

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Fyziologie živočichů



Mgr. Soňa Kauerová

roz. Čejková

Adheze monocytů k endotelu a aterogeneze

Monocyte adhesion to endothelium and atherogenesis

Disertační práce

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

Laboratoř pro výzkum aterosklerózy

Institut klinické a experimentální medicíny

Praha, 12.8.2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala 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, dne

.....

Mgr. Soňa Kauerová

Prohlášení:

Jménem všech spoluautorů prohlašuji, že Mgr. Soňa Kauerová zásadně přispěla ke všem publikacím, jež jsou nedílnou částí této disertační práce. U publikací, kde je první autorkou, samostatně designovala a prováděla experimenty, analýzy dat, interpretaci výsledků a přípravu manuskriptů.

V Praze, dne

.....

MUDr. Ivana Králová Lesná, Ph.D., školitel

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří mi umožnili absolvovat doktorský studijní program a podporovali mě po celou dobu mého studia.

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce MUDr. Ivaně Králové Lesné, Ph.D., za možnost studovat a realizovat výzkum v rámci Laboratoře pro výzkum aterosklerózy v pražském IKEM. Cennými radami a věcnými připomínkami mi velmi pomohla a umožnila mi nejen se spolupodílet na jejím výzkumu, ale zastřešila výzkum můj. Mimořádný dík patří také prof. Ing. Rudolfu Polednemu, CSc., a to zejména za pečlivé vedení mých prvních publikačních pokusů a korekci chyb. Jejich lidský přístup a podpora po celou dobu postgraduálního studia významně přispěly nejen k překonání trémy při prezentaci výsledků na tuzemských a zahraničních konferencích a kurzech, ale i k úspěšnému završení mého studia. Velmi oceňuji i podporu mého studijního pobytu na Univerzitě v Leidenu v Nizozemsku.

Velký dík patří jistě i transplantačním chirurgům, přednostovi Kliniky transplantační chirurgie doc. MUDr. Jiřímu Froňkovi, Ph.D., FRCS, a MUDr. Filipu Thiememu, bez jejichž spolupráce bychom nezískali unikátní vzorky lidských tkání. Sestrám Laboratoře pro výzkum aterosklerózy a koordinátorkám transplantačního programu, jmenovitě Mgr. Jolaně Mrázkové a Bc. Renatě Zámečnickové, děkuji za komunikaci s pacienty. Nemenší poděkování patří jistě i pacientům, kteří souhlasili se zařazením do studie a tím umožnili získat data prezentovaná v této práci.

Dále bych chtěla poděkovat kolegyním a kamarádkám Mgr. Haně Kubátové, Mgr. Anně Králové, Mgr. Tereze Blahové, Mgr. Markétě Jirátové a Mgr. Kateřině Zemánkové, PhD., nejen za spolupráci, ale i za příjemnou atmosféru na pracovišti.

Děkuji velmi i mé rodině a mému manželovi za podporu při studiu, za pochopení, trpělivost a především za láskyplnou péči.

Výzkum byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (číslo GAUK 592216) a projektem Ministerstva zdravotnictví ČR pro rozvoj výzkumu, institucionální podpora 00023001 (IKEM Praha).

Abstrakt

Přes dostupnou a efektivní terapii hypercholesterolémií a hypertenze je v západním světě mortalita v důsledku kardiovaskulárních chorob stále velice vysoká. Zánětlivé změny v arteriální stěně, ale i v tukové tkáni hrají zásadní roli v rozvoji aterosklerózy. Makrofágy se uplatňují v procesu aterogeneze již od iniciace rozvoje, kdy ještě ve formě monocytů adherují a migrují do arteriální stěny v důsledku aktivace endotelu a stimulace prozánětlivě působícími látkami. Je známo, že tuková tkáň je významným endokrinním orgánem a součástí tukové tkáně je velké množství makrofágů schopných produkovat řadu prozánětlivě působících cytokinů a přispívat k rozvoji mírného chronického zánětu, zásadního v rozvoji aterosklerózy.

Ve vzorcích subkutánní, viscerální a perivaskulární tukové tkáně (SAT, VAT, PVAT) od zdravých subjektů jsme analyzovali makrofágy a jejich polarizaci, genovou expresi prozánětlivých cytokinů a vliv látek uvolněných VAT na míru adheze monocytů k endotelu. V některých analýzách doplnili o vzorky SAT, VAT a PVAT od pacientů s angiologicky potvrzenou chorobou periferních cév (PAD). Výsledky jsme porovnávali jednak mezi skupinami zdravých a nemocných subjektů, mezi jednotlivými typy tukové tkáně v rámci skupin (SAT, VAT, PVAT) a dále jsme analyzovali případné vztahy k rizikovým faktorům kardiovaskulárních chorob.

Vzorky tukové tkáně skupiny PAD vykazovaly významně vyšší genovou expresi všech sledovaných prozánětlivých genů a to nejvíce v případě VAT. Nicméně v genové expresi nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi jednotlivými typy tukové tkáně a rozdíly nebyly nalezeny ani ve vztahu k rizikovým faktorům kardiovaskulárních chorob. Produkty VAT analyzované prostřednictvím kondicionovaných médií VAT (ATCM získaných inkubací VAT v kultivačním médiu *in vitro*) významně zvýšily míru adheze monocytů k takto ovlivněnému endotelu. Dále jsme prokázali, že v tomto procesu z námi sledovaných cytokinů hrají nejzásadnější roli IL-1 β a TNF- α . V případě ačkoli MCP-1 a RANTES rostla míra adheze monocytů k endotelu s jejich rostoucí koncentrací v ATCM, ale jejich selektivní inhibice nevedla ke snížení míry adheze monocytů k endotelu. Ovlivnění endoteliálních buněk ATCM vedlo k prozánětlivým změnám v genové expresi, došlo k významnému zvýšení exprese adhezních molekul (ICAM-1, VCAM-1) a prozánětlivého IL-6 a zároveň ke snížení exprese protizánětlivého TGF- β .

Průtokovou cytometrií se nám podařilo definovat fenotypy polarizovaných makrofágů v tukové tkáni na základě povrchových znaků a vliv jednotlivých rizikových faktorů kardiovaskulárních chorob na proporce prozánětlivě a protizánětlivě polarizovaných makrofágů. Prokázali jsme vztah mezi rostoucí koncentrací nonHDL cholesterolu a proporcí prozánětlivě polarizovaných makrofágů, přičemž VAT vykazovala užší vztah než SAT. Obezita vedla k vyšší proporcí prozánětlivých makrofágů pouze v SAT. V případě VAT bylo zastoupení prozánětlivých populací makrofágů zvýšeno ve vztahu k pohlaví (muži), věku nad 51 let, ale i v důsledku hypercholesterolémie. Léčba statiny naopak vedla ke snížení zastoupení prozánětlivých populací makrofágů ve VAT. Uzavíráme tedy, že jsme prokázali vztah proporce prozánětlivých makrofágů v tukové tkáni k hlavním rizikovým faktorům aterosklerózy.

Abstract

Despite the availability of effective therapy of hypercholesterolemia and hypertension, cardiovascular mortality continues to be very high in the Western world. Inflammatory changes occurring in the arterial wall as well as in the adipose tissue play a major role in the development of atherosclerosis. Macrophages are involved in the process of atherogenesis as early as atherosclerosis begins to develop, when, still as monocytes, they migrate and adhere to the arterial wall as a result of endothelial activation and stimulation by pro-inflammatory substances. Adipose tissue has long been recognized as an important endocrine organ, with part of adipose tissue made up by a large amount of macrophages capable of producing a large number of pro-inflammatory cytokines, which contribute to the development of low-grade chronic inflammation important in the development of atherosclerosis.

In samples of subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue (SAT, VAT, and PVAT, respectively) obtained from healthy subjects (living kidney donors, LKD), we analyzed macrophages and their polarization, gene expression of pro-inflammatory cytokines and the effect of substances released by VAT on the level of monocyte adhesion to the endothelium. In some analyses, we included samples of SAT, VAT and PVAT obtained from patients with angiography-documented peripheral arterial disease (PAD). Results were compared both between the groups of healthy and diseased subjects and between individual types of adipose tissue (SAT, VAT, PVAT); in addition, we sought to analyze their relationship to cardiovascular risk factors.

Adipose tissue samples of the PAD group exhibited significantly higher gene expression of all the pro-inflammatory genes assessed, most significantly in VAT; however, otherwise no significant differences were found between the individual types of adipose tissue or their relation to cardiovascular risk factors. The products of VAT analyzed using adipose tissue-conditioned media (ATCM, obtained by incubation of VAT in a culture medium *in vitro*) significantly increased the level of monocyte adhesion to the treated endothelium. Besides, we demonstrated that, among the cytokines studied, the critical role in the process of atherogenesis is played by IL-1 β and TNF- α . While, in the case of with MCP-1, RANTES and IL-10, the level of adhesion to the endothelium increased with their increasing concentrations in ATCM, their selective inhibition did not document any major effect on the monocyte adhesion. Moreover, ATCM was shown to provoke pro-inflammatory changes in gene expression, as documented by increased expression of adhesion molecule (ICAM-1, VCAM-1) as well as pro-inflammatory IL-6 genes and decreased expression of the anti-inflammatory TGF- β gene.

Using flow cytometry, we were able to define the phenotypes of polarized macrophages based on the surface markers in adipose tissue and the influence of individual cardiovascular risk factors on the proportions of polarized pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) macrophages. We demonstrated a relationship between increasing concentrations of non-HDL cholesterol and the proportion of M1 polarized macrophages, with VAT exhibiting a closer association compared with SAT. Obesity was associated with a higher proportion of pro-inflammatory macrophages only in SAT. Regarding VAT, the proportion of pro-inflammatory macrophage populations was higher in men, in those aged >51 years and, also, in individuals with hypercholesterolemia. By contrast, statin therapy was associated with a decrease in the proportion of macrophage populations in VAT. In conclusion, we have demonstrated a relation between the proportion of pro-inflammatory macrophages in adipose tissue and the major risk factors of atherosclerosis.

Obsah

PODĚKOVÁNÍ	- 3 -
ABSTRAKT	- 4 -
SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	- 7 -
SEZNAM ZKRATEK.....	- 8 -
1. ÚVOD	- 10 -
1.1. Úloha endotelu v rozvoji aterosklerózy	- 13 -
1.2. Monocyty a makrofágy v rozvoji aterosklerózy	- 14 -
1.3. Adhezní kaskáda	- 18 -
1.4. Tuková tkáň	- 19 -
1.4.1. Hnědá a bílá tuková tkáň a jejich vztah ke kardiovaskulárním chorobám.....	- 19 -
1.4.2. Anatomické rozdělení tukové tkáně ve vztahu ke kardiovaskulárním chorobám	- 20 -
2. CÍLE STUDIE.....	- 25 -
3. METODY	- 26 -
4. VÝSLEDKY.....	- 31 -
4.1. Prozáňtlivá genová exprese v tukových tkáních pacientů s aterosklerózou	- 31 -
Závěr	- 33 -
4.2. Vliv cytokinů produkovaných tukovou tkání na adhezi monocytů k endotelu	- 34 -
Závěr	- 40 -
4.3. Vztah mezi non-HDL cholesterolem a fenotypy makrofágů v lidské tukové tkáni	- 41 -
Závěr	- 43 -
4.4. Prediktory kardiovaskulárních chorob a polarizace makrofágů v lidské tukové tkáni	- 44 -
Závěr	- 47 -
5. DISKUZE	- 48 -
6. ZÁVĚR	- 53 -
7. REFERENCE	- 54 -

Seznam publikací autora

A. Zařazené do disertační práce

The effect of cytokines produced by human adipose tissue on monocyte adhesion to the endothelium.

Čejkova S, Kubátová H, Thieme F, Janoušek L, Froněk J, Poledne R, Králová Lesná I.

Cell Adh Migr. 2019 IF 3,30

Pro-inflammatory gene expression in adipose tissue of patients with atherosclerosis.

Čejková S, Králová Lesná I, Froněk J, Janoušek L, Králová A, Ždychová J, Poledne R.

Physiol Res. 2017 IF 1,32

Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macrophage polarization: Is there a link?

Králová Lesná I, Petráš M, **Čejková S**, Králová A, Froněk J, Janoušek L, Thieme F, Tyll T, Poledne R.

Eur J Prev Cardiol. 2018 IF = 4,54

The relationship between non-HDL cholesterol and macrophage phenotypes in human adipose tissue.

Poledne R, Králová Lesná I, Králová A, Froněk J, **Čejková S**. J Lipid Res. 2016 IF = 4,81

B. Další publikace, na kterých jsem se podílela

Monocyte adhesion to the endothelium is an initial stage of atherosclerosis development

Čejková S, Králová Lesná I, Poledne R. Cor Et Vasa 2016

Human adipose tissue accumulation is associated with pro-inflammatory changes in subcutaneous rather than visceral adipose tissue.

Králová Lesná I, **Čejková S**, Králová A, Froněk J, Petráš M, Sekerková A, Thieme F, Janoušek L,

Poledne R. Nutr Diabetes. 2017 IF = 2,74

Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue.

Králová Lesná I, Králová A, **Čejková S**, Froněk J, Petráš M, Sekerková A, Thieme F, Janoušek L,

Poledne R. J Transl Med. 2016 IF = 3,79

Macrophage phenotypes in the adipose tissue of postmenopausal women.

Králová A, Králová Lesná I, Froněk J, **Čejková S**, Sekerková A, Janoušek L, Thieme F, Stříž I,

Ždychová J, Poledne R. Physiol Res. 2015 IF = 1,64

The effect of ectopic fat on graft function after living kidney transplantation.

Thieme F, Janoušek L, Froněk J, Králová A, **Čejková S**, Králová Lesná I, Poledne R. Physiol Res. 2015

IF = 1,64

Adipose tissue and atherosclerosis.

Poledne R, Králová Lesná I, **Čejková S**. Physiol Res. 2015 IF = 1,64

Co-cultivation of human aortic smooth muscle cells with epicardial adipocytes affects their

proliferation rate. Ždychová J, **Čejková S**, Králová Lesná I, Králová A, Malušková J, Janoušek L,

Kazdová L. Physiol Res. 2014 IF = 1,29

Seznam zkratek

	Anglický název	Český název
AT	Adipose tissue	Tuková tkáň
ATCM	Adipose tissue conditioned media	Kondiciované médium z tukové tkáně
B2M	Beta 2 microglobuline	Beta 2 mikroglobulin
BMI	Body mass index	Body mass index
BSA	Bovin serum albumin	Hovězí sérový albumin
DAMP	Damage/Danger-associated molecular patterns	Molekulární vzory poškození/nebezpečí
HDL	High density lipoprotein	Vysokodenzní lipoprotein
HMG-CoA	β -Hydroxy β -methylglutaryl coenzyme A	β -hydroxy- β -methyl-glutaryl- koenzym A
hsCRP	High sensitivity C-reactive protein	C-reaktivní protein měřený vysokosenzitivní metodou
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	Lidské endoteliální buňky z pupeční žíly
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	Intercelulární adhezni molekula 1
IFN- γ	Interferon gamma	Interferon gamma
IL-	Interleukine	Interleukin
LDL	Low density lipoprotein	Nízkodenzní lipoprotein
LKD	Living kidney donors	Živí dárci ledvin
Lp(a)	Lipoprotein a	Lipoprotein a
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1	Monocytární chemoatraktivní protein 1
MerTk	Mer tyrosine kinase	Mer tyrosin kináza
NF- κ B	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells	Nukleární faktor kappa B
oxLDL	Oxidized low-density lipoprotein	Oxidovaný nízkodenzní lipoprotein
PAD	Peripheral artery disease	Periferní cévní onemocnění
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns	Molekulární vzory asociované s patogeny
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr
RANTES (CCL5)	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted	

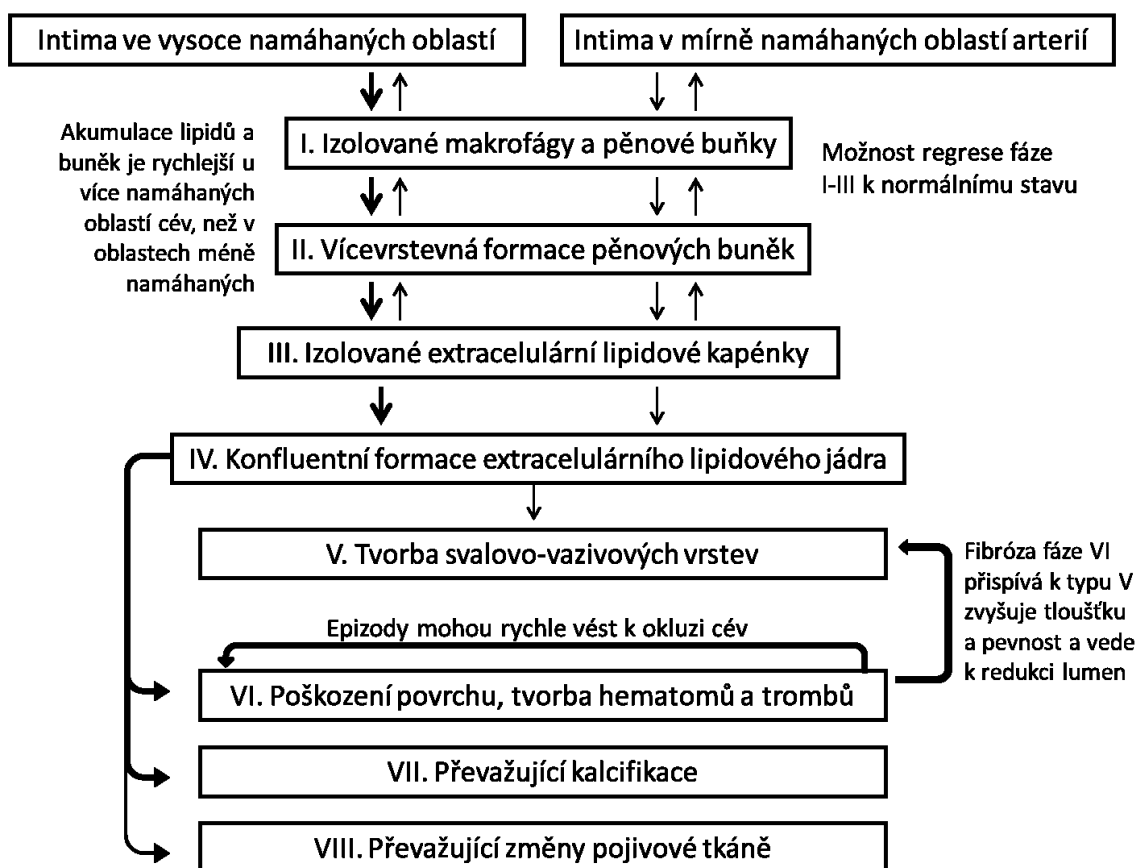
SCAB	SREBP cleavage-activating protein	Protein aktivující štěpení SREBP
SeE	Selectin E	Selektin E
SREBP	Sterol regulatory element-binding proteins	Proteiny vázající se na regulační elementy sterolů
SVF	Stromal vascular fraction	Stromovaskulární frakce
SVFCM	SVF conditioned media	Kondicionované médium ze SVF
TGF- β	Transforming growth factor β	Transformující růstový faktor
TLR	Toll-like receptor	Toll-genu podobný receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor α	Tumor nekrotizující faktor α
UCP	Uncoupling protein	Rozpřahující protein
VAT/PVAT/SAT	Visceral/perivascular/subcutaneous adipose tissue	Viscerální/Perivaskulární/Subkutánní tuková tkáň
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1	Vaskulární adhezní molekula 1

1. Úvod

Ateroskleróza neboli kornatění cév je chronické zánětlivé onemocnění charakterizované ukládáním lipidů do plaku uvnitř cév. Ačkoli klinické příznaky nastávají až po řadě dekád rozvoje aterosklerózy, lze do jisté míry predikovat riziko výskytu akutních komplikací, z nichž nejčastější jsou infarkt myokardu, cévní mozkové příhody či ischemická choroba dolních končetin. K tomu slouží sledování hladin triglyceridů, nízkodenzních (LDL) a vysokodenzních (HDL) lipoproteinových částic a jejich poměru, apolipoprotein A-I, apolipoprotein B-100 a Lp(a), dále pak hladiny fibrinogenu a fibrinolytické kapacity. Rovněž diabetes melitus, kouření a obezita jsou považovány za zásadní rizikové faktory rozvoje kardiovaskulárních chorob.

V polovině devadesátých let prof. Stary popsal šest fází rozvoje aterosklerotického plaku, které následně ještě doplnil na osm fází (I-VIII) viz Obrázek 1 (Stary, 2000; Stary et al., 1995; Stary et al., 1994). Fáze I se vyznačuje pouze mikroskopickými změnami v cévní stěně s drobnými žlutými tečkami – počátečními ložisky lipidových depozitů. Histologické změny jsou zcela minimální, obvykle detekovatelné v oblastech větvení velkých arterií u dětí případně u dospělých v místech senzitivních pro rozvoj aterosklerózy. K těmto změnám dochází již velmi brzy, každé druhé osmiměsíční dítě má koronární arterie infiltrované pěnými buňkami a makrofágy (Stary, et al., 1994). Dochází ke změnám endotelu, které vedou ke zvýšení infiltrace do cévní stěny imunokompetentními buňkami. Druhý typ (fáze II) se vyznačuje již přítomností tzv. fatty streaks – „tukovými pruhy“. Jedná se o žlutě zbarvená intracelulární lipidová ložiska patrná na vnitřní straně intimy. V této fázi dochází ke zvýšení tvorby pěnových buněk, které vznikají z makrofágů a buněk hladké svaloviny cév akumulací lipidových kapének. Lipidy v extracelulárním prostoru jsou pouze v malém množství ve formě lipidových kapének a lipoproteinových částic. Fáze III bývá také někdy označována jako preaterom. Histologicky je charakterizovaná extracelulárními lipidovými kapénkami, a to v takovém množství, že tyto materiály tvoří ložiska mezi vrstvami buněk hladkého svalstva a navíc dochází k adaptivnímu tloušťnutí intimy. Lipidová ložiska již v této fázi narušují koherenci vrstev arteriální stěny. Tyto iniciační fáze rozvoje aterosklerózy jsou obvykle bez jakýchkoli klinických manifestací. Pokročilé fáze rozvoje (IV a V) se vyznačují přítomností tzv. fibrous cap – vazivové čepičky v lumen cév. Tloušťka plaku odráží mimo jiné i množství lipidového jádra, buněčné debris a krystalů cholesterolu a drobných kalciových krystalků. V této fázi je již omezen průtok krve cévou, nicméně je arterie ještě schopna kompenzovat průtok krve svojí roztažností, a tedy nedochází k významné obstrukci. V další fázi (V) dochází k ztlouštění vazivové čepičky doprovázenému kumulací drobných trombotických událostí uvnitř lézí aterosklerotického plaku bez klinické manifestace. Při destabilizaci plaku, například ztenčením vazivové čepičky v důsledku působení matrix-metaloproteáz, může docházet k porušení

povrchové vrstvy a tvorbě trombu na odhalených strukturách (fáze VI). Fáze VII a VIII jsou charakteristické tvorbou kalcifikací a další fibrotizací. Nicméně ve skutečnosti se jednotlivé fáze rozvoje velmi prolínají. Stejně velký plak v lidských karotidách může být velmi lipidový a měkký, nebo naopak silně kalcifikovaný s jasnými trombotickými ložisky.



Obrázek 1 Schéma vývoje aterosklerotického plaku. Převzato a upraveno ze Stary, Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions, Volume: 20, Issue: 5, Pages: 1177-1178, DOI: (10.1161/01.ATV.20.5.1177)

Cirkulující cholesterol v lipoproteinových částicích v krevním oběhu je esenciální pro fyziologické procesy jako je syntéza steroidních hormonů, žlučových kyselin, ale i pro prosté dělení buněk a s ním spojenou tvorbu buněčných membrán. V krevním oběhu je cholesterol převážně ve formě esterů, minoritně ale i ve volné formě. Cholesterol je přijímán z potravy a transportován v podobě chylomikronů ze střeva do jater, které jsou hlavním regulačním orgánem pro homeostázu cholesterolu (Gylling, 2004). Ke ztrátám cholesterolu dochází nejvíce prostřednictvím žlučových kyselin uvolněných do tenkého střeva, a to i přes významnou resorpci v rámci cyklu žlučových kyselin. Cholesterol je syntetizován také *de novo*, a to převážně v játrech, ale i v tenkém střevu,

odkud je následně transportován do oběhu v podobě VLDL (lipoproteinové částice o velmi nízké hustotě) obsahující na svém povrchu lipoprotein apoB-100. V játrech je syntéza cholesterolu regulována SREBP-proteiny (sterol regulatory element-binding proteins) a HMG-CoA reduktázou (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reduktáza) (Ness, 2015; Shao & Espenshade, 2012). Tyto transkripční faktory a klíčové enzymy syntézy ovlivňují lipogenezi a lipidovou homeostázu – při vysoké koncentraci cholesterolu nedochází ke štěpení SREBP pomocí SREBP cleavage-activating protein (SCAP), SREBP je tedy neaktivní a tvorbu cholesterolu inhibuje (Ness, 2015; Shao, et al., 2012). Přebytečný intracelulární cholesterol je odstraňován pomocí HDL lipoproteinových částic cestou tzv. reverzního transportu cholesterolu. HDL částice jsou produkovány převážně játry (70-80 %) a tenkým stěvem (Zhou et al., 2015). Hlavní lipoproteinovou částicí zprostředkující reverzní transport cholesterolu jsou malé HDL obsahující apoA1 (Zhou, et al., 2015).

Ačkoli chronická hyperlipidémie je zásadní v rozvoji kardiovaskulárních chorob, až polovina pacientů s infarktem myokardu nemá rizikové hladiny lipidů v krevní plasmě (Ridker, 1999) a pouhé monitorování hladin plasmatických lipidů se ukázalo jako nedostatečné pro predikci kardiovaskulárních chorob (Khot et al., 2003). Již koncem sedmdesátých let Ross publikoval teorii rozvoje aterosklerózy tzv. „Response to injury theory“ (Ross et al., 1977). Podle této teorie působením zánětlivých procesů dochází k poruše integrity endotelu jak mezi endoteliálními buňkami, tak i mezi endotelem a extracelulárními strukturami cévní stěny (Ross, et al., 1977). V důsledku proudění krve může docházet až k deskvamaci takto porušeného endotelu (Ross, et al., 1977). Ačkoli v době zveřejnění teorie nebyly známy konkrétní bioaktivní látky zodpovědné za tyto procesy, již bylo jasné, že v aterogenezi hrají důležitou úlohu nejen lipidy a lipoproteinové částice, ale i další mediátory iniciující rozvoj zánětlivých odpovědí, aktivace endotelu a proliferace buněk hladké cévní svaloviny.

Koncem devadesátých let Ridker (Ridker et al., 2000) prokázal, že C-reaktivní protein měřený vysoce citlivou metodou (hsCRP) je velmi dobrým prediktorem akutních kardiovaskulárních příhod (Ridker et al., 2002). CRP je protein akutní fáze zánětu, řadí se mezi tzv. pentraxinové proteiny a jeho nativní forma se skládá z pěti nekovalentně spojených podjednotek (Myles et al., 1990). Je produkován hepatocyty jako tzv. protein akutní fáze a jeho produkce rapidně roste stimulací prozánětlivými cytokiny, zejména stimulací IL-6 (Taylor & van den Berg, 2007). K rapidnímu vzrůstu hladin CRP přispívá rozpad jeho pentamerické formy, v důsledku stimulace prozánětlivými stimuly (Taylor, et al., 2007). Kromě fluktuace v průběhu infekce, nebo zánětu dochází i k významným fluktuacím v rámci hormonálních změn, jako je menopauza (Ebong et al., 2016). Nicméně dochází také k významné fluktuaci i v rámci jednotlivých fází menstruačního cyklu (Gaskins et al., 2012). Ridker inovativně začal měřit hsCRP a zjistil, že dlouhodobě zvýšené

hodnoty v intervalu normálního rozmezí (3-10 mg/l) velmi dobře predikují riziko akutních kardiovaskulárních komplikací (Ridker, 2001). Tyto výsledky dokonce stimulovaly klinický výzkum zaměřený na přímé ovlivnění imunitního systému. V rámci letošního 87. Kongresu Evropské aterosklerotické společnosti Ridker prezentoval recentní výsledky z klinické studie CANTOS (Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study, studie čítala 556 jedinců s diabetem melitus 2. typu). Dlouhodobé užívání canakinumabu, protilátky proti významnému prozánětlivému cytokinu IL-1 β , významný prozánětlivý cytokin, vedlo k významnému snížení mortality a hs-CRP (Aday & Ridker, 2018). Tyto výsledky dokumentují zásadní roli zánětlivých procesů v rozvoji kardiovaskulárních chorob.

1.1. Úloha endotelu v rozvoji aterosklerózy

Endotel tvoří semipermeabilní monovrstva endoteliálních buněk vystylající vnitřní stranu cév. Je zásadní pro udržení homeostázy krevního řečiště. Podílí se na regulaci kardiovaskulárního systému, ovlivňuje výměnu látek mezi lumen cév a její stěnou, koagulaci, angiogenezi a v neposlední řadě se podílí na reakci při zánětlivé odpovědi (Pries & Kuebler, 2006). Narušení fyziologické funkce vede k narušené endoteliální odpovědi. Dysfunkce endotelu je nedílnou součástí patogeneze mnoha chorob včetně aterosklerózy, hypertenze, ale i sepse a zánětlivých stavů (Bermejo-Martin et al., 2018).

Dysfunkce endotelu je považována za klíčovou nejen v iniciaci, ale také další progresi aterogeneze. K dysfunkci endotelu dochází nejčastěji a nejdříve ve vysoce namáhaných oblastech, v oblastech s turbulentním prouděním (obvykle v cévních bifurkacích), ale i v důsledku chronické stimulace prozánětlivými cytokiny a chronickým zánětlivým stavem (Chiu & Chien, 2011; Steyers & Miller, 2014). V důsledku hemodynamického stresu dochází v buňkách endotelu k prozánětlivým změnám a následně k rozvolňování mezibuněčných spojů (VE-Cadherin a PECAM-1) (Conway et al., 2013), což vede k aktivaci endotelu, zvýšení adhezivity, permeability, k rozvoji oxidativního stresu a k lokálním zánětlivým změnám (Liao, 2013). V animálním modelu s využitím žilní arterializace (by-passem propojený žilní segment s arteriálním oběhem, což vede ke strukturální a funkční reorganizaci cévní stěny v reakci na nové lokální biomechanické prostředí) se již v prvních dnech po zavedení bypassu zvýšila genová exprese selektinu E (SelE) a vaskulární adhezni molekuly 1 (VCAM-1) a k infiltraci makrofágů (Chiu, et al., 2011; Kwei et al., 2004). Kromě hemodynamického stresu přispívá k dysfunkci endotelu i působení oxidativního stresu, glykace (Messner & Bernhard, 2014), chronicky zvýšená hladina LDL částic a jejich oxidovaných forem (Li

& Mehta, 2005) a v neposlední řadě aktivace endotelu prozánětlivými cytokiny (C. H. Zhang, 2008).

Nejčastěji bývá s rozvojem aterosklerózy a endoteliální dysfunkce spojována hyperlipidemie, která bývá silným iniciálním spouštěčem onemocnění. Hyperlipidemie je definována jako chronické zvýšení hladin triglyceridů a cholesterolu v krevní plasmě. Počáteční hyperlipidemie vede k aktivaci endotelu prostřednictvím Caspase-1-Sirtuin-1 signalizační dráhy (Yin et al., 2015). Částice oxidovaného LDL (oxLDL) *in vitro* snižují migraci endoteliálních buněk, na druhou stranu stimulují migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny cév. To snižuje schopnost regenerace endotelu při jeho poškození a vede ke zvýšenému oxidativnímu stresu (Rosenbaum et al., 2012). Dalším důsledkem vysokých koncentrací cholesterolu v krevním oběhu vede v arteriální stěně často ke vzniku krystalů cholesterolu intracelulárně. Dlouhou dobu nebylo jisté, zda k tomu dochází i přímo v endoteliálních buňkách. Recentní práce Yvone Baumer prokázala, že nejen *in vitro*, ale i *in vivo* v důsledku vysokocholesterolové diety (u APO E-/- myši) dochází k intracelulární formaci krystalků cholesterolu (Baumer et al., 2017).

1.2. Monocyty a makrofágy v rozvoji aterosklerózy

Makrofágy, jak již jejich název napovídá, jsou velké buňky nespecifické imunity, jejichž stěžejní funkcí je schopnost fagocytózy. Vznikají diferenciací z kmenových buněk kostní dřeně, odkud jsou vyplavovány ve formě monocytů. K následné přeměně na makrofágy dochází v tkáních, tato proměna je provázena morfologickými a funkčními změnami. Typickou vlastností makrofágů je schopnost fagocytózy a to jak cizorodého materiálu na základě tzv. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) – potenciálně nebezpečných molekulárních vzorů, tak i tělu vlastních apoptotických/nekrotických buněk a buněčného debris prostřednictvím rozpoznání DAMPs (damage/dnger-associated molecular patterns), a dalších částic jako například lipoproteinových částic (X. Zhang & Mosser, 2008). Další významnou funkcí makrofágů je antigen-prezentující schopnost pro T-lymfocyty.

Makrofágy se vyznačují vysokou heterogenitou, která je důsledkem jejich polarizace vlivem signálů z mikroprostředí. Tato heterogenita umožňuje přizpůsobení funkce potřebám *in situ*. Tradiční rozdělení makrofágů na M1 a M2 makrofágy, prozánětlivé a protizánětlivé makrofágy, vychází z *in vitro* experimentů, kdy naivní makrofágy byly stimulované Th1 a Th2 buňkami (Mills et al., 2000). Th1 buněčná odpověď je typická svou produkcí interferonu γ (IFN- γ), což vede k polarizaci makrofágů (M1) v prozánětlivém směru na tzv. klasicky aktivované makrofágy. Naopak

Th2 buněčná odpověď je spojena s produkcí protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-5, IL-10) a stimulací diferenciaci na M2 makrofágy, tzv. alternativně aktivované. Tato cesta byla původně označovaná jako inhibice aktivace makrofágů (Mills, et al., 2000). Je třeba zdůraznit, že ač je tato nomenklatura založená na označení na základě interakcí s Th1 a Th2 lymfocyty, polarizace makrofágů jako taková není závislá na skutečné přítomnosti T buněk, ale pouze na vlivu kombinací jejich produktů, respektive na přítomnosti kombinace prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů (Trial et al., 2016).

Funkčně je pro M1 makrofágy typická zvýšená produkce NO, který inhibuje proliferaci nejen patogenních mikroorganismů, ale obecně všech buněk. Dále se tyto makrofágy vyznačují vysokou antigen-prezentující schopností a vysokou produkcí prozánětlivých cytokinů a chemokinů (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-2, MCP-1). M2 makrofágy vykazují zvýšenou expresi arginázy, enzymu katalyzujícího štěpení argininu na ornitin a močovinu, což přispívá k proliferaci buněk a hojení, mimo jiné i díky tomu, že je ornitin prekurzorem tvorby polyaminů (Mills, et al., 2000). M2 makrofágy jsou také typické vysokou produkcí protizánětlivých cytokinů (IL-10, TGF- β) (Lu et al., 2013). Takto polarizované makrofágy následně reagují i při další stimulaci ligandy Toll-like receptorů (TLR). TLR jsou proteinové struktury fungující jako jedna z prvních linií obrany proti patogenům schopných na buněčném povrchu rozeznat cizí a tedy potenciálně nebezpečné antigeny, jejichž typickým zástupcem je lipopolysacharid (LPS), hlavní složka vnější membrány gramnegativních bakterií. Stimulace LPS u M2 makrofágů vyvolá zvýšení produkce ornitinu, obdobná stimulace M1 vede k nárůstu produkce NO a citrulinu (Lu, et al., 2013).

Ukázalo se, že tento základní koncept neodpovídá širokému spektru fenotypů makrofágů *in vivo*. V novějším konceptu prozánětlivé M1 makrofágy vznikají stimulací IFN- γ a LPS případně TNF- α (Mantovani et al., 2004). Protizánětlivé M2 makrofágy jsou již v této práci rozděleny na M2a vznikající stimulací kombinací IL-4 a IL-13. Vedle toho M2b vznikají stimulací přes TLR (LPS) v kombinaci s IL-1R agonisty (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33) a M2c vznikají stimulací IL-10 (Mantovani, et al., 2004; Palomo et al., 2015). Jednotlivým subtypům M2 makrofágů v *in vitro* studiích pozornost věnuje nejvíce výzkum zaměřený na karcinomy, proto jsou tyto fenotypy makrofágů také často označovány jako tumor-asociované makrofágy. I později objevený subtyp M2d se řadí mezi tumor-asociované makrofágy (Duluc et al., 2007; Wang et al., 2010). *In vitro* vzniká stimulací IL-6 v kombinaci s leukémií inhibujícím faktorem (LIF) a M-CSF (monocytové kolonie stimulující faktor) (Duluc, et al., 2007). V posledních letech byly popsány makrofágy M4 a Mox (vzniká stimulací oxidovanými fosfolipidy) s jasným proaterogenním efektem (Bobryshev et al., 2016; Gleissner et al., 2010). Na druhou stranu jsou definovány makrofágy HA-mac, M(Hb) a Mhem (stimulované volným hemem v hematomech) s protektivními účinky (Bobryshev, et al., 2016;

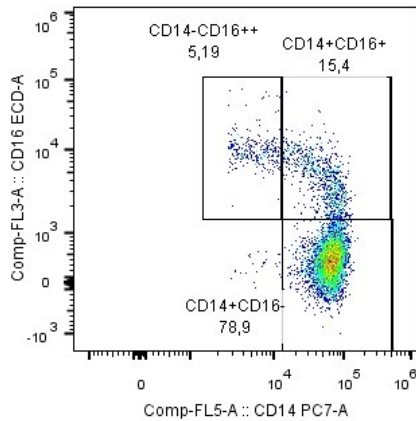
Erbel et al., 2015; Kadl et al., 2010). Přestože roste počet popsaných fenotypů, stále se jedná o významné zjednodušení širokého spektra fenotypů makrofágů vhodného v rámci *in vitro* experimentů. Na rozdíl od *in vitro* experimentů, tkáňově makrofágy vykazují velmi vysokou variabilitu v závislosti na typu tkáně, ale i prostředí *in situ* (Gordon & Pluddemann, 2017).

Makrofágy se ve velkém množství nacházejí i v aterosklerotických placích. Stejně jako makrofágy v jiných tkáních se vyznačují značnou tkáňovou a lokální variabilitou. Popis fenotypů makrofágů *in vivo* navíc komplikuje jejich významná autofluorescence, která interferuje s metodami využívajícími fluorescenční značení makrofágů, jakou je například průtoková cytometrie.

Jak bylo zmíněno výše, již první mikroskopické změny ve stěnách arterií jsou doprovázeny masivní infiltrací monocytů/makrofágů do cévní stěny, kde vychytávají nadbytečné lipidové částice. Makrofágy v cévních stěnách mohou hrát zásadní úlohu. Na jedné straně jsou schopny kumulovat nadbytečné LDL částice, na druhé straně se nadbytku intracelulárního cholesterolu zbavují reverzním transportem na částice HDL. HDL částice z periferních tkání transportují cholesterol do jater odkud je v podobě žlučových kyselin vyloučen z organismu (Rader et al., 2009). Cholesterol je v optimálním množství pro buňky esenciální, nicméně jeho výrazný nadbytek působí cytotoxicky.

Kromě reverzního transportu se makrofágy uplatňují při eferocytóze, tedy procesu receptorem zprostředkované fagocytózy umírajících a mrtvých buněk a jejich zbytků. Právě při selhání tohoto mechanismu pak debris z mrtvých buněk prohlubuje lokální zánět v důsledku tzv. sekundární nekrózy (Schrijvers et al., 2005). Zvýšená akumulace mrtvých buněk vytváří tzv. nekrotické jádro v placích. Receptor MerTK (c-Mer tyrosin kináza) je esenciální pro eferocytózu a jeho defekt vede k akceleraci tvorby aterosklerotického plaku a nekrózy v něm (B. S. Cai et al., 2017). Proteolytickým štěpením MerTK se uvolňuje tzv. sol-Mer, tedy solubilní Mer, jehož hladina u lidí úzce koreluje s nekrózou plaku a ischemickými symptomy (B. S. Cai, et al., 2017). Význam MerTK posilují experimenty na myším modelu, kdy inhibice jeho štěpení významně snižuje riziko nekrózy a destabilizace plaku (B. S. Cai, et al., 2017).

Lidské krevní monocyty jsou tradičně rozdělovány na základě míry exprese dvou povrchových markerů - lipopolysacharidový receptor (CD14) a nízkoafinitní receptor pro imunoglobulin G (CD16) (Ajami & Steinman, 2018). Klasicky aktivované monocyty s povrchovým znakem CD14 (CD14++CD16-), neklasické exprimující na povrchu v nízké míře CD14 ve vysoké míře CD16 (CD14+CD16++) a intermediální CD14+ buňky s nízkou expresí CD16 (CD14+CD16+). Rozdělení subpopulací a typické poměrné zastoupení v krevním vzorku je znázorněno na Obrázek 2.



Obrázek 2: Rozdělení lidských krevních monocytů měřených průtokovou cytometrií.

Když jsme před lety začínali, zdála se problematika polarizace lidských makrofágů na základě literatury (zejména přehledných článků) jasná. Již naše počáteční experimenty, ale ukázaly, že aplikace animálních dat na lidské tkáňové makrofágy velmi omezená. Vzhledem k širokému spektru a vysoké plasticitě makrofágů, dodnes nejsou jasně definované a popsány *in vivo* fenotypy makrofágů (Mitsi et al., 2018). Pro analýzu makrofágů v lidské tukové tkáni jsme vyšli z již známých povrchových znaků krevních monocytů, které jsme doplnili o další znaky pro zpřesnění fenotypů. Relativně recentní práce Thaler ukazuje, že právě intermediální monocyty (CD14+CD16+) hrají zásadní roli v tkáních při chronickém zánětu (Thaler et al., 2016), což je v souladu i s našimi výsledky analýz makrofágů infiltrovaných do tukové tkáně ve vztahu k rizikovým faktorům kardiovaskulárních chorob (Kralova et al., 2015; Kralova Lesna et al., 2016; Kralova Lesna et al., 2018; Kralova Lesna et al., 2015; Lesna et al., 2017; Poledne et al., 2016). CD14+CD16+ monocyty vykazují vyšší produkci ROS a vyšší kapacitu indukce proliferace T buněk ve srovnání s dalšími dvěma subtypy (Zawada et al., 2011).

Kromě zmíněných základních povrchových znaků (CD14 a CD16) jsme vybrali další povrchové znaky makrofágů (CD36 a CD163) pro zpřesnění analýzy jejich fenotypů v lidské tukové tkáni. CD36 se řadí mezi tzv. skavengerové receptory. Kromě makrofágů se nachází na povrchu řady typů buněk včetně adipocytů a svalových buněk, kde se zásadně podílí na vychytávání mastných kyselin s dlouhým řetězcem (Vroegrijk et al., 2013), dále se nachází i na endoteliálních buňkách, erytrocytech nebo krevních destičkách (Collot-Teixeira et al., 2007). U makrofágů byl CD36 popsán nejdříve jako fyziologický receptor oxLDL, který se též podílí na akumulaci esterů cholesterolu v makrofázích (Nozaki et al., 1995). Později se ukázalo, že jeho absence vede ke snížení produkce

prozánětlivých cytokinů (L. Cai et al., 2012). CD36 se také podílí na fagocytóze buněčného debrisu, což v některých situacích, jako je třeba v oblastech s akutním nahromaděním nekrózy v důsledku poškození ischemií, může působit protektivně (Woo et al., 2016). Zvýšená hladina prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-18) vede ke zvýšení exprese CD36 makrofágů, na druhou stranu anti-inflamační TGF- β , ale i jinak prozánětlivě působící LPS a IFN- γ snižují jeho expresi (Choromanska et al., 2017).

CD163 patří do rodiny na cystein bohatých skavengerových receptorů (Buechler et al., 2000). Jedná se o marker protizánětlivých M2 makrofágů (Bertani et al., 2017). Nejvyšší expresi vykazuje v CD14+CD16- monocytech/makrofázích (Buechler, et al., 2000; Tippett et al., 2011). Jeho exprese je stimulována protizánětlivými cytokiny jako je IL-10, na druhou stranu stimulace prozánětlivými (TNF- α , LPS, IFN- γ) jeho expresi snižuje (Buechler, et al., 2000).

1.3. Adhezní kaskáda

Proces migrace monocytů do cévní stěny probíhá kaskádovitě. Začíná adhezí k endotelu, následovaného tzv. rollingem – valením adheované buňky po endotelu a finální extravazací monocytu z krevního oběhu do oblasti probíhajícího zánětu - do vnitřních vrstev cévy, případně dále do vnitřních orgánů (Gerhardt & Ley, 2015). V cílové lokalitě dochází k jejich diferenciaci v závislosti na cytokinovém prostředí (Gerhardt, et al., 2015). V oblasti aktivace endotelu dochází ke zvýšení exprese selektinů – hlavně E-selektinu (Sele) a P-selektinu (SelP), které se řadí do rodiny Ca²⁺-dependentních lektinů. Tyto lektiny váží sialylované a fukosylované sacharidové ligandy (např. sialomuciny, O-glykosidované cukerné ligandy SelP glykoproteinovém ligandu 1 (PSGL-1)) a zprostředkovávají prvotní zachycení a rychlý rolling po endotelu (Cejkova et al., 2016; Galkina & Ley, 2007; Martins et al., 2007).

Nicméně vazby selektinů nejsou za fyziologického toku krve dostatečně silné a zajišťují zejména reverzibilní zpomalení proudících leukocytů a stimulaci dalších adhezních mechanismů (Ma et al., 2004). Po prvotní interakci SelP a Sele a jeho ligandu dochází k dalšímu zpomalení leukocytu pomocí Sele, jehož exprese je silně stimulována prozánětlivými cytokiny (Kunkel & Ley, 1996), a následně se přidávají vazby β_2 integriny (s lymfocyty funkčně asociovaný antigen 1 (LFA-1), velmi pozdní antigen 4 (VLA-4)) a jejich imunoglobulinové ligandy (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4, ICAM-5 a JAM-A a dále VCAM-1 a fibronectin) (Imai et al., 2010; Sen et al., 2013). Pevné adheze leukocytů k endotelu tvoří zvláště interakce mezi integriny a jejich ligandy ICAM-1 a VCAM-1 (Tan et al., 2000; Woollard & Geissmann, 2010). Za fyziologických podmínek endotel kontinuálně exprimuje ICAM-1, VCAM-1 endotel exprimuje až v důsledku stimulace prozánětlivými cytokiny

(Cook-Mills et al., 2011). Finální fází je transmigrace leukocytů přes endotel, k němuž dochází dvěma cestami - paracelulární cestou, kdy dochází k remodelaci mezibuněčných spojů v důsledku transmigrace leukocytů, nebo transcelulární cestou (průnikem endoteliální buňky) (Gerhardt, et al., 2015; Mamdouh et al., 2009).

1.4. Tuková tkáň

Subklinický chronický zánět provází všechna stadia rozvoje aterosklerózy, tedy od endoteliální dysfunkce až po destabilizaci aterosklerotického plaku (Libby, 2012; Libby et al., 2009). Tuková tkáň byla dlouho vnímána zejména jako zásobárna energie a orgán hrající roli v termoregulaci, nicméně v posledních dekádách byla prokázána její významná úloha v patogenezi kardiovaskulárních a metabolických chorob. Tuková tkáň je významným zdrojem endokrinně působících látek, které se podílejí zejména na rozvoji chorob spojených metabolismem a s chronickým zánětem (Kershaw & Flier, 2004). Později bylo prokázáno, že tuková tkáň je zdrojem desítek látek ovlivňujících nejen metabolismus, ale i imunitní systém a může mít negativní, ale i pozitivní vliv na rozvoj kardiovaskulárních chorob, tyto produkty začaly být označovány jako tzv. adipokiny (Kershaw, et al., 2004).

Tukovou tkáň lze rozlišovat buď z hlediska lokalizace na subkutánní, viscerální a perivaskulární, nebo podle její morfologie a funkce na hnědou a bílou tukovou tkáň. Tuková tkáň není tvořena pouze adipocyty, ale tvoří ji i řada dalších buněčných typů, které tvoří tzv. stromavaskulární frakci (SVF). SVF tvoří množství typů buněčných včetně buněk imunitního systému, fibrocyty, mezenchymální kmenové buňky, preadipocyty a další. V našem výzkumu se zaměřujeme na subkutánní, viscerální a perivaskulární tukovou tkáň.

1.4.1. Hnědá a bílá tuková tkáň a jejich vztah ke kardiovaskulárním chorobám

Hnědá a bílá tuková tkáň se zásadně liší metabolickými procesy, které v nich probíhají. Adipocyty bílé tukové tkáně tvoří hlavní zásobárnu energie uchovávanou ve formě intracelulárních kapének lipidů, které mohou být mobilizovány lipolýzou stimulovanou noradrenalinem a glukagonem (Duncan et al., 2007). Buňky hnědé tukové tkáně se vyznačují velkým množstvím mitochondrií, na jejichž vnitřní membráně se nachází tzv. rozpřahující proteiny (UCP1 a UCP2, uncoupling protein 1/2). Hnědá tuková tkáň se uplatňuje při netřesové termogenezi, při které spotřebovává triglyceridy a cholesterol z krevního oběhu (Berbee et al., 2015; Khedoe et al., 2015). Protonový potenciál na vnitřní mitochondriální membráně vzniklý z odbourávání triglyceridů a glukózy není

však využit na tvorbu ATP (adenosintrifosfát), ale prostřednictvím UCP1 dojde ke zkratu a uvolnění energie ve formě tepla. Malí hlodavci mají ložiska hnědé tukové tkáně nejvíce v podkoží v oblasti interskapulární, dále mají drobná ložiska v axilární, kraniální a peritoneální oblasti (Schoettl et al., 2018). Lidští novorozenci se rodí s velkým množstvím hnědé tukové tkáně hlavně v oblasti interskapulární, axilární a v oblasti krku (van den Berg et al., 2017). S věkem hnědé tukové tkáně ubývá, ale i dospělým jedincům zůstávají drobná ložiska v supraklavikulární oblasti, v oblasti krku a dále podél obratlů páteře, aorty a ledvin (van den Berg, et al., 2017; Virtanen et al., 2009). Přestože hnědá tuková tkáň představuje minoritní zastoupení, je vysoce vaskularizována a zdá se, že díky vysoké spotřebě glukózy a lipidů může působit protektivně proti rozvoji aterosklerózy a rozvoje dalších metabolických chorob (dyslipidemie, insulinová rezistence) snížením triglyceridů a cholesterolu v krevním oběhu (Festuccia et al., 2011).

Při dlouhodobém vystavení chladu dochází ke zmnožení hnědé tukové tkáně a reverzibilní přeměně bílé tukové tkáně na přechodnou tzv. béžovou až hnědé podobnou tukovou tkáň prostřednictvím procesu zvaným béžovění nebo hnědnutí (beiging, browning) (Zingaretti et al., 2009). Toto bylo poprvé popsáno u hlodavců, kdy docházelo k hnědnutí adipocytů po adrenergní stimulaci (Xue et al., 2007). Později bylo zjištěno, že proces hnědnutí tukové tkáně může být stimulován i eozinofilními granulocyty a alternativně aktivovanými makrofágy infiltrovanými do tukové tkáně (Qiu et al., 2014). Alternativně aktivované makrofágy produkují katecholaminy, které stimulují lokální hnědnutí tukové tkáně (Nguyen et al., 2011; Qiu, et al., 2014). Recentní práce prokazují úlohu UCP1 a UCP2 i jako transportéru aspartátu a glutamátu přes mitochondriální membránu (Monne et al., 2018). Tento mechanismus je pravděpodobně evolučně velmi starý a mohl se uplatňovat při výměně redukcí ekvivalentů z mitochondrie v rámci fotorespirace (Monne, et al., 2018). UCP1 se pravděpodobně také uplatňuje v adaptaci na redoxní stres, kdy v důsledku lokálně zvýšené hladiny laktátu dochází ke zvýšení jeho exprese a tím snížení redoxního tlaku (Carriere et al., 2014).

1.4.2. Anatomické rozdělení tukové tkáně ve vztahu ke kardiovaskulárním chorobám

Tuková tkáň se mezi jednotlivými lokalitami liší morfologií i funkcí. Rozlišujeme tukovou tkáň subkutánní (SAT) a viscerální (VAT). Perivaskulární (PVAT) tuková tkáň obklopující cévy bývá někdy řazena do viscerální tukové tkáně. Subkutánní tuková tkáň bývá považována za méně důležitou z hlediska kardiovaskulárních a metabolických chorob vzhledem k nižší expresi prozánětlivých cytokinů ve srovnání s VAT (Porter et al., 2009).

Podrobněji lze VAT u člověka rozlišovat na omentální tukovou tkáň, která transversálně obklopuje střeva a žaludek, mesenterickou tukovou tkáň lokalizovanou hlouběji obklopující vnitřní orgány a retroperitoneální tukovou tkáň obklopující ledviny v retroperitoneu. Mezi VAT bývá řazena i epikardiální a perikardiální tuková tkáň přiléhající k srdci. Množství epikardiální tukové tkáně řada prací spojuje s incidencí a závažností kardiovaskulárních chorob (Jeong et al., 2007; Shemirani & Khoshavi, 2012; Taguchi et al., 2001).

Perivaskulární tuková tkáň (PVAT) byla dlouhou dobu přehlížena a považována za pouhou pasivní oporu cév. Caroline M. Pond ve své přehledné práci uvádí, že anatomové zabývající se lidskou srovnávací anatomíí přehlíželi a odstraňovali PVAT, protože byla považována za nekonzistentní a bezvýznamnou strukturu, kterou nemá smysl se zabývat (Pond, 2017). Nicméně nepřítomnost fyzické bariéry mezi PVAT a cévní stěnou dává PVAT možnost přímo ovlivňovat homeostázu cévní stěny (Fernandez-Alfonso et al., 2018). U zvířecího modelu obezitou indukované změny v PVAT vedou ke zvýšení tvorby aterosklerotických lézí (Takaoka et al., 2009). Tento proces stimuluje a akceleruje nerovnováhu produkce prozánětlivých adipokinů a zvýšená infiltrace imunokompetentních buněk do PVAT (Fernandez-Alfonso, et al., 2018).

Bioaktivní látky uvolňované tukovou tkání produkují jednak přímo z adipocytů, ale i další buňky tzv. SVF tvořené velkým množstvím buněk bílé krevní řady, mezi které patří i makrofágy schopné produkovat velké množství cytokinů působících prozánětlivě. Je prokázáno, že tyto prozánětlivé produkty makrofágů v tukové tkáni zhoršují inzulinovou signalizaci a přispívají tím k rozvoji inzulinové rezistence (Arkan et al., 2005; Baker et al., 2011; Gual et al., 2005; Hirosumi et al., 2002). Množství makrofágů a hlavně polarizace se liší jak mezi jednotlivými depozity tukové tkáně, tak v závislosti na patofyziologických podmínkách. U zvířecích modelů obezity makrofágy mohou tvořit až 40 % buněk SVF tukové tkáně, přičemž se jedná jak o *in situ* makrofágy, tak i infiltrované makrofágy pocházející z krevního oběhu (Weisberg et al., 2003). Práce Amana (Amano et al., 2014) ukazuje, že v případě geneticky obézního kmene (*ob/ob*) myši může dokonce docházet i k proliferaci makrofágů *in situ* v tukové tkáni. I výsledky Waqase potvrzují, že makrofágy v tukové tkáni nepochází pouze z infiltrace a následné diferenciaci monocytů krevního oběhu, ale i z proliferace *in situ* (Waqas et al., 2017).

Adipokiny

Prvním objeveným hormonem reflektujícím dlouhodobou zásobu energie v podobě tukové tkáně byl leptin (Y. Y. Zhang et al., 1994). Účastní se adaptace na změnu hmotnosti (Strohacker et al., 2014). Jeho hladina pozitivně koreluje s množstvím tukové tkáně bez vztahu k věku a pohlaví nejen v animálním modelu, ale i u lidí (Liuzzi et al., 1999). Již v devadesátých letech byla nalezena

úzká spojitost mezi koncentrací leptinu v krevní plasmě a kardiovaskulárními chorobami (Liuzzi, et al., 1999). Byl také prokázán negativní vliv zvýšených hladin leptinu při chronických zánětlivých onemocnění jako nealkoholová steatohepatitida (NESH), chronický plicní zánět, chronické střevní záněty, nebo při autoimunitních onemocněních (Hoffmann et al., 2019; La Cava, 2017). V animálním modelu subfyziologické a fyziologické hladiny leptinu snižují plasmatické koncentrace i expresi prozánětlivých cytokinů v tukové tkáni (Hoffmann, et al., 2019). Tato studie také prokazuje, že při nízkých hladinách leptinu dochází k pomalejšímu vývoji aterosklerotického plaku. Naopak v případě stimulace monocytů vysokou koncentrací leptinu dochází k významnému zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů (Zarkesh-Esfahani et al., 2001).

Objevem leptinu se zvýšil zájem o endokrinní schopnosti tukové tkáně a již v roce 1996 byl objeven další hormon - adiponektin. Jeho původní označení bylo velmi ambiciózní - Adipose Most Abundant Gene Transcript 1 (apM1) (Maeda et al., 1996). Hladina adiponektinu, na rozdíl od leptinu, klesá s rostoucím BMI (body mass index) jak u zvířat, tak i u lidí (Arita et al., 1999; Hu et al., 1996; O'Brien et al., 2018). Adiponektinu jsou připisovány významné ateroprotektivní (Okamoto et al., 2002) a antiinflamační účinky (Turer & Scherer, 2012), dále pak zvyšuje senzitivitu k insulinu (Ruan & Dong, 2016). Přímá souvislost mezi jeho koncentrací a stabilitou plaku však prokázána nebyla (Marino et al., 2018). Poměr leptinu a adiponektinu se ukázal jako lépe reflektujícím riziko kardiovaskulárních chorob, a to zejména u diabetiků 2. typu (Chou et al., 2014; Satoh et al., 2004). Tento poměr dobře koreluje s tloušťkou intimy a média (Norata et al., 2007). V recentním přehledném článku Fruhbeck popisuje tento poměr leptinu a adiponektinu jako výborný znak metabolických poruch zejména v tukové tkáni (Fruhbeck et al., 2018). Respektive připouští, že metabolicky zdraví obézní jedinci mají vyšší poměr adiponektinu a leptinu, než metabolicky nemocní obézní. Zvýšení tohoto poměru může snižovat rizika akutních kardiovaskulárních příhod (Fruhbeck, et al., 2018).

Mezi další adipokiny řadíme resistin a omentin jejichž produkce roste s adipozitou a vyvolává insulinovou resistenci (Steppan et al., 2001). Protilátky neutralizující resistin u zvířecího modelu působí proti insulinové resistenci (Steppan, et al., 2001). Omentin-1 je převážně produkován ve viscerální tukové tkáni (Yang et al., 2006). Tento hormon obdobně jako resistin působí protektivně proti insulinové resistenci prostřednictvím aktivace Akt fosforylace (Yang, et al., 2006). Yamakawaki prokázal vasodilatační vliv omentinu na potkaní aortu (Yamawaki et al., 2010). V lidských endoteliálních buňkách omentin inhibuje expresi prozánětlivého TNF- α prostřednictvím signalizace přes c-Jun N-terminální kinázu, což nasvědčuje jeho protizánětlivý efekt (Yamawaki et al., 2011). Intenzivní zájem o produkty tukové tkáně vedl k objevům dalších adipokinů včetně cytokinů s již známými imunitními vlastnostmi. Další důležité adipokiny jsou shrnuty viz tabulka 1.

Cytokiny/adipokiny	Základní důležité vlastnosti
TNF-α	Dominantně produkovaný imunokompetentními buňkami, stimulace produkce kyslíkových radikálů stimulace exprese adhezních molekul SelE, ICAM-1, VCAM-1 a dalších cytokinů CXCL2, CXCL6, kolonie stimulující faktor 1 (Kuldo et al., 2005; S. Y. Park et al., 2008; Viemann et al., 2006)
IL-6	Stimulace produkce CRP v játrech, snižuje senzitivitu v inzulínu (Held et al., 2017) Přispívají k polarizaci makrofágů prozánětlivým směrem (Lockett-Chastain et al., 2016) Zvýšení adhezivity endotelu (Watson et al., 1996)
IL-1β	↑ adheze leukocytů v endotelu ↑ produkce prozánětlivých cytokinů, chemokinů, matrix metaloproteáz ↑ proliferace buněk cévní hladké svaloviny (Libby, 2017)
IL-8	Destabilizace plaku Prokoagulační efekt Prediktor pro akutní koronární syndrom (Cavusoglu et al., 2015)
IL-10	Protizánětlivý ↓ expresi prozánětlivých cytokinů v monocytech ↓ adheze a adhezních molekul v endoteliálních buňkách Inhibice v animálním modelu vede k akceleraci aterosklerózy (Mtairag et al., 2001)
MCP-1	Zvyšuje extravazaci monocytů z krevního oběhu Plasmatické koncentrace rostou se rozvojem aterosklerózy (Basurto et al., 2019)
Adiponektin	↓ exprese adhezních molekul Antioxidační Protizánětlivý Insulin senzitivizující Vasoprotektivní (Katsiki et al., 2017)
Leptin	Signál nasycenosti (v animálním modelu blokuje přibývání hmotnosti)

	<p>(Hoffmann, et al., 2019))</p> <p>Prozánětlivý</p> <p>Insulindesenzitizující</p> <p>Negativní vliv na neointimální formaci (Hubert et al., 2017)</p>
Resistin	<p>Prozánětlivý</p> <p>Aterogenní</p> <p>Zvýšený při diabetu</p> <p>(Gencer et al., 2016)</p>
Visfatin	<p>Vnitřní enzymová nicotinamide fosforibosyltransferázová aktivita – zásadní při syntéze NAD+</p> <p>Přímý vliv na proliferaci buněk hladké svaloviny a angiogenezi</p> <p>Zvyšuje aktivitu matrix metaloproteáz a adhezních molekul (ICAM-1, VCAM-1, SeI), což přispívá k destabilizaci plaku</p> <p>(Pitoulas et al., 2017)</p>
Omentin	<p>Zvýšené hladiny při chronických inflamačních onemocněních (Crohnova nemoc, psoriáza)</p> <p>S obezitou klesá</p> <p>Při akutním infarktu roste</p> <p>Nevyazuje vztahy s tradičními rizikovými faktory kardiovaskulárních chorob, ale při vysokých koncentracích incidence akutních komplikací je významně nižší</p> <p>(Kadoglou et al., 2015; Saely et al., 2016)</p>

Tabulka 1 Vybrané adipokiny a jejich vlastnosti.

2. Cíle studie

- ➔ Popsat fenotypy makrofágů v lidské tukové tkáni a jejich vztah k rizikům rozvoje kardiovaskulárních onemocnění.
- ➔ Porovnat genovou expresi prozánětlivých cytokinů v jednotlivých depozitech tukové tkáně (SAT, VAT, PVAT) u živých dárců ledvin a dále je porovnat s expresí u pacientů s prokázanou aterosklerózou periferních arterií.
- ➔ V kondicionovaných médiích získaných inkubací tukové tkáně změřit koncentrace uvolněných cytokinů (ATCM). Zavést a změřit vliv těchto produktů tukové tkáně na adhezi monocytů k endotelu a stanovit genovou expresi v ovlivněných endoteliálních buňkách.

3. Metody

Charakteristika analyzované skupiny

Účastníci studií byli detailně informováni o smyslu, cíli a struktuře studie a podepsali informované souhlasy s účastí ve studii. Studie byly schváleny Etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny a Thomayerovy nemocnice.

Analyzovaná skupina LKD ve srovnání s výsledky dlouhodobé studie post-MONICA, popisujícím průměrnou českou populaci (Cifkova et al., 2010), měla mírně nižší BMI, celkový cholesterol, nižší prevalenci hypertenze a diabetu mellitu 2. typu. Jednalo se tedy o mírně zdravější skupinu v rámci průměrné české populace. Počty a konkrétní průměrné hodnoty analyzovaných skupin je rozepsáno ve výsledcích jednotlivých analýz. Do některých analýz byly zahrnuty i vzorky od pacientů s angiologicky prokázanou chorobou periferních cév (PAD). Skupina PAD ve srovnání s LKD byla v průměru starší, měla vyšší koncentrace cholesterolu a hsCRP, ale v BMI se skupiny nelišily.

Koncentrace lipoproteinů

Před zahájením operace byla LKD a pacientům s PAD odebrána krev na lačno (min 10 hod lačnění). Plasma byla separována do 30 minut od odběru. Koncentrace cholesterolu a triglyceridů byly kvantifikovány Hoffmann-LaRoche přímou metodou - enzymatickým kitem HDL-C plus 3rd generation (Roche) na Cobas Mira+ autoanalyzátoru (Roche). Koncentrace non-HDL cholesterolu byla dopočítána jako rozdíl celkového cholesterolu a frakce HDL cholesterolu. Data od LKD a od pacientů s PAD byla analyzována identickými metodami.

Izolace stromovaskulární frakce (SVF) tukové tkáně

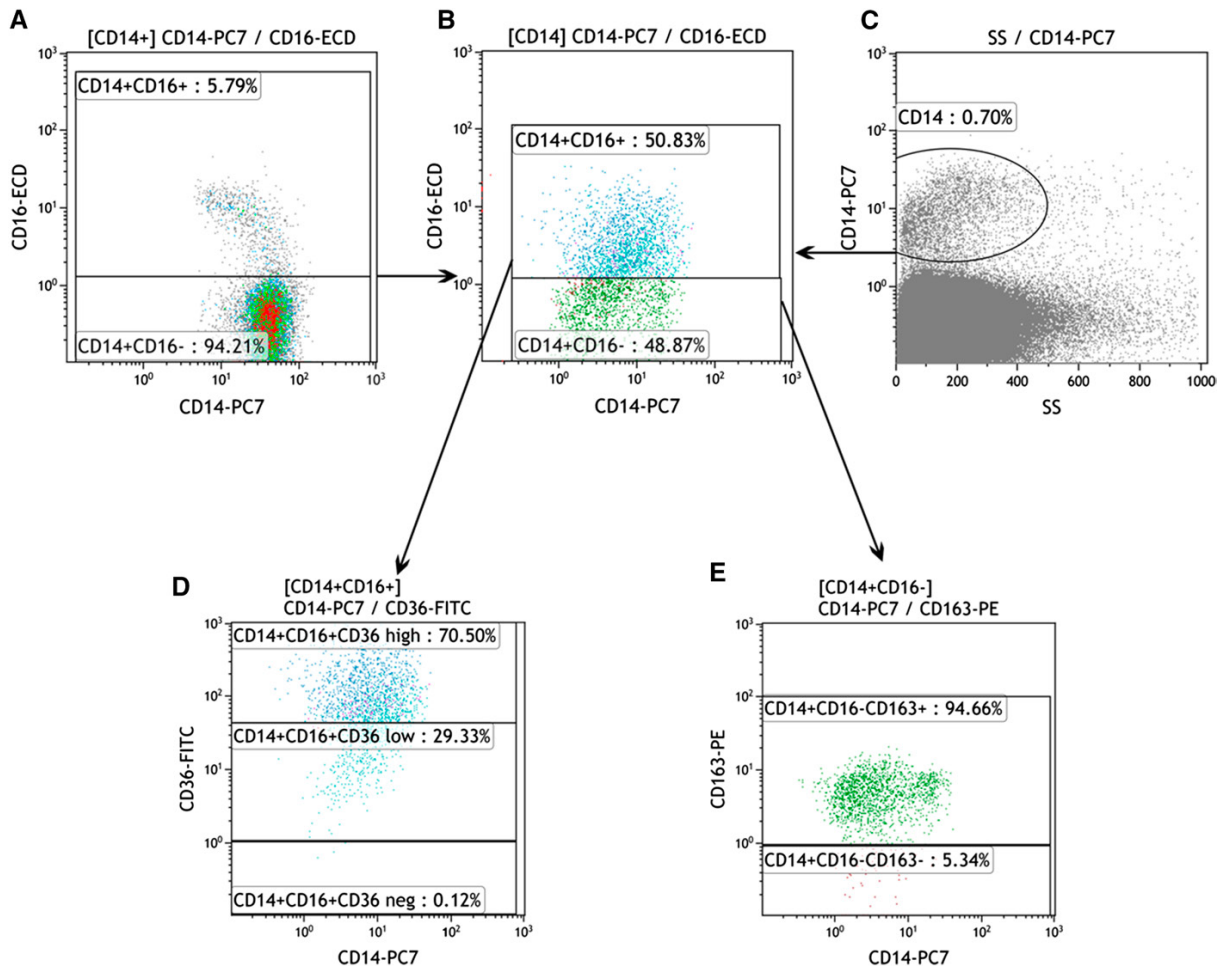
SAT, VAT a PVAT byla odebrána peroperačně od živých dárců ledvin (LKD) během nefrektomie, případně v rámci rekonstrukce periferních arterií od pacientů s angiograficky potvrzenou chorobou periferních cév (PAD). Vzorky byly odebírány ze stejných lokalit. VAT byl odebírán z oblasti vně Gerotovy fascie a PVAT byl odebírán z vnějšku renální arterie. Po očištění od všech viditelných zbytků vazivové tkáně a cév byla tuková tkáň nastříhána na malé kousky (asi 2 mm) a přes filtr byly vzorky promyty fosfátovým pufrům (PBS), aby se odstranila rezidua krve. Očištěná tkáň byla inkubována v roztoku kolagenázy (2 mg/ml kolagenázy v roztoku PBS s přidaným 2% albuminem) a inkubovány ve vodní lázni asi 15 min při 37°C. Homogenát byl filtrován přes

50 um filtr a centrifugován. Takto izolovaná stromovaskulární frakce byla analyzována pomocí průtokové cytometrie (CyAn; Beckman Coulter).

Průtoková cytometrie

Pro rozlišení jednotlivých fenotypů monocytů/makrofágů byly použity monoklonální protilátky s navázanými fluorochromy (CD14, Phycoerythrin-Cyanine; CD16, Phycoerythrin-Texas Red X; CD36, FITC; CD163 Phycoerythrin, PE/Clone RM 3/1). Data byla hodnocena v softwaru Kaluza (Beckman Coulter). Viabilita analyzovaných buněk byla hodnocena pomocí 7-AAD (7-Aminoactinomycinu D) a pouze vzorky s viabilitou nad 75 % byly zařazeny do analýz. Gate pro rozdělení CD16+ a CD16- populace byl vytvořen na základě jasně viditelného přechodu u paralelně měřeného vzorku krve stejného jedince.

Na základě našich předchozích výsledků (Kralova Lesna, et al., 2015), ale i publikované literatury (Barros et al., 2013; Krychtiuk et al., 2014) jsme hodnotili buňky CD14+CD16+ s vysokou expresí CD36 jako prozánětlivé (tzv. M1) a CD14+ bez exprese CD16 (CD16-) ale exprimující CD163 jako protizánětlivé (viz Obrázek 3). Je třeba připomenout, že se jedná o extrémní a zároveň majoritní fenotypy z celého spektra makrofágů.



Obrázek 3 Gateovací strategie pro definování populací polarizovaných makrofágů v tukové tkáni. Po vybrání CD14+ populace buněk je gate pro CD16+ buňky vytvořený podle krve (A), kde je jasně viditelná hranice, použit pro rozdělení CD14+CD16+ a CD14+CD16- makrofágů v SVF tukové tkáni (B). Obr. C znázorňuje vybranou populaci CD14+ buněk vybraných pro další gateování. CD14+CD16+ populace dále tvoří významnou populaci buněk s vysokou expresí CD36 a menší populaci s nízkou expresí CD36 (D). Naopak CD14+CD16- majoritní část buněk exprimuje i CD163 (E) považované za znak protizánětlivých makrofágů.

Genová exprese

Pro analýzu genové exprese tukové tkáně byly vzorky tukové tkáně ihned po odebrání zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80°C až do analýzy. Z přibližně 200 mg tukové tkáně byla izolována RNA pomocí TRIzol Reagent (Molecular Research Centre). V případě ovlivněných endoteliálních buněk analyzovaných v poslední diskutované studii byla RNA izolována pomocí RNeasy Plus mini kit (Qiagen). Po odstranění reziduí DNA pomocí DNase I (Sigma Aldrich), cDNA byla přepsána podle instrukcí výrobce za užití kitu High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix kit (Life Technologies). Následně byla měřena míra exprese sledovaných cytokinů pomocí Corbett Life

Science Rotor Gene 3000 (Qiagen) za použití 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solise BioDyne).

V tukové tkáni byly analyzovány geny TNF- α (tumor necrosis factor α), MCP-1 (CCL2, C-C motif chemokin ligand 2) a IL-6 (Interleukin 6). Beta-2-microglobulin (B2M) byl použit pro normalizaci. Míra exprese sledovaných genů byla porovnávána mezi jednotlivými depozity tukové tkáně (SAT, VAT, PVAT) a zároveň mezi zdravými živými dárci ledvin a pacienty s prokázanou aterosklerózou periferních arterií (PAD).

Pro analýzu genové exprese v endoteliálních buňkách byly použity následující nukleotidové sekvence primerů: MCP-1, IL-6, syntáza oxidu dusnatého 3 (NOS3), transformující růstový faktor β (TGF- β), selektin E (SelE), intercelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1), vaskulární adhezní molekula 1 (VCAM-1). Glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) bylo použito jako endogenní kontrola pro normalizaci. Relativní genová exprese byla vyhodnocena pomocí metody $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001) srovnané k negativní kontrole (bez stimulace).

Kondicionovaná média

Pro analýzu vlivu produktů tukové tkáně na adhezi monocytů k endotelu byla vytvořena tzv. kondicionovaná média, kterými byly následně ovlivňovány endoteliální buňky v *in-vitro* modelu. Ihned po odebrání vzorků VAT od LKD byl vzorek v aseptických podmínkách očištěn od viditelné vazivové tkáně, cév a zbytků krve. Takto očištěné a na malé kousky nastříhané vzorky tkáně (2 mm³) byly inkubovány v odpovídajících množstvích kultivačního média (1 g VAT respektive SVF izolované z 1 g VAT v 1 ml roztoku endoteliálního bazálního média 1 (Lonza) s 0,2 % bovinním sérovým albuminem bez mastných kyselin (Sigma Aldrich)) po dobu 24 hodin.

Stromovaskulární frakce (SVF) byla získána natrávením očištěného vzorku VAT v roztoku kolagenázy (c=0,002 g/ml, Sigma-Aldrich) v PBS s přídavkem 2 % BSA. Po natrávení byla buněčná frakce filtrována a centrifugována, v rámci tohoto procesu jsou odmyty plně diferencované adipocyty. SVF izolovaná z 1 g VAT byla inkubována v 1 ml stejného kultivačního média, jako bylo použito pro ATCM. Po 24 hodinách bylo kondicionované médium ze SVF (SVFCM) odebráno a centrifugováno pro odstranění buněk v roztoku.

Odebraná kondicionovaná média (ATCM a SVFCM) byla skladována při -80°C až do dalších analýz.

Měření adheze monocytů k endotelu

V adhezním modelu byla míra adheze hodnocena na základě intenzity fluorescence adherovaných monocytů THP-1 (ECACC lot. 88081201) k ovlivněným endoteliálním buňkám (primární linie HUVEC -Human Umbilical Vein Cells, Lonza, lot. 369948).

THP-1 buňky byly kultivovány v RPMI-1640 (Biosera) s 10% fetálního bovinního séra (FBS) (Gibco™), 2 mM L-glutaminu (Sigma Aldrich) a 100 U/ml penicilin-streptomycinu (Biosera). Buňky HUVEC byly kultivovány v endoteliálním růstovém médiu 2 BulletKit (Lonza, CC-3156 & CC-4176).

Plně konfluentní vrstva endoteliálních buněk byla ovlivněna ATCM (případně SVFCM) v 5% koncentraci v EBM-2 s 2 % FBS v hexaplikátu na 96-jamkových černých destičkách s čirým dnem. Inkubace s TNF- α (10ng/ml, R&D Systems) byla použita jako pozitivní kontrola. Po 24hodinách bylo médium odstraněno a přidány THP-1 buňky značené pomocí calcein-AM (calcein-acetoxymethyl, Molecular Probes). Po 30 minutách inkubace byly monocyty odmyty a na základě intenzity fluorescence byla vyhodnocena míra adheze monocytů k endotelu.

Koncentrace cytokinů měřených v kondicionovaných médiích a krevním séru

Koncentrace cytokinů IL-1 β , MCP-1, TNF- α , MCP-1, IL-4, IL-5, IL-10, CXCL5 a RANTES v kondicionovaných médiích byly měřeny pomocí Luminex performance assay (R&D Systems Inc). Destičky byly čteny pomocí Luminex 100 analyzer (PerkinElmer Life Inc.) a vyhodnoceny přes xPONENT software (Luminex).

Hs-CRP

CRP měřené vysokosenzitivní metodou (hsCRP) byl měřen immunoturbidimetrickou analýzou (Cobas Mira Plus, Roche).

Statistická analýza

Není-li u jednotlivých výsledků uvedeno jinak, jsou data prezentována jako průměr \pm SD pro spojité proměnné a procenta \pm SD pro kategorické proměnné. Meziskupinové srovnání spojitých proměnných a lineární regrese byly provedeny pomocí nepárového t-testu a korelační analýzy byly provedeny softwarem GraphPad Prism, verze 6. Hodnoty *P* vyšší než 0,05 byly považovány za statisticky nesignifikantní. Pro vyhodnocení cytokinů měřené Luminex assay byl použit Mann-Whitney test.

4. Výsledky

4.1. Prozánětlivá genová exprese v tukových tkáních pacientů s aterosklerózou

Proinflammatory gene expression in adipose tissue of patients with atherosclerosis.

S. Čejková, I. Králová Lesná, J. Froněk, L. Janoušek, A. Králová, J. Ždychová, F. Thieme, R.

Poledne

Physiol. Res. 66: 633-640, 2017

Při porovnání skupiny pacientů s prokázanou chorobou periferních arterií (PAD) a zdravé skupiny živých dárců ledvin (LKD) (Tabulka 2 2) byli pacienti s PAD významně starší než LKD ($61 \pm 12,9$ let PAD, $46 \pm 10,5$ let LKD, $p < 0,001$). Průměrné BMI srovnatelné v obou skupinách ($26,3 \pm 3,8$ kg.m⁻² LKD, $27,4 \pm 4,8$ kg.m⁻² PAD). Prevalence kouření, hypertenze a diabetu mellitu 2. typu byla významně vyšší u skupiny PAD ve srovnání s LKD. Četnost kouření a prevalence hypertenze ve skupině PAD významně vyšší (kouření 79,2 % PAD vs. 28,6 % LKD, hypertenze 79,2 % PAD vs. 25,7 % LKD) ve srovnání se zdravou skupinou. Pouze jeden jedinec ze skupiny LKD vykazoval zvýšenou hladinu glukózy na lačno (>7 mol/l), nicméně klinická diagnóza diabetu nebyla následně potvrzena.

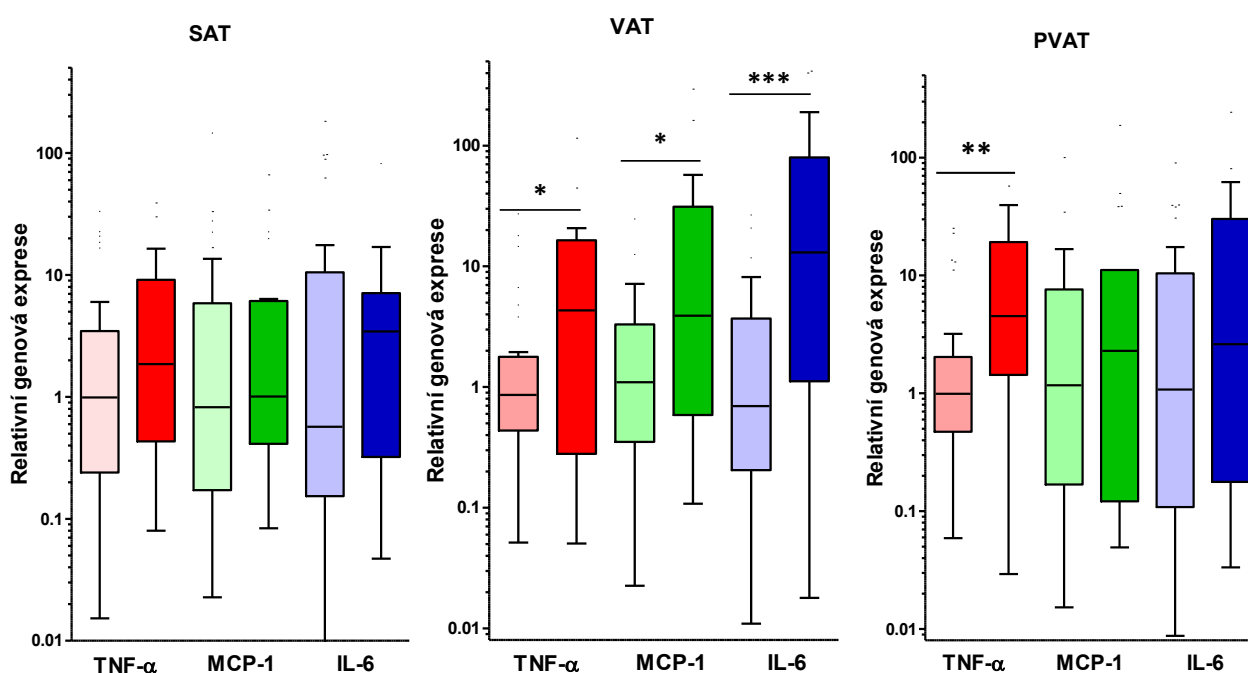
Koncentrace prozánětlivého TNF- α v krevní plasmě byla významně vyšší u skupiny pacientů s PAD ($4,86 \pm 1,4$ pg/ml) ve srovnání s LKD ($2,14 \pm 0,9$ pg/ml) ($p < 0,001$). Stejně tak byl nalezen významný rozdíl ve sledovaném hsCRP ($11,79 \pm 7,0$ PAD vs. $1,5 \pm 0,48$ LKD, $p < 0,02$). I přes velké rozptyly hodnot hsCRP je rozdíl mezi skupinami signifikantní. PAD pacienti byli rozděleni do dvou skupin (A,B) podle stupně stenózy *Arteria iliaca communis* a *Arteria iliaca externa*.

Genová exprese všech sledovaných genů byla signifikantně vyšší u VAT pacientů s PAD ve srovnání s LKD ve všech sledovaných genech (TNF- α 5-násobně, $p < 0,05$; MCP-1 3,6-násobně, $p < 0,05$; IL-6 18,8-násobně, $p < 0,001$) (obrázek 4). V případě PVAT pouze exprese TNF- α byla signifikantně vyšší ve skupině pacientů s PAD než u LKD (4,6-násobně, $p < 0,01$), zatímco při srovnání ostatních sledovaných genů se jejich exprese významně nelišila. V případě SAT nebyl žádný významný rozdíl genové exprese jednotlivých genů mezi skupinami nalezen. Při rozdělení skupiny LKD do 50 let a nad 50 let nebyl mezi podskupinami významný rozdíl v genové expresi sledovaných genů. Navzdory významnému rozdílu ve věku mezi LKD a pacienty s PAD je tedy velmi nepravděpodobné, že by tato skutečnost mohla hrát důležitou roli v genovém vyjádření obou skupin.

Při analýze genové exprese skupiny pacientů s PAD z hlediska závažnosti onemocnění, měřeného na základě stupně arteriální stenózy, žádný významný rozdíl v genové expresi TNF- α , MCP-1 a IL-6 nebyl zjištěn. Porovnání kuřáků a nekuřáků ve skupině LKD neukázalo žádné významné rozdíly v genové expresi.

	Živí dárci ledvin (n = 35)	Pacienti s PAD (n = 24)	Signifikance
Věk (roky)	46 \pm 10	61 \pm 13	p<0,0001
BMI (kg.m ⁻²)	26,3 \pm 3,8	27,4 \pm 4,8	p=0,489
Kuřák, n (%)	10 (28,6 %)	19 (79,2 %)	p<0,0001
Hypertenze, n (%)	9 (25,7 %)	19 (79,2 %)	p<0,0001
Diabetes mellitus 2. Typu, n (%)	0 (0 %)	7 (29,2 %)	p<0,001

Tabulka 2: Characteristics of the analyzed populations



Obrázek 4: Relativní genová exprese TNF α , MCP-1, a IL-6 v SAT, VAT a PVAT živých dárců ledvin (n=35) (LKD) a pacientů s PAD (n=24). Srovnání genové exprese mezi LKD a pacientů s PAD je znázorněno formou boxplotu. Světle jsou znázorněny hodnoty LKD a tmavě jsou znázorněny hodnoty pacientů s PAD. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Vzhledem k tomu, že sledované cytokiny jsou typicky produktem převážně makrofágů infiltrovaných v tukové tkáni, bylo analyzováno množství makrofágů na gram tukové tkáně a zároveň porovnán mezi sledovanými skupinami osob. Při srovnání množství makrofágů zjištěných průtokovou cytometrií nebyly zjištěny rozdíly stejného typu tukové tkáně mezi skupinami v případě VAT (11001 ± 10351 CD14+ monocytů/g u LKD, 11457 ± 12462 CD14+ monocytů/g u pacientů s PAD) a PVAT (11494 ± 12347 CD14+ monocytů/g u LKD a 15500 ± 13222 CD14+ monocytů/g u pacientů s PAD) významné rozdíly nebyly zjištěny. Pouze SAT při porovnání mezi skupinami vykazoval rozdíl na hranici významnosti (7411 ± 8527 CD14+ monocytů/g u LKD a 20721 ± 23312 CD14+ monocytů/g u pacientů s PAD). Lze tedy uzavřít, že množství makrofágů v tukových tkáních nehraje zásadní roli v analýze genové exprese.

Závěr

Zvýšená exprese prozánětlivých genů ve VAT pacientů s prokázanou PAD by zřejmě mohla souviset s prozánětlivou polarizací rezidenčních makrofágů v této tukové tkáni. Vyšší genová exprese ve VAT jsou v souladu i s plasmatickou koncentrací prozánětlivých markerů – TNF- α a hsCRP. Naše data potvrzují důležitost tukové tkáně v rozvoji aterosklerózy. Nicméně zůstává nezjištěno, zda námi dokumentované změny v tukové tkáni jsou příčinou přítomného patofyziologického stavu, nebo zda tento prozánětlivý stav existoval již daleko dříve u skupiny jedinců náchylných k rozvoji aterosklerózy.

4.2. Vliv cytokinů produkovaných tukovou tkání na adhezi monocytů k endotelu

The effect of cytokines produced by human adipose tissue on monocyte adhesion to the endothelium.

Čejková S, Kubátová H, Thieme F, Janoušek L, Froněk J, Poledne R, Kralová Lesná I.

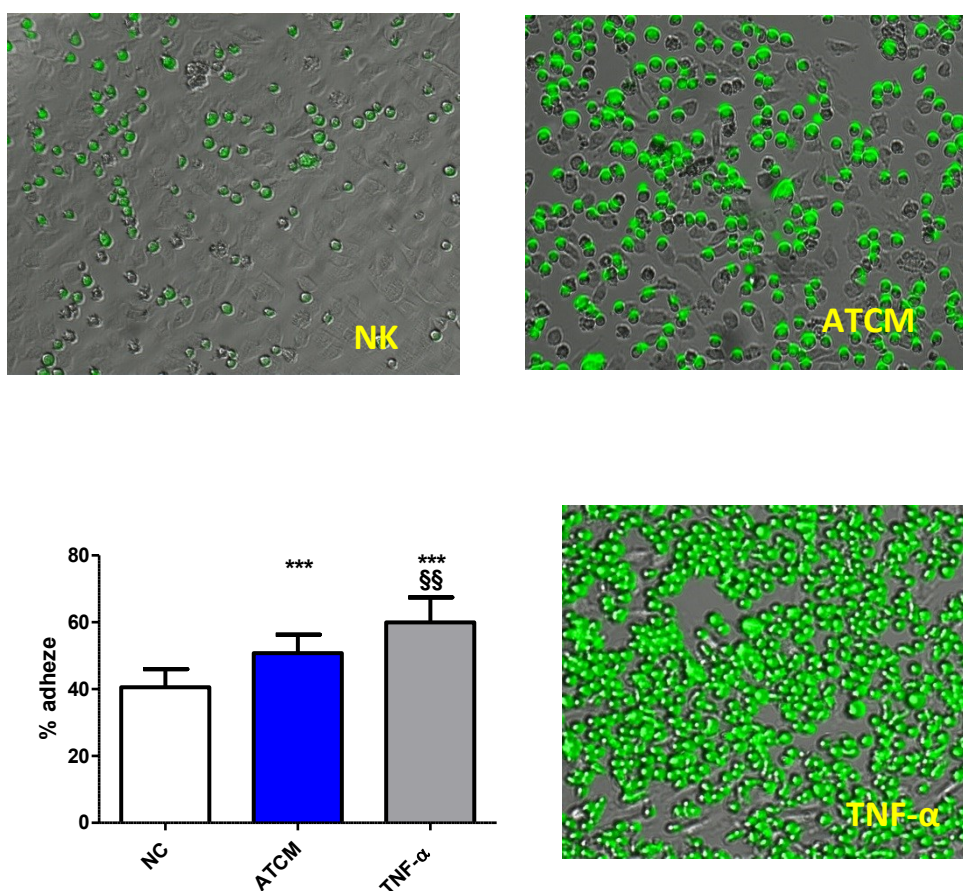
Cell Adh Migr. 2019

Průměrné parametry základních klinických a laboratorní hodnot (věk - $46,2 \pm 12,1$ let, BMI $26,1 \pm 4,20$ kg.m⁻², celkový cholesterol $5,41 \pm 1,52$ mmol/l, hsCRP $1,88 \pm 2,36$ mg/l) jsou srovnatelné u mužů i žen a jsou srovnatelné s průměrnou českou populací (srovnání s publikovanými výsledky post-MONICA (Cifkova, et al., 2010)), pouze četnost kuřáků byla v naší skupině vyšší (46,7 %), na druhou stranu v námi analyzované skupině bylo BMI mírně nižší.

Vliv ATCM na míru adheze monocytů k endotelu

První hlavní výsledek (obrázek 5):

Stimulace endoteliálních buněk pomocí ATCM významně zvýšila adhezi monocytů ve srovnání s negativní kontrolou (kultivovány jen v základním médiu). Kokultivace s ATCM zvýšila míru adheze monocytů o čtvrtinu (ATCM $50,8 \% \pm 5,6$ vs. negativní kontrola $40,6 \% \pm 5,4$, $p < 0,0001$). Pozitivní kontrola, kde byly endoteliální buňky kokultivovány s přidavkem TNF- α (10 ng/ml), dále zvýšila míru adheze monocytů ($60,0 \% \pm 7,5$, $p < 0,0001$). Jedná se však o řádově vyšší koncentrace tohoto cytokinu, než je koncentrace fyziologická.

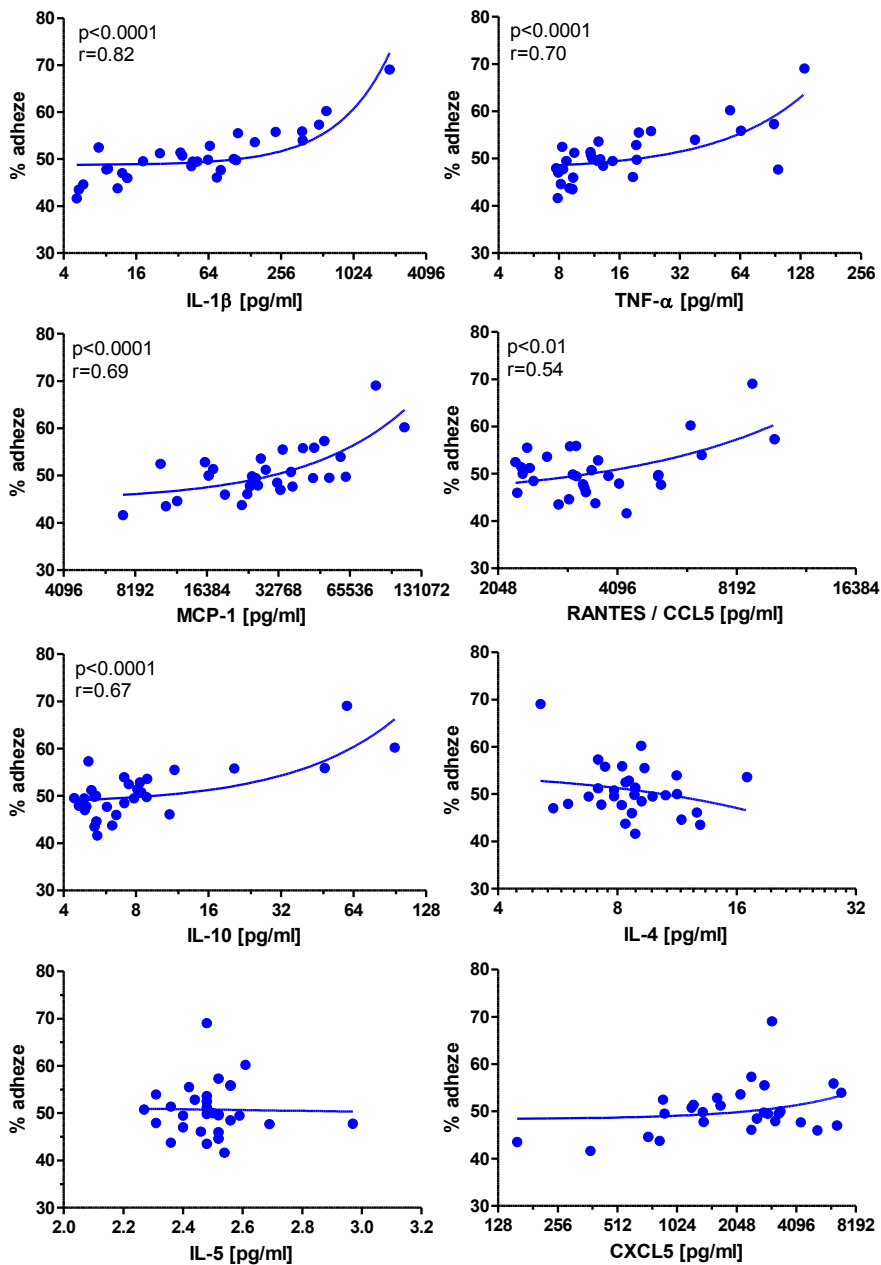


Obrázek 5: ATCM významně zvýšilo míru adheze monocytů k endotelu ve srovnání k negativní kontrole (NK) bez stimulace ATCM. TNF- α (10ng/ml) použitý jako pozitivní kontrola zvýšil adhezi monocytů k endotelu oproti NK i ATCM. Graf je doplněn o obrázky z fluorescenčního zobrazovacího systému JuLI. *** $p < 0,0001$ srovnáno k NK; §§ $p < 0,001$ srovnáno k ATCM.

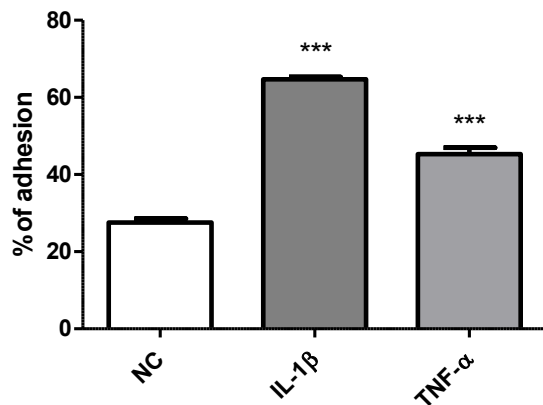
Druhý hlavní výsledek (obrázek 6):

S rostoucí koncentrací IL-1 β ($p < 0,0001$, $r = 0,82$), TNF- α ($p < 0,0001$, $r = 0,70$), MCP-1 ($p < 0,0001$, $r = 0,69$) a RANTES (CCL2, $p < 0,01$, $r = 0,54$) v ATCM signifikantně vzrůstala i míra adheze monocytů k endotelu. Tyto výsledky jsou v soulase se známými vlastnostmi těchto prozánětlivých cytokinů. Nejužší vztah mezi mírou adheze monocytů k endotelu a koncentrací cytokinů vykazovaly IL-1 β a TNF- α . Žádný vztah mezi mírou adheze a koncentrací IL-4, IL-5 a CXCL5 nebyl nalezen. Nicméně překvapivě míra adheze proporcčně rostla i s koncentrací IL-10 ($p < 0,0001$, $r = 0,67$), cytokinu obecně řazeného mezi protizánětlivé.

Pro kontrolu, zda takto nízké koncentrace mohou vést ke zvýšení míry adheze monocytů k endotelu, byl proveden kontrolní separátní pokus, kde byly endoteliální buňky stimulovány koncentrací IL-1 β (200 pg/ml) a TNF- α (30 pg/ml) měřenou v ATCM. I takto nízké koncentrace vedly k velmi významnému zvýšení adheze monocytů k endotelu (obrázek 7).



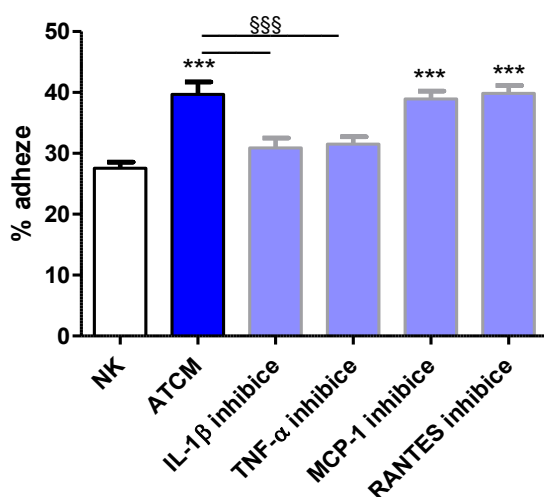
Obrázek 6: Korelace míry adheze a koncentrace jednotlivých cytokinů měřených v ATCM. Osa x je znázorněna v log₂ škále.



Obrázek 7: Stimulace endoteliálních buněk IL-1 β a TNF- α v průměrných koncentracích měřených v ATCM. IL-1 β (200 pg/ml) a TNF- α (30 pg/ml). * p<0,001.**

Vliv selektivní inhibice cytokinů

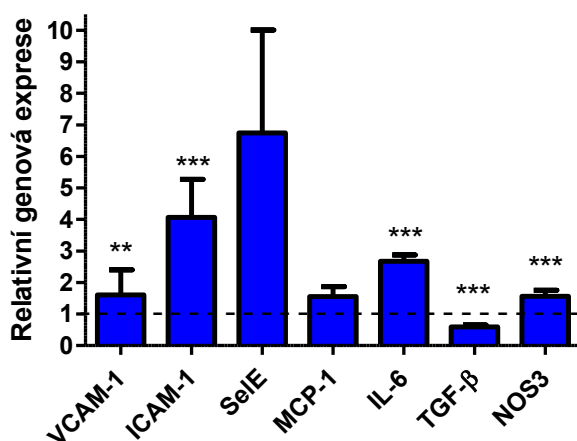
Pro kontrolu skutečného efektu jednotlivých cytokinů, jsme v samostatném experimentu využili selektivní inhibice těch cytokinů, které významně ovlivnily míru adheze monocytů k endotelu. Výsledky znázorňuje obrázek 8. Inhibice IL-1 β a TNF- α významně snížila adhezi monocytů k endotelu oproti stimulaci ATCM. Inhibice MCP-1 a RANTES nevedla k významné změně adheze monocytů k ovlivněným endoteliálním buňkám.



Obrázek 8: Vliv selektivní inhibice cytokinů během stimulaci endoteliálních buněk. * p<0,001 vztaženo k NK, §§§ p<0,001 vztaženo k ATCM stimulaci.**

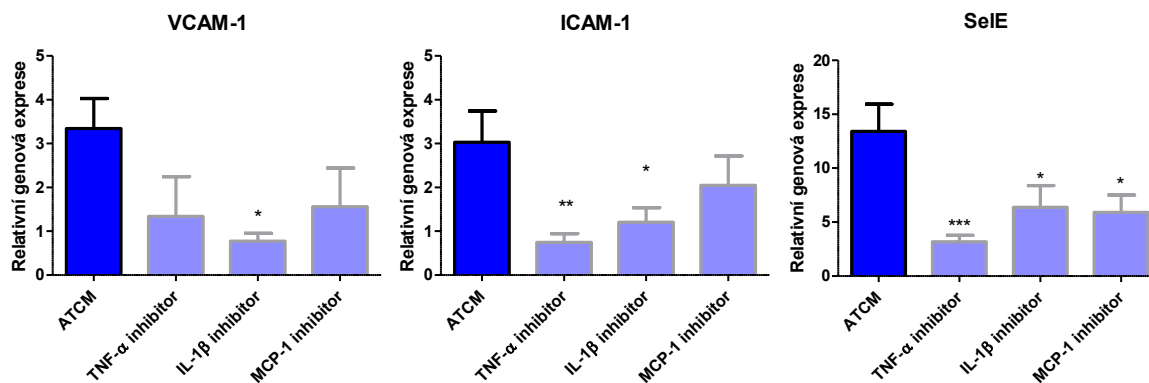
Genová exprese v endoteliálních buňkách ovlivněných ATCM a SVFCM

Kromě analýzy vlivu směsi produktů VAT prostřednictvím ATCM na míru adheze monocytů k endotelu, byla v paralelně běžícím pokusu analyzována genová exprese v ovlivněných endoteliálních buňkách. Inkubace s ATCM signifikantně zvýšila genovou expresi adhezních molekul VCAM-1 (1,60-násobně, $p < 0,01$) a ICAM-1 (4,07-násobně, $p < 0,01$) oproti negativní kontrole (obrázek 9). Navíc kokultivace s ATCM zvýšila expresi IL-6 (2,64-násobně, $p < 0,001$) zároveň snížila expresi TGF- β (0,59-násobně, $p < 0,001$) ve srovnání s kontrolním médiem. Genová exprese MCP-1 a SelE nebyla signifikantně ovlivněna ($p = 0,090$ respektive $p = 0,088$). Ze všech sledovaných molekul pouze genová exprese SelE pozitivně korelovala s mírou adheze monocytů k endotelu ($p < 0,0001$, $r = 0,73$).



Obrázek 9: Vliv ATCM na relativní genovou expresi v endoteliálních buňkách. Hodnoty jsou vztažené k negativní kontrole bez stimulace. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

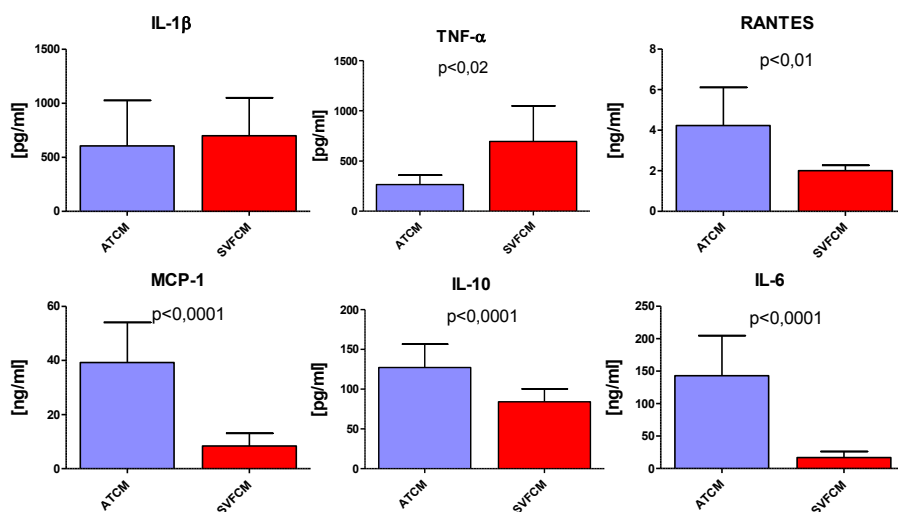
Zvýšená genová exprese adhezních molekul VCAM-1, ICAM-1 a SelE v důsledku stimulace ATCM byla částečně snížena selektivní inhibicí IL-1 β , TNF- α a MCP-1 (obrázek 10). K největšímu snížení exprese došlo v případě SelE, jehož genová exprese byla snížena působením inhibitorů proti IL-1 β , TNF- α i MCP-1. K největšímu poklesu došlo v důsledku inhibice TNF- α ($3,17 \pm 0,71$ vs. $13,4 \pm 2,52$, $p < 0,001$). Inhibice TNF- α významně snížila i expresi ICAM-1 ($1,34 \pm 0,91$ vs. $3,34 \pm 0,68$, $p < 0,01$) a sice méně, ale přesto významně snížila expresi ICAM-1 i inhibice MCP-1 ($1,21 \pm 0,33$ vs. $3,03 \pm 0,71$, $p < 0,05$). Genová exprese VCAM-1 byla signifikantně snížena pouze v případě inhibice IL-1 β ($0,77 \pm 0,18$ vs. $3,34 \pm 0,68$, $p < 0,05$).



Obrázek 10: Relativní genová exprese adhezních molekul stimulované ATCM a ATCM s přidáním selektivních inhibitorů. Inhibice vybranými selektivními inhibitory snížila genovou expresi adhezních molekul - VCAM-1, ICAM-1 a SelE. Hodnoty jsou vztažené k negativní kontrole (nestimulované buňky). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

Srovnání ATCM a SVFCM

Pro přiblížení zdroje cytokinů jsme v paralelním soboru párových vzorků ATCM a SVFCM ($n = 8$) porovnali koncentrace jednotlivých cytokinů (obrázek 11). Absence rozdílu mezi koncentrací IL-1 β a vyšší průměrná koncentrace TNF- α měřená v SVFCM ve srovnání s ATCM značí, že zdrojem těchto cytokinů jsou primárně zdrojem buňky SVF a ne adipocyty, které jsou v rámci izolace SVF odmyty. Vyšší koncentrace TNF- α ve SVFCM oproti ATCM může být způsobena zhoršenou difuzí z celé tukové tkáně oproti jednotlivým buňkám v případě SVF. Zatímco významně vyšší koncentrace IL-10, IL-6, MCP-1 a RANTES v ATCM než v SVFCM naznačují, že zdrojem jsou primárně adipocyty.



Obrázek 11 Porovnání koncentrací cytokinů měřených v sadě párových vzorků ATCM a SVFCM.

Porovnání extrémních kvartil míry adheze

V další analýze jsme srovnávali extrémní kvartily míry adheze (tabulka 3 Tabulka 3). Největší rozdíly při srovnání genové exprese extrémních kvartil vykazoval gen VCAM-1 ($4,36 \pm 3,1$ vs. $1,01 \pm 0,8$, $p=0,011$). Obdobný trend vykazovala genová exprese MCP-1 ($3,19 \pm 2,6$ vs. $0,80 \pm 0,04$, $p=0,022$). Genová exprese TGF- β při srovnání extrémních kvartil ($0,40 \pm 0,9$, $0,60 \pm 0,2$) vykazovala hraniční hodnoty signifikance ($p=0,063$). Ačkoli byla nalezena významné zvýšení exprese ICAM-1 a IL-6 v důsledku stimulace ATCM, v případě porovnání extrémních kvartil nebyl nalezen žádný rozdíl.

	horní kvartil	dolní kvartil	P hodnota
VCAM-1	$4,36 \pm 3,1$	$1,01 \pm 0,8$	0,011
SeIE	$19,45 \pm 29,5$	$0,33 \pm 0,2$	0,088
ICAM-1	$7,89 \pm 10,7$	$1,37 \pm 0,83$	0,107
TGF- β	$0,60 \pm 0,2$	$0,40 \pm 0,2$	0,063
IL-6	$2,00 \pm 1,1$	$2,84 \pm 1,0$	0,130
MCP-1	$3,19 \pm 2,6$	$0,80 \pm 0,04$	0,022
NOS3	$1,22 \pm 0,3$	$1,34 \pm 0,6$	0,619

Tabulka 3: Srovnání genové exprese míry adheze extrémních kvartil míry adheze monocytů k endotelu.

Vztah mezi rizikovými faktory kardiovaskulárních chorob a produkce cytokinů tukovou tkání

Vztah mezi kardiovaskulárními chorobami, jako je pohlaví, věk, BMI, kouření a koncentrace hsCRP, a hladinou jednotlivých sledovaných cytokinů v ATCM nebyl nalezen. Není tedy překvapení, že tento vztah nebyl nalezen ani k míře adheze monocytů k endotelu. Pouze v případě srovnání BMI v rámci extrémních kvartil míry adheze byly rozdíly na hranici významnosti ($25,8 \pm 2,96$ kg.m⁻² vs. $28,9 \pm 2,97$ kg.m⁻², $p=0,064$). Toto srovnání může být ovlivněno relativně nízkým počtem sledovaných jedinců v jednotlivých skupinách.

Závěr

Cytokiny uvolněné lidskou VAT zvyšují adhezi monocytů k endotelu a vedou k prozánětlivým změnám genové exprese v ovlivněných buňkách endotelu. Navíc jsme prokázali, že v tomto procesu ze sledovaných cytokinů se nejvýznamněji uplatňují IL-1 β a TNF- α na zvýšení míry adheze monocytů k endotelu.

4.3. Vztah mezi non-HDL cholesterolem a fenotypy makrofágů v lidské tukové tkáni

The relationship between non-HDL cholesterol and macrophage phenotypes in human adipose tissue.

Poledne R, Kralova Lesna I, Kralova A, Fronck J, Cejkova S.

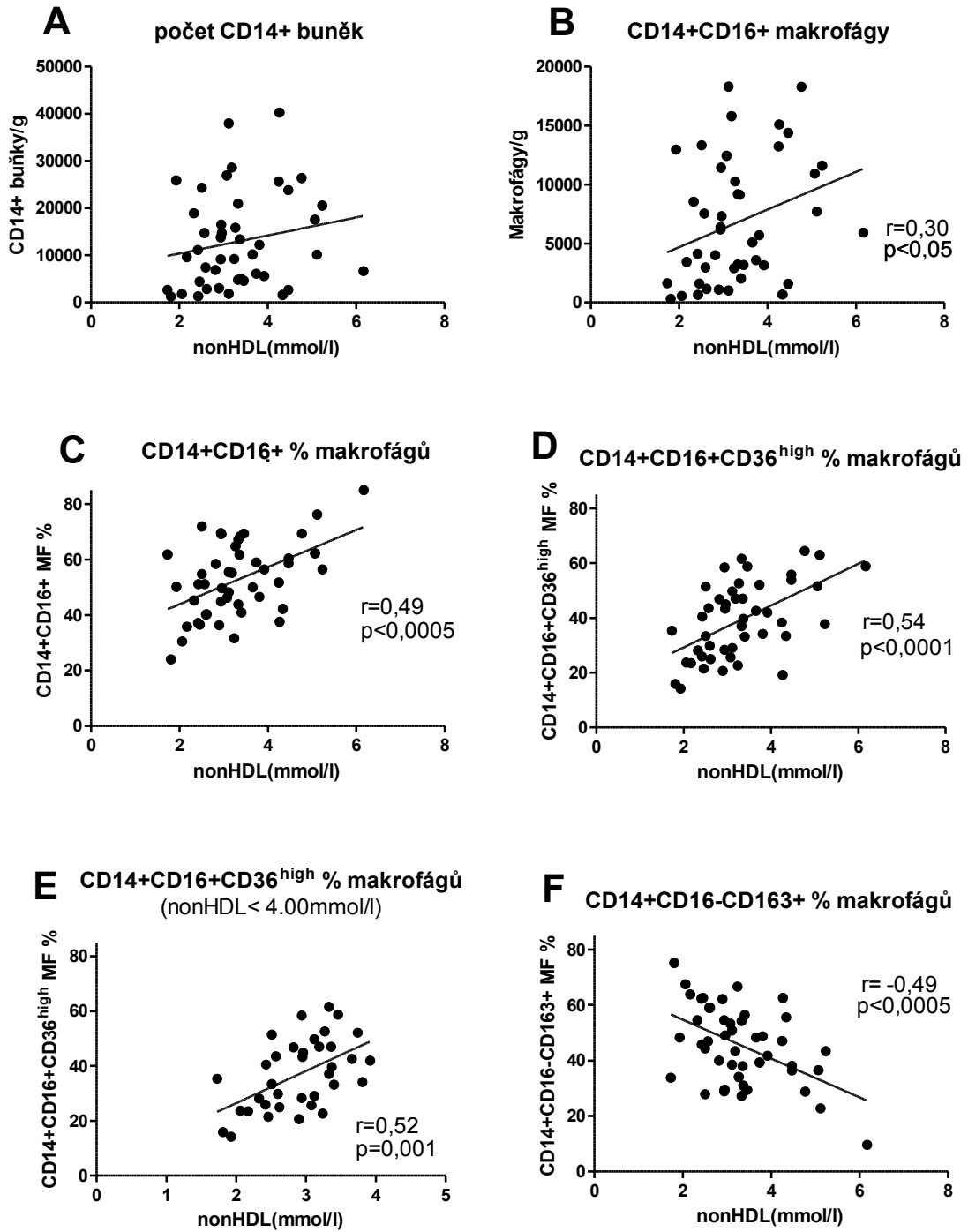
J Lipid Res. 2016 Oct;57(10):1899-1905. Epub 2016 Aug 1.

Analyzovaná skupina LKD čítala 47 subjektů (věk $46,1 \pm 10,6$ let) s průměrným BMI $25,75 \pm 3,58$ kg.m⁻². Koncentrace celkového cholesterolu byla $4,40 \pm 0,95$ mmol/l a nonHDL cholesterolu $3,24 \pm 0,92$ mmol/l. Prevalence hypercholesterolemie (nad 5 mM) a vysoké koncentrace non-HDL cholesterolu byly minoritní - pět subjektů mělo dyslipoproteinémií, pět bylo léčeno statiny a dva užívali antihypertenzními léky.

S rostoucí koncentrací nonHDL cholesterolu rostlo množství prozánětlivě polarizovaných makrofágů makrofágů (CD14+CD16+) infiltrovaných ve VAT i v SAT (obrázek 12A-B a 13A-B). Úzký vztah s rostoucí koncentrací non-HDL cholesterolu vykazovalo zastoupení prozánětlivě polarizovaných makrofágů (CD14+16+) ve VAT. V případě rozšíření fenotypu o znak CD36, tedy analýzu populace prozánětlivých fagocytujících makrofágů (CD14+16+36^{high}), došlo ke zúžení vztahu a zvýšení signifikance mezi rostoucí koncentrací nonHDL a proporcí takto polarizovaných makrofágů ve VAT. V případě SAT tyto vztahy byly méně významné, ale dosahovaly hranice signifikance (obrázek 12C-D a 13C-D). V případě plně diferencovaných prozánětlivých makrofágů (CD14+CD16+CD36^{high}) signifikance nemizí ani při vyčlenění hodnot non-HDL cholesterolu nad 4 mmol/l (obrázek 12E a 13E) a uplatňuje se tedy i v rozmezí fyziologických koncentrací nonHDL cholesterolu.

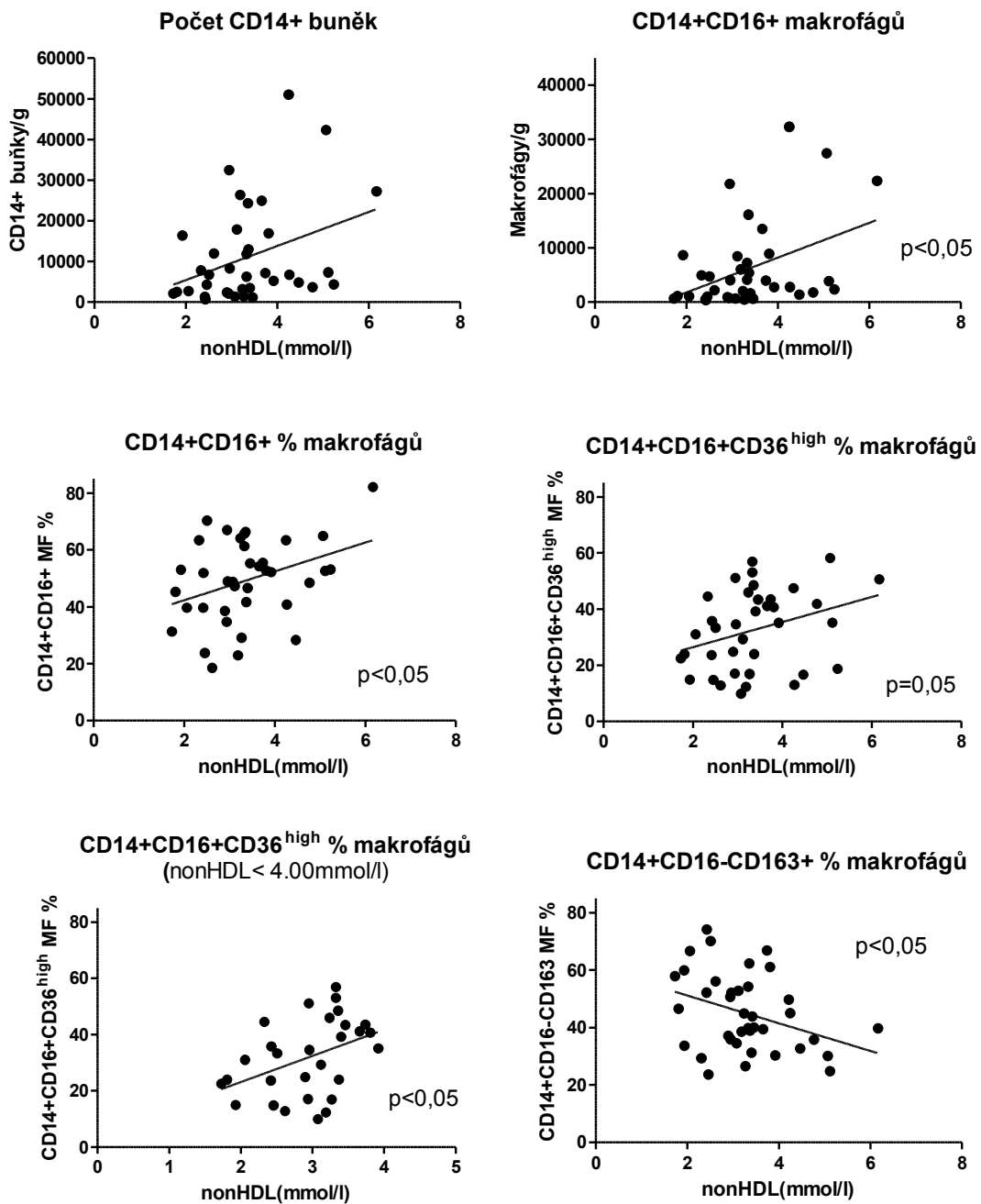
Naopak anti-inflamační fenotyp makrofágů (CD14+16-163+) vykazoval zcela opačný trend v obou typech tukové tkáně (obrázek 12F a 13F). V případě VAT byl tento vztah opět významnější, než v případě SAT.

Viscerální tuková tkáň



Obrázek 12 Vztahy mezi jednotlivými subpopulacemi makrofágů VAT a koncentrací non-HDL cholesterolu.

Subkutánní tuková tkáň



Obrázek 13 Vztahy mezi jednotlivými subpopulacemi makrofágů SAT a koncentrací non-HDL cholesterolu.

Závěr

Výsledky prokazují překvapivý vztah mezi hladinou non-HDL cholesterolu a polarizací makrofágů prozánětlivým směrem ve VAT a SAT s dominancí ve VAT u zdravých jedinců, LKD.

4.4. Prediktory kardiovaskulárních chorob a polarizace makrofágů v lidské tukové tkáni

Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macrophage polarization: Is there a link?

Ivana Králová Lesná, Marek Petráš, Soňa Čejková, Anna Králová, Jiří Froněk, Libor Janoušek, Filip Thieme, Tomas Tyll, Rudolf Poledne

Eur J Prev Cardiol. 2018

Celkem bylo analyzováno 79 vzorků VAT (52 od LKD a 27 od pacientů s angiograficky prokázanou chorobou periferních arterií (PAD)), a 70 vzorků SAT (devět osob nesouhlasilo s odběrem této tkáně). Antropometrické a biochemické vlastnosti subjektů viz tabulka 4. Proporce makrofágů v tukové tkáni je vyjádřena v procentech z celkového počtu makrofágů (tabulka 5).

	LKD (n = 52)	PAD (n = 27)
Pohlaví	19/33	17/10*
Věk (roky)	46,0 ± 10,6	64,9 ± 8,5***
BMI (kg.m ⁻²)	25,9 ± 3,6	26,7 ± 4,4
Kuřáci, n (%)	18 (34,6 %)	23 (85,2 %)**
Hypertenze, n (%)	10 (19,2 %)	19 (70,4 %)**
Léčba statiny, n (%)	5 (9,6 %)	19 (70,4 %)**
Celkový cholesterol (mmol/l)	4,35 ± 0,88	3,91 ± 0,93*
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,53 ± 0,78	2,29 ± 0,72
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,19 ± 0,36	0,88 ± 2,67***
hsCRP (mg/l)	1,57 ± 2,46	4,60 ± 9,32**

Tabulka 4 Antropometrické a biochemické parametry subjektů. Hodnoty jsou uvedené jako průměr ± SD, nebo jako incidence. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Statistická analýza

Subjektům bylo přiřazeno skóre na základě přítomnosti (1) a nepřítomnosti (0) rizikového parametru kardiovaskulárních chorob (CVD). Hrubé rozdíly proporcí jednotlivých podskupin makrofágů byly odhadnuty s 95% intervaly spolehlivosti založenými na normální distribuci. Rozdíly vzájemně adjustované pro všechny uvažované prediktory byly vypočteny univariantní nebo multivariantní lineární regresi za použití Bayesovského přístupu s pomocí algoritmu Metropolis – Hastings, který umožňuje pracovat s malým souborem dat stejně jako s velkým. Byla použita přísná kritéria, ve kterých byly rozdíly vyjádřeny jako průměr a byl použit 99% posteriorní interval pravděpodobnosti. Asociace proporce makrofágových subtypů s odpovídajícími prediktory CVD byly hodnoceny s 99% Bayesovským intervalem spolehlivosti vzájemně adjustovaného rozdílu mezi subjekty s přítomným a chybějícím prediktorem. Pokud Bayesovské intervaly spolehlivosti neobsahovaly 0, vzájemně adjustovaný rozdíl byl považován za relevantní a proporce makrofágu byla hodnocena jako ovlivněná příslušným prediktorem.

Proporce subtypů makrofágů v nízkorizikové skupině, v tzv. nulové populaci (nepřítomnost žádného rizikového znaku - populace žen nekuřačky, <50 let, BMI <30 kg.m⁻², bez hypercholesterolemie a hypertenze, tabulka 5) byla odvozena z matematického modelu, jehož přijatelnost byla ověřena na malém souboru subjektů splňujících kritéria pro nulovou populaci.

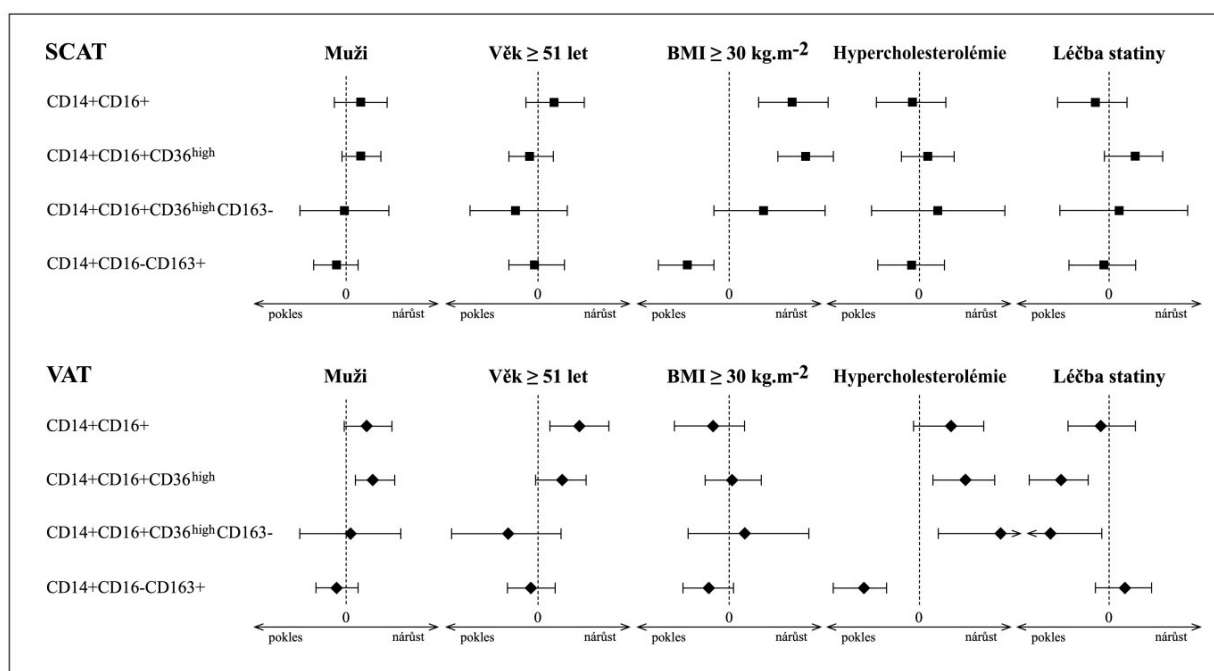
% makrofágů v tukové tkáni	SAT		VAT	
	Analyzovaná populace (±SD)	Nulová populace (%)	Analyzovaná populace (±SD)	Nulová populace (%)
CD14+CD16+	51,8 ± 14,6	37,8 ± 1,7	55,5 ± 13,0	43,8 ± 1,6
CD14+CD16+CD36 ^{high}	36,1 ± 15,3	23,6 ± 1,23	39,9 ± 13,4	29,4 ± 1,3
CD14+CD16+ CD36 ^{high} CD163+	22,0 ± 11,5	16,4 ± 3,1	16,9 ± 8,9	13,4 ± 2,2
CD14+CD16+ CD36 ^{high} CD163-	15,0 ± 10,5	13,5 ± 2,8	24,0 ± 13,7	22,2 ± 3,3
CD14+CD16+CD36 ^{low} CD163+	13,6 ± 7,8	9,0 ± 0,8	13,7 ± 8,5	7,3 ± 0,7
CD14+CD16-CD163+	46,7 ± 15,1	51,7 ± 1,8	42,9 ± 13,0	46,5 ± 1,6

Tabulka 5 Procentuální zastoupení jednotlivých populací makrofágů v SAT a VAT a jejich průměrné hodnoty pro nulovou populaci.

Obrázek 14 znázorňuje vztah individuálních rizikových faktorů a jednotlivých populací makrofágů v SAT a VAT. Obezita ($BMI > 30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$) v tomto modelu vedla k nárůstu zastoupení prozánětlivě polarizovaných ($CD14+CD16+$) a fagocytických prozánětlivých ($CD14+CD16+CD36^{\text{high}}$) makrofágů pouze v případě SAT. A zároveň signifikantně sníženému zastoupení protizánětlivých makrofágů ($CD14+CD16-CD163+$).

V případě VAT překvapivě nedošlo k významnému ovlivnění proporcí polarizovaných populací makrofágů v závislosti na obezitě. Ve skupině mužů bylo hraničně významně vyšší zastoupení prozánětlivých makrofágů ($CD14+CD16+$), ale při upřesnění pomocí znaku CD36 došlo k významnému zvýšení zastoupení prozánětlivých fagocytujících makrofágů ($CD14+CD16+CD36^{\text{high}}$) ve srovnání s nulovou populací. Starší populace vykazovala také významně zvýšené zastoupení prozánětlivých polarizovaných makrofágů.

V souladu s předchozími výsledky i v této komplexní analýze zahrnující i soubor jedinců s angiograficky potvrzenou PAD byl potvrzen úzký vztah mezi zastoupením polarizovaných makrofágů a hypercholesterolémií (definovaná jako naměřená koncentrace cholesterolu $>5 \text{ mmol/l}$ nebo statinová léčba hypercholesterolémie). Přítomnost hypercholesterolémie i v tomto rozšířeném modelu významně zvýšila zastoupení prozánětlivých makrofágů (obrázek 14). Současně hypercholesterolémie snížila zastoupení protizánětlivého fenotypu makrofágů ($CD14+CD16-CD163+$) naopak významně snížila ve srovnání s nulovou populací. Zajímavé je také, že léčba statiny naopak významně snížila proporce prozánětlivých makrofágů ve srovnání s nulovou populací. Tyto vztahy však byly potvrzeny pouze u VAT.



Obrázek 14 Vztah rizikových faktorů ve vztahu k nejvíce zastoupeným fenotypům makrofágů v tukové tkáni.

Závěr

Výsledky potvrdily vliv kardiovaskulárních rizikových faktorů na proporce prozánětlivých makrofágů v lidské tukové tkáni. Zatímco pohlaví, věk a hypercholesterolemie zvýšily proporce prozánětlivě polarizovaných makrofágů, léčba statiny měla opačný vliv ve VAT. Obezita zvýšila proporce prozánětlivých makrofágů pouze v SAT.

5. Diskuze

Makrofágy se vyznačují vysokou variabilitou v závislosti na lokálním polarizujícím mikroprostředí. Na základě literárních údajů jsme vybrali základní povrchový znak CD14, jako obecný marker pro monocyty/makrofágy. CD14 je však exprimován i na povrchu dendritických buněk, proto byla pro všechny námi sledované fenotypy makrofágů nezbytná i koexprese dalšího CD znaku (čímž se omezila možnost zahrnutí dendritických buněk do analýzy). Dalším sledovaným znakem byl CD16, který v kombinaci s CD14 je exprimovaný u prozánětlivým směrem polarizovaných makrofágů v tkáních (CD14+CD16+) (Coen et al., 2010). Pro analýzu jsme tedy využili sledování znaků, které již byly použity k definici fenotypu monocytů v krevním řečišti (CD14+16-, CD14+16+ a CD14^{low}16++) (Ajami, et al., 2018; Thaler, et al., 2016). Definici fenotypů makrofágů v tukové tkáni, prozánětlivých makrofágů CD14+CD16+ a naopak protizánětlivých CD14+CD16-, jsme použili již v naší starší práci (Kralova Lesna, et al., 2015). V další publikaci jsme upřesnili charakterizaci fenotypů s použitím dalších povrchových markerů – CD36 a CD163. Ukázali jsme, že prozánětlivé makrofágy, CD14+CD16+, zahrnují i významnou populaci s vysokou expresí CD36 (CD14+CD16+CD36^{high}) (Kralova Lesna, et al., 2016). Exprese tohoto markeru na prozánětlivých makrofázích je s největší pravděpodobností způsobena jeho vlastní funkcí transportéru lipidů včetně oxLDL, a navíc se uplatňuje i v procesu fagocytózy (L. Cai, et al., 2012; Nozaki, et al., 1995). Další sledovaný marker CD163 byl ve zvýšené míře exprimován na povrchu CD14+CD16- makrofágů (CD14+CD16-CD163+). CD14+16+ a CD14+CD16+CD36^{high} jsme tedy definovali jako prozánětlivé makrofágy, na druhou stranu CD14+CD16- a CD14+CD16-CD163+ jako protizánětlivé makrofágy v tukové tkáni. Nepřímým důkazem naší vhodné definice populací makrofágů je, že u subpopulací s takto definovaným prozánětlivým fenotypem byl potvrzen vztah k hlavním rizikovým faktorům kardiovaskulárních chorob.

S rostoucí koncentrací nonHDL cholesterolu rostlo zastoupení prozánětlivých fenotypů makrofágů ve VAT u LKD. Významnost této korelace dále rostla s postupným upřesněním fenotypu (CD14+CD16+CD36^{high}) a byla významná i při vyloučení jedinců s hypercholesterolémií. Vztah koncentrace nonHDL cholesterolu k proporci prozánětlivých makrofágů v SAT měl podobný charakter jako u VAT, ale významnost korelací byla pouze hraniční. Lze tedy předpokládat, že VAT je senzitivnější ke zvyšujícím se koncentracím nonHDL cholesterolu, než SAT. Zrcadlově opačný vztah jsme zjistili u proporce protizánětlivých makrofágů (CD14+CD16-CD163+) ke koncentraci nonHDL cholesterolu v obou sledovaných tukových tkáních. Peled a Fisher předpokládají, že v důsledku vyšších koncentrací nonHDL (hlavně tedy VLDL a LDL) dochází ke zvýšení infiltrace prozánětlivými makrofágy do arteriální stěny a jejich následné polarizaci prozánětlivým směrem (Peled & Fisher, 2014). Tento efekt autoři vysvětlují třemi hlavními mechanismy (1) v důsledku vysoké hladiny

cholesterolu se hromadí intracelulární krystalky cholesterolu v monocytech/makrofázích, což stimuluje uvolňování prozánětlivého IL-1 β (Rajamaki et al., 2010); (2) *in vitro* oxLDL aktivuje povrchové TLR makrofágů a aktivuje prozánětlivé signalizační kaskády (CD14–TLR4–MD2 nebo CD36–TLR4–TLR6), které v důsledku vedou k aktivaci k NF- κ B; (3) zvýšené koncentrace cytoplasmatického cholesterolu mohou učinit buňky citlivější na ligandy, a tím zvýšit zánětlivé reakce.

V další práci jsme soubor dat od zdravých LKD, doplnili o obdobný soubor dat pacientů s PAD a spojený soubor analyzovali Bayesovskou analýzou. Tato analýza umožňuje pracovat i s relativně omezeným množstvím dat jako se soubory podstatně rozsáhlejšími. Literární údaje naznačují, že vznik dalších fenotypů souvisí s metabolismem tukové tkáně, především lokální koncentrace volných mastných kyselin a dále vnějších vlivů intravazální koncentrace glukózy a inzulínu (Kratz et al., 2014). Do kompletní Bayesovské analýzy jsme tedy navíc zařadili další podskupiny fenotypů makrofágů (CD14+CD16+CD36^{high}CD163+, CD14+CD16+CD36^{high}CD163-).

Bayesovskou analýzou spojeného souboru zdravých osob a pacientů s PAD jsme potvrdili vztah populací polarizovaných makrofágů k jednotlivým rizikovým faktorům u VAT a SAT (pohlaví, věk, BMI ≥ 30 kg.m⁻², hypercholesterolémií a léčba statiny). U obézních jedinců byla v SAT významně vyšší proporce prozánětlivých makrofágů (CD14+CD16+ i CD14+CD16+CD36^{high}). Ve VAT se tento vliv neprojevil. Tento nálezn je překvapivý, protože VAT je považována za tukovou tkáň více asociovanou s prozánětlivým stavem a chorobami souvisejícími s obezitou (Gruzdeva et al., 2018). I když je tento náš nálezn v kontradikci s převažujícím názorem v literatuře, naše nálezny jsou v souladu s publikovanými výsledky, také prokazujících užší vztah mezi obezitou a prozánětlivými změnami v SAT než ve VAT (Spoto et al., 2014). Fakt, že polarizace makrofágů v tukové tkáni je ovlivněna i jinými faktory než množstvím tukové tkáně popsali i další autoři (Klimcakova et al., 2011).

Bayesovská analýza spojeného souboru potvrdila i náš původní nálezn korelace proporce makrofágů v tukové tkáni s koncentrací nonHDL cholesterolu ve VAT u LKD. Na tomto rozšířeném souboru ukázala, že přítomnost hypercholesterolémie zvýšila polarizaci prozánětlivým směrem ve VAT (CD14+CD16+CD36^{high}). Dále prokázala, že hypercholesterolémie vedla ke zvýšení proporce dalšího fenotypu (CD14+CD16+CD36^{high}CD163-) a významnému poklesu protizánětlivých makrofágů (CD14+CD16-CD163+) ve VAT.

Velmi překvapivým nálezem Bayesovské analýzy je signifikantní snížení proporce prozánětlivých makrofágů ve VAT u jedinců léčených statiny. Tento náš nálezn je zcela původní a je v souladu s tím, že již několik studií prokázalo, že terapie statiny nevede jen ke snížení cholesterolu, ale ovlivňuje i záněť obecně (Kwon et al., 2017; Nissen et al., 2005; S. J. Park et al., 2016; Ridker et al., 2018). Naše studie

naznačuje, že protizánětlivý efekt léčby statiny je s velkou pravděpodobností způsoben i ovlivněním polarizace makrofágů v tukové tkáni.

Z dalších rizikových faktorů Bayesovská analýza prokázala vliv mužského pohlaví a věku, zvyšující proporcii prozánětlivých makrofágů ve VAT. V SAT se tyto vlivy neprojeví. Lze se domnívat, že v případě věku tento vztah může být do jisté míry ovlivněn jednak zastoupením postmenopauzálních žen, kdy v menopauze obecně dochází k rozvoji prozánětlivých změn (Kralova, et al., 2015; Poledne et al., 2009) a obecně starší populací pacientů s PAD, jejichž tuková tkáň vykazuje obecně více prozánětlivý charakter ve srovnání se skupinou LKD (Cejkova et al., 2017). Zároveň tyto výsledky potvrzují správnost našich definic fenotypů makrofágů.

K analýze mechanismu vlivu tukové tkáně na celkový prozánětlivý stav jsme analyzovali genovou expresi prozánětlivých cytokinů ve vzorcích obou porovnávaných skupin. Zjistili jsme vyšší exprese prozánětlivých cytokinů, TNF- α , MCP-1 i IL-6 ve VAT pacientů s PAD ve srovnání zdravou populací, což je v souladu s plasmatickými významně vyššími koncentracemi hsCRP a prozánětlivého cytokinu TNF- α u PAD než LKD. V porovnání s VAT byly rozdíly v genové expresi PVAT méně významné a signifikantní pouze u exprese TNF- α . Tento náš nález velmi dobře odpovídá výsledkům Cheng (Cheng et al., 2008), prokazující vyšší exprese IL-6 a TNF- α v PVAT pacientů s koronární chorobou ve srovnání se zdravými kontrolními subjekty. Tyto nálezy podporují význam tukové tkáně, zejména VAT v rozvoji chronického zánětu, který přispívá k rozvoji aterosklerózy. V SAT nebyly nalezeny rozdíly v genové expresi mezi oběma skupinami. V analýze genové exprese spojeného souboru LKD a PAD jsme nenašli významné vztahy k expresi prozánětlivých cytokinů u žádné z analyzovaných tukových tkání v závislosti na rizikových faktorech kardiovaskulárních chorob (věk, kouření, hypertenze, míra postižení periferních tepen pacientů s PAD).

V návaznosti na prokázané vztahy mezi proporcí prozánětlivých makrofágů a rizikovými faktory aterosklerózy ve sledovaných souborech byl v další práci analyzován vliv produktů tukové tkáně na extravazaci monocytů z krevního oběhu prostřednictvím změn v adhezivitě monocytů k ovlivněným buňkám endotelu *in vitro*. V těchto experimentech jsme použili kondicionovaná média (ATCM) získaná inkubací VAT odebraných od LKD v kultivačním médiu. Takto získanými kondicionovanými médii jsme testovali možný vliv na adhezi monocytů k endotelu v *in vitro* modelu. Nejdříve jsme prokázali, že kondicionovaná média z tukové tkáně významně zvyšují míru adheze monocytů k endotelu. Při analýze vlivu jednotlivých cytokinů měřených v kondicionovaných médiích na míru adheze jsme zjistili, že prokazatelně stimulační vliv mají IL-1 β , TNF- α , MCP-1, RANTES a IL-10. Tyto cytokiny (s výjimkou IL-10) prokazatelně prozánětlivé a přispívají k rozvoji kardiovaskulárních chorob a metabolických chorob (Braunersreuther et al., 2008; Caer et al., 2017; Hajer et al., 2008). Vliv

vzrůstajících koncentrací IL-4, IL-5 a CXCL5 se neprokázal. Protože v našich experimentech s ATCM se jednalo o řádově nižší koncentrace ve srovnání s koncentracemi používanými při *in vitro* pokusech (Cecrdlova et al., 2016; Raices et al., 2008), potvrdili jsme v separátních pokusech jejich vliv přidáním IL-1 β a TNF- α v průměrných naměřených hodnotách v ATCM. I takto nízké koncentrace cytokinů velmi významně zvýšily míru adheze monocytů k endotelu, což potvrzuje použitelnost ATCM v analýze adhezibility *in vitro* a genové exprese v endoteliálních buňkách. Vedle potencujícího vlivu těchto prozánětlivých cytokinů vykazoval signifikantní pozitivní korelaci s mírou adheze monocytů k endotelu překvapivě i IL-10 (obecně považovaný za protizánětlivý cytokin (Verma et al., 2016)). Tento překvapivý nálezn je v soulase s výsledky Gimena, který také prokázal jeho prozánětlivý vliv na endotel (Gimeno et al., 2003). Tento nálezn mohl být způsoben synergií IL-10 s jinou složkou ATCM. Když jsme testovali účinek IL-10 přidaného do kultivačního média odděleně na adhezi monocytů stejným modelem, došlo k mírnému nesignifikantnímu zvýšení míry adheze, ale nepochybně nevedla ke snížení míry adheze, v rozporu se starší prací, kde používali srovnatelné koncentrace IL-10 (Mtairag, et al., 2001).

Vedle analýzy vlivu směsi produktů VAT prostřednictvím ATCM na míru adheze monocytů k endotelu, byla v paralelně běžícím pokusu analyzovaná genová exprese v endoteliálních buňkách. Působení ATCM dále vedlo k významnému zvýšení genové exprese adhezních molekul – VCAM-1 a ICAM-1, které se uplatňují právě v iniciaci adheze monocytů k endotelu, na niž navazuje jejich migrace do cévní stěny a případně dále do tkání (Galkina, et al., 2007). Pozitivní ovlivnění genové exprese Sele bylo nesignifikantní. Působení ATCM dále vedlo ke zvýšení genové exprese IL-6 a naopak signifikantnímu snížení exprese protizánětlivého TGF- β (Sanjabi et al., 2009), což potvrzuje, že tuková tkáň může svými produkty aktivovat endotel a přispívat tak k narušení jeho regulačních vlastností (Bozic et al., 2015; Hung et al., 2010; Sena et al., 2013). Zvýšená exprese IL-6 navíc může přispívat i k lokální polarizaci infiltrovaných makrofágů prozánětlivým směrem (Lockett-Chastain, et al., 2016) zejména v případě synergie s dalšími prozánětlivými cytokiny (IL-1 β a TNF- α) produkovanými makrofágy (Bing, 2015; Kitagawa et al., 2018). Naše nálezy zvýšené adhezibility a genové exprese adhezních molekul a prozánětlivých cytokinů působením ATCM potvrzují, že produkty VAT mohou přímo přispívat k rozvoji aterosklerózy prostřednictvím zvýšeného počtu monocytů/makrofágů infiltrovaných do cévní stěny stejně jako infiltraci monocytů/makrofágů do tukové tkáně.

Dále jsme testovali vliv selektivní inhibice jednotlivých cytokinů (IL-1 β , TNF- α , MCP-1, RANTES) na míru adheze monocytů k endotelu preinkubací s ATCM. Míra adheze byla snížena pouze selektivní inhibicí IL-1 β a TNF- α . Zatímco inhibice MCP-1 a RANTES významně nesnížila míru adheze monocytů k endotelu. Ačkoli MCP-1 a RANTES vykazovaly v předchozích pokusech také velmi úzké vztahy mezi jejich koncentrací a mírou adheze, jak je již zmíněno výše, hrají zřejmě podpůrnou roli, oproti IL-1 β

a TNF- α . Selektivní inhibitory přidané k ATCM navíc snížily genovou expresi adhezních molekul. Inhibitor IL-1 β v ATCM signifikantně snížil genovou expresi všech analyzovaných adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1, SelE), TNF- α inhibitor snížil signifikantně genovou expresi ICAM-1 a SelE a nejmenší vliv opět vykazovala inhibice MCP-1. Tyto výsledky opět podporují majoritní vliv IL-1 β a TNF- α .

Pro přiblížení buněčného zdroje jednotlivých cytokinů jsme paralelně analyzovali sadu párových vzorků (n=8) ATCM a SVFCM, přičemž izolací SVF dochází k odstranění plně diferencovaných plovoucích adipocytů. V tomto případě je také zapotřebí připustit, že uvolnění cytokinů tukovou tkání do ATCM je pravděpodobně do jisté míry ovlivněno difuzí, zatímco v případě SVFCM je zkreslení difuzí nepravděpodobně a jedná se spíše o cytokiny uvolněné přímo z buněk SVF. IL-10, IL-6, MCP-1 a RANTES vykazovaly vyšší koncentrace v ATCM, a lze tedy předpokládat, že jsou produkovány převážně adipocyty. Oproti tomu koncentrace IL-1 β byla naměřena v obou sadách paralelních vzorků srovnatelná a v případě TNF- α dokonce vyšší v SVFCM než v ATCM, což naznačuje, že tyto cytokiny jsou produkovány primárně buňkami SVF. V souladu s publikovanými pracemi lze uvažovat, že v rámci buněk obsažených ve SVF významnou část produkce IL-1 β a TNF- α tvoří právě makrofágy (Bing, 2015; Sims & Smith, 2010; Vicennati et al., 2002; Weisberg, et al., 2003).

Naše studie nepotvrdila vliv obecných kardiovaskulárních rizikových faktorů, jako je kouření, BMI, pohlaví, nebo hsCRP ani na produkci cytokinů pomocí VAT, ani na jejich na adhezi monocytů k endotelu. Pravděpodobně tento vliv není dostatečně silný, aby se odrazil v našem počtu analyzovaných vzorků. Ačkoli nebyl nalezen vztah mezi obezitou a koncentracemi cytokinů produkováných VAT, byly potvrzeny úzké vztahy mezi většinou měřených cytokinů a mírou adheze monocytů k endotelu. Mohlo by to být způsobeno tím, že mnoho studií potvrzujících význam obezity na prozánětlivý stav VAT, je zaměřena na morbidně obézní subjekty nebo na subjekty s určitými zdravotními komplikacemi. Námi analyzovaní LKD musí být dostatečně zdraví, aby mohli být zařazeni do transplantačního programu. Ani naše nedávná studie zaměřená na genovou expresi prozánětlivých cytokinů u srovnatelných typů subjektů však nepotvrdila vztah k obezitě nebo jiným kardiovaskulárním rizikovým faktorům (Cejkova, et al., 2017).

Vliv nízkomolekulárních látek produkováných tukovou tkání, může tedy přímo přispět k rozvoji aterosklerózy jednak zvýšením počtu monocytů ve stěně cévy, ale i zvýšením infiltrace makrofágů do tukové tkáně, a tedy zpětnou vazbou zvýšit prozánětlivý charakter tukové tkáně.

6. Závěr

Díky unikátnímu projektu transplantace ledvin od žijících dárců v pražském IKEM se nám podařilo charakterizovat polarizované fenotypy makrofágů v lidské tukové tkáni na základě míry exprese povrchových markerů měřených průtokovou cytometrií. U takto definovaných populací makrofágů jsme prokázali úzké vztahy s rizikovými faktory kardiovaskulárních chorob, jako je hypercholesterolémie, obezita, pohlaví a věk, ale i ovlivnění statinovou léčbou. Analýzou genové exprese prozánětlivých cytokinů jsme zjistili významně vyšší exprese všech sledovaných genů u skupiny PAD než LKD. Tyto výsledky nás přivedly k otázce, zda tuková tkáň může přímo svými produkty stimulovat migraci monocytů z krevního oběhu. Výsledků z *in vitro* adhezního modelu potvrdily, že látky uvolněné z lidské VAT vedou k významnému zvýšení adheze monocytů k endoteliálním buňkám, iniciálnímu kroku pro jejich další migrace z krevního oběhu.

7. Reference

- Aday, A. W., & Ridker, P. M. (2018). Antiinflammatory Therapy in Clinical Care: The CANTOS Trial and Beyond. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5. doi: ARTN 62 10.3389/fcvm.2018.00062
- Ajami, B., & Steinman, L. (2018). Nonclassical monocytes: are they the next therapeutic targets in multiple sclerosis? *Immunology and Cell Biology*, 96(2), 125-127. doi: 10.1111/imcb.12004
- Amano, S. U., Cohen, J. L., Vangala, P., Tencerova, M., Nicoloso, S. M., Yawe, J. C., . . . Aouadi, M. (2014). Local Proliferation of Macrophages Contributes to Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metabolism*, 19(1), 162-171. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.017
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., . . . Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1), 79-83. doi: DOI 10.1006/bbrc.1999.0255
- Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., . . . Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine*, 11(2), 191-198. doi: 10.1038/nm1185
- Baker, R. G., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*, 13(1), 11-22. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.008
- Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B., & Niedobitek, G. (2013). Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. *Plos One*, 8(11). doi: UNSP e80908 10.1371/journal.pone.0080908
- Basurto, L., Gregory, M. A., Hernandez, S. B., Sanchez-Huerta, L., Martinez, A. D., Manuel-Apolinar, L., . . . Sanchez-Arenas, R. (2019). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and fibroblast growth factor-21 (FGF-21) as biomarkers of subclinical atherosclerosis in women. *Experimental Gerontology*, 124. doi: UNSP 110624 10.1016/j.exger.2019.05.013
- Baumer, Y., McCurdy, S., Weatherby, T. M., Mehta, N. N., Halbherr, S., Halbherr, P., . . . Boisvert, W. A. (2017). Hyperlipidemia-induced cholesterol crystal production by endothelial cells promotes atherogenesis. *Nature Communications*, 8. doi: ARTN 1129 10.1038/s41467-017-01186-z
- Berbee, J. F. P., Boon, M. R., Khedoe, P. P. S. J., Bartelt, A., Schlein, C., Worthmann, A., . . . Rensen, P. C. N. (2015). Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nature Communications*, 6. doi: ARTN 6356 10.1038/ncomms7356
- Bermejo-Martin, J. F., Martin-Fernandez, M., Lopez-Mestanza, C., Duque, P., & Almansa, R. (2018). Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease). *Journal of Clinical Medicine*, 7(11). doi: ARTN 400 10.3390/jcm7110400
- Bertani, F. R., Mozetic, P., Fioramonti, M., Iuliani, M., Ribelli, G., Pantano, F., . . . Rainer, A. (2017). Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Scientific Reports*, 7. doi: ARTN 8965 10.1038/s41598-017-08121-8
- Bing, C. (2015). Is interleukin-1 beta a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? *Adipocyte*, 4(2), 149-152. doi: 10.4161/21623945.2014.979661
- Bobryshev, Y. V., Ivanova, E. A., Chistiakov, D. A., Nikiforov, N. G., & Orekhov, A. N. (2016). Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Research International*. doi: Artn 9582430 10.1155/2016/9582430
- Bozic, M., Alvarez, A., de Pablo, C., Sanchez-Nino, M. D., Ortiz, A., Dolcet, X., . . . Valdivielso, J. M. (2015). Impaired Vitamin D Signaling in Endothelial Cell Leads to an Enhanced Leukocyte-Endothelium Interplay: Implications for Atherosclerosis Development. *Plos One*, 10(8). doi: ARTN e0136863 10.1371/journal.pone.0136863
- Braunersreuther, V., Steffens, S., Arnaud, C., Pelli, G., Burger, F., Proudfoot, A., & Mach, F. (2008). A novel RANTES antagonist prevents progression of established atherosclerotic lesions in mice.

- Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 28(6), 1090-1096. doi: 10.1161/Atvbaha.108.165423
- Buechler, C., Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J., & Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(1), 97-103.
- Caer, C., Rouault, C., Le Roy, T., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Torcivia, A., . . . Andre, S. (2017). Immune cell-derived cytokines contribute to obesity-related inflammation, fibrogenesis and metabolic deregulation in human adipose tissue. *Scientific Reports*, 7. doi: ARTN 3000 10.1038/s41598-017-02660-w
- Cai, B. S., Thorp, E. B., Doran, A. C., Sansbury, B. E., Daemen, M. J. A. P., Dorweiler, B., . . . Tabas, I. (2017). MerTK receptor cleavage promotes plaque necrosis and defective resolution in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 127(2), 564-568. doi: 10.1172/Jci90520
- Cai, L., Wang, Z., Ji, A. L., Meyer, J. M., & van der Westhuyzen, D. R. (2012). Scavenger Receptor CD36 Expression Contributes to Adipose Tissue Inflammation and Cell Death in Diet-Induced Obesity. *Plos One*, 7(5). doi: ARTN e36785 10.1371/journal.pone.0036785
- Carriere, A., Jeanson, Y., Berger-Muller, S., Andre, M., Chenouard, V., Arnaud, E., . . . Casteilla, L. (2014). Browning of White Adipose Cells by Intermediate Metabolites: An Adaptive Mechanism to Alleviate Redox Pressure. *Diabetes*, 63(10), 3253-3265. doi: 10.2337/db13-1885
- Cavusoglu, E., Marmur, J. D., Yanamadala, S., Chopra, V., Hegde, S., Nazli, A., . . . Eng, C. (2015). Elevated baseline plasma IL-8 levels are an independent predictor of long-term all-cause mortality in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*, 242(2), 589-594. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.022
- Cecrdlova, E., Petrickova, K., Kolesar, L., Petricek, M., Sekerkova, A., Svachova, V., & Striz, I. (2016). Manumycin A downregulates release of proinflammatory cytokines from TNF alpha stimulated human monocytes. *Immunology Letters*, 169, 8-14. doi: 10.1016/j.imlet.2015.11.010
- Cejkova, S., Kralova-Lesna, I., & Poledne, R. (2016). Monocyte adhesion to the endothelium is an initial stage of atherosclerosis development. *Cor Et Vasa*, 58(4), E419-E425. doi: 10.1016/j.crvasa.2015.08.002
- Cejkova, S., Kralova Lesna, I., Fronek, J., Janousek, L., Kralova, A., Zdychova, J., & Poledne, R. (2017). Pro-inflammatory gene expression in adipose tissue of patients with atherosclerosis. *Physiol Res*, 66(4), 633-640.
- Cifkova, R., Skodova, Z., Bruthans, J., Adamkova, V., Jozifova, M., Galovcova, M., . . . Lanska, V. (2010). Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA. *Atherosclerosis*, 211(2), 676-681. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.007
- Coen, P. M., Flynn, M. G., Markofski, M. M., Pence, B. D., & Hannemann, R. E. (2010). Adding exercise to rosuvastatin treatment influence on C-reactive protein, monocyte toll-like receptor 4 expression, and inflammatory monocyte (CD14+CD16+) population. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 59(12), 1775-1783. doi: 10.1016/j.metabol.2010.05.002
- Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDennott-Roe, C., Poston, R., & McGregor, J. L. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 75(3), 468-477. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.010
- Conway, D. E., Breckenridge, M. T., Hinde, E., Gratton, E., Chen, C. S., & Schwartz, M. A. (2013). Fluid Shear Stress on Endothelial Cells Modulates Mechanical Tension across VE-Cadherin and PECAM-1. *Current Biology*, 23(11), 1024-1030. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.049
- Cook-Mills, J. M., Marchese, M. E., & Abdala-Valencia, H. (2011). Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal*, 15(6), 1607-1638. doi: 10.1089/ars.2010.3522
- Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M. P., Grimaud, L., Lenoir, J., . . . Jeannin, P. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-

- associated macrophage-like cells. *Blood*, 110(13), 4319-4330. doi: 10.1182/blood-2007-02-072587
- Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., & Sul, H. S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual Review of Nutrition*, 27, 79-101. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734
- Ebong, I. A., Schreiner, P., Lewis, C. E., Appiah, D., Ghelani, A., & Wellons, M. (2016). The association between high-sensitivity C-reactive protein and hypertension in women of the CARDIA study. *Menopause-the Journal of the North American Menopause Society*, 23(6), 662-668. doi: 10.1097/Gme.0000000000000609
- Erbel, C., Wolf, A., Lasitschka, F., Linden, F., Domschke, G., Akhavanpoor, M., . . . Gleissner, C. A. (2015). Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. *International Journal of Cardiology*, 186, 219-225. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.151
- Fernandez-Alfonso, M. S., Somoza, B., Tsvetkov, D., Kuczmanski, A., Dashwood, M., & Gil-Ortega, M. (2018). Role of Perivascular Adipose Tissue in Health and Disease. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 23-59. doi: 10.1002/cphy.c170004
- Festuccia, W. T., Blanchard, P. G., & Deshaies, Y. (2011). Control of Brown Adipose Tissue Glucose and Lipid Metabolism by PPARgamma. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2, 84. doi: 10.3389/fendo.2011.00084
- Fruhbeck, G., Catalan, V., Rodriguez, A., & Gomez-Ambrosi, J. (2018). Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. *Adipocyte*, 7(1), 57-62. doi: 10.1080/21623945.2017.1402151
- Galkina, E., & Ley, K. (2007). Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 27(11), 2292-2301. doi: 10.1161/Atvbaha.107.149179
- Gaskins, A. J., Wilchesky, M., Mumford, S. L., Whitcomb, B. W., Browne, R. W., Wactawski-Wende, J., . . . Schisterman, E. F. (2012). Endogenous Reproductive Hormones and C-reactive Protein Across the Menstrual Cycle. *American Journal of Epidemiology*, 175(5), 423-431. doi: 10.1093/aje/kwr343
- Gencer, B., Auer, R., de Rekeneire, N., Butler, J., Kalogeropoulos, A., Bauer, D. C., . . . Rodondi, N. (2016). Association between resistin levels and cardiovascular disease events in older adults: The health, aging and body composition study. *Atherosclerosis*, 245, 181-186. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.004
- Gerhardt, T., & Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res*, 107(3), 321-330. doi: 10.1093/cvr/cvv147
- Gimeno, M. J., Pascual, G., Garcia-Honduvilla, N., Prieto, A., de Mon, M. A., Bellon, J. M., & Bujan, J. (2003). Modulatory role of IL10 in endothelial cell damage and platelet adhesion. *Histology and Histopathology*, 18(3), 695-702.
- Gleissner, C. A., Shaked, I., Little, K. M., & Ley, K. (2010). CXC Chemokine Ligand 4 Induces a Unique Transcriptome in Monocyte-Derived Macrophages. *Journal of Immunology*, 184(9), 4810-4818. doi: 10.4049/jimmunol.0901368
- Gordon, S., & Pluddemann, A. (2017). Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *Bmc Biology*, 15. doi: ARTN 53 10.1186/s12915-017-0392-4
- Gruzdeva, O., Borodkina, D., Uchasova, E., Dyleva, Y., & Barbarash, O. (2018). Localization of fat depots and cardiovascular risk. *Lipids in Health and Disease*, 17. doi: ARTN 21810.1186/s12944-018-0856-8
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 87(1), 99-109. doi: 10.1016/j.biochi.2004.10.019
- Gylling, H. (2004). Cholesterol metabolism and its implications for therapeutic interventions in patients with hypercholesterolaemia. *Int J Clin Pract*, 58(9), 859-866.

- Hajer, G. R., van Haefen, T. W., & Visseren, F. L. J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 29(24), 2959-2971. doi: 10.1093/eurheartj/ehn387
- Held, C., White, H. D., Stewart, R. A. H., Budaj, A., Cannon, C. P., Hochman, J. S., . . . Investigators, S. (2017). Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) Trial. *Journal of the American Heart Association*, 6(10). doi: ARTN e005077 10.1161/JAHA.116.005077
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L. F., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., . . . Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913), 333-336. doi: 10.1038/nature01137
- Hoffmann, A., Ebert, T., Kloting, N., Kolb, M., Gericke, M., Jeromin, F., . . . Kralisch, S. (2019). Leptin decreases circulating inflammatory IL-6 and MCP-1 in mice. *Biofactors*, 45(1), 43-48. doi: 10.1002/biof.1457
- Hu, E., Liang, P., & Spiegelman, B. M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 271(18), 10697-10703. doi: DOI 10.1074/jbc.271.18.10697
- Hubert, A., Bochenek, M. L., Schutz, E., Gogiraju, R., Munzel, T., & Schafer, K. (2017). Selective Deletion of Leptin Signaling in Endothelial Cells Enhances Neointima Formation and Phenocopies the Vascular Effects of Diet-Induced Obesity in Mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 37(9), 1683-+. doi: 10.1161/Atvbaha.117.309798
- Hung, M. J., Cherng, W. J., Hung, M. Y., Wu, H. T., & Pang, J. H. S. (2010). Interleukin-6 inhibits endothelial nitric oxide synthase activation and increases endothelial nitric oxide synthase binding to stabilized caveolin-1 in human vascular endothelial cells. *Journal of Hypertension*, 28(5), 940-951. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833992ef
- Cheng, K. H., Chu, C. S., Lee, K. T., Lin, T. H., Hsieh, C. C., Chiu, C. C., . . . Lai, W. T. (2008). Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease. *International Journal of Obesity*, 32(2), 268-274. doi: 10.1038/sj.ijo.0803726
- Chiu, J. J., & Chien, S. (2011). Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiological Reviews*, 91(1), 327-387. doi: 10.1152/physrev.00047.2009
- Choromanska, B., Mysliwiec, P., Choromanska, K., Dadan, J., & Chabowski, A. (2017). The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(4), 717-722. doi: 10.17219/acem/62325
- Chou, H. H., Hsu, L. A., Wu, S., Teng, M. S., Suns, Y. C., & Ko, Y. L. (2014). Leptin-to-Adiponectin Ratio is Related to Low Grade Inflammation and Insulin Resistance Independent of Obesity in Non-Diabetic Taiwanese: A Cross-Sectional Cohort Study. *Acta Cardiologica Sinica*, 30(3), 204-214.
- Imai, Y., Shimaoka, M., & Kurokawa, M. (2010). Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. *International Journal of Hematology*, 91(4), 569-575. doi: 10.1007/s12185-010-0555-3
- Jeong, J. W., Jeong, M. H., Yun, K. H., Oh, S. K., Park, E. M., Kim, Y. K., . . . Park, J. C. (2007). Echocardiographic epicardial fat thickness and coronary artery disease. *Circulation Journal*, 71(4), 536-539. doi: DOI 10.1253/circj.71.536
- Kadl, A., Meher, A. K., Sharma, P. R., Lee, M. Y., Doran, A. C., Johnstone, S. R., . . . Leitinger, N. (2010). Identification of a Novel Macrophage Phenotype That Develops in Response to Atherogenic Phospholipids via Nrf2. *Circulation Research*, 107(6), 737-U155. doi: 10.1161/Circresaha.109.215715
- Kadoglou, N. P. E., Tahmatzidis, D. K., Giannakoulas, C., Kapelouzou, A., Gkontopoulos, A., Parisis, J., . . . Kottas, G. (2015). Serum levels of novel adipokines, omentin-1 and chemerin, in patients with acute myocardial infarction: KOZANI STUDY. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 16(5), 341-346. doi: 10.2459/Jcm.0000000000000053

- Katsiki, N., Mantzoros, C., & Mikhailidis, D. P. (2017). Adiponectin, lipids and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 28(4), 347-354. doi: 10.1097/MOL.0000000000000431
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548-2556. doi: 10.1210/jc.2004-0395
- Khedoe, P. P. S. J., Hoeke, G., Kooijman, S., Dijk, W., Buijs, J. T., Kersten, S., . . . Rensen, P. C. N. (2015). Brown adipose tissue takes up plasma triglycerides mostly after lipolysis. *Journal of Lipid Research*, 56(1), 51-59. doi: 10.1194/jlr.M052746
- Khot, U. N., Khot, M. B., Bajzer, C. T., Sapp, S. K., Ohman, E. M., Brener, S. J., . . . Topol, E. J. (2003). Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 290(7), 898-904. doi: DOI 10.1001/jama.290.7.898
- Kitagawa, T., Yamamoto, H., Hattori, T., Sentani, K., Takahashi, S., Senoo, A., . . . Kihara, Y. (2018). Tumor Necrosis Factor-alpha Gene Expression in Epicardial Adipose Tissue is Related to Coronary Atherosclerosis Assessed by Computed Tomography. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 25(3), 269-280. doi: 10.5551/jat.41178
- Klimcakova, E., Rousel, B., Kovacova, Z., Kovacikova, M., Siklova-Vitkova, M., Combes, M., . . . Langin, D. (2011). Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat. *Diabetologia*, 54(4), 876-887. doi: 10.1007/s00125-010-2014-3
- Kralova, A., Kralova Lesna, I., Fronek, J., Cejkova, S., Sekerkova, A., Janousek, L., . . . Poledne, R. (2015). Macrophage phenotypes in the adipose tissue of postmenopausal women. *Physiol Res*, 64 Suppl 3, S427-433.
- Kralova Lesna, I., Kralova, A., Cejkova, S., Fronek, J., Petras, M., Sekerkova, A., . . . Poledne, R. (2016). Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue. *J Transl Med*, 14(1), 208. doi: 10.1186/s12967-016-0962-1
- Kralova Lesna, I., Petras, M., Cejkova, S., Kralova, A., Fronek, J., Janousek, L., . . . Poledne, R. (2018). Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macrophage polarization: Is there a link? *Eur J Prev Cardiol*, 25(3), 328-334. doi: 10.1177/2047487317743355
- Kralova Lesna, I., Poledne, R., Fronek, J., Kralova, A., Sekerkova, A., Thieme, F., & Pitha, J. (2015). Macrophage subsets in the adipose tissue could be modified by sex and the reproductive age of women. *Atherosclerosis*, 241(1), 255-258. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.018
- Kratz, M., Coats, B. R., Hisert, K. B., Hagman, D., Mutskov, V., Peris, E., . . . Becker, L. (2014). Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab*, 20(4), 614-625. doi: 10.1016/j.cmet.2014.08.010
- Krychtiuk, K. A., Kastl, S. P., Pfaffenberger, S., Pongratz, T., Hofbauer, S. L., Wonnerth, A., . . . Speidl, W. S. (2014). Small high-density lipoprotein is associated with monocyte subsets in stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 237(2), 589-596. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.015
- Kuldo, J. M., Westra, J., Asgeirsdottir, S. A., Kok, R. J., Oosterhuis, K., Rots, M. G., . . . Molema, G. (2005). Differential effects of NF-kappa B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF-alpha- and IL-1 beta-induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 289(5), C1229-C1239. doi: 10.1152/ajpcell.00620.2004
- Kunkel, E. J., & Ley, K. (1996). Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice - E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circulation Research*, 79(6), 1196-1204. doi: Doi 10.1161/01.Res.79.6.1196
- Kwei, S., Stavrakis, G., Takahas, M., Taylor, G., Folkman, M. J., Gimbrone, M. A., & Garcia-Cardena, G. (2004). Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *American Journal of Pathology*, 164(1), 81-89. doi: Doi 10.1016/S0002-9440(10)63099-4
- Kwon, O., Kang, S. J., Kang, S. H., Lee, P. H., Yun, S. C., Ahn, J. M., . . . Park, S. J. (2017). Relationship Between Serum Inflammatory Marker Levels and the Dynamic Changes in Coronary Plaque

- Characteristics After Statin Therapy. *Circulation-Cardiovascular Imaging*, 10(7). doi: ARTN e005934 10.1161/CIRCIMAGING.116.005934
- La Cava, A. (2017). Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine*, 98, 51-58. doi: 10.1016/j.cyto.2016.10.011
- Lesna, I. K., Cejkova, S., Kralova, A., Fronek, J., Petras, M., Sekerkova, A., . . . Poledne, R. (2017). Human adipose tissue accumulation is associated with pro-inflammatory changes in subcutaneous rather than visceral adipose tissue. *Nutr Diabetes*, 7(4), e264. doi: 10.1038/nutd.2017.15
- Li, D. Y., & Mehta, J. L. (2005). Oxidized LDL, a critical factor in atherogenesis. *Cardiovascular Research*, 68(3), 353-354. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.09.009
- Liao, J. K. (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *Journal of Clinical Investigation*, 123(2), 540-541. doi: 10.1172/Jci66843
- Libby, P. (2012). Inflammation in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 32(9), 2045-2051. doi: 10.1161/Atvbaha.108.179705
- Libby, P. (2017). Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy Biological Basis of CANTOS and Beyond. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(18), 2278-2289. doi: 10.1016/j.jacc.2017.09.028
- Libby, P., Ridker, P. M., Hansson, G. K., & Ather, L. T. N. (2009). Inflammation in Atherosclerosis From Pathophysiology to Practice. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(23), 2129-2138. doi: 10.1016/j.jacc.2009.09.009
- Liuzzi, A., Savia, G., Tagliaferri, M., Lucantoni, R., Berselli, M. E., Petroni, M. L., . . . Viberti, G. C. (1999). Serum leptin concentration in moderate and severe obesity: relationship with clinical, anthropometric and metabolic factors. *International Journal of Obesity*, 23(10), 1066-1073. doi: DOI 10.1038/sj.ijo.0801036
- Lu, J. Y., Cao, Q., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C. Q., Yu, X., . . . Wang, Y. P. (2013). Discrete functions of M-2a and M-2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney International*, 84(4), 745-755. doi: 10.1038/ki.2013.135
- Luckett-Chastain, L., Calhoun, K., Schartz, T., & Gallucci, R. M. (2016). IL-6 influences the balance between M1 and M2 macrophages in a mouse model of irritant contact dermatitis. *Journal of Immunology*, 196.
- Ma, Y. Q., Plow, E. F., & Geng, J. G. (2004). P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of alphaMbeta2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. *Blood*, 104(8), 2549-2556. doi: 10.1182/blood-2004-03-1108
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., & Matsubara, K. (1996). CDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (Adipose most abundant gene transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(2), 286-289. doi: DOI 10.1006/bbrc.1996.0587
- Mamdouh, Z., Mikhailov, A., & Muller, W. A. (2009). Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *Journal of Experimental Medicine*, 206(12), 2795-2808. doi: 10.1084/jem.20082745
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677-686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015
- Marino, B. C. A., Buljubasic, N., Akkerhuis, M., Cheng, J. M., Garcia-Garcia, H. M., Regar, E., . . . Kardys, I. (2018). Adiponectin in Relation to Coronary Plaque Characteristics on Radiofrequency Intravascular Ultrasound and Cardiovascular Outcome. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 111(3), 345-352. doi: 10.5935/abc.20180172
- Martins, P. D., Garcia-Vallejo, J. J., van Thienen, J. V., Fernandez-Borja, M., van Gils, J. M., Beckers, C., . . . Zwaginga, J. J. (2007). P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 27(5), 1023-1029. doi: 10.1161/Atvbaha.107.140442

- Messner, B., & Bernhard, D. (2014). Smoking and Cardiovascular Disease Mechanisms of Endothelial Dysfunction and Early Atherogenesis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 34(3), 509-515. doi: 10.1161/Atvbaha.113.300156
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology*, 164(12), 6166-6173. doi: DOI 10.4049/jimmunol.164.12.6166
- Mitsi, E., Kamng'ona, R., Rylance, J., Solorzano, C., Reine, J. J., Mwandumba, H. C., . . . Jambo, K. C. (2018). Human alveolar macrophages predominately express combined classical M1 and M2 surface markers in steady state. *Respiratory Research*, 19. doi: ARTN 66 10.1186/s12931-018-0777-0
- Monne, M., Daddabbo, L., Gagneul, D., Obata, T., Hielscher, B., Palmieri, L., . . . Palmieri, F. (2018). Uncoupling proteins 1 and 2 (UCP1 and UCP2) from *Arabidopsis thaliana* are mitochondrial transporters of aspartate, glutamate, and dicarboxylates. *Journal of Biological Chemistry*, 293(11), 4213-4227. doi: 10.1074/jbc.RA117.000771
- Mtairag, E., Chollet-Martin, S., Oudghiri, M., Laquay, N., Jacob, M. P., Michel, J. B., & Feldman, L. J. (2001). Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovascular Research*, 49(4), 882-890.
- Myles, D. A. A., Rule, S. A., Delucas, L. J., Babu, Y. S., Xu, Y., Volanakis, J. E., . . . Greenhough, T. J. (1990). Rotation Function Studies of Human C-Reactive Protein. *Journal of Molecular Biology*, 216(3), 491-496. doi: Doi 10.1016/0022-2836(90)90373-T
- Ness, G. C. (2015). Physiological feedback regulation of cholesterol biosynthesis: Role of translational control of hepatic HMG-CoA reductase and possible involvement of oxysterols. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(5), 667-673. doi: 10.1016/j.bbalip.2015.02.008
- Nguyen, K. D., Qiu, Y. F., Cui, X. J., Goh, Y. P. S., Mwangi, J., David, T., . . . Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, 480(7375), 104-U272. doi: 10.1038/nature10653
- Nissen, S. E., Tuzcu, E. M., Schoenhagen, P., Crowe, T., Sasiela, W. J., Tsai, J., . . . Investigators, R. (2005). Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, 352(1), 29-38. doi: DOI 10.1056/NEJMoa042000
- Norata, G. D., Raselli, S., Grigore, L., Garlaschelli, K., Dozio, E., Magni, P., & Catapano, A. L. (2007). Leptin: Adiponectin ratio is an independent predictor of intima media thickness of the common carotid artery. *Stroke*, 38(10), 2844-2846. doi: 10.1161/Strokeaha.107.485540
- Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., . . . Matsuzawa, Y. (1995). Reduced Uptake of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Monocyte-Derived Macrophages from Cd36-Deficient Subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 96(4), 1859-1865. doi: Doi 10.1172/Jci118231
- O'Brien, L. C., Graham, Z. A., Chen, Q., Lesnefsky, E. J., Cardozo, C., & Gorgey, A. S. (2018). Plasma adiponectin levels are correlated with body composition, metabolic profiles, and mitochondrial markers in individuals with chronic spinal cord injury. *Spinal Cord*, 56(9), 863-872. doi: 10.1038/s41393-018-0089-8
- Okamoto, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Nishida, M., Arita, Y., Kumada, M., . . . Matsuzawa, Y. (2002). Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 106(22), 2767-2770. doi: 10.1161/01.Cir.0000042707.50032.19
- Palomo, J., Dietrich, D., Martin, P., Palmer, G., & Gabay, C. (2015). The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*, 76(1), 25-37. doi: 10.1016/j.cyto.2015.06.017
- Park, S. J., Kang, S. J., Ahn, J. M., Chang, M., Yun, S. C., Roh, J. H., . . . Park, S. W. (2016). Effect of Statin Treatment on Modifying Plaque Composition A Double-Blind, Randomized Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 67(15), 1772-1783. doi: 10.1016/j.jacc.2016.02.014

- Park, S. Y., Lee, J. S., Ko, Y. J., Kim, A. R., Choi, M. K., Kwak, M. K., . . . Kim, J. A. (2008). Inhibitory effect of simvastatin on the TNF-alpha- and angiotensin II-induced monocyte adhesion to endothelial cells is mediated through the suppression of geranylgeranyl isoprenoid-dependent ROS generation. *Archives of Pharmacal Research*, *31*(2), 195-204. doi: 10.1007/s12272-001-1141-2
- Peled, M., & Fisher, E. A. (2014). Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression. *Front Immunol*, *5*, 579. doi: 10.3389/fimmu.2014.00579
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9). doi: ARTN e45 DOI 10.1093/nar/29.9.e45
- Pitoulias, M. G., Skoura, L., Pitoulias, A. G., Chatzidimitriou, D., Margariti, A., Arsenakis, M., & Pitoulias, G. A. (2017). The role of Visfatin in atherosclerotic peripheral arterial obstructive disease. *Cytokine*, *91*, 140-144. doi: 10.1016/j.cyto.2016.12.027
- Poledne, R., Kralova Lesna, I., Kralova, A., Fronek, J., & Cejkova, S. (2016). The relationship between non-HDL cholesterol and macrophage phenotypes in human adipose tissue. *J Lipid Res*, *57*(10), 1899-1905. doi: 10.1194/jlr.P068015
- Poledne, R., Lorenzova, A., Stavek, P., Valenta, Z., Hubacek, J., Suchanek, P., & Pitha, J. (2009). Proinflammatory status, genetics and atherosclerosis. *Physiol Res*, *58 Suppl 2*, S111-118.
- Pond, C. M. (2017). Accuracy and Artistry in Anatomical Illustration of Perivascular Adipose Tissue. *Frontiers in Physiology*, *8*. doi: ARTN 990 10.3389/fphys.2017.00990
- Porter, S. A., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Vasan, R. S., O'Donnel, C. J., & Fox, C. S. (2009). Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue: A Protective Fat Depot? *Diabetes Care*, *32*(6), 1068-1075. doi: 10.2337/dc08-2280
- Pries, A. R., & Kuebler, W. M. (2006). Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*(176 Pt 1), 1-40.
- Qiu, Y. F., Nguyen, K. D., Odegaard, J. I., Cui, X. J., Tian, X. Y., Locksley, R. M., . . . Chawla, A. (2014). Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat. *Cell*, *157*(6), 1292-1308. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.066
- Rader, D. J., Alexander, E. T., Weibel, G. L., Billheimer, J., & Rothblat, G. H. (2009). The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, *50*, S189-S194. doi: 10.1194/jlr.R800088-JLR200
- Raices, R. M., Kannan, Y., Sarkar, A., Bellamkonda-Athmaram, V., & Wewers, M. D. (2008). A synergistic role for IL-1beta and TNFalpha in monocyte-derived IFNgamma inducing activity. *Cytokine*, *44*(2), 234-241. doi: 10.1016/j.cyto.2008.08.004
- Rajamaki, K., Lappalainen, J., Oorni, K., Valimaki, E., Matikainen, S., Kovanen, P. T., & Eklund, K. K. (2010). Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *Plos One*, *5*(7). doi: ARTN e11765 10.1371/journal.pone.0011765
- Ridker, P. M. (1999). Evaluating novel cardiovascular risk factors: Can we better predict heart attacks? *Annals of Internal Medicine*, *130*(11), 933-937. doi: 10.7326/0003-4819-130-11-199906010-00018
- Ridker, P. M. (2001). High-sensitivity C-reactive protein - Potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*, *103*(13), 1813-1818. doi: Doi 10.1161/01.Cir.103.13.1813
- Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E., & Rifai, N. (2000). C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *New England Journal of Medicine*, *342*(12), 836-843. doi: Doi 10.1056/Nejm200003233421202
- Ridker, P. M., MacFadyen, J. G., Everett, B. M., Libby, P., Thuren, T., Glynn, R. J., & Grp, C. T. (2018). Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet*, *391*(10118), 319-328. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32814-3
- Ridker, P. M., Rifai, N., Rose, L., Buring, J. E., & Cook, N. R. (2002). Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, *347*(20), 1557-1565. doi: DOI 10.1056/NEJMoa021993

- Rosenbaum, M. A., Miyazaki, K., & Graham, L. M. (2012). Hypercholesterolemia and oxidative stress inhibit endothelial cell healing after arterial injury. *Journal of Vascular Surgery*, 55(2), 489-496. doi: 10.1016/j.jvs.2011.07.081
- Ross, R., Glomset, J., & Harker, L. (1977). Response to Injury and Atherogenesis. *American Journal of Pathology*, 86(3), 675-684.
- Ruan, H., & Dong, L. Q. (2016). Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *Journal of Molecular Cell Biology*, 8(2), 101-109. doi: 10.1093/jmcb/mjw014
- Saely, C. H., Leihner, A., Muendlein, A., Vonbank, A., Rein, P., Geiger, K., . . . Drexel, H. (2016). High plasma omentin predicts cardiovascular events independently from the presence and extent of angiographically determined atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 244, 38-43. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.100
- Sanjabi, S., Zenewicz, L. A., Kamanaka, M., & Flavell, R. A. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4), 447-453. doi: 10.1016/j.coph.2009.04.008
- Satoh, N., Naruse, M., Usui, T., Tagami, T., Suganami, T., Yamada, K., . . . Ogawa, Y. (2004). Leptin-to-adiponectin ratio as a potential atherogenic index in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 27(10), 2488-2490. doi: DOI 10.2337/diacare.27.10.2488
- Sen, M., Yuki, K., & Springer, T. A. (2013). An internal ligand-bound, metastable state of a leukocyte integrin, alpha(X)beta(2). *Journal of Cell Biology*, 203(4), 629-642. doi: 10.1083/jcb.201308083
- Sena, C. M., Pereira, A. M., & Seica, R. (2013). Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2216-2231. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.08.006
- Shao, W., & Espenshade, P. J. (2012). Expanding Roles for SREBP in Metabolism. *Cell Metabolism*, 16(4), 414-419. doi: 10.1016/j.cmet.2012.09.002
- Shemirani, H., & Khoshavi, M. (2012). Correlation of echocardiographic epicardial fat thickness with severity of coronary artery disease-an observational study. *Anatolian Journal of Cardiology*, 12(3), 200-205. doi: 10.5152/akd.2012.061
- Schoettl, T., Fischer, I. P., & Ussar, S. (2018). Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*, 221. doi: UNSP jeb162958 10.1242/jeb.162958
- Schrijvers, D. M., De Meyer, G. R. Y., Kockx, M. M., Herman, A. G., & Martinet, W. (2005). Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 25(6), 1256-1261. doi: 10.1161/01.ATV.0000166517.18801.a7
- Sims, J. E., & Smith, D. E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 89-102. doi: 10.1038/nri2691
- Spoto, B., Di Betta, E., Mattace-Raso, F., Sijbrands, E., Vilardi, A., Parlongo, R. M., . . . Zoccali, C. (2014). Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 24(10), 1137-1143. doi: 10.1016/j.numecd.2014.04.017
- Strydom, H. C. (2000). Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions - An update. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 20(5), 1177-1178. doi: Doi 10.1161/01.Atv.20.5.1177
- Strydom, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., . . . Wissler, R. W. (1995). A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis - a Report from the Committee on Vascular-Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American-Heart-Association. *Circulation*, 92(5), 1355-1374. doi: Doi 10.1161/01.Cir.92.5.1355
- Strydom, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Rosenfeld, M. E., . . . Wissler, R. W. (1994). A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis - a

- Report from the Committee on Vascular-Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American-Heart-Association. *Circulation*, 89(5), 2462-2478. doi: Doi 10.1161/01.Cir.89.5.2462
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., . . . Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409(6818), 307-312. doi: Doi 10.1038/35053000
- Steyers, C. M., & Miller, F. J. (2014). Endothelial Dysfunction in Chronic Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 11324-11349. doi: 10.3390/ijms150711324
- Strohacker, K., McCaffery, J. M., MacLean, P. S., & Wing, R. R. (2014). Adaptations of leptin, ghrelin or insulin during weight loss as predictors of weight regain: a review of current literature. *International Journal of Obesity*, 38(3), 388-396. doi: 10.1038/ijo.2013.118
- Taguchi, R., Takasu, J., Itani, Y., Yamamoto, R., Yokoyama, K., Watanabe, S., & Masuda, Y. (2001). Pericardial fat accumulation in men as a risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 157(1), 203-209. doi: Doi 10.1016/S0021-9150(00)00709-7
- Takaoka, M., Nagata, D., Kihara, S., Shimomura, I., Kimura, Y., Tabata, Y., . . . Sata, M. (2009). Periadventitial Adipose Tissue Plays a Critical Role in Vascular Remodeling. *Circulation Research*, 105(9), 906-U185. doi: 10.1161/Circresaha.109.199653
- Tan, S. M., Hyland, R. H., Al-Shamkhani, A., Douglass, W. A., Shaw, J. M., & Law, S. K. (2000). Effect of integrin beta 2 subunit truncations on LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) assembly, surface expression, and function. *J Immunol*, 165(5), 2574-2581. doi: 10.4049/jimmunol.165.5.2574
- Taylor, K. E., & van den Berg, C. W. (2007). Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein. *Immunology*, 120(3), 404-411. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02516.x
- Thaler, B., Hohensinner, P. J., Krychtiuk, K. A., Matzneller, P., Koller, L., Brekalo, M., . . . Speidl, W. S. (2016). Differential in vivo activation of monocyte subsets during low-grade inflammation through experimental endotoxemia in humans. *Scientific Reports*, 6. doi: ARTN 30162 10.1038/srep30162
- Tippett, E., Cheng, W. J., Westhorpe, C., Cameron, P. U., Brew, B. J., Lewin, S. R., . . . Crowe, S. M. (2011). Differential Expression of CD163 on Monocyte Subsets in Healthy and HIV-1 Infected Individuals. *Plos One*, 6(5). doi: ARTN e19968 10.1371/journal.pone.0019968
- Trial, J., Cieslik, K. A., & Entman, M. L. (2016). Phosphocholine-containing ligands direct CRP induction of M2 macrophage polarization independent of T cell polarization: Implication for chronic inflammatory states. *Immunity Inflammation and Disease*, 4(3), 274-288. doi: 10.1002/iid3.112
- Turer, A. T., & Scherer, P. E. (2012). Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*, 55(9), 2319-2326. doi: 10.1007/s00125-012-2598-x
- van den Berg, S. M., van Dam, A. D., Rensen, P. C. N., de Winther, M. P. J., & Lutgens, E. (2017). Immune Modulation of Brown(ing) Adipose Tissue in Obesity. *Endocrine Reviews*, 38(1), 46-68. doi: 10.1210/er.2016-1066
- Verma, S. K., Garikipati, V. N. S., Krishnamurthy, P., Khan, M., Thorne, T., Qin, G. J., . . . Kishore, R. (2016). IL-10 Accelerates Re-Endothelialization and Inhibits Post-Injury Intimal Hyperplasia following Carotid Artery Denudation. *Plos One*, 11(1). doi: ARTN e0147615 10.1371/journal.pone.0147615
- Vicennati, V., Vottero, A., Friedman, C., & Papanicolaou, D. A. (2002). Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *International Journal of Obesity*, 26(7), 905-911. doi: 10.1038/sj.ijo.0802035
- Viemann, D., Goebeler, M., Schmid, S., Nordhues, U., Klimmek, K., Sorg, C., & Roth, J. (2006). TNF induces distinct gene expression programs in microvascular and macrovascular human endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(1), 174-185. doi: 10.1189/jlb.0905530

- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., . . . Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*, *360*(15), 1518-1525. doi: 10.1056/NEJMoa0808949
- Vroegrijk, I. O. C. M., van Klinken, J. B., van Diepen, J. A., van den Berg, S. A. A., Febbraio, M., Steinbusch, L. K. M., . . . van Harmelen, V. (2013). CD36 Is Important for Adipocyte Recruitment and Affects Lipolysis. *Obesity*, *21*(10), 2037-2045. doi: 10.1002/oby.20354
- Wang, Q. S., Ni, H., Lan, L., Wei, X. L., Xiang, R., & Wang, Y. (2010). Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Research*, *20*(6), 701-712. doi: 10.1038/cr.2010.52
- Waqas, S. F. H., Noble, A., Hoang, A. C., Ampem, G., Popp, M., Strauss, S., . . . Roszer, T. (2017). Adipose tissue macrophages develop from bone marrow-independent progenitors in *Xenopus laevis* and mouse. *Journal of Leukocyte Biology*, *102*(3), 845-855. doi: 10.1189/jlb.1A0317-082RR
- Watson, C., Whittaker, S., Smith, N., Vora, A. J., Dumonde, D. C., & Brown, K. A. (1996). IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, *105*(1), 112-119. doi: DOI 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-717.x
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796-1808. doi: 10.1172/Jci200319246
- Woo, M. S., Yang, J., Beltran, C., & Cho, S. (2016). Cell Surface CD36 Protein in Monocyte/Macrophage Contributes to Phagocytosis during the Resolution Phase of Ischemic Stroke in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(45), 23654-23661. doi: 10.1074/jbc.M116.750018
- Woollard, K. J., & Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*, *7*(2), 77-86. doi: 10.1038/nrcardio.2009.228
- Xue, B. Z., Rim, J. S., Hogan, J. C., Coulter, A. A., Koza, R. A., & Kozak, L. P. (2007). Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *Journal of Lipid Research*, *48*(1), 41-51. doi: 10.1194/jlr.M600287-JLR200
- Yamawaki, H., Kuramoto, J., Kameshima, S., Usui, T., Okada, M., & Hara, Y. (2011). Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *408*(2), 339-343. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.039
- Yamawaki, H., Tsubaki, N., Mukohda, M., Okada, M., & Hara, Y. (2010). Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *393*(4), 668-672. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.053
- Yang, R. Z., Lee, M. J., Hu, H., Pray, J., Wu, H. B., Hansen, B. C., . . . Gong, D. W. (2006). Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *290*(6), E1253-E1261. doi: 10.1152/ajpendo.00572.2004
- Yin, Y., Li, X. Y., Sha, X. J., Xi, H., Li, Y. F., Shao, Y., . . . Yang, X. F. (2015). Early Hyperlipidemia Promotes Endothelial Activation via a Caspase-1-Sirtuin 1 Pathway. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, *35*(4), 804-816. doi: 10.1161/Atvbaha.115.305282
- Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R. A., Bidlingmaier, M., Wu, Z. D., Ajami, A., . . . Ross, R. J. M. (2001). High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *Journal of Immunology*, *167*(8), 4593-4599. doi: DOI 10.4049/jimmunol.167.8.4593
- Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R. R., Fliser, D., & Heine, G. H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, *118*(12), e50-61. doi: 10.1182/blood-2011-01-326827
- Zhang, C. H. (2008). The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Research in Cardiology*, *103*(5), 398-406. doi: 10.1007/s00395-008-0733-0

- Zhang, X., & Mosser, D. M. (2008). Macrophage activation by endogenous danger signals. *Journal of Pathology*, 214(2), 161-178. doi: 10.1002/path.2284
- Zhang, Y. Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homolog. *Nature*, 372(6505), 425-432. doi: DOI 10.1038/372425a0
- Zhou, L. Y., Li, C. C., Gao, L., & Wang, A. H. (2015). High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 4015-4021. doi: 10.3892/mmr.2015.3930
- Zingaretti, M. C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., . . . Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *Faseb Journal*, 23(9), 3113-3120. doi: 10.1096/fj.09-133546