejí na remodelaci vaskulatury a rekrutaci imunitních buněk (Ye, Gao *et al.*, 2007). Makrofágy fagocytují přebytečné MK, avšak kapacita pro jejich ukládání je omezená. Při jejím překročení dochází k patologickým stavům, viz případ aterosklerózy. Chronická elevace lipolýzy u obézních jedinců tak vede k perzistentní stimulaci makrofágové infiltrace, přičemž dochází ke změně fenotypu makrofágů směrem k prozánětlivé CD11c+ subpopulaci (Cinti, Mitchell *et al.*, 2005; Kosteli, Soguru *et al.*, 2010).

Makrofágy přispívají k regulaci lokálních koncentrací volných MK během stavů zvýšené lipolýzy a chrání adipocyty před lipotoxicitou. U hubených jedinců je bazální lipolýza nízká, adipocyty ukládají minimální množství lipidů a makrofágová infiltrace je omezená. Při aktivaci lipolýzy však dochází k akutnímu zvýšení koncentrací volných MK, což vede k rychlé akumulaci makrofágů bez výrazné zánětlivé odpovědi. Makrofágy zde slouží primárně k lokální regulaci lipidového metabolismu a mohou přispívat ke snížení stresu adipocytů (Kranendonk, Visseren *et al.*, 2014). Po snížení lipidových zásob a poklesu bazální lipolýzy makrofágová infiltrace ustupuje. Nedochozí zde tedy k chronickému zánětu jako u obézních jedinců, kteří mají akumulaci tuku v hypertrofovaných adipocytech spojenou se zvýšenou bazální lipolýzou. Dochází u nich k chronickému uvolňování volných MK a perzistentní rekrutaci makrofágů (Kosteli, Sugaru *et al.*, 2010). Naše data potvrzují, že větší adipocyty v gWAT obsahují více makrofágů v porovnání s ostatními tukovými depy. Ale v srdeční tukové tkáni menší adipocyty vykazují také vysokou makrofágovou infiltraci. Tento jev může být důsledkem zvýšené lipolýzy v těchto depech, či přítomnosti lokálního zánětu, kdy mohou makrofágy vykazovat prozánětlivý fenotyp.

Celkově výsledky potvrzují, že makrofágy v tukové tkáni dynamicky reagují na změny v metabolismu lipidů. Zatímco u obézních jedinců vede chronická stimulace lipolýzy k perzistentnímu makrofágovému zánětu a metabolické dysfunkci, u štíhlejších jedinců se jedná o přechodnou adaptivní odpověď, která přispívá k regulaci lipidové homeostázy.

6.7. PATOFYZIOLOGIE A ZDRAVOTNÍ RIZIKA – IMPLIKACE TUKOVÉ TKÁNĚ KOLEM SRDCE

KVO jsou jednou z celosvětových hlavních příčin morbidity a mortality. Mezi rizikové faktory přispívající k jejich rozvoji patří nejen hypertenze, dyslipidemie, či diabetes mellitus, ale také tuková tkáň v okolí srdce a cév. V této kapitole se zabýváme z KVO zejména AS, FS a CAD.

AS je degenerativní onemocnění aortální chlopně, které se vyznačuje progresivní kalcifikací a zánětlivými procesy. Jedním z rizikových faktorů pro rozvoj AS je zvýšený objem VAT, která prostřednictvím produkce prozánětlivých cytokinů a ROS přispívá k rozvoji zánětu v chlopni (Conte, Petraglia *et al.*, 2022). Ačkoliv jsme se v naší studii nezaměřovali přímo na chlopní vady, zaznamenali jsme vyšší objem VAT u obézních myší, které vykazovaly větší hmotnost gWAT a větší adipocyty. Tento nálezní podporuje hypotézu, že zvýšené množství VAT u obézních jedinců by mohlo přispívat k rozvoji AS. Dále bylo

zjištěno, že tloušťka EAT je u lidských pacientů signifikantně asociována s AS, a to nezávisle na věku, pohlaví a kardiovaskulárních rizikových faktorech (Mahabadi, Kahlert *et al.*, 2017).

FS je arytmie, jejíž patogeneze je spojena s prozánětlivými procesy, které vedou ke strukturální remodelaci předsíní prostřednictvím modulace homeostázy vápníku, apoptózy kardiomyocytů a fibrózy. Navíc FS může sama indukovat zánětlivou odpověď, čímž se vytváří bludný kruh zhoršující průběh onemocnění (Conte, Petraglia *et al.*, 2022). V naší práci jsme analyzovali zánětlivou infiltraci v PAT předsíní (2,24 %) ve srovnání s PAT v okolí komor (1,64 %). Tento rozdíl však nebyl statisticky významný, tudíž nelze jednoznačně potvrdit souvislost mezi objemem PAT a zánětlivými procesy přispívajícími k FS. Nicméně nález mírně vyšší infiltrace v oblasti předsíní odpovídá hypotéze, že PAT by mohla přispívat k patogenezi FS.

CAD je chronické aterosklerotické postižení koronárních tepen, na jehož patogenezi se významně podílí zánětlivé procesy. EAT se nachází v těsném kontaktu s myokardem a koronárními tepnami, přičemž může parakrinně modulovat cévní procesy. U pacientů s CAD dochází ke změně makrofágové polarizace, kdy se zvyšuje podíl M1 na úkor M2. Studie autorů Hirata, Tabata a kol. ukázala pozitivní korelaci mezi poměrem M1/M2 makrofágů a závažnosti CAD (Hirata, Tabata *et al.*, 2011). V našem modelu jsme se nezaměřili na přímou analýzu polarizace makrofágů, nicméně vysoká přítomnost MAC-2+ CLS v epikardiálním tuku naznačuje potenciální roli této tukové tkáně v kardiovaskulárních zánětlivých procesech. Během mikroskopické analýzy jsme však nezaznamenali dostatečnou přítomnost EAT u myši, což omezuje validitu myšího modelu pro studium těchto procesů (MAC-2+ CLS se v EAT vyskytovalo kolem 10 %, ale epikardiálních dep jako takových bylo u myši detekováno málo).

Viscerální tuková depa představují metabolicky aktivní tkáň, která prostřednictvím produkce prozánětlivých cytokinů, ROS a modulace makrofágové polarizace hraje roli v patogenezi KVO. Naše experimentální data naznačují, že zvýšený objem VAT u obézních jedinců by mohl být spojen s vyšším rizikem AS. Dále jsme pozorovali mírně vyšší zánětlivou infiltraci v PAT předsíních, což může podporovat hypotézu o roli PAT v patogenezi AF. V případě CAD byla již dříve prokázána souvislost mezi polarizací makrofágů v EAT a progresí tohoto onemocnění (Hirata, Tabata *et al.*, 2011). Celkově nálezy podporují hypotézu, že VAT, EAT a PAT nejsou pouhými pasivními zásobárnami energie, ale aktivními regulátory zánětlivých procesů, které mohou ovlivňovat kardiovaskulární zdraví.

Závěr

S využitím myších modelů kmene dKO a WT jsme prostřednictvím CT skenu a histologických metod analyzovali distribuci, fenotyp a velikost adipocytů v jednotlivých tukových depech, včetně zastoupení CLS struktur sloužících jako známka přítomnosti zánětu.

1. Na základě získaných dat jsme identifikovali, že myší model, a to ani za podmínek vyššího věku, obezity, či genetické manipulace, není vhodný pro studium EAT. Vliv genotypu se neprokázal jako signifikantně významný z hlediska nárůstu tělesné hmotnosti, ani nezpůsobil zvýšenou akumulaci EAT na úroveň srovnatelnou s člověkem. Výsledky navíc naznačují, že distribuce tukové tkáně v myším organismu není striktně závislá na celkové tělesné hmotnosti – resp. tato závislost je patrná pouze pro určitá tuková depa. U myši dochází namísto expanze EAT především k expanzi PAT a viscerálních tukových dep. Pro jiné oblasti, jako je PVAT, se myší model může potenciálně jevit jako vhodný, avšak je nutné zachovávat obezřetnost při interpretaci morfologických charakteristik adipocytů.
2. Rozlišili jsme jednotlivá tuková depa asociovaná se srdcem a ukázali, že PAT společně s PVAT jsou nejčastější oblasti výskytu adipocytů ve smyslu přítomnosti těchto dep u většiny sledovaných jedinců.
3. PVAT byla v práci jiných autorů identifikována jako hlavní tukové depo s přetrvávající termogenní schopností, která se zachovává navzdory narůstajícímu věku a obezity. Ačkoliv existují studie uvádějící expresi mRNA pro UCP1 v EAT, v našem experimentu jsme imunohistochemicky neprokázáli přítomnost multilokulárních adipocytů v epikardiálnímu depu. Zaznamenali jsme přítomnost CLS v tukové tkáni u starých i obézních jedinců, avšak překvapivě také u štíhlejších jedinců. Tento náález naznačuje, že hypertrofie adipocytů nemusí být jediným faktorem spojeným s makrofágovou infiltrací do tukové tkáně. Navrhli jsme, že tuková depa asociovaná se srdcem mohou představovat oblasti s vyšší lipolytickou aktivitou. To potvrzuje i pozorování, že depo s nejvyšším výskytem CLS představovala gWAT, které má lipolytickou aktivitu nejvyšší.

Seznam literatury a zdrojů

Hvězdičkou (*) jsou označeny reviews:

1. Abbara, S., Desai, J. C., Cury, R. C., Butler, J., Nieman, K., & Reddy, V. (2006). Mapping epicardial fat with multi-detector computed tomography to facilitate percutaneous transepical arrhythmia ablation. *European journal of radiology*, 57(3), 417–422.
2. *An, S. M., Cho, S. H., & Yoon, J. C. (2023). Adipose Tissue and Metabolic Health. *Diabetes & metabolism journal*, 47(5), 595–611.
3. *Antonopoulos, A. S., & Antoniadis, C. (2017). The role of epicardial adipose tissue in cardiac biology: classic concepts and emerging roles. *The Journal of physiology*, 595(12), 3907–3917.
4. Austys, D., Dobrovolskij, A., Jablonskienė, V., Dobrovolskij, V., Valevičienė, N., & Stukas, R. (2019). Epicardial Adipose Tissue Accumulation and Essential Hypertension in Non-Obese Adults. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(8), 456.
5. Ayala-Lopez, N., Jackson, W. F., Burnett, R., Wilson, J. N., Thompson, J. M., & Watts, S. W. (2015). Organic cation transporter 3 contributes to norepinephrine uptake into perivascular adipose tissue. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 309(11), H1904–H1914.
6. Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmüller, A., Gordts, P. L., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., & Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature medicine*, 17(2), 200–205.
7. Bambace, C., Telesca, M., Zoico, E., Sepe, A., Oliosio, D., Rossi, A., Corzato, F., Di Francesco, V., Mazzucco, A., Santini, F., & Zamboni, M. (2011). Adiponectin gene expression and adipocyte diameter: a comparison between epicardial and subcutaneous adipose tissue in men. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 20(5), e153–e156.
8. *Börgeson, E., Boucher, J., & Hagberg, C. E. (2022). Of mice and men: Pinpointing species differences in adipose tissue biology. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 1003118.
9. Burgeiro, A., Fuhrmann, A., Cherian, S., Espinoza, D., Jarak, I., Carvalho, R. A., Loureiro, M., Patrício, M., Antunes, M., & Carvalho, E. (2016). Glucose uptake and lipid metabolism are impaired in epicardial adipose tissue from heart failure patients with or without diabetes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 310(7), E550–E564.
10. Calligaris, S. D., Lecanda, M., Solis, F., Ezquer, M., Gutiérrez, J., Brandan, E., Leiva, A., Sobrevia, L., & Conget, P. (2013). Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PloS one*, 8(4), e60931.
11. Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research*, 46(11), 2347–2355.
12. Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C., & Benoit, S. C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, 55(4), 978–987.

13. *Conte, M., Petraglia, L., Poggio, P., Valerio, V., Cabaro, S., Campana, P., Comentale, G., Attena, E., Russo, V., Pilato, E., Formisano, P., Leosco, D., & Parisi, V. (2022). Inflammation and Cardiovascular Diseases in the Elderly: The Role of Epicardial Adipose Tissue. *Frontiers in medicine*, *9*, 844266.
14. Corradi, D., Maestri, R., Callegari, S., Pastori, P., Goldoni, M., Luong, T. V., & Bordi, C. (2004). The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, *13*(6), 313–316.
15. Darcy, J., & Tseng, Y. H. (2019). ComBATing aging-does increased brown adipose tissue activity confer longevity?. *GeroScience*, *41*(3), 285–296.
16. *Florez-Duquet, M., & McDonald, R. B. (1998). Cold-induced thermoregulation and biological aging. *Physiological reviews*, *78*(2), 339–358.
17. Gao, P., Jiang, Y., Wu, H., Sun, F., Li, Y., He, H., Wang, B., Lu, Z., Hu, Y., Wei, X., Cui, Y., He, C., Wang, L., Zheng, H., Yang, G., Liu, D., Yan, Z., & Zhu, Z. (2020). Inhibition of Mitochondrial Calcium Overload by SIRT3 Prevents Obesity- or Age-Related Whitening of Brown Adipose Tissue. *Diabetes*, *69*(2), 165–180.
18. Gao, Y. J., Zeng, Z. H., Teoh, K., Sharma, A. M., Abouzahr, L., Cybulsky, I., Lamy, A., Semelhago, L., & Lee, R. M. (2005). Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, *130*(4), 1130–1136.
19. Giordano, A., Cinti, F., Canese, R., Carpinelli, G., Colleluori, G., Di Vincenzo, A., Palombelli, G., Severi, I., Moretti, M., Redaelli, C., Partridge, J., Zingaretti, M. C., Agostini, A., Sternardi, F., Giovagnoni, A., Castorina, S., & Cinti, S. (2022). The Adipose Organ Is a Unitary Structure in Mice and Humans. *Biomedicines*, *10*(9), 2275.
20. *Giordano, A., Frontini, A., & Cinti, S. (2016). Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nature reviews. Drug discovery*, *15*(6), 405–424.
21. *Ghesmati, Z., Rashid, M., Fayezi, S., Gieseler, F., Alizadeh, E., & Darabi, M. (2024). An update on the secretory functions of brown, white, and beige adipose tissue: Towards therapeutic applications. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, *25*(2), 279–308.
22. Gollisch, K. S., Brandauer, J., Jessen, N., Toyoda, T., Nayer, A., Hirshman, M. F., & Goodyear, L. J. (2009). Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, *297*(2), E495–E504.
23. Gonçalves, L. F., Machado, T. Q., Castro-Pinheiro, C., de Souza, N. G., Oliveira, K. J., & Fernandes-Santos, C. (2017). Ageing is associated with brown adipose tissue remodelling and loss of white fat browning in female C57BL/6 mice. *International journal of experimental pathology*, *98*(2), 100–108.
24. *Gritsenko, A., Green, J. P., Brough, D., & Lopez-Castejon, G. (2020). Mechanisms of NLRP3 priming in inflammaging and age related diseases. *Cytokine & growth factor reviews*, *55*, 15–25.
25. Gunawardana, S. C., & Piston, D. W. (2015). Insulin-independent reversal of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice with brown adipose tissue transplant. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, *308*(12), E1043–E1055.
26. *Gustafson, B., & Smith, U. (2015). Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, *241*(1), 27–35.

27. Haberka, M., Machnik, G., Kowalówka, A., Biedroń, M., Skudrzyk, E., Regulska-Ilow, B., Gajos, G., Manka, R., Deja, M., Okopień, B., & Gąsior, Z. (2019). Epicardial, paracardial, and perivascular fat quantity, gene expressions, and serum cytokines in patients with coronary artery disease and diabetes. *Polish archives of internal medicine*, 129(11), 738–746.
28. Hirata, Y., Tabata, M., Kurobe, H., Motoki, T., Akaike, M., Nishio, C., Higashida, M., Mikasa, H., Nakaya, Y., Takanashi, S., Igarashi, T., Kitagawa, T., & Sata, M. (2011). Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(3), 248–255.
29. Hoffstedt, J., Arner, P., Hellers, G., & Lönnqvist, F. (1997). Variation in adrenergic regulation of lipolysis between omental and subcutaneous adipocytes from obese and non-obese men. *Journal of lipid research*, 38(4), 795–804.
30. Hua, N., Chen, Z., Phinikaridou, A., Pham, T., Qiao, Y., LaValley, M. P., Bigornia, S. J., Ruth, M. R., Apovian, C. M., Ruberg, F. L., & Hamilton, J. A. (2014). The influence of pericardial fat upon left ventricular function in obese females: evidence of a site-specific effect. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance*, 16(1), 37.
31. Cheng, V. Y., Dey, D., Tamarappoo, B., Nakazato, R., Gransar, H., Miranda-Peats, R., Ramesh, A., Wong, N. D., Shaw, L. J., Slomka, P. J., & Berman, D. S. (2010). Pericardial fat burden on ECG-gated noncontrast CT in asymptomatic patients who subsequently experience adverse cardiovascular events. *JACC. Cardiovascular imaging*, 3(4), 352–360.
32. *Chun K. H. (2021). Mouse model of the adipose organ: the heterogeneous anatomical characteristics. *Archives of pharmacal research*, 44(9-10), 857–875.
33. *Chusyd, D. E., Wang, D., Huffman, D. M., & Nagy, T. R. (2016). Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Frontiers in nutrition*, 3, 10.
34. Iacobellis, G., Ribaldo, M. C., Zappaterreno, A., Iannucci, C. V., & Leonetti, F. (2004). Relation between epicardial adipose tissue and left ventricular mass. *The American journal of cardiology*, 94(8), 1084–1087.
35. *Iacobellis, G., Corradi, D., & Sharma, A. M. (2005). Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, 2(10), 536–543.
36. *Iacobellis, G., & Bianco, A. C. (2011). Epicardial adipose tissue: emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 22(11), 450–457.
37. *Iacobellis G. (2021). Aging Effects on Epicardial Adipose Tissue. *Frontiers in aging*, 2, 666260.
38. *Iacobellis G. (2022). Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology. *Nature reviews. Cardiology*, 19(9), 593–606.
39. *Iacobellis G. (2023). Epicardial fat links obesity to cardiovascular diseases. *Progress in cardiovascular diseases*, 78, 27–33.
40. Ibrahim M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11(1), 11–18.

41. Jacobsson, B., & Smith, U. (1972). Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells. *Journal of lipid research*, 13(5), 651–656.
42. Johnson, P. R., & Hirsch, J. (1972). Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *Journal of lipid research*, 13(1), 2–11.
43. Kalmpourtzidou, A., Di Napoli, I., Vincenti, A., De Giuseppe, R., Casali, P. M., Tomasinelli, C. E., Ferrara, F., Tursi, F., & Cena, H. (2024). Epicardial fat and insulin resistance in healthy older adults: a cross-sectional analysis. *GeroScience*, 46(2), 2123–2137.
44. Kim, E., Choe, Y. H., Han, B. K., Kim, S. M., Kim, J. S., Park, S. W., & Sung, J. (2007). Right ventricular fat infiltration in asymptomatic subjects: observations from ECG-gated 16-slice multidetector CT. *Journal of computer assisted tomography*, 31(1), 22–28.
45. Kim, J. S., Kim, S. W., Lee, J. S., Lee, S. K., Abbott, R., Lee, K. Y., Lim, H. E., Sung, K. C., Cho, G. Y., Koh, K. K., Kim, S. H., Shin, C., & Kim, S. H. (2021). Association of pericardial adipose tissue with left ventricular structure and function: a region-specific effect?. *Cardiovascular diabetology*, 20(1), 26.
46. Kimura, F., Matsuo, Y., Nakajima, T., Nishikawa, T., Kawamura, S., Sannohe, S., Hagiwara, N., & Sakai, F. (2010). Myocardial fat at cardiac imaging: how can we differentiate pathologic from physiologic fatty infiltration?. *Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 30(6), 1587–1602.
47. Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J. F., Lei, J., Zechner, R., & Ferrante, A. W., Jr (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 120(10), 3466–3479.
48. Kranendonk, M. E., Visseren, F. L., van Balkom, B. W., Nolte-'t Hoen, E. N., van Herwaarden, J. A., de Jager, W., Schipper, H. S., Brenkman, A. B., Verhaar, M. C., Wauben, M. H., & Kalkhoven, E. (2014). Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 22(5), 1296–1308.
49. Lakowa, N., Trieu, N., Flehmig, G., Lohmann, T., Schön, M. R., Dietrich, A., Zeplin, P. H., Langer, S., Stumvoll, M., Blüher, M., & Klötting, N. (2015). Telomere length differences between subcutaneous and visceral adipose tissue in humans. *Biochemical and biophysical research communications*, 457(3), 426–432.
50. Lee, J. J., Pedley, A., Hoffmann, U., Massaro, J. M., O'Donnell, C. J., Benjamin, E. J., & Long, M. T. (2018). Longitudinal Associations of Pericardial and Intrathoracic Fat With Progression of Coronary Artery Calcium (from the Framingham Heart Study). *The American journal of cardiology*, 121(2), 162–167.
51. Li, C., Spallanzani, R. G., & Mathis, D. (2020). Visceral adipose tissue Tregs and the cells that nurture them. *Immunological reviews*, 295(1), 114–125.
52. *Lima-Martínez, M. M., Blandenier, C., & Iacobellis, G. (2013). Tejido adiposo epicárdico: ¿más que un simple depósito de grasa? [Epicardial adipose tissue: more than a simple fat deposit?]. *Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición*, 60(6), 320–328.
53. Liu, X., Wang, S., You, Y., Meng, M., Zheng, Z., Dong, M., Lin, J., Zhao, Q., Zhang, C., Yuan, X., Hu, T., Liu, L., Huang, Y., Zhang, L., Wang, D., Zhan, J., Jong Lee, H., Speakman, J. R., & Jin, W. (2015).

- Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology*, 156(7), 2461–2469.
54. *Liu, Z., Wu, K. K. L., Jiang, X., Xu, A., & Cheng, K. K. Y. (2020). The role of adipose tissue senescence in obesity- and ageing-related metabolic disorders. *Clinical science (London, England : 1979)*, 134(2), 315–330.
 55. Lorin de la Grandmaison, G., Le Bihan, C., & Durigon, M. (2001). Assessment of right ventricular lipomatosis by histomorphometry in control adult autopsy cases. *International journal of legal medicine*, 115(2), 105–108.
 56. Lu, Z., Jiang, Z., Tang, J., Lin, C. P., & Zhang, H. (2023). Functions and origins of cardiac fat. *The FEBS journal*, 290(7), 1705–1718.
 57. Nabati, M., Favaedi, M., Kheirgoo, M., Yazdani, J., & Dabirian, M. (2018). Correlation between epicardial fat thickness and aortic valve sclerosis. *Asian cardiovascular & thoracic annals*, 26(3), 188–195.
 58. Mahabadi, A. A., Kahlert, H. A., Dykun, I., Balcer, B., Kahlert, P., & Rassaf, T. (2017). Epicardial Adipose Tissue Thickness Independently Predicts Severe Aortic Valve Stenosis. *The Journal of heart valve disease*, 26(3), 262–267.
 59. Mahabadi, A. A., Lehmann, N., Kälsch, H., Bauer, M., Dykun, I., Kara, K., Moebus, S., Jöckel, K. H., Erbel, R., & Möhlenkamp, S. (2014). Association of epicardial adipose tissue and left atrial size on non-contrast CT with atrial fibrillation: the Heinz Nixdorf Recall Study. *European heart journal. Cardiovascular Imaging*, 15(8), 863–869.
 60. Mahabadi, A. A., Massaro, J. M., Rosito, G. A., Levy, D., Murabito, J. M., Wolf, P. A., O'Donnell, C. J., Fox, C. S., & Hoffmann, U. (2009). Association of pericardial fat, intrathoracic fat, and visceral abdominal fat with cardiovascular disease burden: the Framingham Heart Study. *European heart journal*, 30(7), 850–856.
 61. Mahajan, R., Lau, D. H., Brooks, A. G., Shipp, N. J., Manavis, J., Wood, J. P., Finnie, J. W., Samuel, C. S., Royce, S. G., Twomey, D. J., Thanigaimani, S., Kalman, J. M., & Sanders, P. (2015). Electrophysiological, Electroanatomical, and Structural Remodeling of the Atria as Consequences of Sustained Obesity. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(1), 1–11.
 62. Malavazos, A. E., Di Leo, G., Secchi, F., Lupo, E. N., Dogliotti, G., Coman, C., Morricone, L., Corsi, M. M., Sardanelli, F., & Iacobellis, G. (2010). Relation of echocardiographic epicardial fat thickness and myocardial fat. *The American journal of cardiology*, 105(12), 1831–1835.
 63. Marchington, J. M., & Pond, C. M. (1990). Site-specific properties of pericardial and epicardial adipose tissue: the effects of insulin and high-fat feeding on lipogenesis and the incorporation of fatty acids in vitro. *International journal of obesity*, 14(12), 1013–1022.
 64. Mårin, P., Andersson, B., Ottosson, M., Olbe, L., Chowdhury, B., Kvist, H., Holm, G., Sjöström, L., & Björntorp, P. (1992). The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism: clinical and experimental*, 41(11), 1242–1248.
 65. Mazzocoli, G., Dagostino, M., P., Greco, A. (2012). Age-related changes of epicardial fat thickness. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, Volume 2, Issue 1, 2012

66. Mazurek, T., Zhang, L., Zalewski, A., Mannion, J. D., Diehl, J. T., Arafat, H., Sarov-Blat, L., O'Brien, S., Keiper, E. A., Johnson, A. G., Martin, J., Goldstein, B. J., & Shi, Y. (2003). Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*, *108*(20), 2460–2466.
67. Medrikova, D., Jilkova, Z. M., Bardova, K., Janovska, P., Rossmeisl, M., & Kopecky, J. (2012). Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control. *International journal of obesity (2005)*, *36*(2), 262–272.
68. Morgan, A., Shekhar, N., Strnadová, V., Pirník, Z., Haasová, E., Kopecký, J., Pačesová, A., Železná, B., Kuneš, J., Bardová, K., & Maletínská, L. (2024). Deficiency of GPR10 and NPFFR2 receptors leads to sex-specific prediabetic syndrome and late-onset obesity in mice. *Bioscience reports*, *44*(10), BSR20241103.
69. Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M., & Anversa, P. (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circulation research*, *68*(6), 1560–1568.
70. *Owesny, P., & Grune, T. (2023). The link between obesity and aging - insights into cardiac energy metabolism. *Mechanisms of ageing and development*, *216*, 111870.
71. Padilla, J., Jenkins, N. T., Vieira-Potter, V. J., & Laughlin, M. H. (2013). Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *304*(7), R543–R552.
72. Payne, G. A., Borbouse, L., Kumar, S., Neeb, Z., Alloosh, M., Sturek, M., & Tune, J. D. (2010). Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a protein kinase C-beta pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *30*(9), 1711–1717.
73. Petrosino, J. M., Longenecker, J. Z., Ramkumar, S., Xu, X., Dorn, L. E., Bratasz, A., Yu, L., Maurya, S., Tolstikov, V., Bussberg, V., Janssen, P. M., Periasamy, M., Kiebish, M. A., Duyster, G., von Lintig, J., Ziouzenkova, O., & Accornero, F. (2021). Paracardial fat remodeling affects systemic metabolism through alcohol dehydrogenase 1. *The Journal of clinical investigation*, *131*(4), e141799.
74. Pettersson, U. S., Waldén, T. B., Carlsson, P. O., Jansson, L., & Phillipson, M. (2012). Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PloS one*, *7*(9), e46057.
75. Sacks, H. S., Fain, J. N., Bahouth, S. W., Ojha, S., Frontini, A., Budge, H., Cinti, S., & Symonds, M. E. (2013). Adult epicardial fat exhibits beige features. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *98*(9), E1448–E1455.
76. Pirzgalska, R. M., Seixas, E., Seidman, J. S., Link, V. M., Sánchez, N. M., Mahú, I., Mendes, R., Gres, V., Kubasova, N., Morris, I., Arús, B. A., Larabee, C. M., Vasques, M., Tortosa, F., Sousa, A. L., Anandan, S., Tranfield, E., Hahn, M. K., Iannaccone, M., Spann, N. J., ... Domingos, A. I. (2017). Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine. *Nature medicine*, *23*(11), 1309–1318.
77. Pražienková, V., Funda, J., Pirník, Z., Karnošová, A., Hrubá, L., Kořínková, L., Neprašová, B., Janovská, P., Benzce, M., Kadlecová, M., Blahoš, J., Kopecký, J., Železná, B., Kuneš, J., Bardová, K., & Maletínská, L. (2021). GPR10 gene deletion in mice increases basal neuronal activity, disturbs insulin sensitivity and alters lipid homeostasis. *Gene*, *774*, 145427

78. *Queiroz, M., & Sena, C. M. (2020). Perivascular adipose tissue in age-related vascular disease. *Ageing research reviews*, *59*, 101040.
79. *Reyes-Farias, M., Fos-Domenech, J., Serra, D., Herrero, L., & Sánchez-Infantes, D. (2021). White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochemical pharmacology*, *192*, 114723.
80. Rosito, G. A., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Ruberg, F. L., Mahabadi, A. A., Vasan, R. S., O'Donnell, C. J., & Fox, C. S. (2008). Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Circulation*, *117*(5), 605–613.
81. Rytka, J. M., Wueest, S., Schoenle, E. J., & Konrad, D. (2011). The portal theory supported by venous drainage-selective fat transplantation. *Diabetes*, *60*(1), 56–63.
82. Sacks, H. S., Fain, J. N., Bahouth, S. W., Ojha, S., Frontini, A., Budge, H., Cinti, S., & Symonds, M. E. (2013). Adult epicardial fat exhibits beige features. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *98*(9), E1448–E1455.
83. Salgado-Somoza, A., Teijeira-Fernández, E., Fernández, A. L., González-Juanatey, J. R., & Eiras, S. (2010). Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *299*(1), H202–H209.
84. Sakamoto, T., Nitta, T., Maruno, K., Yeh, Y. S., Kuwata, H., Tomita, K., Goto, T., Takahashi, N., & Kawada, T. (2016). Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, *310*(8), E676–E687.
85. Salans, L. B., Cushman, S. W., & Weismann, R. E. (1973). Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *The Journal of clinical investigation*, *52*(4), 929–941.
86. Sawaki, D., Czibik, G., Pini, M., Ternacle, J., Suffee, N., Mercedes, R., Marcelin, G., Surenaud, M., Marcos, E., Gual, P., Clément, K., Hue, S., Adnot, S., Hatem, S. N., Tsuchimochi, I., Yoshimitsu, T., Hénégat, C., & Derumeaux, G. (2018). Visceral Adipose Tissue Drives Cardiac Aging Through Modulation of Fibroblast Senescence by Osteopontin Production. *Circulation*, *138*(8), 809–822.
87. Sedmera, D., Bardova, K., Rybova, A., Kvasilova, A., Nanka, O., Kopecky, J. (2025) Distribution of fat deposits in the mouse heart and their functional significance – manuskript v přípravě
88. Shaihov-Teper, O., Ram, E., Ballan, N., Brzezinski, R. Y., Naftali-Shani, N., Masoud, R., Ziv, T., Lewis, N., Schary, Y., Levin-Kotler, L. P., Volvovitch, D., Zuroff, E. M., Amunts, S., Regev-Rudzki, N., Sternik, L., Raanani, E., Gepstein, L., & Leor, J. (2021). Extracellular Vesicles From Epicardial Fat Facilitate Atrial Fibrillation. *Circulation*, *143*(25), 2475–2493.
89. Shaver, J. A., Reddy, P. S., Curtiss, E. I., Ziady, G. M., & Reddy, S. C. (2001). Noninvasive/invasive correlates of exaggerated ventricular interdependence in cardiac tamponade. *Journal of cardiology*, *37 Suppl 1*, 71–76.
90. Shimabukuro, M., Hirata, Y., Tabata, M., Dagvasumberel, M., Sato, H., Kurobe, H., Fukuda, D., Soeki, T., Kitagawa, T., Takanashi, S., & Sata, M. (2013). Epicardial adipose tissue volume and adipocytokine

imbalance are strongly linked to human coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(5), 1077–1084.

91. Sidossis, L., & Kajimura, S. (2015). Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *The Journal of clinical investigation*, 125(2), 478–486.
92. Souček F., Novák J. (2018). Role epikardiálního tuku v patofyziologii srdečních onemocnění. *Kardiologická revue - Interní medicína*, 20(3):212-217
93. Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, 56(12), 2910–2918.
94. Szczepaniak, L. S., Dobbins, R. L., Metzger, G. J., Sartoni-D'Ambrosia, G., Arbique, D., Vongpatanasin, W., Unger, R., & Victor, R. G. (2003). Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magnetic resonance in medicine*, 49(3), 417–423.
95. Tansey, D. K., Aly, Z., & Sheppard, M. N. (2005). Fat in the right ventricle of the normal heart. *Histopathology*, 46(1), 98–104.
96. Teodoro, J. S., Zouhar, P., Flachs, P., Bardova, K., Janovska, P., Gomes, A. P., Duarte, F. V., Varela, A. T., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., & Kopecký, J. (2014). Enhancement of brown fat thermogenesis using chenodeoxycholic acid in mice. *International journal of obesity (2005)*, 38(8), 1027–1034.
97. *Tousoulis, D., Psarros, C., Demosthenous, M., Patel, R., Antoniadis, C., & Stefanadis, C. (2014). Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease: the emerging role of statins. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(23), 2491–2502.
98. Ueda, Y., Shiga, Y., Idemoto, Y., Tashiro, K., Motozato, K., Koyoshi, R., Kuwano, T., Fujimi, K., Ogawa, M., Saku, K., & Miura, S. I. (2018). Association Between the Presence or Severity of Coronary Artery Disease and Pericardial Fat, Paracardial Fat, Epicardial Fat, Visceral Fat, and Subcutaneous Fat as Assessed by Multi-Detector Row Computed Tomography. *International heart journal*, 59(4), 695–704.
99. van der Meer, R. W., Hammer, S., Smit, J. W., Frölich, M., Bax, J. J., Diamant, M., Rijzewijk, L. J., de Roos, A., Romijn, J. A., & Lamb, H. J. (2007). Short-term caloric restriction induces accumulation of myocardial triglycerides and decreases left ventricular diastolic function in healthy subjects. *Diabetes*, 56(12), 2849–2853.
100. Venteclef, N., Guglielmi, V., Balse, E., Gaborit, B., Cotillard, A., Atassi, F., Amour, J., Leprince, P., Dutour, A., Clément, K., & Hatem, S. N. (2015). Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinases. *European heart journal*, 36(13), 795–805a.
101. Wang, C. Y., & Liao, J. K. (2012). A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 821, 421–433.
102. *Wang, X., Xu, M., & Li, Y. (2022). Adipose Tissue Aging and Metabolic Disorder, and the Impact of Nutritional Interventions. *Nutrients*, 14(15), 3134.

103. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, *112*(12), 1796–1808.
104. Yamaguchi, Y., Cavallero, S., Patterson, M., Shen, H., Xu, J., Kumar, S. R., & Sucov, H. M. (2015). Adipogenesis and epicardial adipose tissue: a novel fate of the epicardium induced by mesenchymal transformation and PPAR γ activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(7), 2070–2075.
105. Ye, J., Gao, Z., Yin, J., & He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, *293*(4), E1118–E1128.
106. Zamani, Sauyeh K., "Pathophysiologic Consequences of Pericardial Adipose Tissue Assessed by Magnetic Resonance Imaging" (2024). *Kinesiology Dissertations*. 25.
107. *Zhang, P., He, Y., Wu, S., Li, X., Lin, X., Gan, M., Chen, L., Zhao, Y., Niu, L., Zhang, S., Li, X., Zhu, L., & Shen, L. (2022). Factors Associated with White Fat Browning: New Regulators of Lipid Metabolism. *International journal of molecular sciences*, *23*(14), 7641.
108. Zhang, L., Ip, C. K., Lee, I. J., Qi, Y., Reed, F., Karl, T., Low, J. K., Enriquez, R. F., Lee, N. J., Baldock, P. A., & Herzog, H. (2018). Diet-induced adaptive thermogenesis requires neuropeptide FF receptor-2 signalling. *Nature communications*, *9*(1), 4722.
109. Zhang, Y. X., Ou, M. Y., Yang, Z. H., Sun, Y., Li, Q. F., & Zhou, S. B. (2023). Adipose tissue aging is regulated by an altered immune system. *Frontiers in immunology*, *14*, 1125395.
110. Zhu, Z., Spicer, E. G., Gavini, C. K., Goudjo-Ako, A. J., Novak, C. M., & Shi, H. (2014). Enhanced sympathetic activity in mice with brown adipose tissue transplantation (transBATation). *Physiology & behavior*, *125*, 21–29.
111. * Zoico, E., Rubele, S., De Caro, A., Nori, N., Mazzali, G., Fantin, F., Rossi, A., & Zamboni, M. (2019). Brown and Beige Adipose Tissue and Aging. *Frontiers in endocrinology*, *10*, 368

