

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta**

**Katedra Fyziologie**

Doktorský studijní program

**Charles University, Faculty of Science**

**Department of Physiology**

Doctoral study programme

Autoreferát disertační práce

Summary of the doctoral thesis



Adheze monocytů k endotelu a aterogenezi

Monocyte adhesion to endothelium and atherogenesis

**Mgr. Soňa Kauerová**

Rozená/née Čejková

Školitel/Supervisor: MUDr. Ivana Králová Lesná, PhD.

Praha, 2019

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova  
a Akademie věd České republiky*

Program: Fyziologie živočichů

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště: Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM)

Laboratoř pro výzkum aterosklerózy

Autor: Mgr. Soňa Kauerová

Školitel: MUDr. Ivana Králová Lesná, PhD.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

## 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 $\beta$  a TNF- $\alpha$ . 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- $\beta$ .

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 proporcii 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.

## Úvod

Ateroskleróza neboli kornatění cév je chronické zánětlivé onemocnění charakterizované ukládáním na lipidy bohatých lipoproteinových částic do plaku uvnitř cév. Ačkoli ke klinickým příznakům dochází až po řadě dekád rozvoje aterosklerózy, na základě rizikových faktorů, lze do jisté míry predikovat riziko výskytu akutních komplikací, z nichž nejčastější je infarkt myokardu, cévní mozková příhoda či ischemická choroba dolních končetin. Tradičně jsou sledovány hladiny triglyceridů, nízkodenzních (LDL) a vysokodenzních (HDL) lipoproteinových částic včetně jejich poměru, enzymy uplatňující se v redistribuci lipidů krevním řečištěm a koncentrace apolipoproteinu A-I, apolipoproteinu B-100, lipoproteinu(a), hladiny fibrinogenu a fibrinolytické kapacity. Diabetes, kouření a obezita jsou také považovány za zásadní rizikové faktory rozvoje kardiovaskulárních chorob.

Nicméně aterogeneze není pouze pasivní ukládání lipidových částic, ale jedná se o aktivní proces, v němž kromě hyperlipidemie zásadní úlohu hraje chronický zánět (Khot et al., 2003; Libby, 2012; Ridker, 1999; Ridker et al., 2002; Ross et al., 1977). Makrofágy jsou přítomny ve všech fázích vývoje aterosklerotického plaku od tvorby tzv. fatty streaks až po vysoce kalcifikované léze. Zánětlivé procesy provází celý proces a s postupným rozvojem choroby se ještě stupňují do podob nekrotických ložisek.

Jsou to právě makrofágy, které proces rozvoje aterosklerotických plaků provází od počátku vývoje. Nejen že propojují metabolismus lipidů a zánětlivých procesů probíhajících v lézích, ale i samy významným způsobem přispívají k rozvoji chronického zánětu produkcí prozánětlivých mediátorů (Duque & Descoteaux, 2014). Makrofágy tvoří širokou škálu fenotypů v závislosti na mikroprostředí, v němž dochází k jejich diferenciaci. Tradičně se rozdělují na M1 a M2 makrofágy, prozánětlivé a protizánětlivé makrofágy. Toto označení vychází ze zjednodušeného modelu *in vitro*, kdy stimulace produkty T-helper 1 buněk (Th1) vede k diferenciaci prozánětlivým směrem na M1 makrofágy s typickou expresí NO syntázy a produkcí prozánětlivých cytokinů a stimulace produkty T-helper 2 buněk (Th2) vede k typicky vysoké expresi naopak arginázy a spíše protizánětlivých cytokinů (Lu et al., 2013; Mills et al., 2000). Je třeba zdůraznit, že se jedná o výrazné zjednodušení. Zejména tkáňové makrofágy exprimují znaky, které neodpovídají ani M1 ani M2 klasifikaci. Ale i v této disertační práci budou popisované populace makrofágů v lidské tukové tkáni pro zjednodušení označovány jako prozánětlivé a protizánětlivé.

Makrofágy v cévních stěnách jsou zásadní ve vychytávání LDL částic a jejich následném odstranění v procesu zvaném reverzní transport cholesterolu. Čímž mohou makrofágy působit i protektivně z hlediska rozvoje aterosklerózy (Van Eck et al., 2002). Jedná se o eflux přebytečného celulórního cholesterolu z periferních tkání prostřednictvím malých HDL částic do jater, kde je přebytečný cholesterol přeměněn na žlučové kyseliny a vyloučen z organismu (Rader et al., 2009). Cholesterol je v optimálním množství pro buňky esenciální, ale jeho nadbytek působí cytotoxicky. Dále se makrofágy uplatňují při eferocytóze, tedy procesu receptorem zprostředkované fagocytózy umírajících a mrtvých buněk a jejich zbytků. Právě při selhání tohoto mechanismu debris z mrtvých buněk vede k prohloubení lokálních zánětlivých změn v důsledku tzv. sekundární nekrózy (Schrijvers et al., 2005). Zvýšená akumulace mrtvých buněk v kombinaci s vysokým ukládáním přebytečných lipidů vytváří tzv. nekrotické jádro v aterosklerotických placích.

Migrace monocytů do cévní stěny probíhá kaskádovitě. Je iniciovaná lokální aktivací endotelu, kdy dochází ke zvýšení exprese adhezních molekul na povrchu endotelu v důsledku stimulace prozánětlivými cytokiny nebo fyzikálního působení toku krve (Gerhardt & Ley, 2015). Prvotní zachycení a zpomalení tzv. rolling monocytu po povrchu endotelu zajišťují selektiny, zejména selektin P (SelP) a selektin E (SelE) a jejich glykoproteinový ligand selektinu P (Huang et al., 2013; Martins et al., 2007). Expese SelP a SelE na povrch endoteliálních buněk se zvyšuje stimulací prozánětlivými cytokiny (Martins, et al., 2007). Následně tuto reverzibilní vazbu monocytu k endotelu zesilují vazby integrinů a jejich imunoglobulinové ligandy zejména intercelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1), vaskulární adhezní molekula 1 (VCAM-1) a fibronectin (Imai et al., 2010; Sen et al., 2013; Tan et al., 2000). Pevně adherovaný monocyt migruje přes vrstvu endotelu buď paracelulární cestou, tedy mezi buňkami, nebo transcelulární cestou, přímo skrz endoteliální buňky (Gerhardt, et al., 2015; Mamdouh et al., 2009).

Tuková tkáň produkuje endokrinně působící molekuly, které se podílejí zejména na rozvoji chorob spojených metabolismem a s chronickým zánětem (Kershaw & Flier, 2004). Zdrojem těchto bioaktivních látek jsou nejen plně diferencované adipocyty, ale i další buněčné typy, které jsou součástí tukové tkáně a tvoří tzv. stromovaskulární frakci (SVF). Mezi ně se řadí jednak fibroblasty, kmenové buňky, preadipocyty a další, ale i buňky bílé krevní řady jako jsou makrofágy schopné produkovat velké množství prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů v závislosti na jejich polarizaci.

Je tedy známo, že v tukové tkáni je významné zastoupení makrofágů, ale jejich fenotypy nebyly dříve jasně definovány a nebyly známé jejich vztahy ke kardiovaskulárním chorobám. Dále je známo, že tuková tkáň produkuje řadu bioaktivních látek, ale nebylo prokázáno, že přímo tato kombinace látek může sama o sobě aktivovat endotel a tím adhezi monocytů k endotelu jako iniciálního kroku extravazace.

## **Cíle Práce**

- ➔ 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.

## **Materiál a metodika**

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.

Základní klinické a laboratorní hodnoty analyzované skupiny LKD byly mírně lepší ve srovnání s hodnotami průměrné české populace hodnocené v rámci post-MONICA (Cifkova et al., 2010). Průměrné BMI, koncentrace celkového cholesterolu bylo nižší u LKD (konkrétní hodnoty viz jednotlivé publikace). Počty osob s hypercholesterolémií a dyslipoproteinémií byly zcela minoritní. V některých analýzách byli LKD doplněni o skupinu pacientů s potvrzenou chorobou periferních cév (PAD). Skupina pacientů s PAD vykazovala horší klinické a laboratorní hodnoty ve srovnání s LKD, ale v průměrném BMI se nelišila.

### **Koncentrace lipoproteinů**

Před zahájením operace byla LKD a pacientům s PAD na lačno (min 10 hod lačnění) odebrána krev. Plasma byla separována do 30 minut od odběru. Koncentrace cholesterolu a triglyceridů byly kvantifikovány 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 u obou skupin. VAT byl odebírán z oblasti vně Gerotovy fascie a PVAT byl odebírán z oblasti renální arterie. Po očištění od všech viditelných zbytků vazivové tkáně a cév byla tuková tkáň nastříhávána na malé kousky (asi 2 mm) a přes filtr byly vzorky promyty fosfátovým puftrem (PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ ), 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.

### **Genová exprese v tukové tkáni**

Pro analýzu genové exprese tukové tkáně byly vzorky tukové tkáně ihned po odebrání mrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -80°C až do analýzy. Z přibližně 200 mg tukové tkáně RNA izolována 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- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), MCP-1 (CCL2, C-C motif chemokine ligand 2) a IL-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).

V endoteliálních buňkách byly analyzované následující geny: MCP-1, IL-6, syntáza oxidu dusnatého 3 (NOS3), transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), SelE, ICAM-1, VCAM-1, Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) bylo použito jako endogenní kontrola pro normalizaci. Relativní genová exprese byla vyhodnocena pomocí metody  $\Delta\Delta Ct$  (Pfaffl, 2001).



### **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 mm<sup>3</sup>) byly inkubovány v odpovídajících množstvích kultivačního média (1 g VAT respektive SVF izolované z 1 g VAT v 1 ml roztoku EBM-2 Lonza s 0,2 % hovězí sérový albumin bez mastných kyselin (Sigma Aldrich)) po dobu 24 hodin. Kondicionovaná média z VAT (ATCM) a ze SVF (SVFCM) byla použita pro analýzu míry adheze monocytů k endotelu.

### **Měření adheze monocytů k endotelu**

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

THP-1 buňky byly kultivovány v RPMI-1640 (Biosera) s 10% fetální bovinní sérum (FBS) (Gibco™), 2 mM L-glutamin (Sigma Aldrich) a 100 U/ml penicilin-streptomycin (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. TNF- $\alpha$  (10ng/ml, R&D Systems) byl použit jako pozitivní kontrola. Po 24hodinách bylo médium odstraněno a přidány THP-1 buňky značené pomocí calcein-AM (calcein-acetoxymethyl, Molecular Probes). Po 30 min 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 $\beta$ , MCP-1, TNF- $\alpha$ , 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). Mann-Whitney test byl použit pro statistickou analýzu.

## **Hs-CRP**

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

## Výsledky a diskuze

Hlavním cílem disertační práce bylo ověřit, zda produkty lidské tukové tkáně mohou ovlivňovat přímo adhezi monocytů k endotelu jakožto iniciálního kroku jejich migrace do cévní stěny případně dále do místa zánětu a dále popsání polarizovaných fenotypů makrofágů v lidské tukové tkáni a jejich vztahu k rizikovým faktorům kardiovaskulárních chorob.

V analýzách genové exprese prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6) v SAT, VAT a PVAT u LKD a pacientů s PAD jsme prokázali vyšší genové exprese ve skupině pacientů s PAD ve srovnání s LKD. Ve VAT byly prokázány signifikantně vyšší genové exprese ve všech analyzovaných genech v porovnání pacientů s PAD než LKD. Ačkoli změny v SAT byly stejného směru, žádný rozdíl nedosáhl statistické významnosti. V PVAT signifikantně vyšší exprese byla naměřena u IL-6, ačkoli u zbylých genů průměrné hodnoty pacientů s PAD vyšší než LKD, nedosahovaly hranice významnosti. Vztah genové exprese a rizikových faktorů kardiovaskulárních chorob jsme neprokázali. Předpokládané prozánětlivé změny ve VAT jsou v souladu i s plasmatickou koncentrací prozánětlivých markerů – TNF- $\alpha$  a hsCRP. Výsledky potvrdily důležitost VAT v rozvoji aterosklerózy.

Pro ověření, zda tuková tkáň může svými produkty ovlivnit migraci makrofágů z krevního oběhu, jsme zavedli adhezní model monocytů k endotelu. Tento model používá média získaná inkubací VAT v kultivačním médiu *in vitro*. Působení ATCM významně zvýšilo míru adheze monocytů k endotelu. Míra adheze rostla proporčně ke koncentraci IL-1 $\beta$  ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,82$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,70$ ), MCP-1 ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,69$ ), RANTES (CCL2,  $p < 0,01$ ,  $r = 0,54$ ) a překvapivě i IL-10 ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,67$ ) měřené v ATCM. Což, kromě IL-10, je v souladu s jejich proaterogenním a prozánětlivým charakterem (Ait-Oufella et al., 2011; Henrichot et al., 2005; Lin et al., 2014; Virani et al., 2011). Jsou v souladu s výsledky Henrichotovy starší práce zaměřené na chemotaktický efekt ATCM, s tím že MCP-1 v naší analýze nevykazovalo tak silný efekt (Henrichot, et al., 2005). Ale MCP-1 se primárně uplatňuje v chemotaxi jako takové, kterou analyzoval Henrichot, nemusí se tedy samostatně aktivovat endoteliální buňky. Překvapivě také s rostoucí koncentrací protizánětlivého IL-10 v ATCM signifikantně rostla míra adheze monocytů k endotelu. Ačkoli výsledky kolegů naznačují potenciálně i možný prozánětlivý vliv IL-10 (Gimeno et al., 2003; Mtairag et al., 2001), stimulace

endoteliálních buněk samotným IL-10 významně neovlivnila míru adheze. Můžeme se tedy domnívat, že se jednalo o synergii s další složkou ATCM.

Kokultivace s ATCM signifikantně zvýšila genovou expresi v endoteliálních buňkách adhezních molekul (ICAM-1, VCAM-1), což potvrzuje platnost výsledků míry zvýšené adheze monocytů k endoteliálním buňkám. Navíc došlo ke zvýšení genové exprese prozánětlivého IL-6 a naopak ke snížení genové exprese protizánětlivého TGF- $\beta$ . Lokální zvýšení exprese prozánětlivým směrem může přispívat k polarizaci migrujících monocytů/makrofágů prozánětlivým směrem (Luckett-Chastain et al., 2016).

Selektivní inhibice IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  v ATCM vedly k významnému snížení míry adheze monocytů k endotelu, navíc snížily i expresi prozánětlivých cytokinů a adhezních molekul. Selektivní inhibice MCP-1 a RANTES nevedla k významným rozdílům oproti stimulace ATCM. Lze tedy předpokládat, že IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  jsou těmi stěžejními cytokiny uvolňovanými tukovou tkání, které ovlivňují adhezi monocytů k endotelu.

Analyzovali jsme, zda převážná část cytokinů v ATCM je produkována v adipocytech, nebo SVF. Ukázalo se, že převážná část těchto molekul je tvořena adipocyty s výjimkou IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  produkovánými buňkami SVF. Je třeba připustit možné zkreslení v důsledku difuze z tukové tkáně do ATCM, zatímco koncentrace cytokinů SVFCM dobře reflektují jejich produkci buňkami SVF do média. V souladu s publikovanými pracemi lze usuzovat, že v rámci buněk obsažených ve SVF významnou část této produkce mohou produkovat právě makrofágy (Bing, 2015; Sims & Smith, 2010; Vicennati et al., 2002; Weisberg et al., 2003).

Makrofágy v tukové tkáni vykazují vysokou variabilitu. Na základě literatury jsme pro analýzu makrofágů v lidské tukové tkáni vybrali základní znaky sledované i na krevních monocytech CD14 a CD16 (CD14+16-, CD14+16+) (Ajami & Steinman, 2018; Coen et al., 2010; Thaler et al., 2016). Tyto základní znaky jsme doplnili o CD36, scavengerový receptor uplatňující se jak v transportu cholesterolu a lipidů, tak i fagocytózy, a dále o CD163, obecně považovaný za znak protizánětlivě polarizovaných makrofágů (Barros et al., 2013). Ukázalo se, že CD36 je vysoce exprimovaný u části prozánětlivých CD14+CD16+ makrofágů (CD14+CD16+CD36<sup>high</sup>) a CD163 je více exprimovaný naopak u protizánětlivých CD14+CD16- makrofágů (CD14+CD16-CD163+). Takto definované populace makrofágů jsme analyzovali ve vztahu k rizikovým faktorům kardiovaskulárních chorob.

Přítomnost obezity ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) vedla k významně vyššímu zastoupení prozánětlivých makrofágů ( $\text{CD14+CD16+}$ ,  $\text{CD14+CD16+CD36}^{\text{high}}$ ) pouze v případě SAT a nikoli ve VAT, ačkoli je zpravidla právě VAT spojována s rozvojem kardiovaskulárních a metabolických chorob (Gruzdeva et al., 2018). Je však třeba připustit, že se nejednalo o morbidně obézní skupinu, navíc většina z analyzovaných subjektů byli LKD ( $n = 16$ ) a v případě pacientů s PAD ( $n = 11$ ) není obezita hlavním rizikovým faktorem rozvoje choroby. Tyto dvě skupiny se ani významně nelišily v průměrném BMI. Na druhou stranu v případě VAT ostatní sledované rizikové faktory, pohlaví (muž), věk (nad 51 let), vedly k významnému zvýšení zastoupení prozánětlivě polarizovaných makrofágů.

Dále jsme zjistili, že proporce prozánětlivých makrofágů ve VAT roste s koncentrací nonHDL cholesterolu v krevní plasmě rostoucí zastoupení prozánětlivých makrofágů a to i v intervalu fyziologických hodnot ( $\text{nonHDL} < 4 \text{ mmol/l}$ ). V případě SAT byly tyto vztahy podobné, ale statisticky méně významné než v případě VAT. Obdobně v případě Bayesovské analýzy spojeného souboru, kde skupina LKD byla doplněna o pacienty s PAD, hypercholesterolemie signifikantně zvýšila zastoupení prozánětlivých makrofágů a zároveň snížila zastoupení populace protizánětlivě polarizovaných makrofágů ( $\text{CD14+CD16-CD163+}$ ) oproti tzv. nulové populaci bez kardiovaskulárních rizikových faktorů pouze ve VAT. Překvapivě léčba statiny naopak ve VAT signifikantně snížila proporce pro-zánětlivě polarizovaných makrofágů. Ale již dřívější publikace potvrzují pozitivní vliv léčby statiny nejen prostřednictvím redukce hladiny lipidů, ale i zánětu v těle (Kwon et al., 2017; Nissen et al., 2005; Park et al., 2008).

## Závěry

Díky unikátnímu projektu transplantace ledvin od žijících dárců (LKD) běžícího v IKEM se nám podařilo definovat fenotypy makrofágů v lidské tukové tkáni na základě povrchových znaků měřených průtokovou cytometrií. U takto definovaných populací jsme prokázali významné vazby s rizikovými faktory kardiovaskulárních chorob. Ukázali jsme negativní vliv pohlaví, věku, hypercholesterolemie a koncentrace nonHDL cholesterolu na zvýšené zastoupení prozánětlivých makrofágů ve VAT. Obezita se významně zvýšila proporci prozánětlivých makrofágů pouze v SAT. Analýza genové exprese ve VAT prokázala významné zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů u skupiny pacientů s PAD v porovnání se zdravými jedinci (LKD). Výsledky měření míry adheze monocytů k endotelu ovlivněnému ATCM potvrzují, že produkty tukové tkáně zvyšují míru adheze a tuková tkáň může přímo přispívat k jejich extravazaci z krevního oběhu do arteriální stěny. Míru adheze významně ovlivnily IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, RANTES a překvapivě i IL-10 (ale IL-10 předpokládaně protizánětlivý). Z našich měření vyplývá, že největší vliv na adhezibilitu monocytů k endotelu byl zjištěn u IL-1 $\beta$  s TNF- $\alpha$ .

## 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 anti-inflammatory cytokines, which contribute to the development of mild chronic inflammation essential for the development of atherosclerosis.

In samples of subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue (SAT, VAT, and PVAT, respectively) obtained from healthy subjects, 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 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . 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- $\beta$  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.

## Introduction

Atherosclerosis, or hardening of the arteries, is a chronic inflammatory disease characterized by an accumulation of lipid-rich lipoprotein particles to form plaques within the arteries. Although clinical symptoms do not appear until after several decades of atherosclerosis developing, one may predict based on the presence of risk factors, the risk of acute complications, the most frequent of which include myocardial infarction, stroke and peripheral artery disease (PAD). The parameters traditionally assessed include levels of triglycerides, low-density (LDL) and high-density lipoproteins (HDL) cholesterol including the ratio thereof, enzymes involved in lipid distribution within the vascular bed as well as concentrations of apolipoprotein A-I, apolipoprotein B-100, lipoprotein(a), fibrinogen levels and fibrinolytic capacity, with the other major cardiovascular risk factors including diabetes, smoking and obesity are also considered major cardiovascular risk factors.

Atherosclerosis is not only a passive accumulation of lipid particles, it is an active process with a crucial role played also by chronic inflammation, in addition to hyperlipidemia (Khot, et al., 2003; Libby, 2012; Ridker, 1999; Ridker, et al., 2002; Ross, et al., 1977). Macrophages are present in all phases of development of the atherosclerotic plaque from the formation of so-called fatty streaks up to highly calcified lesions. In fact, inflammatory processes accompany the entire process and, as the disease progresses, they lead up to the formation of necrotic lesions.

It is just the macrophages which accompany the process of atherosclerotic plaque formation since its very inception. Not only they link lipid metabolism and the inflammatory processes occurring in the lesions, they themselves significantly contribute to the development of chronic inflammation through the production of pro-inflammatory mediators (Duque, et al., 2014). Depending on the microenvironment where their differentiation occurs takes place, macrophages form a large range of phenotypes. They are traditionally divided into pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophages (M1 and M2 macrophages, respectively). The classification is based on a simplified in vitro model whereby stimulation by T-helper 1 cell (Th1) products leads to differentiation to pro-inflammatory M1 macrophages with typical nitric oxide (NO) synthase expression and production of pro-inflammatory cytokines while stimulation by T-helper 2 cell (Th2) products entails typically high expression of arginase and, rather, anti-inflammatory cytokines (Lu, et al., 2013; Mills, et al., 2000). It



should be emphasized that the above is a huge oversimplification. In particular, tissue macrophages express markers not consistent with the M1 or M2 classification; however, for the sake of simplicity, the populations of macrophages in human adipose tissue described in this doctoral thesis are referred to pro-inflammatory and anti-inflammatory ones.

The macrophages present in the arterial wall are essential for the uptake of LDL particles and their subsequent removal in a process called reverse cholesterol transport whereby the macrophages may also have a protective effect (Van Eck, et al., 2002). The process involves the efflux of excess cellular cholesterol from peripheral tissue to the liver via small HDL particles where excess cholesterol is converted into bile acids to be eliminated from the body (Rader, et al., 2009). While optimal amounts of cholesterol are essential for the cell, its excess has a cytotoxic effect. Furthermore, macrophages are involved in efferocytosis, i.e., the process of receptor-mediated phagocytosis of dying and dead cell and their residues. Should this mechanism fail, the debris of dead cells exacerbates local inflammation as a result of what is referred to as secondary necrosis (Schrijvers, et al., 2005). Increased accumulation of dead cells, combined with a massive buildup of excess lipids, resulting in the formation of the so-called necrotic core of the atherosclerotic plaque.

Monocyte migration to the vessel wall proceeds in a cascade-like manner. It is initiated by local endothelial activation associated with enhanced adhesion molecule expression on the endothelial surface stimulated by pro-inflammatory cytokines or shear stress of the bloodstream (Gerhardt, et al., 2015). The primary tethering and slowing down are called monocyte rolling. The monocytes on the endothelial surface are attached by selectins bindings, in particular, selectin P (SelP) and selectin E (SelE) and their glycoprotein selectin P ligand (Huang, et al., 2013; Martins, et al., 2007). The expression of SelP and SelE on the endothelial cell surface is enhanced by the stimulation of pro-inflammatory cytokines (Martins, et al., 2007). This reversible attachment of the monocyte to endothelial cells is subsequently strengthened by bonds of integrins and their immunoglobulin ligands, in particular, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule 1 (VCAM 1) and fibronectin (Imai, et al., 2010; Sen, et al., 2013; Tan, et al., 2000). The strongly adhering monocyte then migrates across the endothelial layer either via the paracellular pathway, i.e., between the cells, or via the

transcellular pathway, i.e., directly across the endothelial cell (Gerhardt, et al., 2015; Mamdouh, et al., 2009).

Adipose tissue produces molecules with endocrine action which are involved in the development of diseases related to metabolism and chronic inflammation (Kershaw, et al., 2004). Not only fully differentiated adipocytes are the source of these bioactive substances but, also, other types of cells making up adipose tissue and creating so-called stromal vascular fraction (SVF). SVF includes, among others, fibroblasts, stem cells, pre-adipocytes, and other cells as well as white blood cells such as macrophages capable of producing large amounts of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines depending on their polarization.

To summarize, while adipose tissue is known to contain a large proportion of macrophages, their phenotypes have not been clearly defined nor have their associations with cardiovascular disease been investigated in detail to date. Besides, adipose tissue has been shown to produce a number of bioactive substances, yet further research is warranted to determine whether this combination per se could directly activate the endothelium and, in turn, monocyte adhesion to the endothelium as the initial step in extravasation.

## **Aims of the study**

- ➔ To describe the phenotypes of macrophages in human adipose tissue and their relationship to the risk of developing cardiovascular disease.
- ➔ To compare the gene expression of pro-inflammatory cytokines in individual depots of adipose tissue (subcutaneous, SAT; visceral, VAT; and perivascular adipose tissue, PVAT) in living kidney donors (LKDs) and, further, to compare this gene expression with that in patients with established atherosclerosis of the peripheral artery disease (PAD).
- ➔ To determine the concentrations of cytokines released from the whole of VAT into adipose tissue conditioned media (ATCM). To assess, using ATCM, the effect of adipose tissue released products on monocyte adhesion to the endothelium and to measure changes in gene expression of adhesion molecules and cytokines in ATCM-treated endothelial cells.

## **Material and methodology**

Study participants were informed in detail about the purpose, goals and structure of the study and signed informed consent with their participation. The studies were approved by the joint Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital.

The values of the basal clinical and laboratory characteristics of LKDs were slightly more favorable than those of the randomized population sample reported in the post-MONICA study (Cifkova, et al., 2010). The average values of BMI and total cholesterol were lower in LKDs (for specific values, see relevant publications). The numbers of study participants with hypercholesterolemia and dyslipoproteinemia were negligible. In some of the analyses, the group of LKDs was complemented with patients with established peripheral artery disease (PAD). The group of PAD patients, while having clinical and laboratory values less favorable compared with LKDs, did not differ in average BMI.

### **Lipoprotein concentrations**

Prior to surgery, LKDs and PAD patients had fasting blood samples drawn (after at least 10-hour fasting), with plasma separated within 30 minutes of collection. Cholesterol and triglyceride levels were determined by a direct method using an HDL-C plus 3rd generation enzymatic kit (Roche) and a Cobas Mira+ autoanalyzer (Roche). Non-HDL cholesterol levels were calculated as the difference between total cholesterol and the HDL-cholesterol fraction. Data from LKDs and PAD patients were analyzed using identical methods.

### **Isolation of adipose tissue stromal vascular fraction (SVF)**

Samples of SAT, VAT and PVAT were obtained intraoperatively from living kidney donors during nephrectomy, and during peripheral artery reconstruction performed in patients with angiography-documented peripheral artery disease (PAD). The samples were obtained from the same sites in either group. VAT samples were obtained from the area outside Gerota's fascia, with PVAT samples retrieved from the area surrounding a renal artery. Once cleansed of all visible residues of fibrous tissue and vessels, adipose tissue was cut into small pieces (approx. 2 mm) and the samples were filtered and washed with phosphate-buffered solution (calcium- and magnesium-free PBS) to

remove residual blood. Cleansed tissue was incubated in a collagenase solution (2 mg/ml collagenase in PBS with 2% albumin added) and incubated in a water bath for approx. 15 mins at 37°C. The homogenate was subsequently filtered using a 50 µm filter and centrifuged. The stromal vascular fraction isolated in this fashion was analyzed by flow cytometry (CyAn; Beckman Coulter).

### **Flow cytometry**

To distinguish individual phenotypes of monocytes/macrophages, monoclonal antibodies with attached fluorochromes were used (CD14, Phycoerythrin-Cyanine, CD16, Phycoerythrin-Texas Red X, CD36, FITC, CD163 Phycoerythrin, PE/Clone RM 3/1). Data were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter). Viability of the analyzed cells was assessed using 7-AAD (7-aminoactinomycin D), with only samples with viability over 75% were included in analyses. The gate for dividing the CD16+ and CD16- populations was defined as clearly visible transition zone in blood samples obtained in parallel from the same individual.

### **Gene expression in adipose tissue**

For analysis of adipose tissue gene expression, adipose tissue samples were frozen immediately after collection in liquid nitrogen at -80°C until analysis. RNA from an approx. 200 mg of adipose tissue was isolated using TRIzol Reagent (Molecular Research Centre). Regarding the treated endothelial cells analyzed study, RNA was isolated using an RNeasy Plus mini kit (Qiagen). Upon removal of residual DNA with DNase I (Sigma Aldrich), cDNA was transcribed according to manufacturer's instructions using a High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix kit (Life Technologies), with the rate of expression of the studied cytokines subsequently determined by means of using Corbett Life Science Rotor Gene 3000 (Qiagen) and 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne).

The genes analyzed in adipose tissue included those for TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), MCP-1 (CCL2, C-C motif chemokine ligand 2) and IL-6, with beta-2-microglobulin (B2M) used as housekeeper. The rate of expression of the genes studied was compared among the individual adipose tissue depots (SAT, VAT, PVAT) and, at the same time, between LKDs and patients with established peripheral arterial disease (PAD).

Analysis of gene expression in endothelial cells was analyzing the following genes MCP-1, IL-6, nitric oxide synthase 3 (NOS3), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), SelE, ICAM-1, VCAM-1, with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) used as housekeeper. Relative gene expression was assessed using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method (Pfaffl, 2001) adjusted for negative control (not stimulated cells).

### **Conditioned media**

For analysis of the influence of adipose tissue products on monocyte adhesion to the endothelium, so called conditioned media were prepared to subsequently treat endothelial cells in an *in vitro* model. Samples of VAT obtained from LKDs were cleansed, under aseptic conditions, to remove all visible fibrous tissue, vessels and residual blood. Next, the cleansed adipose tissue samples cut into small pieces (2 mm<sup>3</sup>) were incubated in corresponding amounts of culture media (1 g VAT, or more accurately SVF isolated from 1 g of VAT in 1 ml EBM-2 Lonza solution with 0.2% fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma Aldrich)) for 24 hours. Conditioned media from VAT (ATCM) were used for adhesiveness analysis.

The collected conditioned media (ATCM and SVFCM) were stored at -80°C until further analyses.

### **Measurement of monocyte adhesion to the endothelium**

In our adhesion model, the rate of adhesion was assessed based on the intensity of fluorescence of THP-1 monocytes (ECACC 88081201) adhered to treated endothelial cells (primary HUVEC [Human Umbilical Vein Cells] line, Lonza, lot. 369948).

The THP-1 cells were cultured in RPMI-1640 (Biosera) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco™), 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Biosera). HUVEC cells were cultured in an endothelial cell grow medium-2 BulletKit (Lonza, CC-3156 & CC-4176).

A fully confluent layer of endothelial cells was treated with 5% ATCM (or, alternatively, SVFCM) in EBM-2 with 2% FBS in hexaplicate in 96-well black plates with clear bottom, with TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, R&D Systems) used as positive control. After 24 hours, the medium was collected and calcein-AM (calcein-acetoxymethyl, Molecular Probes)-labeled THP-1 cells added. Following 30-min incubation, monocytes were washed away

to assess the level of monocyte adhesion to endothelial cells based on fluorescence intensity.

#### **Cytokine concentrations measured in conditioned media and blood serum**

Concentrations of cytokines IL-1 $\beta$ , MCP-1, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-4, IL-5, IL-10, CXCL5 and RANTES in conditioned media were measured using Luminex performance assay (R&D Systems, Inc.). Plates were read using a Luminex 100 analyzer (PerkinElmer Life, Inc.) and analyzed using xPONENT software (Luminex). Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test.

#### **Hs-CRP**

High-sensitivity CRP (hsCRP) was determined by immunoturbidimetry (Cobas Mira Plus, Roche).

## Results and discussion

The main goals of the present doctoral thesis were to verify whether human adipose tissue products can directly affect monocyte adhesion to the endothelial cells as the initial step in their migration to the vessel and/or farther to the site of inflammation, and to describe polarized macrophage phenotypes in human adipose tissue and their relationship to cardiovascular risk factors.

In our analyses of the gene expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6) in SAT, VAT and PVAT both in LKDs and PAD patients, we documented higher rates of gene expression in the group of patients with PAD compared with LKDs. In VAT, the rates of gene expression were shown to be significantly higher in all genes analyzed in PAD patients compared with LKDs. While the changes occurring in SAT showed the same trend, no difference reached statistical significance. In PVAT, significantly higher rates of gene expression were observed with IL-6 and, although, in the remaining genes, the average values in PAD patients higher than those in LKDs, they did not reach limits of significance. No association between gene expression and cardiovascular risk factors was found. The presumably pro-inflammatory changes in VAT are also consistent with the plasma levels of pro-inflammatory markers, i.e., TNF- $\alpha$  and hsCRP. Our results thus support the important role of VAT in the development of atherosclerosis.

To determine whether or not adipose tissue can affect macrophage migration from the circulation, we developed a model of monocyte adhesion to the endothelium. The model uses media obtained by VAT incubation in a culture medium *in vitro*. ATCM significantly increased the level of monocyte adhesion to endothelial cells. The level of adhesion increased proportionately to the concentrations of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.82$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.70$ ), MCP-1 ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.69$ ), RANTES (CCL2,  $p < 0.01$ ,  $r = 0.54$ ) and, quite surprisingly, also IL-10 ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.67$ ) as measured in ATCM. The finding is consistent with their pro-atherogenic and pro-inflammatory effect, with the exception of IL-10 (Ait-Oufella, et al., 2011; Henrichot, et al., 2005; Lin, et al., 2014; Virani, et al., 2011). Likewise, our data are consistent with those reported in an earlier Henrichot's study focused on the chemotactic effect of ATCM (except for MCP-1, not shown to have such a strong effect in our analysis) (Henrichot, et al., 2005). However, given the fact that MCP-1 is primarily involved in chemotaxis as such – as proposed by Henrichot – it may not necessarily activate endothelial cells. Quite surprisingly, increasing concentrations of anti-inflammatory IL-10 in ATCM were significantly associated with

increasing levels of monocyte adhesion to endothelial cells. While data reported by other authors (Gimeno, et al., 2003; Mtairag, et al., 2001) suggest a possible pro-inflammatory effect of IL-10, stimulation of endothelial cells by IL-10 alone had no significant effect on the rate of adhesion, with the implication being synergy with another component of ATCM was at play.

Co-culture with ATCM was significantly associated with enhanced gene expression in endothelial cells of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) thus supporting the validity of our results of increased rate of monocyte adhesion to endothelial cells. Furthermore, there was an increase in the gene expression of pro-inflammatory IL-6 and, conversely, a decrease in the gene expression of anti-inflammatory TGF- $\beta$ . A local increase in expression toward pro-inflammatory activity may contribute to polarization of migrating monocytes/macrophages towards pro-inflammatory action (Lockett-Chastain, et al., 2016).

Unlike inhibition of MCP-1 and RANTES, selective inhibition of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in ATCM resulted in a significant decrease in the rate of monocyte adhesion to the endothelium as well as a decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules. It is thus presumably the two cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) which are the main cytokines released by adipose tissue and affecting most monocyte adhesion to endothelial cells.

We were also interested to see whether the predominant amount of cytokines in ATCM is produced by adipocytes or by SVF. Higher concentrations of MCP-1, RANTES, IL-6 and IL-10 were measured in ATCM compared to SVFCM, on contrary concentrations of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were the same or slightly higher in the SVFCM compared to ATCM. Our data clearly show that MCP-1, RANTES, IL-6 and IL-10 are formed predominantly in adipocytes. On the other hand IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are produced by cells of SVF. Possibility of cytokine diffusion from adipose tissue to ATCM must be considered, whereas cytokines measured in SVFCM mirror their production by SVF cells into the medium. Consistent with previous reports, one may assume that it is just macrophages that may be the source of a significant proportion of this production by cells comprising SVF (Bing, 2015; Sims, et al., 2010; Vicennati, et al., 2002; Weisberg, et al., 2003).

Adipose tissue macrophages exhibit high variability. Based on a literature search, we selected for analysis of macrophages in human adipose tissue the basic markers assessed also in the monocytes CD14 and CD16 (CD14+16-, CD14+16+) (Ajami, et al.,



2018; Coen, et al., 2010; Thaler, et al., 2016). These basic markers were complemented by CD36, a scavenger receptor involved both in cholesterol and lipid transport and phagocytosis, and by CD163, generally considered a marker of M2 polarized macrophages (Barros, et al., 2013). It turned out that CD36 is highly expressed in a proportion of pro-inflammatory CD14+CD16+ macrophages (CD14+CD16+CD36<sup>high</sup>) and, conversely, CD163 is highly expressed in anti-inflammatory CD14+CD16-macrophages (CD14+CD16-CD163+). The populations of macrophages defined in this manner were subsequently analyzed in relation to cardiovascular risk factors.

In our subjects, obesity (BMI  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) was associated with a significantly higher proportion of pro-inflammatory macrophages (CD14+CD16+, CD14+CD16+CD36<sup>high</sup>) only in SAT, but not in VAT, although it is just VAT which has been implicated in the development of cardiovascular and metabolic disease (Gruzdeva, et al., 2018). Admittedly, our study participants were not morbidly obese, in addition most of the obese subjects were LKDs (n = 16) while, in PAD patients (n = 11) obesity is the not the main risk factor for the development of PAD. Moreover, the two groups did not even differ in their average BMI. On the other hand, in the case of VAT, the other risk factors assessed, i.e., male sex and age (over 51 years) were associated with a significant increase in the proportion of pro-inflammatory polarized macrophages.

Another observation made in our study was that the proportion of pro-inflammatory macrophages in VAT increases with increasing plasma concentrations of nonHDL cholesterol, yet within physiological values (nonHDL < 4 mmol/l). A similar correlation was seen in SAT, yet statistically less significant compared with VAT. Similarly, in Bayesian analysis, where the group of LKDs was complemented with PAD patients, hypercholesterolemia significantly increased the proportion of pro-inflammatory macrophages while decreasing the proportion of the population of M2 polarized macrophages (CD14+CD16-CD163+) versus the so-called zero population, i.e., one without any cardiovascular risk factors. While, surprisingly, statin therapy in VAT significantly decreased the proportion of M2 polarized macrophages. Even earlier reports confirmed the beneficial effect of statin therapy not only due to reduction of lipid levels but, also inflammation in the body (Kwon, et al., 2017; Nissen, et al., 2005; Park, et al., 2008).

## Conclusion

Thanks to the unique project of kidney transplantation using organs from living kidney donors (LKDs) currently ongoing at IKEM, we were able to define phenotypes of macrophages in human adipose tissue based on surface markers measured by flow cytometry. In the defined populations, we have documented significant associations with cardiovascular risk factors. We have demonstrated the adverse effects of sex, age, hypercholesterolemia and non-HDL cholesterol concentrations on increased proportions of pro-inflammatory macrophages in VAT. Obesity significantly increased the proportion of pro-inflammatory macrophages only in SAT. Analysis of gene expression in VAT showed a significant increase in the expression of pro-inflammatory cytokines in PAD patients compared with healthy individuals (LKDs). Our data on the rate of monocyte adhesion to the ATCM-treated endothelium show that adipose tissue products increase the level of adhesion and that adipose tissue may directly contribute to their extravasation from the circulation to the arterial wall. The level of adhesion was significantly affected by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, RANTES and, surprisingly, also by IL-10 (given its presumably anti-inflammatory action). Our measurements using selective inhibitors suggest that the strongest effect on the level of monocyte adhesion to the endothelium is exerted by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

## Použitá literatura / References

- Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z., & Tedgui, A. (2011). Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 31(5), 969-979. doi: 10.1161/Atvbaha.110.207415
- 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
- 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
- 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
- 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
- Duque, G. A., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5, 1-12. doi: ARTN 491 10.3389/fimmu.2014.00491
- 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.
- 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 218 10.1186/s12944-018-0856-8
- Henrichot, E., Juge-Aubry, C. E., Pernin, A. S., Pache, J. C., Velebit, V., Dayer, J. M., . . . Meier, C. A. (2005). Production of chemokines by perivascular adipose tissue - A role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 25(12), 2594-2599. doi: 10.1161/01.Atv.0000188508.40052.35
- Huang, J. F., Wang, R. F., Liu, X. M., Zeng, X. L., & Wei, M. (2013). Sulfochitosan inhibits P-selectin-mediated HL-60 leukocyte adhesion under flow conditions. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 18(2), 200-208. doi: 10.2478/s11658-013-0084-1
- 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
- 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
- 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
- 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

- Libby, P. (2012). Inflammation in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 32(9), 2045-2051. doi: 10.1161/Atvbaha.108.179705
- Lin, J. T., Kakkar, V., & Lu, X. J. (2014). Impact of MCP-1 in Atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 20(28), 4580-4588. doi: Doi 10.2174/1381612820666140522115801
- 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.
- 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
- Martins, P. D., Garcia-Vallejo, J. J., van Thienen, J. V., Fernandez-Borja, M., van Gils, J. M., Beckers, C., . . . Zwarginga, 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
- 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
- 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.
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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., 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
- Ross, R., Glomset, J., & Harker, L. (1977). Response to Injury and Atherogenesis. *American Journal of Pathology*, 86(3), 675-684.
- 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
- 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
- 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
- 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
- Van Eck, M., Bos, I. S. T., Kaminski, W. E., Orso, E., Rothe, G., Twisk, J., . . . Schmitz, G. (2002). Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6298-6303. doi: 10.1073/pnas.092327399
- 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
- Virani, S. S., Nambi, V., Hoogeveen, R., Wasserman, B. A., Coresh, J., Gonzalez, F., . . . Ballantyne, C. M. (2011). Relationship between circulating levels of RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed, and secreted) and carotid plaque characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRI Study. *European Heart Journal*, 32(4), 459-468. doi: 10.1093/eurheartj/ehq367
- 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

# Životopis

## Vzdělání

2014 – nyní	<b>UK PŘF, Doktorský program - Fyziologie živočichů</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Disertační práce: Adheze monocyte k endotelu v aterogenezi</li><li>• SZK: Buněčná fyziologie, Lipidy a buněčné membrány, Buňky a tkáně in vitro, Bioenergetika a metabolismus</li></ul>
2012 – 2014	<b>UK PŘF, Magisterské studium - Fyziologie živočichů</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Diplomová práce: Úloha perivaskulární tukové tkáně v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění</li><li>• SZK: Imunologie, Animal and Human Physiology and Cell Physiology</li></ul>
2009 – 2012	<b>UK PŘF, Bakalářské studium - Biologie</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Bakalářská práce: Endotelinový systém a úloha soli v hypertenzi</li><li>• SZK: Buněčná a molekulární biologie</li></ul>
2005 – 2009	Gymnázium Ch. Dopplera <ul style="list-style-type: none"><li>• Zaměření: Matematika a fyzika</li></ul>

---

## Kurzy a konference

Květen 2019	<b>87th EAS Congress, Maastricht, Nizozemsko</b> Prezentace v sekci: Moderovaný poster
Květen 2018	<b>86th EAS Congress, Lisabon, Portugalsko</b> Prezentace v sekci: Science at a glance
Duben 2017	<b>85th EAS Congress, Praha, ČR</b> Prezentace v sekci: Moderovaný poster
Květen 2016	<b>84th EAS Congress, Innsbruck, Rakousko</b> Prezentace v sekci: Moderovaný poster
Březen 2016	<b>EAS Advance Course on AIL, Amsterdam</b> Crossroad of Atherosclerosis, Immunology and Lipids
Prosinec 2015	<b>19. KONGRES O ATEROSKLERÓZE (19th Atherosclerosis Congress)</b> Oral presentation
Srpen 2015	<b>International Atherosclerosis Research School in Prague</b>
Září 2015	<b>Symposium Triglyceridy a ateroskleróza</b> Prezentace
Prosinec 2014	<b>18. KONGRES O ATEROSKLERÓZE</b> Posterová sekce

---

## Zkušenosti

Srpen 2017-Únor 2018	Stáž – Leidenská univerzita, Cardiovascular and metabolic therapeutics at the Division of BioTherapeutics, pod vedením prof. Mirandy van Eck
2012 – nyní	Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

---

## Úspěchy

2016 - 2018	Granotvá agentura Univerzity Karlovy (GAUK) Získaný grant na projekt: Vliv bioaktivních produktů tukové tkáně na adhezi monocytů k endotelu
2016, 2017, 2018	Young investigator fellowship na 84.-86. EAS Congress

---

# *Curriculum vitae*

## EDUCATION

- 2014 – Present **Charles University, Faculty of Science, Doctoral Programme**
- Thesis: Monocyte adhesion to endothelial cells in atherosclerosis
  - Final Examination: Cell Physiology, Lipids of Biological Membranes, Cells and Tissues in vitro, Bioenergetics and metabolism
- 2012 – 2014 **Charles University, Faculty of Science**
- Master Degree in Animal and Human Physiology
  - Thesis: The role of perivascular adipocytes in the development of atherosclerosis and heart disease, depending on metabolic syndrome
  - Final Examination: Immunology, Animal and Human Physiology and Cell Physiology
- 2009 – 2012 **Charles University, Faculty of Sciences – specialising in Biology**
- Bachelors thesis: The role of the endothelin system and the role of salt in the development of hypertension
  - Final Examination: Molecular and Cellular Biology
- 2005 – 2009 **Secondary School – Ch. Doppler secondary grammar school in Prague**
- Department of Mathematics and Physics

---

## COURSES AND CONGRESSES

- May 2019 **87<sup>th</sup> EAS Congress, Maastrich, Netherlands**  
Poster presentation
- May 2018 **86<sup>th</sup> EAS Congress, Lisbon, Portugal**  
Science at a glance
- April 2017 **85<sup>th</sup> EAS Congress, Prague, Czech Republic**  
Abstract presentation
- May 2016 **84<sup>th</sup> EAS Congress, Innsbruck, Austria**  
Abstract presentation
- March 2016 **EAS Advance Course on AIL, Amsterdam**  
Crossroad of Atherosclerosis, Immunology and Lipids
- December 2015 **19. KONGRES O ATEROSKLERÓZE (19<sup>th</sup> Atherosclerosis Congress)**  
Oral presentation
- August 2015 **International Atherosclerosis Research School in Prague**
- September 2015 **Symposium Triglyceridy a ateroskleroza (Triglycerides and Atherosclerosis Symposium)**  
Oral presentation
- December 2014 **18. KONGRES O ATEROSKLERÓZE (18<sup>th</sup> Atherosclerosis Congress)**  
Poster presentation

---

## EXPERIENCE AND PRACTICE

- Aug 2017-Feb 2018 Traineeship** - Leiden University, Cardiovascular and metabolic therapeutics at the Division of BioTherapeutics
- 2012 – present** Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague Czech republic

---

## ACHIEVEMENTS

### 2016 - 2018

#### **Grant Agency of Charles University (GAUK)**

Financial support for my project: Effect of bioactive products of adipose tissue on the adhesion of monocytes to the endothelium.

2015-2018 Young investigator fellowship for 84<sup>th</sup>, 85<sup>th</sup> a 86<sup>th</sup> EAS Congress

---

## Seznam publikací

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

**Cejkova S**, Kubatova H, Thieme F, Janousek L, Fronek J, Poledne R, Kralova Lesna I. Cell Adh Migr. 2019 IF 3,30

*Zavedení metody, příprava a nasbírání vzorků, plánování, provádění a analýza experimentů, příprava manuskriptu*

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

*Příprava a nasbírání vzorků, plánování, provádění a analýza experimentů, příprava manuskriptu*

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

**Cejkova S**, Kralova Lesna I, Poledne R. Cor Et Vasa 2016

*Příprava přehledného článku*

Cardiovascular disease predictors and adipose tissue macrophage polarization: Is there a link? Kralova Lesna I, Petras M, **Cejkova S**, Kralova A, Fronek J, Janousek L, Thieme F, Tyll T, Poledne R. Eur J Prev Cardiol. 2018 IF = 4,54

*Získání dat a kritické zhodnocení manuskriptu*

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

Poledne R, Kralova Lesna I, Kralova A, Fronek J, **Cejkova S**. J Lipid Res. 2016 IF = 4,81

*Získání dat a kritické zhodnocení manuskriptu*

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

Lesna IK, **Cejkova S**, Kralova A, Fronek J, Petras M, Sekerkova A, Thieme F, Janousek L, Poledne R. Nutr Diabetes. 2017 IF = 2,74

*Získání dat a kritické zhodnocení manuskriptu*

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

Kralova Lesna I, Kralova A, **Cejkova S**, Fronek J, Petras M, Sekerkova A, Thieme F, Janousek L, Poledne R. J Transl Med. 2016 IF = 3,79

*Získání dat a kritické zhodnocení manuskriptu*

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

*Získání dat a kritické zhodnocení manuskriptu*

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



Thieme F, Janousek L, Fronek J, Kralova A, **Cejkova S**, Kralova Lesna I, Poledne R. *Physiol Res.* 2015 IF = 1,64

*Získání dat a kritické zhodnocení manuskriptu*

Adipose tissue and atherosclerosis.

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

*Získání dat a kritické zhodnocení manuskriptu*

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