

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Barbora Muffová

Vliv statinů na polarizaci makrofágů *in vitro*

Effect of statin treatment on macrophage polarisation *in vitro*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Soňa Kauerová, Ph.D.

Praha, 2022

PROHLÁŠENÍ

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

V Praze dne 24.4.2022

Bc. Barbora Muffová

.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych nejprve ráda poděkovala své školitelce RNDr. Soně Kauerové, Ph.D. za věnovaný čas, odborné vedení této práce, a především za její trpělivost v počátcích mé práce. Velké díky patří také kolegyni Mgr. Haně Bartuškové, bez jejíž pomoci bych tuto diplomovou práci nebyla schopná včas dokončit. Za její ochotu, cenné rady i čas, který mi poslední rok věnovala. Dále děkuji MUDr. Ivaně Králové-Lesné, Ph.D. a Prof. Ing. Rudolfovi Poledne, CSc. za jejich cenné rady. Chtěla bych poděkovat celému týmu laboratoře pro výzkum aterosklerózy za vytvoření takových pracovních podmínek, díky nimž jsem znovu začala uvažovat o kariéře ve vědecké sféře. Velké díky patří mojí rodině, která mi studium umožnila a která mě po celou dobu studia bezvýhradně podporovala. V neposlední řadě děkuji svým nejbližším přátelům, kteří mi vždy byli neochvějnou oporou.

ABSTRAKT

Statiny jsou pro svůj významný hypolipidemický efekt využívány jako léčiva aterosklerózy od 90. let 20. století a navzdory nově se vyvíjejícím možnostem léčby jsou stále první volbou při primární i sekundární prevenci v léčbě kardiovaskulárních chorob. Začátek 21. století přinesl také důkazy o antiinflamačním efektu těchto léčiv, který se zdá být nezávislý na jejich již zmíněném hypolipidemickém účinku.

Tato diplomová práce se zabývá vlivem statinů na polarizaci makrofágů v *in vitro* prostředí. K analýzám byly využity makrofágy diferencované z monocytů periferní krve. Pomocí průtokové cytometrie byl stanoven efekt statinové terapie na expresi povrchových znaků (CD16, CD15, CD36, CD163, CD206, ABCA-1 a Trem-2), metodou qPCR byl stanoven efekt statinů na genovou expresi prozánětlivých genů (NFκB, IL-1β, IL-6, TNFα a iNOS), protizánětlivých genů (Arg-1, TGFβ) a genů typických pro proteiny zprostředkovávající adhezi a transmigraci monocytů a makrofágů do intimy cévy (VCAM-1 a MCP-1). Pomocí Griessovy metody byl kvantifikován efekt statinů na aktivitu iNOS a v neposlední řadě byl sledován jejich vliv na uvolňování prozánětlivých cytokinů (IL-1β, IL-6 a TNFα) a protizánětlivého cytokinu IL-10.

Pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že statiny snižují expresi znaků CD15, CD36, ABCA-1, Trem-2 a CD163, naopak exprese znaku CD206 byla působením statinů zvýšena. Metodou qPCR byl prokázán signifikantní vliv statinové terapie na snížení genové exprese NFκB, IL-1β, IL-6 a iNOS u M1 makrofágů ve srovnání s nestimulovanými M1 makrofágy. Zejména v případě M2 makrofágů, statiny zvýšily expresi protizánětlivých znaků Arg-1 a TGFβ. Ovlivněna byla také exprese VCAM-1 a MCP-1 u všech sledovaných subpopulací makrofágů. Griessovou metodou byl prokázán statisticky pokles aktivity enzymu iNOS u M1 makrofágů působením statinové terapie v srovnání s nestimulovanými M1 makrofágy. To je v souladu s výsledky analýzy genové exprese. V neposlední řadě byl prokázán signifikantní vliv na snížení uvolňování zánětlivých cytokinů IL-1β, IL-6 a TNFα a zvýšení produkce protizánětlivého IL-10 u všech sledovaných fenotypů.

Výsledky této práce prokazují antiinflamační efekt statinů na markery zánětu a prokazují také jejich schopnost přímo podpořit znaky spojované s protizánětlivým fenotypem imunitní reakce. Tato práce přispívá k bližšímu pochopení vlivu statinové terapie na zánětlivý profil makrofágů a rozšiřuje tak současné poznatky o antiinflamačním efektu statinů nezávisle na jejich hypolipidemické schopnosti.

Klíčová slova: statiny, makrofágy, polarizace, zánět

ABSTRACT

Statins are widely used for their eminent hypolipidemic effect as anti-atherosclerotic drugs from the 90's of the 20th century. Even though there are new approaches, statins are still the first choice in the prevention of cardiovascular diseases. At the beginning of the 21st century, the anti-inflammatory effect independent of lipid-lowering properties was discovered.

This diploma thesis deals with the effect of statin treatment on macrophage polarisation *in vitro*. Macrophages differentiated from blood monocytes were used in this thesis. The effect of statin treatment on the expression of surface markers (CD16, CD15, CD36, CD163, CD206, ABCA-1 and Trem-2) was evaluated by flow cytometry. The qPCR method was used to quantify the effect of statin treatment on the gene expression of inflammatory genes (NFκB, IL-1β, IL-6, TNFα and iNOS), anti-inflammatory genes (Arg-1, TGFβ) and genes which play a role in the adhesion and migration of monocytes and macrophages to vessel intima (VCAM-1 and MCP-1). Griess method was used to evaluate the effect of statin treatment on the inducible NO-synthase activity. Last, but not least, the effect of statin treatment on proteosynthesis of inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6 a TNFα) and anti-inflammatory cytokine IL-10 was measured.

Flow cytometry results show that statins decrease the expression of CD15, CD36, ABCA-1, Trem-2 and CD163. The expression of CD206 was significantly increased on M2 macrophages under the statin treatment. qPCR analysis showed a significant effect of statin therapy on reducing the gene expression of the inflammatory markers NFκB, IL-1β, IL-6 and iNOS in M1 macrophages, enhancing the expression of anti-inflammatory markers Arg-1 and TGFβ. The gene expression of VCAM-1 and MCP-1 was also altered. The significant effect of statins on the iNOS activity in M1 macrophages was proved by Griess method. This result is congruent with the gene expression analysis results. Finally, the levels of pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6 and TNFα released by all macrophage subtypes were reduced under the statin treatment. The production of anti-inflammatory cytokine IL-10 by M1 and M2 macrophages was significantly elevated under the statin treatment.

The results presented in this thesis prove the anti-inflammatory effect of statins on the inflammatory markers and prove the direct ability of statins to enhance the expression and/or production of markers connected with the anti-inflammatory phenotype of immune reaction. This thesis contributes to a closer understanding of the effect of statin therapy on the inflammatory profile of macrophages and expand current knowledge about the anti-inflammatory effect of statins regardless of their hypolipidemic ability.

Key words: statins, macrophages, polarisation, inflammation

Seznam použitých zkratek

<i>ABCA-1</i>	<i>ATP (adenosine triphosphate)-binding cassette A1</i>	
<i>APC</i>	<i>Allophycocyanin</i>	
<i>β2m</i>	<i>Beta-2 microglobulin</i>	<i>Beta-2 mikroglobulin</i>
<i>CCL</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>	<i>Chemokin s C-C motivem (ligand)</i>
<i>CCR</i>	<i>Chemokine (C-C motif) receptor</i>	<i>Receptor chemokinů s C-C motivem</i>
<i>CD</i>	<i>Cluster of differentiation</i>	<i>Diferenční skupina</i>
<i>COVID-19</i>	<i>Coronavirus disease-19</i>	<i>Onemocnění koronaviru-19</i>
<i>CXCL</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>	<i>Chemokin s C-X-C motivem (ligand)</i>
<i>CXCR</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor</i>	<i>Receptor chemokinů s C-X-C motivem</i>
<i>DEPC</i>	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>	<i>Diethyl pyrokarbonát</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	<i>Dimethyl sulfoxid</i>
<i>DNA</i>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	<i>Deoxyribonukleová kyselina</i>
<i>DNase I</i>	<i>Deoxyribonuclease I</i>	<i>Deoxyribonukleáza I</i>
<i>dNTPs</i>	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>	<i>Deoxyribonukleotid trifosfát</i>
<i>ECD</i>	<i>Phycoerythrin-Texas Red-X</i>	
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>	
<i>ERK</i>	<i>Extracellular signal-regulated kinasesmap</i>	
<i>FACS</i>	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>	<i>Fluorescenční průtoková cytometrie</i>
<i>FBS</i>	<i>Fetal bovine serum</i>	<i>Fetální hovězí sérum</i>
<i>FBS</i>	<i>Fetal bovin serum</i>	<i>Fetální hovězí sérum</i>
<i>FITC</i>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>	
<i>FMO</i>	<i>Fluorescence minus one</i>	
<i>FVD</i>	<i>Fixable Viability Dye</i>	<i>Barva pro detekci životnosti</i>
<i>GLN</i>	<i>Glutamine</i>	<i>Glutamin</i>
<i>GVHD</i>	<i>Graft versus host disease</i>	<i>Reakce štepu vůči hostiteli</i>
<i>HDL</i>	<i>High-density lipoprotein</i>	<i>Lipoprotein s vysokou hustotou</i>
<i>HMG-CoA</i>	<i>Hydroxymethyl-glutaryl-Coenzyme A</i>	<i>Hydroxymetyl-glutaryl-Koenzym A</i>
<i>hsCRP</i>	<i>High sensitivity C-reactive protein</i>	<i>Vysokosenzitivní C- reaktivní protein</i>
<i>IBD</i>	<i>Inflammatory bowel disease</i>	<i>Zánětlivé onemocnění střev</i>
<i>IFN_γ</i>	<i>Interferon gamma</i>	<i>Interferon gama</i>
<i>IRAK-1</i>	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>	<i>Kináza asociovaná s receptorem interleukinu 1</i>
<i>iNOS</i>	<i>Inducible NO (nitric oxide) synthase</i>	<i>Inducibilní NO (oxid dusnatý) syntáza</i>
<i>JAK</i>	<i>Janus kinase</i>	<i>Janusova kináza</i>
<i>JNK</i>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>	<i>c-Jun N-terminální kináza</i>
<i>LDL</i>	<i>Low-density lipoprotein</i>	<i>Lipoprotein s nízkou hustotou</i>
<i>LPS</i>	<i>lipopolysaccharide</i>	<i>Lipopolysacharid</i>
<i>MAP</i>	<i>Mitogen-activated protein</i>	<i>Mitogenem aktivovaný protein</i>
<i>MARCO</i>	<i>Macrophage receptor with collagenous structure</i>	<i>Makrofágový receptor s kolagenní strukturou</i>
<i>MCP-1</i>	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>	<i>Chemotaktický protein makrofágů I</i>
<i>M-CSF</i>	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>	<i>Faktor stimulující kolonie makrofágů</i>
<i>MFI</i>	<i>Mean fluorescence intensity</i>	<i>Průměr intenzity fluorescence</i>
<i>MHC II</i>	<i>Major histocompatibility complex class II</i>	<i>Hlavní histokompatibilní komplex II</i>

<i>MIP-3α</i>	<i>Macrophage-inflammatory protein-3α</i>	<i>Zánětlivý protein 3α produkovaný makrofágy</i>
<i>MuLV</i>	<i>Murine leukemia virus</i>	<i>Virus myší leukémie</i>
<i>MyD88</i>	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>	
<i>NADPH</i>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	<i>Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát</i>
<i>NED</i>	<i>N-(1-naphthyl)ethylenediamin</i>	<i>N-(1- naftyl) ethylendiamin</i>
<i>NKT</i>	<i>Natural killer T cells</i>	
<i>NLRP3</i>	<i>NOD (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors)-like pyrin receptor containing pyrin 3</i>	
<i>NOS</i>	<i>Reactive nitric species</i>	<i>Reaktivní formy dusíku</i>
<i>Nox</i>	<i>NADPH oxidase</i>	<i>NADPH oxidáza</i>
<i>P/S</i>	<i>Penicilin/ Streptomycin</i>	<i>Penicil/ Streptomycin</i>
<i>PBMC</i>	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>	<i>Mononukleární buňky periferní krve</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate-buffered saline</i>	<i>Fosfátový pufr</i>
<i>PC7</i>	<i>Phycoerythrin Cyanin 7</i>	
<i>PCSK9</i>	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>	
<i>PE</i>	<i>Phycoerythrin</i>	
<i>PPAR-γ</i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>	
<i>PRR</i>	<i>Pattern recognition receptor</i>	<i>Vzor rozpoznávající receptor</i>
<i>qPCR</i>	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>	<i>Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonucleic acid</i>	<i>Ribonukleová kyselina</i>
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxygen species</i>	<i>Reaktivní formy kyslíku</i>
<i>SR</i>	<i>Scavenger receptor</i>	<i>Scavengerový receptor</i>
<i>STAT</i>	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	
<i>TGFβ</i>	<i>Tumor growth factor β</i>	<i>Růstový faktor nádoru β</i>
<i>Th1/2/17</i>	<i>Type T-helper 1/2/17</i>	<i>Pomocné T buňky typu 1/2/17</i>
<i>TLR</i>	<i>Toll-like receptor</i>	<i>Toll podobný receptor</i>
<i>TNFα</i>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	<i>Faktor nádorové nekrózy</i>
<i>Treg</i>	<i>Regulatory T- lymphocytes</i>	<i>Regulační T lymfocyty</i>
<i>TREM-2</i>	<i>Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2</i>	
<i>VCAM-1</i>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>	<i>Vaskulární adhezni molekula</i>

OBSAH

1	ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1	Ateroskleróza	3
2.1.1	Mechanismus vzniku	3
2.1.2	Makrofágy a ateroskleróza	7
2.1.2.1	Fenotypová rozmanitost makrofágů	7
2.1.2.1.1	M1 a M2a makrofágy	9
2.2	Statiny	11
2.2.1	Antiinflamační a antioxidační účinek statinů	12
2.2.1.1	Mechanismus antiinflamačního a antioxidačního vlivu statinů	13
2.2.2	Možnosti klinického využití statinů	15
3	MATERIÁLY	17
3.1	Základní roztoky	17
3.2	Použité chemikálie, reagenty a protilátky	17
3.3	Kity a přístroje	17
4	METODIKA	19
4.1	Izolace PBMC a oddělení CD14 ⁺ buněk	19
4.2	Stimulace CD14 ⁺ buněk M-CSF a jejich následná polarizace	19
4.3	Kvantifikace povrchových znaků metodou FACS	20
4.3.1	Značení buněk pro průtokovou cytometrii a příprava FMO kontrol	20
4.4	Stanovení genové exprese metodou qPCR	21
4.4.1	Izolace RNA	21
4.4.2	Reverzní transkripce	22
4.4.3	Příprava primerů a samotná qRT-PCR reakce	22
4.5	Kvantifikace aktivity iNOS Griessovou metodou	24
4.5.1	Redukce dusičnanů	24
4.5.2	Deproteinizace	24
4.5.3	Příprava Griessova činidla a pracovní postup samotné Griessovy reakce	25
4.6	Kvantifikace cytokinů ELISA testy	26
5	STATISTICKÁ ANALÝZA	27
6	VÝSLEDKY	28
6.1	Optimalizace	29
6.1.1	Optimalizace doby inkubace buněk se statiny	29
6.1.2	Výběr vhodného modelu	30
6.2	Průtoková cytometrie	31
6.2.1	Rozdělení makrofágů podle fenotypu	31

6.2.1.1	Kvantifikace povrchových znaků	35
6.3	Analýza genové exprese	39
6.4	Aktivita indukibilní NO syntázy	42
6.5	Produkce cytokinů	43
7	DISKUZE	45
7.1	Zvolení modelu, optimalizace, separace CD14 ⁺ buněk z krve	45
7.2	Diskuze výsledků	47
7.2.1	Kvantifikace povrchových znaků a stanovení životnosti buněk	47
7.2.2	Analýza genové exprese	51
7.2.3	Stanovení aktivity iNOS	55
7.2.4	Stanovení cytokinů	55
8	ZÁVĚR	58
9	POUŽITÉ ZDROJE	59
10	PŘÍLOHA	74

1 ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Inhibitory hydroxymethylglutaryl-koenzym A-(HMG-CoA)-reduktázy, tedy statiny, jsou v léčbě aterosklerózy využívány již od 90. let minulého století. Navzdory nově se vyvíjejícím přístupům a léčbám jsou nadále považovány za nejúčinnější léčiva tohoto onemocnění a jsou stále první volbou při primární i sekundární prevenci a léčbě.

V České republice je dostupných 6 statinů, jejichž aktivita je založena na stejném mechanismu, ale které se mezi sebou liší účinností, snášenlivostí organismem a místem degradace. Předností statinů je velice účinná reverzibilní schopnost blokace aktivity enzymu HMG-CoA-reduktázy, který je klíčový v konverzi HMG-CoA na mevalonát, což je limitující krok při jaterní syntéze cholesterolu (Endo *et al.*, 1976; Endo, 2004). Blokace tohoto enzymu přispívá ke zvýšené expresi receptoru pro LDL (z angl. *Low-density lipoprotein*) částic (Feldt *et al.*, 2020), a tedy i snížení množství těchto částic volně cirkulujících v krevním řečišti. Naopak statiny prokázaly schopnost mírného zvýšení HDL (z angl. *High-density lipoprotein*) cholesterolu (Blasetto *et al.*, 2003). Mevalonát je důležitým prekurzorem izoprenoidních molekul (Cubeddu and Seamon, 2006; Jiang *et al.*, 2014), které se obvykle účastní významných signalizačních drah, omezením jeho syntézy tak mají statiny schopnost ovlivňovat další buněčné pochody (shrnuto v Shah *et al.*, 2015).

Ač bylo dlouhou dobu na aterosklerózu pohlíženo zejména jako na onemocnění, které je způsobeno poruchami distribuce a ukládání cholesterolu, je dnes už zcela jasné, že zásadní roli v rozvoji tohoto onemocnění hrají i buňky imunitního systému, především makrofágy, a zejména chronický zánět (shrnuto v Kobiyama and Ley, 2018). Koincidence hypercholesterolemie se zánětem ovlivňuje různé fáze aterogeneze a je třeba soustředit se při výzkumu i léčbě na oba tyto faktory.

Protektivní význam cílené protizánětlivé terapie na kardiovaskulární chorobu byl prokázán klinickými studii, publikovaná data prokázala i protizánětlivý vliv statinů v *in vitro* a v *in vivo* studiích. Výsledky z klinické studie JUPITER (z angl. *an Inervertion Trial Evaluating Rovustatin*) dokonce ukázaly protizánětlivý vliv statinů demonstrováný snížením CRP v séru pacientů nezávisle na hladině LDL cholesterolu (Mora and Ridker, 2006) a naznačily tak potenciál těchto léčiv při léčbě jiných inflamačních onemocnění. I v naší výzkumné skupině byl zjištěn výrazný efekt užívání statinů na polarizaci makrofágů protizánětlivým směrem *in vivo* v lidské tukové tkáni (Kauerova *et al.*, 2021).

Přesný mechanismus antiinflamačního účinku statinů není nicméně zatím zcela objasněn. Tato diplomová práce byla zaměřena na zkoumání vlivu statinů na makrofágy v *in vitro* prostředí a kladla si za cíl zjistit, zda a jakým způsobem ovlivňují polarizaci makrofágů do prozánětlivé M1 a protizánětlivé M2 formy.

Byly stanoveny následující experimentální cíle:

- 1) Pomocí průtokové cytometrie kvantifikovat vliv statinů na expresi povrchových markerů monocytárních buněk. Na základě relevantní literatury byly vybrány následující markery CD14, CD16, CD15, CD36, CD163, CD206, Trem-2 a ABCA-1.
- 2) Metodou qPCR kvantifikovat vliv statinů na expresi genů pro inducibilní NO syntázu, MCP-1, Arginázu-1, NF- κ B, IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF β a VCAM-1.
- 3) Definovat vliv statinů na aktivitu inducibilní NO syntázy.
- 4) Pomocí ELISA testů stanovit změny v produkci cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-10 a TNF α po ošetření buněk statiny.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je zánětlivé imunitní onemocnění vyznačující se chronickým charakterem, přítomností na lipidy bohatých lézí a dlouhodobým asymptomatickým průběhem. Mnoho studií prokázalo, že vedle poruch distribuce a ukládání cholesterolu je pro rozvoj aterosklerózy stejně důležitá také přítomnost imunitních buněk a chronický zánět (shrnutí v Kobiyama and Ley, 2018). Tyto faktory v rámci aterosklerózy fungují synergně.

Samotné onemocnění není tématem této diplomové práce. Nicméně vzhledem k faktu, že je ateroskleróza silně spjata s léčbou statiny a že tato práce byla vypracována v laboratoři zabývající se jejím výzkumem, pokládám za nutné část teoretického úvodu tomuto onemocnění věnovat.

2.1.1 Mechanismus vzniku

Patofyziologický proces aterosklerózy je způsoben souhrou poruch v metabolismu lipidů a nefyziologických proinflamačních imunitních reakcí, které vedou k nahromadění na lipidy bohatých makrofágů, tzv. pěnovitých buněk, ve stěně arterií. Není-li aterogeneze zachycena včas, obvykle vyústí infarktem myokardu, cévní mozkovou příhodou (Pentikäinen *et al.*, 2000; Grønholdt *et al.*, 2002; Geovanini and Libby, 2018) či ischemickou chorobou dolních končetin. Proces vzniku a progresu aterosklerózy může být zejména z hlediska role zánětu zjednodušeně shrnut do následujících bodů:

1. Aktivace endotelií

Lipoproteiny, které se hromadí v cévě, jsou často náchylné k modifikacím (např. oxidace či agregace). Tyto modifikace indukují zánětlivý charakter lipidových částic, které působí na buňky endotelu a přispívají k jejich aktivaci (Khan *et al.*, 1995; Vladykovskaya *et al.*, 2012). Na aktivaci endotelií se podílejí i monocyty a makrofágy, které působením enzymu NADPH (z angl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidázy (Nox) přispívají vzniku oxidovaných LDL částic (oxLDL; Manea *et al.*, 2015; Vendrov *et al.*, 2007). I Nox produkované samotnými endoteliemi nebo buňkami hladké svaloviny v cévě jsou velmi důležité pro aktivaci endotelií. Jejich působením jsou totiž generovány reaktivní superoxidy (ROS), které stimulují expresi adhezivních molekul, a podporují tak migraci monocytů/makrofágů do intimy cévy v další fázi (Vendrov *et al.*, 2007).

Dalším aktivátorem endotelií je dvojice hyperlipidémie a tzv. shear stress, a to zejména v zakřivených oblastech cév, v místech jejich větvení či v oblastech aterosklerotických plátů (shrnuto v Cunningham and Gotlieb, 2005). Bylo prokázáno, že poruchy proudu krve společně s hyperlipidemií zvyšují expresi TLR2 (z angl. *Toll-like receptor 2*; Mullick *et al.*, 2008; Bertocchi *et al.*, 2011), který pak spouští kaskádu prozánětlivých reakcí. Fyziologický tok krve je tedy v rámci aterogeneze významně protektivní. K aktivaci endotelií, která vede k rozvoji aterosklerózy, přispívá také chronické zvýšení krevního tlaku. Ten působí na endotel menších i velkých cév. Dochází ke změnám iontového prostředí, které přispívá ke zvýšené proliferaci buněk hladké svaloviny, a tedy růstu hladkého svalstva v cévě. Za fyziologických podmínek endotel působí na růst buněk hladké svaloviny ve stěně cévy inhibičně, dysfunkční endotel naopak růst podporuje, díky čemuž přispívá k zúžení lumen cévy, a tedy i k nedostatečnému prokrvení a prokysličení tkáně (Alexander, 1995).

2. Vstup monocytů do intimy cévy

Aktivované endotelie následně produkují adhezivní molekuly, prozánětlivé cytokiny a chemokiny, které umožňují transmigraci monocytů do intimy cévy (Gerszten *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004; Pae *et al.*, 2006). Zásadní roli v počáteční fázi aterosklerózy hraje adhezivní molekula produkovaná endotelovými buňkami VCAM-1 (z angl. *Vascular cell adhesion molecule-1*). Díky ní makrofágy adherují k povrchu cévy (Cybulsky *et al.*, 2001) a jsou připraveny k transmigraci do intimy cévy, která je umožněna působením výkonného, silně prozánětlivého chemokinu MCP-1 (z angl. *Monocyte chemoattractant protein-1*), známého také jako CCL2 (z angl. *Chemokine (C-C motif) ligand 2*), v subendotelu. Tato molekula je v zánětlivém prostředí produkována řadou buněčných typů (Beall *et al.*, 1996) a na monocyty se váže přes jejich povrchový receptor CCR2 (z angl. *Chemokine (C-C motif) receptor 2*; Volpe *et al.*, 2012). Spojení CCL2/CCR2 je esenciální nejen pro vstup monocytů do intimy cévy, ale také pro jejich akumulaci ve vznikajících aterosklerotických placích a destabilizaci těchto plátů v pozdějších fázích onemocnění (Živković *et al.*, 2021). VCAM-1 i MCP-1 jsou produkovány také samotnými makrofágy (Kowala *et al.*, 2000; Nahrendorf *et al.*, 2006; Dutta *et al.*, 2015).

3. Produkce chemokinů a chemoatraktantů následovaná zvýšením migrace dalších buněk do intimy cévy

Další buňky imunitního systému do místa vznikajícího zánětu migrují díky nadprodukcii chemokinů a chemoatraktantů tkáňovými makrofágy, nahromaděnými monocyty i neimunitními buňkami (např. buňky endotelu či hladké svaloviny cévy; Keophipath *et al.*,

2010; Veillard *et al.*, 2006). Dochází ke zvýšení produkce chemokinu CCL5 adipocyty (Keophiphath *et al.*, 2010), monocyty a T lymfocyty (Zeng *et al.*, 2021) i neimunitními buňkami (Appay and Rowland-Jones, 2001). Ten napomáhá k další transmigraci monocytů do místa vznikajícího zánětu. Brání také jejich apoptóze, čímž přispívá další progresi onemocnění (Keophiphath *et al.*, 2010). Dalším důležitým chemokinem je CXCL16 (z angl. *C-X-C Motif Chemokine Ligand 16*), který je exprimovaný endoteliemi (Yu *et al.*, 2016), buňkami hladké svaloviny (Wågsäter *et al.*, 2004) či makrofágy (Lehrke *et al.*, 2007). S receptorem CXCR6 (z angl. *C-X-C Motif Chemokine Receptor 6*) tvoří důležitý vazebný pár pro migraci Th1, Th17 (z angl. *Type 1 T-helper, Type 17 T-helper*) lymfocytů a NKT (z angl. *Natural killer T cells*) buněk (Butcher *et al.*, 2016; Lv *et al.*, 2013) do aterosklerotického plátu. Pro vstup B buněk je důležitá exprese MIP-3 α (z angl. *Macrophage-inflammatory protein-3 α*)/CCL20 a jeho vazba na receptor CCR6 na povrchu B buněk periferní krve (Liao *et al.*, 2002).

4. Diferenciace monocytů v makrofágy, zisk prozánětlivého M1 fenotypu vlivem okolního prostředí

Diferenciace monocytů do makrofágů je řízena mediátory v místě vznikající léze. Mezi tyto molekuly patří například M-CSF (z angl. *Macrophage colony-stimulating factor*; Clinton *et al.*, 1992). Následná polarizace do klasicky aktivovaných M1 prozánětlivých makrofágů je pak zajištěna zánětlivými agens, mezi něž patří enzym PCSK9 (z angl. *Proprotein convertase subtilisin kexin type 9*) produkovaný buňkami hladké svaloviny (Ricci *et al.*, 2018) či oxidované lipidové částice (Buttari *et al.*, 2014). Vliv na polarizaci makrofágů mají také mastné kyseliny přítomné v tukové tkáni. Mezi prozánětlivé mastné kyseliny jsou řazeny palmitát nebo palmitooleát (Poledne *et al.*, 2020). Rozdělení makrofágů do populací M1 a M2 reprezentuje extrémní rozdílných konců spektra makrofágů, které se aterosklerózy účastní (Jinnouchi *et al.*, 2020). Transkriptomické profily buněk v ateroskleróze nicméně jasně ukazují, že nejvíce zastoupenými jsou M1 makrofágy (Martinez *et al.*, 2006; Baidžajevs *et al.*, 2020). Klasicky aktivované M1 a alternativně aktivované M2 makrofágy jsou i nadále v rámci aterosklerózy nejstudovanějšími fenotypy.

5. Fagocytóza a internalizace lipoproteinů makrofágy a jejich přeměna v pěnovité buňky

Makrofágy exprimují tzv. scavenger receptory (SR) několika skupin. Dle dostupné literatury jsou za fagocytózu lipoproteinových částic, které vedou k internalizaci lipidů do makrofágů a následné transformaci v pěnovité buňky, zodpovědné především SR

skupiny B, CD36, SR-AI/II (Fuhrman *et al.*, 2002; Kunjathoor *et al.*, 2002; Mäkinen *et al.*, 2010), receptory MARCO (z angl. *Macrophage Receptor with Collagenous Structure*, Dahl *et al.*, 2007) nebo CD68 z rodiny SR-D (van der Kooij *et al.*, 1997). Je také prokázáno, že mononukleární fagocyty mohou cholesterol vstřebávat i makro a mikropinocytózou LDL částic (Anzinger *et al.*, 2010). Pěnovité buňky tvoří velkou část aterosklerotického plátu, ateromu.

Je třeba zmínit, že tvorba pěnovitých buněk není exkluzivní schopností makrofágů/monocytů, jak bylo dlouho předpokládáno. V posledních letech se objevují důkazy o tom, že se v pěnovité buňky mohou změnit i buňky hladké svaloviny cévy, pericity obklopující cévu nebo dokonce kmenové buňky (shrnutí v Poznyak *et al.*, 2020).

6. Sekrece zánětlivých cytokinů, reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (NOS) a dalších zánětlivých mediátorů

Makrofágy jsou hlavními producenty prozánětlivých cytokinů v aterosklerotickém plátu. Pod vlivem zánětlivého prostředí exprimují silně prozánětlivé IL-1 β , TNF α či IL-6 a chemokiny IL-8 a MCP-1 (Håversen *et al.*, 2009; Ricci *et al.*, 2018). Prozánětlivé M1 makrofágy jsou také typické produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS; Wang *et al.*, 2014), které podporují oxidaci LDL (z angl. *Low density lipoprotein*) částic nebo dále regulují prozánětlivé signalizační dráhy citlivé na oxido-redoxní homeostázu (Fenyo and Gafencu, 2013). Významnou roli zastává také inducibilní NO syntáza (iNOS) prozánětlivých makrofágů, díky které tyto buňky produkují prozánětlivý oxid dusnatý (NO), který přispívá další progresi onemocnění (Behr-Roussel *et al.*, 2000).

V aterosklerotickém plátu jsou přítomny i další buňky imunitního systému, které svou aktivitou podporují jeho prozánětlivý charakter a které napomáhají progresi tohoto onemocnění. Mezi tyto buňky vedle monocytů a makrofágů patří také oba subtypy CD3⁺ buněk (Frostegård *et al.*, 1999), eozinofily (Marx *et al.*, 2019) či proaterogenní B buňky (Tsiantoulas *et al.*, 2015).

7. Formace nekrotického jádra zralého aterosklerotického plátu, jeho destabilizace a ruptura cévy

Tvorba aterosklerotických plátů je jedním z hlavních znaků aterosklerózy. Dochází k ukládání lipidových částic, ztlušťování intimy cévy a v pozdějších fázích také k tvorbě tzv. fibroateromu. Ten je typický velkým nekrotickým jádrem, které je bohaté na lipidy a makrofágy a které je obklopeno fibrotizovanou tkání. S vytvořením fibroateromu obvykle

přechází ateroskleróza do pokročilé fáze, dochází k další expanzi nekrotického jádra a ztenčování fibrotické oblasti a vytváří se aterom náchylný k ruptuře (shrnutí v Gonzalez and Trigatti, 2017).

2.1.2 Makrofágy a ateroskleróza

Jak již bylo popsáno výše v této práci, ke zvýšení influx makrofágů, respektive monocytů, do cévní stěny dochází v průběhu iniciační fáze aterosklerózy (Gerszten *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004; Pae *et al.*, 2006). Vychytávají zde nadbytečné LDL částice pomocí scavengerových receptorů, například CD36 či SR-A (Mäkinen *et al.*, 2010). V lysozomech jsou pak částice rozloženy kyselou lipázou (Hakala *et al.*, 2003; Ouimet *et al.*, 2011), dochází k uvolnění volného cholesterolu (Ouimet *et al.*, 2011) a mastných kyselin, které jsou následně esterifikovány v endoplazmatickém retikulu. Tento proces zajišťuje eliminaci toxicity volného cholesterolu a umožňuje jeho uskladnění ve formě intracelulárních lipidových kapének (shrnutí v Jeong *et al.*, 2017). Nadbytečný intracelulární cholesterol může buňky opustit samovolně pomocí pasivní difuze (Mendez, 1997) nebo tzv. reverzním transportem, který je zabezpečen například transportéry ABCA-1 (z angl. *ATP (adenosine triphosphate)-binding cassette A1*) a ABCG-1 (z angl. *ATP-binding cassette G 1*; de Gaetano *et al.*, 2016) na povrchu makrofágů. Během reverzního transportu dochází k vazbě intracelulárního cholesterolu na HDL částice, které zprostředkují jeho přenos do jater. V játrech je cholesterol metabolizován na žlučové kyseliny a je následně vyloučen z organismu (shrnutí v Rader *et al.*, 2009).

Důležitost imunitních reakcí, a tedy i imunitních buněk, je v rozvoji a progresi aterosklerózy neoddiskutovatelná. Zásadní roli hrají nejen buňky vrozené části imunitního systému, ale také buňky řazené do adaptivní imunity. Tato diplomová práce si nicméně neklade za cíl seznámit čtenáře se všemi aspekty vlivu imunitního systému na toto onemocnění. Vzhledem k tématu práce je následující kapitola věnována pouze makrofágům a jejich roli v rozvoji a progresi aterosklerózy.

2.1.2.1 Fenotypová rozmanitost makrofágů

V literatuře je popsána prozánětlivá polarizace makrofágů v prostředí bohatém na prozánětlivé cytokiny (např. IFN γ (Interferon gama) či LPS). Tento typ makrofágům získal název M1 makrofágy. Jejich protikladem jsou M2 makrofágy polarizující se pod vlivem protizánětlivých cytokinů (typicky IL-4 a IL-13), u kterých byla popsána zánět tlumící, regulační role. M1 a M2 subpopulace makrofágů se významně liší v sekreční aktivitě, genové expresi i metabolickým profilem. Toto rozdělení je nutné vnímat jako extrémní stavy spektra,

příčemž existuje mnoho dalších stavů s nepříliš jasným významem. Typickou vlastností makrofágů je jejich tkáňová specifita a vysoká fenotypová variabilita daná specifickým mikroprostředím dané tkáně (Gosselin *et al.*, 2014).

Významně zastoupenou subpopulací makrofágů v aterosklerotickém plátu jsou M1 makrofágy, které jsou stimulovány ligandem pro TLR (Xu *et al.*, 2001) a vyznačují se silnou expresí prozánětlivých cytokinů IL-1 β (Chávez-Sánchez *et al.*, 2014), IL-6 a TNF α , zánětlivých mediátorů ROS (Tao *et al.*, 2021) a NOS a chemokinů s C-X-C motivem (shrnuto v Bobryshev *et al.*, 2016).

M2 makrofágy účastníci se aterosklerózy mohou být rozděleny do dvou skupin, na makrofágy M2a, tzv. hojivé a regulační M2b, c (shrnuto v Bobryshev *et al.*, 2016). M2a makrofágy jsou *in vitro* polarizovány vlivem cytokinů IL-4 a IL-13 (Adutler-Lieber *et al.*, 2013). Je pro ně typická vysoká exprese scavengerového receptoru CD163 (Lesna *et al.*, 2016) a manózu vázajícího receptoru CD206 (Bisgaard *et al.*, 2016). Exprimují protizánětlivé cytokiny IL-10, TGF β (Riccobono *et al.*, 2018) a fibronektin (Kim *et al.*, 2013), který je důležitou složkou při hojení poškozených tkání. M2b fenotyp makrofágů je indukován imunokomplexy a stimulací TLR. Jsou typické smíšeným fenotypem, produkují totiž významné množství protizánětlivého IL-10, ale také prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF α (z angl. *Tumor necrosis factor α* ; Yue *et al.*, 2017b). M2c fenotyp lidských makrofágů vzniká působením IL-10 (Lurier *et al.*, 2017), TGF β (z angl. *Tumor growth factor*; Lu *et al.*, 2013) a/nebo glukokortikoidů (Zizzo and Cohen, 2013). Vyznačují se vysokou expresí receptoru pro rozpoznání a fagocytózu apoptických buněk, čímž významně přispívají jejich odstranění (Zizzo *et al.*, 2012).

V aterosklerotickém plátu byly detekovány i další subpopulace makrofágů, například proaterogenní M4 makrofágy, v literatuře často označované jako M2-like makrofágy, které svůj fenotyp získávají pod vlivem chemokinů pro krevní destičky CXCL4 (Erbel *et al.*, 2015a). Jejich přítomnost je spojována s nestabilitou aterosklerotického plátu (Erbel *et al.*, 2015b). Bylo také prokázáno, že chemotakticky přispívají k influxu neutrofilů do aterosklerotického plátu, čímž přispívají k tvorbě tzv. neutrofilových extracelulárních pastí (Maretti-Mira *et al.*, 2021). Dále byly definovány subpopulace, které jsou stimulovány hemoglobinem, haptoglobinem nebo hemem, vyznačují se expresí CD163 a ateroprotektivním charakterem (shrnuto v Bobryshev *et al.*, 2016).

2.1.2.1.1 M1 a M2a makrofágy

Velké množství zánětlivých makrofágů v místě vznikající léze je klíčové pro rozvoj a progresi aterosklerózy. Jejich vysoké zastoupení v aterosklerotickém plátu je způsobeno vtokem mononukleárních fagocytů. Ten je z velké části podpořen samotnými makrofágy, které jsou významnými producenty chemokinu MCP-1 (Kowala *et al.*, 2000). Důležitou roli hraje také jejich udržení ve vznikajícím plátu. I zde hrají roli samotné makrofágy, produkují protein netrin-1, který omezuje vycestovávání makrofágů z místa aterosklerotického plátu (van Gils *et al.*, 2012).

Diferenciace monocytů do makrofágů je spojena se zvýšením exprese scavenger receptorů, které jsou zásadní pro příjem cholesterolu do buňky (Libby *et al.*, 2013). Hromadění modifikovaného cholesterolu v makrofázích a vznik intracelulárních mirkokrystalů indukuje nejen tvorbu pěnovitých buněk, ale způsobuje také aktivaci NLRP3 (z angl. *NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) - like receptor pyrin domain containing 3*)-inflamazomu. Jeho aktivace způsobuje uvolnění kaspázou 1 sestřihnutého prozánětlivého cytokinu IL-1 β , jehož množství je přímo úměrné množství cholesterolu (Duewell *et al.*, 2010). Tento proces se zdá být závislý na působení komplementu (Samstad *et al.*, 2014).

Ač se role M1 a M2 makrofágů významně liší, je přítomnost obou fenotypů v procesu aterogeneze důležitá. Vedle rozdílných funkcí se obvykle různí také místem lokalizace. Ta je obvykle determinována stádiem onemocnění. V asymptomatické fázi makrofágy mají ještě poměrně silnou schopnost migrace a ve zvýšeném množství jsou přítomny jen v lipidovém jádře vznikajícího plátu, v intimě cévy se nachází pouze sporadicky. Při další progresi jsou již makrofágy, hlavně prozánětlivé M1, hojně nejen v jádře plátu, ale i v jeho okrajových částech. Dochází ke zvýšení exprese prozánětlivých markerů CD68, CD36, TNF α , IL-1 β či IL-8. Zvýšená je také exprese proteinů umožňující eflux intracelulárního cholesterolu z makrofágů, ABCA-1 a ABCG-1. Exprese protizánětlivých proteinů (IL-4, IL-10 či IL-13) je v aterosklerotickém plátu v porovnání s asymptomatickou fází významně snížena (de Gaetano *et al.*, 2016). Prozánětlivé makrofágy podporují zánětlivé prostředí vznikajícího ateromu také nadprodukcí ROS (Manea *et al.*, 2015).

Významným procesem v aterogenezi je přeměna cholesterol bohatých makrofágů v pěnovité buňky. V určitém stádiu je množství intracelulárního cholesterolu tak vysoké, že dojde k potlačení fyziologických funkcí makrofágů a podlehnou přeměně v pěnovité buňky, které tvoří základ aterosklerotického plátu. Schopnost transformace v pěnovité buňky byla prokázána u obou fenotypů makrofágů, nicméně M2 makrofágy se ukázaly být k této přeměně

výrazně náchylnější (Baidžajevs *et al.*, 2020). Výsledky studie také překvapivě ukázaly, že prozánětlivé M1 makrofágy mají nižší schopnost vychytávání lipidů v porovnání s M2 polarizovanými makrofágy (da Silva *et al.*, 2016; Baidžajevs *et al.*, 2020). Zdá se tedy, že v rámci aterosklerózy je významnější rolí M1 makrofágů indukce zánětlivého prostředí a tím i podmínek vedoucích k nestabilitě aterosklerotického plátu.

Nestabilita plátů, která předchází jejich ruptuře, je typická signifikantně zvýšeným množstvím prozánětlivých M1 markerů (CD86, iNOS) a naopak poklesem protizánětlivých M2 znaků (Argináza-1, TGF β). Zvýšená exprese transkripčního faktoru pro Th2 imunitní odpověď STAT6 (z angl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 6*) aktivuje signalizační kaskádu Wnt- β catenin, která vede polarizaci makrofágů do M2 fenotypu a stabilizaci plátu (Gong *et al.*, 2017). M1 makrofágy nejsou schopny ani pod vlivem protizánětlivého prostředí změnit svůj fenotyp v protizánětlivém směru, naopak změna ve směru prozánětlivého fenotypu u M2 makrofágů prokázána byla (van Tits *et al.*, 2011; Van den Bossche *et al.*, 2016).

Významnou schopností makrofágů je tzv. efferocytóza, receptorem zprostředkovaná fagocytóza mrtvých buněk a jejich pozůstatků. Při defektu tohoto mechanismu v místě zůstávají zbytky mrtvých buněk, jejichž přítomnost ještě podporuje a zesiluje lokální zánět a dává vzniku tzv. sekundární nekrózy (Schrijvers *et al.*, 2005). Právě akumulace mrtvých buněk je jeden z klíčových procesů vedoucích ke vzniku nekrotického jádra ateromu (Cai *et al.*, 2017).

2.2 Statiny

Statiny byly poprvé popsány japonským biochemikem Dr. Akira Endo na přelomu 60. a 70. let minulého století. Na počátku stála hypotéza, že by vysoké množství cholesterolu v plazmě mohlo být účinně sníženo inhibicí aktivity enzymu HMG-CoA (*Hydroxymethylglutaryl-koenzym A*) reduktázy, který je klíčovým regulátorem biosyntetické dráhy cholesterolu. Dr. Endo předpokládal, že inhibicí tohoto enzymu lze dosáhnout výraznějšího snížení cholesterolu než pouhou změnou jídelníčku na nízko tukovou dietu. Předpokládal také, že některé organismy přirozeně produkují inhibitory tohoto enzymu jako obranný mechanismus proti infekci mikroby, které cholesterol a jiné steroidy z mevalonátové dráhy využívají pro růst a přežití. První známý statin byl pod jeho vedením vyizolován v první polovině 70. let z plísně *Penicillium citrinum*. Izolovaná látka měla vysokou míru strukturální podobnosti s HMG-CoA a ukázala se být kompetitivním inhibitorem HMG-CoA reduktázy. Později získala jméno mevastatin (Endo *et al.*, 1976; Endo, 2004), který ale nikdy nebyl použit v praxi.

Chemická struktura statinů je tvořena dvěma částmi, tzv. farmakoforem, který je zodpovědný za farmakologickou aktivitu statinu, a kruhovým systémem s různými substituenty, kterými se od sebe statiny odlišují. Farmakofofor zabezpečuje reverzibilní, na množství závislou inhibici enzymu HMG-CoA reduktázy, kruhová část pak definuje afinitu daného statinu k aktivnímu centru enzymu (shrnuo v Mohammadkhani *et al.*, 2019).

Statiny jsou pro jejich významný hypolipidemický efekt první volbou v léčbě i prevenci kardiovaskulárních chorob. Zabezpečují snížení hladin LDL cholesterolu přímo, omezením jeho syntézy v rámci mevalonátové dráhy inhibicí přeměny HMG-CoA na mevalonát zablokováním HMG-CoA reduktázy (Endo *et al.*, 1976). I nepřímo, podporou exprese receptorů pro LDL cholesterol. Ty vyvazují nadbytečný LDL cholesterol z prostředí (Feldt *et al.*, 2020). Statiny také přispívají ke snížení hladin triglyceridů v krvi (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group), které ovlivňují vznik kardiovaskulárních onemocnění (shrnuo v Miller *et al.*, 2011). Statiny také podporují stabilitu již vzniklého aterosklerotického plátu (Libby and Aikawa, 2003), jehož nestabilita vede ke klinickým komplikacím aterosklerózy.

Inhibice tvorby mevalonátu vede také ke snížení syntézy izoprenoidů, jímž je mevalonát prekurzorem (Cubeddu and Seamon, 2006; Jiang *et al.*, 2014). Tímto statiny zasahují i do dalších signálních drah s významným klinickým přesahem.

2.2.1 Antiinflamační a antioxidační účinek statinů

V rámci rozvíjejícího se odvětví translační medicíny byl důležitý objev antiinflamačního účinku statinů nezávislého na jejich hypolipidemickém efektu. K jeho průkazu významně přispěly výsledky mezinárodní klinické studie JUPITER, která, vedle efektu statinů na mortalitu a morbiditu kardiovaskulárních onemocnění, jasně demonstrovala signifikantní vliv statinů na snížení hladiny vysokosenzitivního CRP (hs-CRP) nezávisle na hladinách cholesterolu (Mora and Ridker, 2006). Vliv těchto léčiv na hladinu CRP byl v následujících letech potvrzen i dalšími studiemi (Ruiz-Limon *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018).

Mechanismus, kterým statiny ovlivňují hladinu CRP, není stále zcela objasněn, pravděpodobně je ale tento efekt způsoben omezením IL-6. Studií z roku 2005 bylo prokázáno, že statiny redukují genovou expresi i produkci proteinu IL-6 a na něj vázanou hladinu CRP v lidských hepatocytech. Bylo také prokázáno, že k tomuto dochází díky inhibici geranylgeranylace (Arnaud *et al.*, 2005). Vliv na expresi *IL6* byl prokázán *in vitro* (Jougasaki *et al.*, 2010) i *in vivo* na myším modelu traumatického poranění mozku (Xu *et al.*, 2017).

In vitro byl prokázán antiinflamační efekt statinů na další zánětlivé markery. Omezena byla genová exprese i proteosyntéza chemokinu MCP-1 i jím zprostředkovaná chemotaxe (Jougasaki *et al.*, 2010) a produkce dalších zánětlivých cytokinů IL-1 β a TNF α (McFarland *et al.*, 2017). *In vitro* byla prokázána také schopnost statinů omezit expresi MHC II (z angl. *Major histocompatibility complex class II*) a kostimulačních molekul CD80 a CD86 na povrchu dendritických buněk. Omezením signalizace zprostředkované těmito molekulami je možné potlačit maturaci dendritických buněk, snížit tvorbu protilátek IgG či redukovat produkci cytokinu IL-21, jehož přítomnost vede k aktivaci cytotoxických reakcí (Li *et al.*, 2015) v rámci Th17 imunitní odpovědi. Tento efekt je pak ještě zesílen omezením exprese kostimulačního receptoru CD40 (Youssef *et al.*, 2002).

Protizánětlivý efekt byl potvrzen i *in vivo* studiemi na zvířecích modelech, kdy po podání statinů došlo nejen ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů (IFN γ , IL-6) či chemokinu CCL5, ale byla také favorizována polarizace makrofágů do protizánětlivého fenotypu následovaná zvýšením syntézy protizánětlivých cytokinů TGF β a IL-10 (Stumpf *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2017), IL-4 a IL-5 (Youssef *et al.*, 2002).

Antiinflamační efekt statinů byl prokázán i přímo na lidech. Byl demonstrován snížením produkce chemokinů MCP-1/2/3 a CXCL5 zodpovědných za migraci monocytů/makrofágů a neutrofilů, zánětlivých cytokinů IL-6, TNF α či metaloproteáz v séru (Yoshimura *et al.*, 2015; Kadhim *et al.*, 2019).

Vedle antiinflamačního efektu statinů byla demonstrována také jejich antioxidační schopnost (Franzoni *et al.*, 2003). *In vitro* byla prokázána jejich schopnost redukovat množství zánětlivých mediátorů ROS a NOS (McFarland *et al.*, 2017). V epiteliálních buňkách pak prokázaly schopnost omezení oxidace LDL částic (Li *et al.*, 2001).

2.2.1.1 Mechanismus antiinflamačního a antioxidačního vlivu statinů

Výše zmíněné a další studie demonstrovaly schopnost statinů favorizovat Th2 imunitní odpověď oproti zánětlivým Th1 a Th17 (Zhang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013). Způsob, kterým statiny podporují polarizaci imunitní odpovědi v protizánětlivém směru, není doposud zcela objasněn. Pravděpodobně dochází k podpoře fosforylace, a tedy aktivace transkripčního faktoru STAT6. Aktivace STAT4 je naopak statiny blokována (Youssef *et al.*, 2002). Tyto výsledky byly podpořeny daty *in vivo* studie na myším modelu z roku 2006, kde statiny prokázaly stejný efekt na buňkách lymfatických uzlin (Arahamian *et al.*, 2006).

Studie také ukazují na schopnost statinů ovlivnit imunitní reakce ve směru regulačním, tlumivém, kdy podporují polarizaci Treg (regulační T buňky). Výsledky *in vitro* studie z roku 2010 prokázaly jejich vliv na indukci exprese transkripčního faktoru Foxp3, která je pravděpodobně závislá na inhibici geranylgeranylace proteinů statiny. Podpora regulačního fenotypu imunitní odpovědi statiny se tak zdá být spojena s ovlivněním dráhy geranylgeranylace a jejich vlivem na metylaci promotoru v genu pro Foxp3. Neopomenutelnou roli v nastolení významnější tlumivé odpovědi má pak efekt synergie statinů s TGF β (Kim *et al.*, 2010). Pozitivní vliv statinů na množství cirkulujících Foxp3⁺ Treg byl prokázán i přímo u lidí (Rodríguez-Perea *et al.*, 2015).

Byly popsány i další možnosti vlivu statinů na zánětlivou odpověď. Významný vliv mají na signalizační dráhy TLR2 a TLR4, kdy inhibují expresi těchto receptorů na povrchu imunitních buněk. Tím omezují produkci prozánětlivých cytokinů a dalších mediátorů zánětu (Niessner *et al.*, 2006; Földes *et al.*, 2008). Byla popsána také jejich schopnost omezit expresi adaptorového proteinu MyD88 (z angl. *Myeloid differentiation primary response 88*; Yue *et al.*, 2017).

Inhibice exprese TLR4 vede také k omezení aktivity NFκB dráhy (Fang *et al.*, 2014a). Ta může být také iniciována cytokinem IL-1β. Ve studii z roku 2017 byl na buňkách ze střední části obratlové ploténky (tzv. nucleus pulposus) popsán inhibiční efekt statinů na aktivaci IL-1β-stimulované NFκB dráhy. Výsledky ukázaly, že statiny omezují translokaci podjednotky p65 do jádra, kde hraje důležitou roli v aktivaci NFκB. Byla také prokázána schopnost statinů omezit degradaci inhibitoru IκBα. Ten tak může v rámci NFκB dráhy splnit svou inhibiční funkci a omezit tím expresi zánětlivých molekul (Tu *et al.*, 2017). Omezení signalizace NFκB byla detekována i při indukci dráhy cytokinem TNFα (Yoshimura *et al.*, 2015). Studie Tu *et al.*, 2017 také prokázala protizánětlivý efekt v rámci MAP (z angl. *Mitogen-activated protein*) kinázové signalizační dráhy, kdy brání fosforylaci JNK (z angl. *c-Jun N-terminal kinase*), p38 a ERK (z angl. *Extracellular signal-regulated kinases*). Statiny jsou také schopny inhibovat aktivaci NLRP3 inflamazomu vyvolanou ox-LDL či TNFα v epiteliálních buňkách. Mechanismem tohoto účinku je jejich schopnost aktivovat jaderný receptor vázající xenobiotika PXR (z angl. *Pregnane X receptor*; Wang *et al.*, 2017), u nějž byla vedle jeho klasické schopnosti obrany organismu proti xenobiotikům (Kliwer *et al.*, 2002) prokázána také schopnost redukovat zánětlivé reakce (Wang *et al.*, 2013).

Významným se jeví také efekt statinů na aktivaci tzv. *Peroxisome proliferator-activated receptor-γ* (PPARγ) na povrchu lidských monocytů/makrofágů. Byl prokázán pozitivní vliv statinů na aktivaci tohoto receptoru (Zhang *et al.*, 2017a). Zvýšení aktivity tohoto receptoru bylo spojeno nejen se zvýšenou expresí některých protizánětlivých markerů (např. CD206), ale také s redukcí některých prozánětlivých znaků (např. *TNFA*; Zhang *et al.*, 2017; Heming *et al.*, 2018).

Bylo prokázáno, že statinová terapie ovlivňuje také izoprenoidní meziprodukty mevalonátové dráhy, které se účastní mnoha významných signálních drah. Mezi tyto izoprenoidy patří například geranylgeranyl pyrofosfát či farnesyl pyrofosfát, které se účastní prenylace proteinů (Maeda *et al.*, 2003). Studií z roku 2005 byl prokázán protizánětlivý efekt statinů na množství CRP, který byl indukován působením cytokinu IL-6, a jehož snížení korelovalo s omezením geranylgeranylce proteinů v játrech (Arnaud *et al.*, 2005). Nicméně byl také popsán opačný efekt, kde omezení prenylace stimulovalo efektorové interakce proteinu Rac1 vedoucí k prozánětlivé signalizaci (Akula *et al.*, 2019). Vliv statinů na imunitní odpovědi v kontextu prenylace proteinů není tak dodnes zcela jasný.

Dalším izoprenoidním proteinem, který je statiny ovlivněn, je ubiquinon (koenzym Q10), který v organismu plní antioxidační funkci, přispívá k redukci oxidačního stresu (McGregor *et al.*, 2020). Statiny přímo omezují syntézu koenzymu Q10 (Cordes and Metallo, 2020) a snižují tak jeho množství v plazmě (Passi *et al.*, 2003). Tohoto efektu může být využito například v nádorové terapii, kde nepřímým podpořením oxidačního prostředí v nádoru omezují jeho růst (McGregor *et al.*, 2020).

2.2.2 Možnosti klinického využití statinů

Preklinické studie *in vivo* na myších prokázaly protektivní efekt statinů vůči vzniku GVHD (z angl. *Graft-versus-host disease*) u alogenních transplantací hematopoetických buněk, aniž by byla omezena reakce GVL (z angl. *Graft-versus-leukemia*; Zeiser, 2018; Hamadani *et al.*, 2008). Letalita GVHD u myší byla snížena podporou polarizace T buněk do Th2 fenotypu. Statiny podpořily expresi transkripčního faktoru GATA-3, který má klíčovou roli v polarizaci Th2 imunitní odpovědi, naopak omezily expresi transkripčního faktoru pro Th1 (Zeiser *et al.*, 2007).

Retrospektivní studie z roku 2010 zabývající se akutní GVHD alogenních transplantací hematopoetických buněk u lidí pak prokázala významný efekt statinů na snížení rizika vzniku tohoto onemocnění, byli-li statinové terapii vystaveni dárci (Rotta *et al.*, 2010a). U recipientů nebyl efekt statinové terapie prokázán (Rotta *et al.*, 2010b). Na základě těchto a dalších výsledků byla snaha o potvrzení a případně využití profylaktického efektu statinů. Pacienti byli 14 dní před odběrem vystaveni cílené statinové terapii, zde nicméně nebyl na GVHD prokázán žádný výrazný efekt (Efebera *et al.*, 2016).

Efekt statinů je studován také ve vztahu k zánětlivým onemocněním střev (IBD). Bylo prokázáno, že statiny redukuje riziko vzniku těchto onemocnění, a to zejména u starších jedinců (Ungaro *et al.*, 2016). Statiny vykazují schopnost redukce závažnosti IBD omezením zánětlivých reakcí, oxidativního stresu a omezením apoptózy (Shin *et al.*, 2017), které jsou se vznikem IBD přímo spojovány.

Statiny jsou významné také pro jejich proti-angiogenní vlastnosti (Koutouzis *et al.*, 2007; Massaro *et al.*, 2010). V kombinaci s již zmíněnými protizánětlivými, antioxidačními či proti-adhezivními vlastnostmi a schopností omezovat proliferaci buněk, jsou slibnými kandidáty pro účinnou léčbu endometriózy a dalších gynekologických onemocnění podobného charakteru (shrnuto v Zeybek *et al.*, 2018).

Terapeutický potenciál statinů sahá ještě dál. Ač metaanalýza z roku 2006 neprokázala žádnou signifikantní spojitost mezi užíváním statinů a vývojem nádorových onemocnění (Dale *et al.*, 2006), byl protinádorový terapeutický potenciál statinů demonstrován v lidské rakovině prostaty odolné vůči kastraci, kde statiny významně omezily proliferaci nádorových buněk inhibicí signalizace NFκB (Jeong *et al.*, 2017). Dále byl jejich terapeutický potenciál demonstrován v práci McGregor *et al.*, kde statiny nepřímo omezily růst nádoru podporou oxidačního prostředí inhibicí syntézy koenzymu Q10 (McGregor *et al.*, 2020). Nebo v kombinaci s jinými léčivy v nádorovém mikroprostředí duktálního adenokarcinomu pankreatu schopností navodit apoptózu nádorových buněk a tím také omezit růst nádoru (Cordes and Metallo, 2020).

V neposlední řadě byl *in silico* přednesen důkaz o pozitivním vlivu statinů na onemocnění COVID-19 přímým ovlivněním virové partikuleb (Reiner *et al.*, 2020). U COVID-19⁺ pacientů dlouhodobě užívajících statiny byl pak metaanalýzou prokázán pozitivní efekt na omezení závažnosti průběhu i následků onemocnění (Kow and Hasan, 2020).

3 MATERIÁLY

3.1 Základní roztoky

- RPMI-1640 s glutaminem (Biosera, Manila, The Philippines)
- Penicillin a streptomycin (Biosera, Manila, The Philippines),
- Fetální hovězí sérum (Biosera)
- PBS bez Ca^{2+} a Mg^{2+} (Biosera, Manila, The Philippines)

3.2 Použité chemikálie, reagensie a protilátky

- Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)
- DEPC H₂O (H₂O, 0,1% diethyl pyrokarbonát)
- AccumaxTM pro uvolnění buněk z povrchu (Sigma-Aldrich)
- Tri Reagent (Molecular Reaseach Center, Kat # TR 118)
- Kolonie stimulující faktor M-CSF (PEPROTECH®, Kat # 300-25, USA)
- Cytokiny (výrobce, zásobní koncentrace)
 - IFN γ (Gibco, Gaithersburg, MD, USA; c= 100 $\mu\text{g/ml}$)
 - LPS (Preprotech, Hamburg, Germany; c= 100 $\mu\text{g/ml}$)
 - IL-13 (Preprotech, Hamburg, Germany; c= 10 $\mu\text{g/ml}$)
 - IL-4 (Preprotech, Hamburg, Germany; c= 20 $\mu\text{g/ml}$)
- Fluvastatin (Sigma-Aldrich; c= 10mM)
- Protilátky proti povrchovým molekulám na průtokovou cytometrii:
 - CD14 (Beckam Coulter)
 - CD15 (Invitrogen, eBioscience)
 - CD16 (Beckam Coulter)
 - CD36 (Beckam Coulter)
 - TREM-2 (R&D Systems)
 - CD163 (Biolegend)
 - CD206 (Biolegend)
 - ABCA-1 (R&D Systems)
 - FVD (Invitrogen, eBioscience)
- Primery pro qRT-PCR
- Nitrát reduktáza (Aspergillus Niger; 50 mU/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- NADPH (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)
- DNase I (DNase I Amplification Grade; Sigma-Aldrich, USA)

3.3 Kity a přístroje

- Kit na izolaci CD14⁺ buněk: M-pluriBead[®] Maxi Reagent Kit a CD14 M-pluriBead[®] anti-huma (Pluriselect, Leipzig, Germany)
- High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Kat # 4387406)
- HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia)
- Cyto-FastTM Fix/Perm Buffer Set (Biolegend, Kat # 426803)
- ELISA kity pro detekci cytokinů
 - ELISA MAXTM Deluxe Set Human IL-1 β (Biolegend, Kat # 437004)

- ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-10 (Biolegend, Kat # 430604)
- ELISA MAX™ Deluxe Set Human TNF α (Biolegend, Kat # 430204)
- ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-6 (Biolegend, Kat # 430504)

- Orbitální třepačka (Vortex-Gen2, Scientific Industries)
- Třepačka (Intelli-Mixer RM-2, ELMi Ltd.)
- Centrifuga (Allegra X-12R, Beckman Coulter)
- Průtokový cytometr (Navios Ex3/10, Beckman Coulter)
- Analyzátor životnosti buněk (Vi-CELL® XR, Beckman Coulter)
- Spektrofotometr (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek).
- PCR cycler Corbett Life Science Rotor Gene 3000 (Qiagen, Venlo, Nizozemí)
- Thermo cycler ProFlex PCR Systém (ThermoFisher Scientific)
- NanoDrop 2000 spektrofotometr (ThermoFisher Scientific)

4 METODIKA

4.1 Izolace PBMC a oddělení CD14⁺ buněk

V této práci bylo pracováno s makrofágy diferencovanými z periferní krve. Odebraná periferní krev byla nejprve promíchána překlápěním zkumavky, dále byla za sterilních podmínek naředěna 1:1 fosfátovým pufrům (PBS; z angl. *Phosphate-buffered saline*). Ředěná krev byla navrstvena na vrstvu ficollu v poměru 2:1 a následně centrifugována při 400 g, při teplotě 20 °C po dobu 35 min. Na centrifuze bylo nastaveno pomalé zrychlení a byla vypnutá brzda, aby nedošlo ke smísení vrstev. Buňky ze vzniklého prstence PBMC (z angl. *Peripheral blood mononuclear cell*) na rozhraní ficollu a plazmy byly odebrány pipetou a přeneseny do nové 50ml centrifugační zkumavky. Objem byl doplněn PBS do celkového množství 50 ml. Vzorek byl dále centrifugován (200 g, 4 °C, 10 min). Vzniklá peleta byla rozpuštěna v PBS a přenesena do 15ml centrifugační zkumavky, jejíž objem byl doplněn PBS do 15 ml. Vzorek byl centrifugován při 200 g, při teplotě 4 °C, 5 min.

CD14⁺ buňky byly odděleny na základě exprese povrchového znaku CD14 pomocí polystyrenových kuliček s navázanou anti-CD14 monoklonální protilátkou. Bylo postupováno podle separačního protokolu M-pluriBead[®] Maxi Reagent Kit a CD14 M-pluriBead[®] anti-human (Pluriselect, Leipzig, Germany).

4.2 Stimulace CD14⁺ buněk M-CSF a jejich následná polarizace

Peleta CD14⁺ buněk byla následně rozpuštěna v adekvátním objemu média RPMI-1640 obohaceného o 10 % FBS (z angl. *Fetal bovine serum*), 1 % Glutaminu (Gln) a 1 % směsi antibiotik Penicilinu a Streptomycinu (P/S). Buňky byly kultivovány po dobu čtyř dnů ve 24jamkové destičce (Orange Scientific), do každé jamky byl přidán 1 ml buněčné suspenze ($150 \cdot 10^3$ - $250 \cdot 10^3$ buněk/jamka) s 80 ng/ml M-CSF pro diferenciaci monocytů v makrofágy.

Po čtyřech dnech bylo diferencovaným makrofágům vyměněno médium za nové, ke kterému byly přidány cytokiny tak, aby došlo k polarizaci buněk do kýžených fenotypů makrofágů. Pro získání M1 fenotypu byl využit LPS (c= 100 ng/ml) společně s IFN γ (c= 20 ng/ml), pro fenotyp M2 cytokiny IL-4 (c= 20 ng/ml) s IL-13 (c= 20 ng/ml). Kontrolní M0 makrofágy byly ponechány bez cytokinů. Ke každé jamce byla vytvořena duplicitní, do které byl navíc přidán fluvastatin (10 μ mol/ml).

Po 48 hodinách byla z jamek odebrána média, která byla stočena (300 g, 5 min) a zamražena pro detekci cytokinů ELISA testy a stanovení aktivity enzymu iNOS Griessovou metodou. K buňkám přisedlým na povrch jamky byl pro jejich uvolnění z povrchu přidán 0,3 ml AccumaxTM a následně byly využity na analýzu exprese povrchových znaků průtokovou cytometrií a pro stanovení genové exprese qPCR (viz dále).

4.3 Kvantifikace povrchových znaků metodou FACS

Fluorescenční průtoková cytometrie (FACS; z angl. *Fluorescent Activated Cell Sorting*) je metoda, která umožňuje relativně rychlou analýzu velkého množství jednotlivých buněk v suspenzi na základě jejich granularity, velikosti a fluorescence. V této práci byla metoda využita ke kvantifikaci rozdílů exprese vybraných povrchových molekul, markerů u buněk ošetřených statiny a u buněk bez statinů.

Vybrané povrchové molekuly byly označeny protilátkami s konjugovanými fluorochromy (viz Tabulka 1): CD14-PC7 (z angl. *Phycoerythrin Cyanin 7*); CD15-PE (z angl. *Phycoerythrin*); CD16-ECD (z angl. *Phycoerythrin-Texas Red-X*); CD36-FITC (z angl. *Fluorescein isothiocyanate*); TREM-2 (z angl. *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells* 2)-APC (z angl. *Allophycocyanin*); CD163-PE; CD206-APC a ABCA-1-Alexa Flour® 488. Životnost buněk byla stanovována FVD (z angl. *Fixable Viability Dye*)-eFluor 780TM.

Marker	Klon	Izotyp	Fluorochrom	Excitace/Emise	Výrobce
CD14	RMO52	Myší IgG2a	PC7	488/770	Beckman Coulter
CD15	HI98	Myší IgM κ	PE	565/578	Invitrogen (eBioscience)
CD16	3G8	Myší IgG1	ECD	488/613	Beckman Coulter
CD36	FA6.152	Myší IgG1	FITC	490/525	Beckman Coulter
TREM-2	23790	Kryší IgG2B	APC	650/660	R&D Systems
CD163	RM3/1= GHI/61	Myší IgG1κ	PE	565/578	Biologend
CD206	15-2	Myší IgG1κ	APC	650/660	Biologend
ABCA-1	768510	Myší IgG2a	Alexa Fluor 488	488/515-545	R&D Systems

Tabulka 1: Sada protilátek proti povrchovým znakům

4.3.1 Značení buněk pro průtokovou cytometrii a příprava FMO kontrol

K uvolněným buňkám z povrchu jamek byl přidán 0,2-0,3 ml PBS, buněčná suspenze byla přenesena do centrifugačních mikrozkuvek. Vzorke byly centrifugovány při 300 g, 10 min při pokojové teplotě. Tento promývací krok byl proveden dvakrát, v mikrozkuvce byl ponechán objem 100 µl, potřebný pro značení buněk na FACS podle protokolu Cyto-FastTM Fix/Perm Buffer Set. Do jednotlivých zkuvek na průtokovou cytometrii byly před přidáním

samotného vzorku přidány adekvátní objemy protilátek s navázanými fluorochromy dle pokynů výrobce. K nim bylo přidáno 100 µl vzorku a jako poslední odpovídající množství FVD. Vzorky byly řádně promíchány a byly ponechány ve tmě při pokojové teplotě po dobu 20 minut barvit. Vzorky byly následně promyty 1 ml PBS, centrifugováno při pokojové teplotě, 300 g, 5 min. Promývací krok byl proveden dvakrát. Následně byl obsah zkumavky vylit a bylo přidáno 300 µl PBS. Expres povrchových znaků byla měřena na fluorescenčním průtokovém cytometru (Navios Ex3/10, Beckman Coulter).

FMO (z angl. *Fluorescence Minus One*) kontroly byly připravovány standartním způsobem, sice vynecháním protilátky proti povrchovému znaku u odpovídající FMO kontroly. K jejich přípravě byly využity M0 makrofágy.

4.4 Stanovení genové exprese metodou qPCR

Genová exprese byla v této práci měřena metodou qPCR (z angl. *Quantitative Polymerase chain reaction*), která má oproti klasické PCR tu výhodu, že je v každém cyklu přesně kvantifikováno množství amplifikované nukleové kyseliny.

4.4.1 Izolace RNA

Buňky byly z 24jamkové destičky přeneseny do 2ml mikrozkušavek (Eppendorf) a byl k nim dodán 1 ml TRI Reagentu[®]. Poté, co byl vzorek homogenizován, byl inkubován 5 min při pokojové teplotě. Následně bylo ke vzorku přidáno 0,2 ml chloroformu, vzorek byl 15 vteřin míchán na orbitální třepačce (Vortex-Gene2, Scientific Industries), inkubován 3 min při pokojové teplotě a vzorky byly dále 15 min centrifugovány (12 000 g, 4 °C).

Horní vodní fáze byla přenesena do čisté mikrozkušavky, k ní bylo přidáno 0,5 ml izopropanolu, vzorek byl promíchán, inkubován při pokojové teplotě 10 min a následně opět centrifugován při 12 000 g, 4 °C, 10 min. Během centrifugace se ve zkumavce vytvořila čirá RNA peleta, od které byla opatrně odebrána tekutina. Samotná peleta byla opláchnuta 1 ml 75% ethanolu. Vzorek byl řádně promíchán a centrifugován (7 500 g, 4 °C, 5 min). Supernatant odebrán a peleta byla ponechána sušit na vzduchu. Po naprostém vysušení byla RNA peleta rozpuštěna ve 40 µl DEPC H₂O a byla změřena koncentrace RNA v jednotlivých vzorcích na NanoDrop 2000 spektrofotometru (Thermo Scientific).

4.4.2 Reverzní transkripce

Před samotným přepisem RNA na cDNA (z angl. *Complementary Deoxyribonucleic acid*) je nutné vzorek zbavit zbytkových molekul DNA, které by mohly negativně ovlivnit měření a celý výsledek kvantifikace genové exprese. K tomuto účelu je využívána DNasa I (Deoxyribonukláza I), která zbytky DNA degraduje.

Izolovaná RNA byla, podle vyizolovaného množství, nejprve naředěna adekvátním množstvím H₂O tak, aby celkový objem tvořil 8 µl. Ke vzorku byl přidán 1 µl DNasy I (DNase I Amplification Grade, Sigma-Aldrich, USA) a 1 µl pufru (Reaction buffer, Sigma-Aldrich, USA) pro udržení stálého pH v reakci. Vzorky byly stočeny a inkubovány při pokojové teplotě. Po 15 min byl přidán 1 µl STOP roztoku. Celkový objem vzorku v každé mikrozkušavce nakonec tvořil 11 µl, vzorek byl 10 min inkubován na thermo cycleru (ThermoFisher Scientific) při teplotě 37 °C.

Pro přepis cDNA z RNA byl využit kit na reverzní transkripci (High Capacity RNA-to-cDNAkit, Applied Biosystems). Celkový objem na jednu reakci byl 20 µl. K 9 µl DNAsou ošetřené RNA z předešlého kroku byl přidán 1 µl 2x RT (z angl. *Reverse transcription*) pufru (dNTPs, oktamery, oligo deoxy thymin-16) a 1 µl mixu enzymů (inhibitor RNázy, MuLV protein (z angl. *Murine Leukemia Virus*)). Program reverzní transkripce zahrnoval nejprve inkubaci 60 min při 37 °C, následně 5 min na 95 °C, nakonec krok chlazení při 4 °C. Vzniklá cDNA byla uskladněna v -80 °C.

4.4.3 Příprava primerů a samotná qRT-PCR reakce

Reakce probíhala v celkovém objemu 20 µl (viz Tabulka 3) a pro stanovení jednotlivých genů byly použity směsi specifických primerů (viz Tabulka 2). Jako endogenní kontrola pro normalizaci byl použit housekeeping gen b2m (β2-mikroglobulin).

Primer	Sekvence	Teplota annealingu
b2m (F)	TCTCTCTTTCTGGCCTGGAG	60 °C
b2m (R)	AATGTCGGATGGATGAAACC	
NF-κB (F)	ATGGCTTCTATGAGGCTGAG	62 °C
NF-κB (R)	GTGTTGTTGGTCTGGATGC	
IL-1β (F)	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA	62 °C
IL-1β (R)	GTCGGSGSTTCGTSGCTGGAT	
IL-6 (F)	AGCAGCAAAGAGGCACTGGCA	65 °C

IL-6 (R)	TGAGGAACAAGCCAGAGCTGTGC	
TNF α (F)	TCTTCTCGAACCCCGAGTGA	60 °C
TNF α (R)	CCTCTGATGGCACCACCAG	
NOS2 (F)	CAARGGCAACATCAGGTCGG	60 °C
NOS2 (R)	TGAAGGATTCTGCAGCCGAG	
MCP-1 (F)	AGAAGCTGTGATCTTCAAGACC	60 °C
MCP-1 (R)	AGCTGCAGATTCTTGGGTG	
Arg-1 (F)	ACAGTTGGCAATTGGAAGCA	60 °C
Arg-1 (R)	CACCCAGATGACTCCAAGATCAG	
TGF- β (F)	TCGCCAGAGTGGTTATCTTTT	64 °C
TGF- β (R)	TAGTGAACCCGTTGATGTCC	
VCAM-1 (F)	CTGGAAATGCAACTCTCACC	64 °C
VCAM-1 (R)	GTCTCCAATCTGAGCAGCAA	

Tabulka 2: Použité primery pro jednotlivé geny a housekeeping gen

Před samotnou reakcí byla nejprve získaná cDNA zředěná sterilní H₂O. cDNA je nutno před reakcí zředit tak, aby její množství bylo optimální pro správné proběhnutí PCR reakce a aby nedošlo v důsledku velké, nebo naopak nízké koncentrace nukleové kyseliny ke zkreslení výsledků. Pro reakci qPCR byl využit 5x HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (Rox; Solis BioDyne, Tartu, Estonia). Tento mix obsahuje HOT FIREPol[®] DNA polymerázu, 5x EvaGreen[®] qPCR pufr (pro udržení adekvátních chemických podmínek pro DNA polymerázu), 12,5 mM MgCl₂ (pro zesílení aktivity DNA polymerázy), dNTPs (nukleotidy pro prodloužení řetězce), EvaGreen[®] barvu a ROX barvu. EvaGreen[®] barva je využívána pro svou vysokou fluorescenci po vazbě na DNA a nulovou nebo velmi nízkou autofluorescenci, ROX barva pro normalizaci dat, tedy pro snížení variability mezi replikáty.

Pro každou reakci, specificky pro sledovaný gen, byl vytvořen mix. Bylo pracováno v triplikátech.

Reagencie	Množství na 1 reakci
5x qPCR mix	4 μ l
Primer	1 μ l
Vzorek	3 μ l
Voda	12 μ l
Celkové množství	20 μ l

Tabulka 3: Rozpis reagentů na jednu qPCR reakci

cDNA byla amplifikována pomocí Corbett Life Science Rotor Gene 3000 (Qiagen, Venlo, Nizozemí) za následujících podmínek: 1. fáze – Počáteční denaturace: 95 °C, 15 min, 1 cyklus;

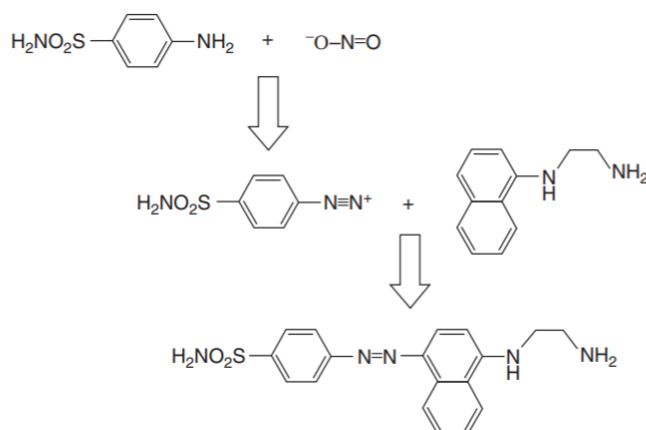
2. fáze – Denaturace: 95 °C, 15 s, 40 cyklů; 3. fáze – Nasedání primerů: 60 °C-65 °C (v závislosti na primerech), 20 s, 40 cyklů; 4. fáze – Elongace: 72 °C, 2 s, 40 cyklů; 5. fáze – Melting: 72 °C–95 °C.

4.5 Kvantifikace aktivity iNOS Griessovou metodou

Ze získaného supernatantu (viz 4.2 Stimulace CD14⁺ buněk M-CSF a jejich následná polarizace) bylo pro detekci aktivity NO syntázy odebráno 100 µl od každého vzorku.

4.5.1 Redukce dusičnanů

Redukce dusičnanu (NO^{3-}) na dusitan (NO^{2-}) je jedním z esenciálních kroků pro správné provedení Griessovy reakce. NO^{2-} narozdíl od NO^{3-} interaguje se sulfoamidem a NED (N-(1-naftyl) ethylen diamin) za vzniku chromoforního azo ($\text{R-N=N-R}'$) produktu (viz Obrázek 1: Grafické znázornění Griessovy reakce).



Obrázek 1: Grafické znázornění Griessovy reakce.

- 1.) Dusičnan v kyselém pH za vzniku diazoniového iontu interaguje se sulfanilamidem.
- 2.) Diazoniový ion se následně váže na NED
- 3.) Vznik chromoforního produktu; (Giustarini *et al.*, 2008).

Pro zredukování NO^{3-} byl ke 100 µl vzorku přidán 1 µl NADPH (Sigma Aldrich SL, MO, USA) a 1 µl Nitrát-reduktázy. Jako kontrola byl použit exogenní standard NaNO_3 . Vzorky i kontrola byly inkubovány 30 min při pokojové teplotě.

4.5.2 Deproteinizace

Deproteinizace vzorku je dalším důležitým mezikrokem Griessovy reakce. Proteiny ve vzorku mohou interferovat s Griessovým činidlem a dochází pak k nepřesnostem v měření.

Ke 100 μl vzorku po redukci dusičnanů bylo přidáno 900 μl směsi methanolu a diethyletheru v poměru 3:1. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 4 $^{\circ}\text{C}$, během čehož se vytvořila bílá sraženina. Následně byly vzorky centrifugovány při 12000 g, 10 min při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$ a dále byl zpracováván oddělený supernatant.

4.5.3 Příprava Griessova činidla a pracovní postup samotné Griessovy reakce

Griessovo činidlo je tvořeno roztoky A (0,1% naftylethylenamin dihydrochlorid) a B (1% sulfanilamid a 5% H_3PO_4) v poměru 1:1, 50 μl roztoku A: 50 μl roztoku B na 100 μl vzorku.

Roztok A byl vytvořen přidáním 0,1 g naftylethylenamin dihydrochloridu do 100 ml H_2O . Pro roztok B bylo nejprve třeba naředit 85% H_3PO_4 na 5% roztok (1,18 ml H_3PO_4 + 18,82 ml H_2O). K takto ředěné kyselině bylo přidáno 0,21 g sulfanilamidu. Následně byly roztoky A, B smíchány v Griessovo činidlo v poměru 1:1.

Dále byly připraveny standardy (viz Tabulka 4). Zásobním roztokem pro jejich přípravu byl NaNO_2 o koncentraci 150 $\mu\text{mol/l}$ (0,01 g NaNO_2 v 1 ml H_2O). Neředěný zásobní roztok sloužil jako standard 6, dále byly standardy ředěny dvojkovou řadou tak, aby celkový objem činil vždy 1 ml. K vodě nebylo přidáno nic.

Standard 6	150 $\mu\text{mol/l}$
Standard 5	75 $\mu\text{mol/l}$
Standard 4	37,5 $\mu\text{mol/l}$
Standard 3	18,75 $\mu\text{mol/l}$
Standard 2	9,38 $\mu\text{mol/l}$
Standard 1	4,69 $\mu\text{mol/l}$
Voda	0 $\mu\text{mol/l}$

Tabulka 4: Koncentrace standardů NaNO_2 pro kalibrační křivku Griessovy reakce

Do 96jamkové mikroděstičky (Corning Incorporated) bylo duplicitně napipetováno 100 μl standardů a vody, tedy kalibrační křivka, a kontroly. Po 100 μl byly v teraplikátech napipetovány také připravené vzorky. Do všech jamek bylo následně přidáno 100 μl Griessova činidla a destička byla ponechána 10 min při pokojové teplotě ve tmě. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 550 nm na spektrofotometru (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek).

4.6 Kvantifikace cytokinů ELISA testy

Pro detekci cytokinů IL-1 β , IL-10, IL-6 a TNF α byly využity ELISA (z angl. *Enzyme-linked immuno sorbent assay*) kity (viz 3.3 Kity a přístroje) a bylo postupováno dle přiložených protokolů. Téměř veškeré chemikálie potřebné pro provedení ELISA testů byly součástí kitu. Součástí kitu nebyl PBS, promývací pufr a stop roztok. Promývací roztok byl připraven smísením 500ml 1xPBS s 250 μ l Tween-20, stop roztok (2N H₂SO₄) byl připraven smísením 1,11 ml 36N H₂SO₄ a 18,89 ml deionizované vody.

Absorbance byla měřena při vlnových délkách 450 nm a 570 nm na spektrofotometru (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek).

5 STATISTICKÁ ANALÝZA

Statistické analýzy byly provedeny v programu GraphPad Prism 5. Pro porovnání jednotlivých populací byl využit jednosměrný ANOVA test a Bonferroniho multiple comparison test. Všechny výsledky jsou demonstrovány jako průměr \pm SD, není-li uvedeno jinak. Za statisticky významné byly považovány výsledky s $p \leq 0,05$.

6 VÝSLEDKY

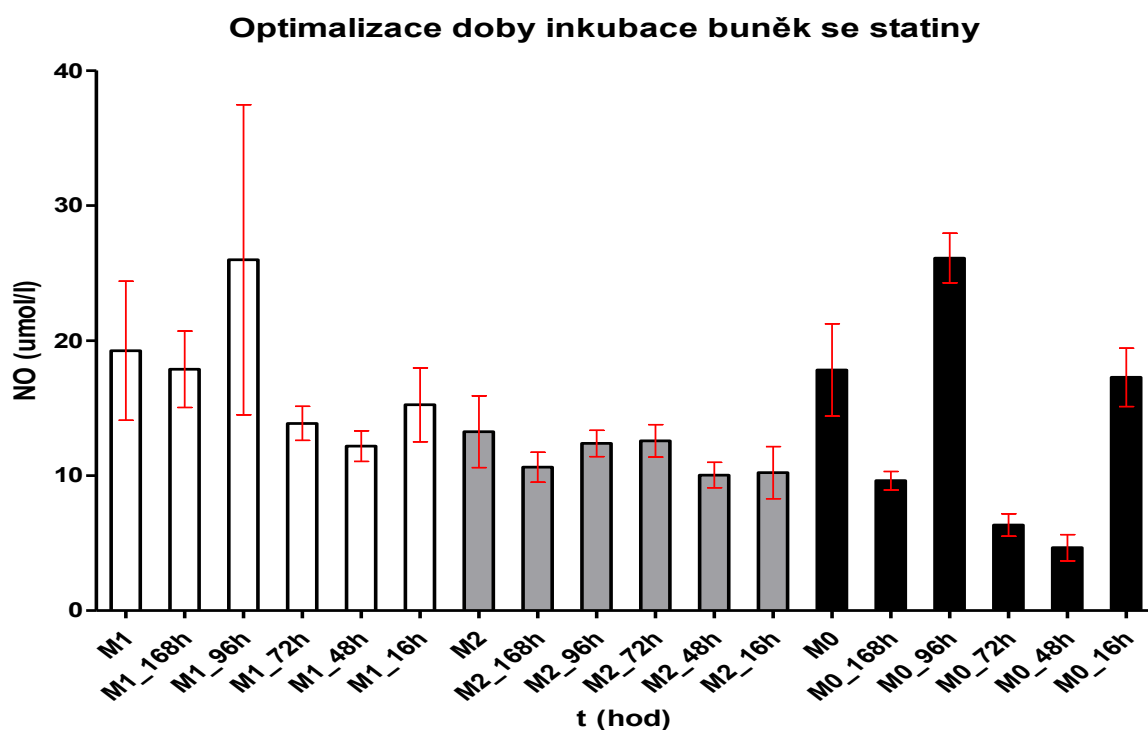
250ml-300ml periferní krve bylo odebráno pěti anonymizovaným dárcům. Mononukleární buňky byly izolovány pomocí ficoll separace, během níž došlo k oddělení plazmy, erytrocytů a granulocytů od mononukleárních buněk. Vzniklý prstenec PBMC byl odebrán, buňky byly promyty PBS a následně byla měřena jejich koncentrace a životnost pomocí přístroje Vi-CELL® XR (BeckmanCoulter; počet buněk: $37,1 \cdot 10^6$ buněk/ml - $80,7 \cdot 10^6$ buněk/ml; životnost: 90 % - 96,5 %).

Monocyty tvoří zhruba 5-10 % celkového množství PBMC, očekávaná výtěžnost byla tedy $1,85 \cdot 10^6$ buněk/ml - $8,0 \cdot 10^6$ buněk/ml. Reálné počty CD14⁺ buněk se pohybovaly v hodnotách mezi $185 \cdot 10^3$ buněk/ml - $550 \cdot 10^3$ buněk/ml. Životnost buněk byla značně ovlivněna a pohybovala se mezi 48,7 % - 63,4 %. Pro potřeby FACS analýzy bylo na každou jamku nutno nasadit $150 \cdot 10^3$ - $250 \cdot 10^3$ buněk, pro potřeby qPCR bylo na jamku vysazeno $50 \cdot 10^3$ - $250 \cdot 10^3$ buněk, v závislosti na výtěžnosti separace monocytárních buněk.

6.1 Optimalizace

6.1.1 Optimalizace doby inkubace buněk se statiny

Před samotnými analýzami byla provedena optimalizační měření vlivu času inkubace statinů s buňkami. K tomuto byla využita Griessova metoda stanovení aktivity NO syntázy. Graf 1 ukazuje, že u všech subpopulací makrofágů došlo k nejvýznamnějšímu poklesu aktivity NO syntázy po dvou dnech jejich inkubace se statiny. U M2 makrofágů byla aktivita NO syntázy téměř stejně snížena i v případě inkubace po dobu 168 hodin a 16 hodin. V rámci udržení stejných podmínek u všech subpopulací byla vybrána jako optimální doba inkubace 48 hodin.



Graf 1: Optimalizace času inkubace buněk se statiny

Vliv času inkubace statinů s buňkami na aktivitu iNOS. M0 17,83 ± 6,84 µmol/ml vs. M0+statin_{48h} 4,66 ± 1,94; M1 19,25 ± 8,9 µmol/ml vs. M1+statin_{48h} 12,19 ± 2,53 µmol/ml; M2 13,25 ± 10,62 µmol/ml vs. M2+statin_{168h} 10,62 ± 1,93 µmol/ml vs. M2+statin_{48h} 10,04 ± 1,89 µmol/ml vs. M2+statin_{16h} 10,23 ± 3,86 µmol/ml. Výsledky vyjádřeny jako koncentrací uvolněného NO do kulturačního média, µmol/ml ± SD.

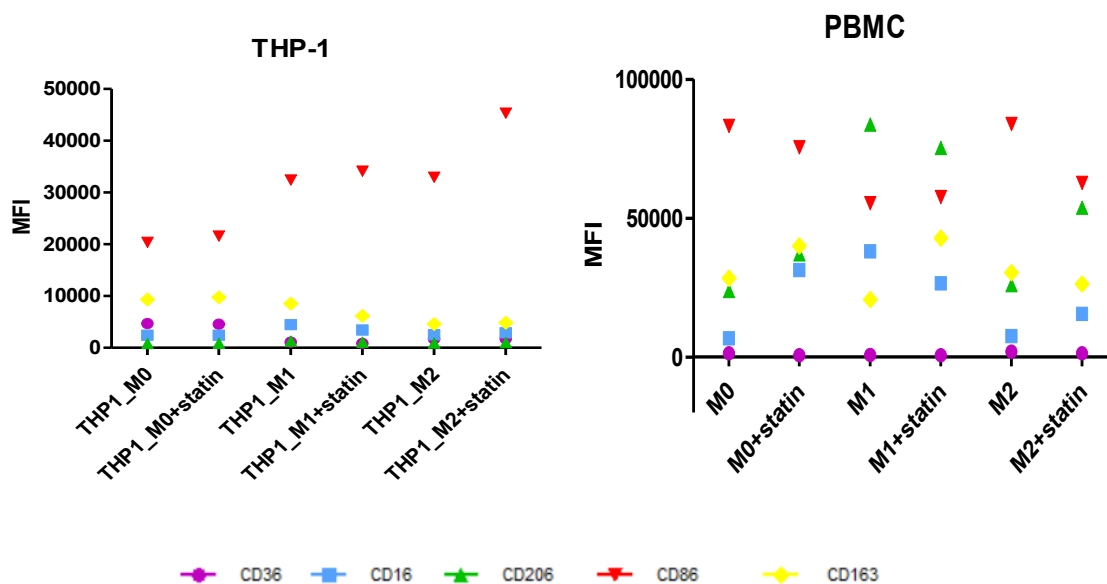
6.1.2 Výběr vhodného modelu

Výběr vhodného modelu je naprosto zásadní pro optimální nastavení protokolů všech analýz. Původním záměrem této práce bylo k získání makrofágů využít buněčnou linii THP-1 a lidské monocyty izolované z periferní krve.

V této části byla sledována míra exprese povrchových znaků CD16, CD36, CD86, CD163 a CD206 a vliv statinové terapie na jejich expresi.

První graf z obrázku 2 (THP-1) ukazuje, že hladina exprese povrchových znaků byla na všech makrofázích odvozených z této buněčné linie velice nízká a mezi subpopulacemi makrofágů se nelišila. Dále je z grafu patrné, že statinová terapie na jejich expresi neměla žádný vliv. Linie THP-1 neprokázala v podmínkách naší laboratoře vlastnosti, které byly pro tuto experimentální práci nezbytné a z toho důvodu nebyla v této diplomové práci dále využita (viz DISKUZE).

Druhý graf obrázku 2 (PBMC) naopak ukazuje zřetelné rozdíly nejen v expresi povrchových znaků mezi jednotlivými populacemi makrofágů, ale také efekt statinové terapie na jejich expresi. Na základě tohoto pilotního pokusu byly v diplomové práci využívány makrofágy diferencované z monocytů periferní krve.



Obrázek 2: Vliv statinů na expresi povrchových znaků na makrofágy odvozených od THP-1 a PBMC

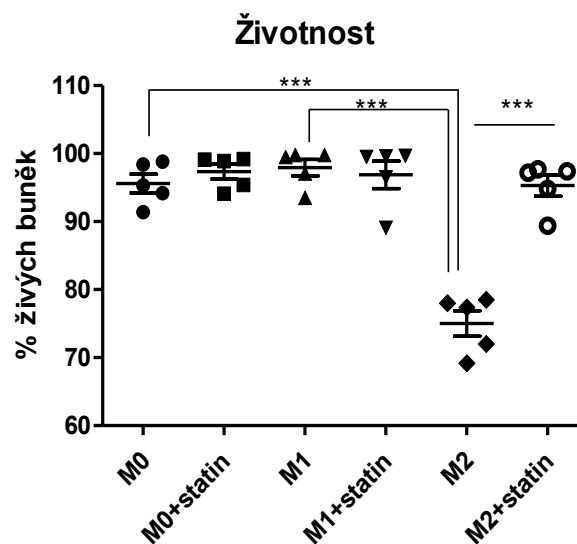
Míra exprese povrchových znaků vyjádřena jako MFI (z angl. *Mean fluorescence intensity*) \pm SD.

6.2 Průtoková cytometrie

V rámci této diplomové práce bylo sledováno 8 povrchových znaků (CD14, CD16, CD15, CD36, CD163, CD206, ABCA-1, TREM-2) a životnost buněk. Povrchové znaky byly vybrány na základě výsledků naší laboratoře (Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, IKEM) a relevantní literatury (viz DISKUZE). K analýze cytometrických dat byl využit software FlowJo™ v10.

6.2.1 Rozdělení makrofágů podle fenotypu

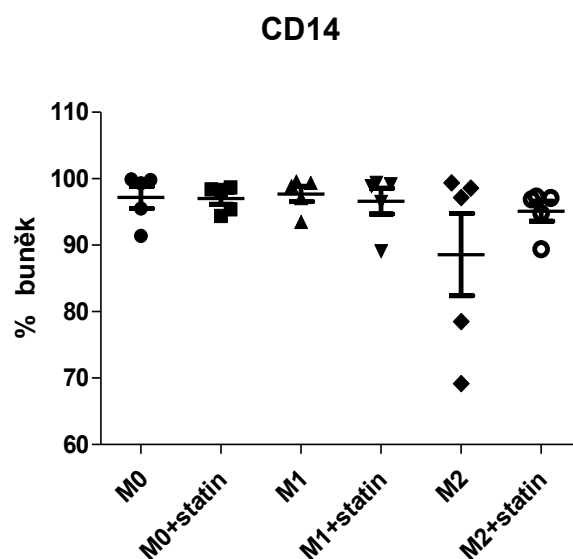
Nejprve byl stanoven vliv statinů na životnost buněk. Graf 2 demonstruje, že statiny nemají negativní efekt na přežívání buněk u subpopulací M1 a M0, naopak u M2 makrofágů statiny signifikantně zvýšily životnost buněk. V grafu je zvýrazněn také významný rozdíl mezi životností M0 a M1 makrofágů vůči M2 makrofágům.



Graf 2: Vliv statinů na životnost buněk (n=5)

Graf vyjadřuje míru přežívání buněk bez statinů a po stimulaci statiny. M0 $95,62 \pm 3,07$ %, M0+statin $97,34 \pm 2,41$ %; M1 $97,94 \pm 2,73$ %, M1+statin $96,88 \pm 4,55$ %; M2 $75,02 \pm 4,17$ %, M2+statin $95,3 \pm 3,49$ %. Výsledky vyjádřeny jako % \pm SD; *** $p < 0,0001$.

Dále byl pro kontrolu, zda statiny neovlivňují makrofágy jako takové, stanoven vliv statinů na expresi povrchového znaku CD14 (lipopolysacharidový receptor). Graf 3 ukazuje, že statiny expresi tohoto povrchového znaku neovlivňují.



Graf 3: Vliv statinů na expresi CD14 (n=5)

Graf demonstruje vliv statinové terapie na expresi povrchového znaku CD14. M0 $97,18 \pm 3,708$ vs. M0+statin $97,04 \pm 1,991$; M1 $97,7 \pm 2,547$ vs. M1+statin $96,62 \pm 4,363$; M2 $88,58 \pm 13,87$ vs. M2+statin $95,10 \pm 3,341$. Výsledky vyjádřeny jako $\% \pm SD$.

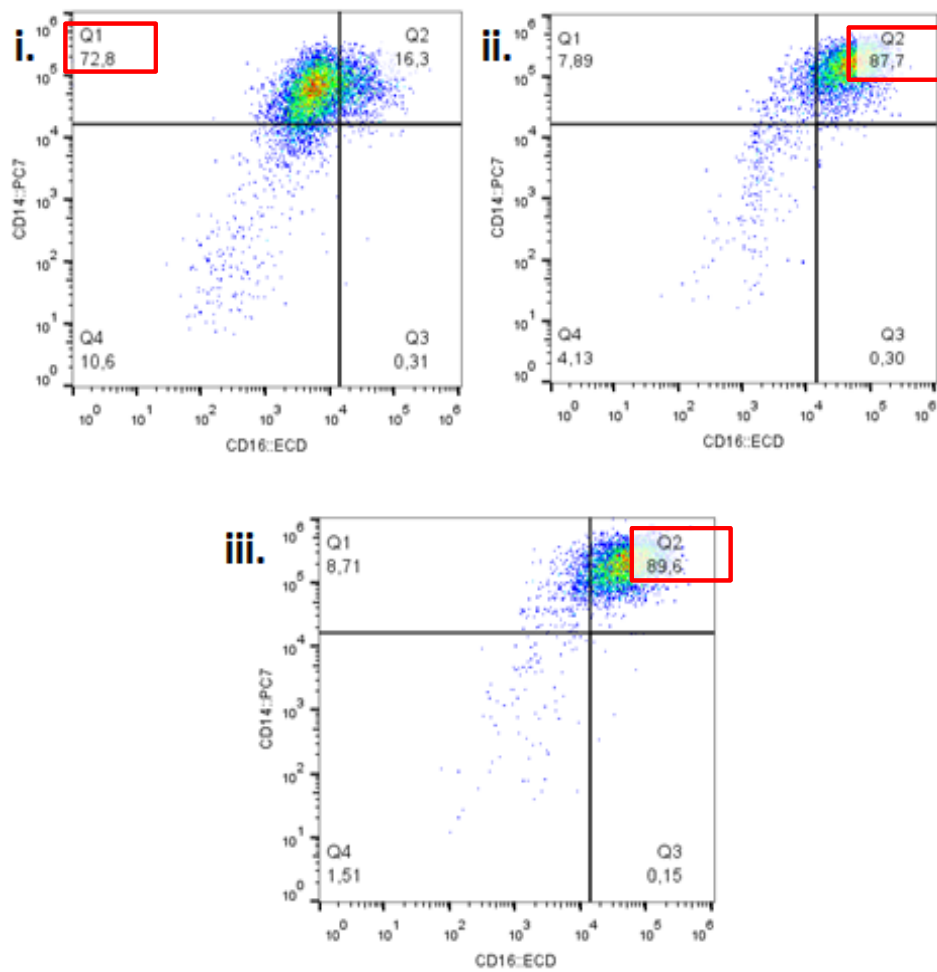
Na základě těchto výsledků byly následně populace klasicky aktivovaných M1 a alternativně aktivovaných M2 makrofágů rozděleny na základě exprese znaků CD14 a CD16 (nízkoafinní receptor pro imunoglobulin G).

Lidské krevní monocyty jsou tradičně rozdělovány na základě exprese dvou povrchových znaků, CD14 a CD16. Na základě míry exprese těchto markerů se pak obvykle dělí do tří skupin: 1. Klasické monocyty ($CD14^+CD16^-$), 2. Intermediární monocyty ($CD14^+CD16^+$), 3. Neklasické monocyty ($CD14^{low}CD16^+$; Patel *et al.*, 2017). Klasické monocyty mají prozánětlivý charakter, u intermediárních a neklasických byla popsána schopnost regenerace a oprav tkání (shrnuto v Cornwell *et al.*, 2018), lze tedy předpokládat jejich snazší schopnost diferenciaci protizánětlivým směrem, nicméně i u těchto dvou skupin byla popsána schopnost zánětlivých reakcí pod vlivem zánětlivého prostředí. Stejně tak klasické monocyty mají i schopnost polarizace v protizánětlivém směru (Cornwell *et al.*, 2018). Na základě těchto zdrojů byly v této práci definovány subpopulace makrofágů.

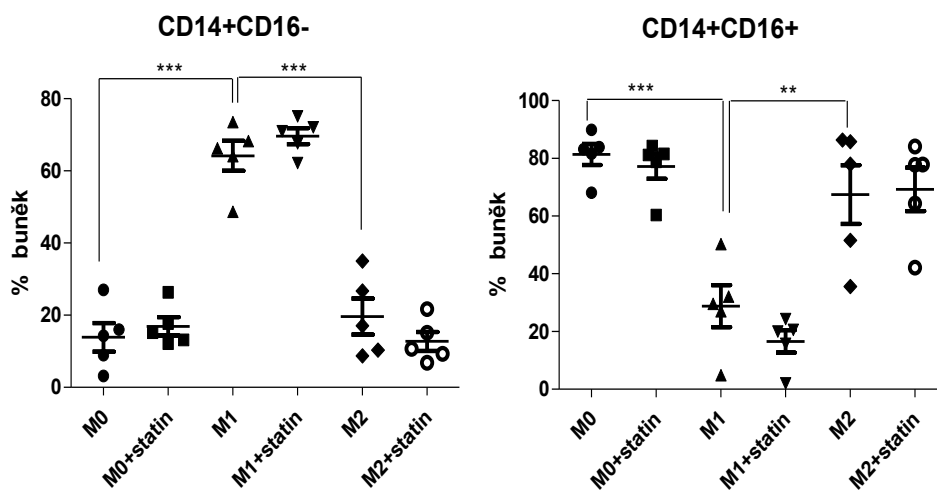
Za M1 ($IFN\gamma+LPS$) byly považovány buňky $CD14^+CD16^-$ (Obrázek 3A, i.), jako M2 ($IL-4+IL-13$) makrofágy byly uvažovány buňky s expresí $CD14^+CD16^+$ (Obrázek 3A, ii.). Nestimulované M0 makrofágy vykazovaly stejně jako M2 makrofágy expresi $CD14^+CD16^+$

(Obrázek 3A, iii.; viz kapitola DISKUZE). V obrázku jsou zvýrazněny procenta buněk vykazující daný fenotyp. Populace makrofágů s nízkou nebo žádnou expresí CD14 nebyla v rámci této práce brána v potaz vzhledem k charakteru využití metody izolace monocytů (viz 4.1 Izolace PBMC a oddělení CD14⁺ buněk). Z obr. 3B je patrné, že stimulace cytokiny výrazně ovlivnila zejména expresi povrchového znaku CD16. První graf ukazuje signifikantně vyšší množství M1 makrofágů ($64,2 \pm 9,4$ %) exprimujících kombinaci znaků CD14⁺CD16⁻ oproti makrofágům fenotypu M2 ($19,6 \pm 11,15$ %) a M0 ($13,9 \pm 8,9$ %). Druhý graf demonstruje signifikantní rozdíl v expresi znaků CD14⁺CD16⁺ u M2 ($67,5 \pm 22,8$ %) a M0 makrofágů ($81,3 \pm 8,04$ %) vůči M1 makrofágům ($28,8 \pm 16,2$ %).

(A)



(B)



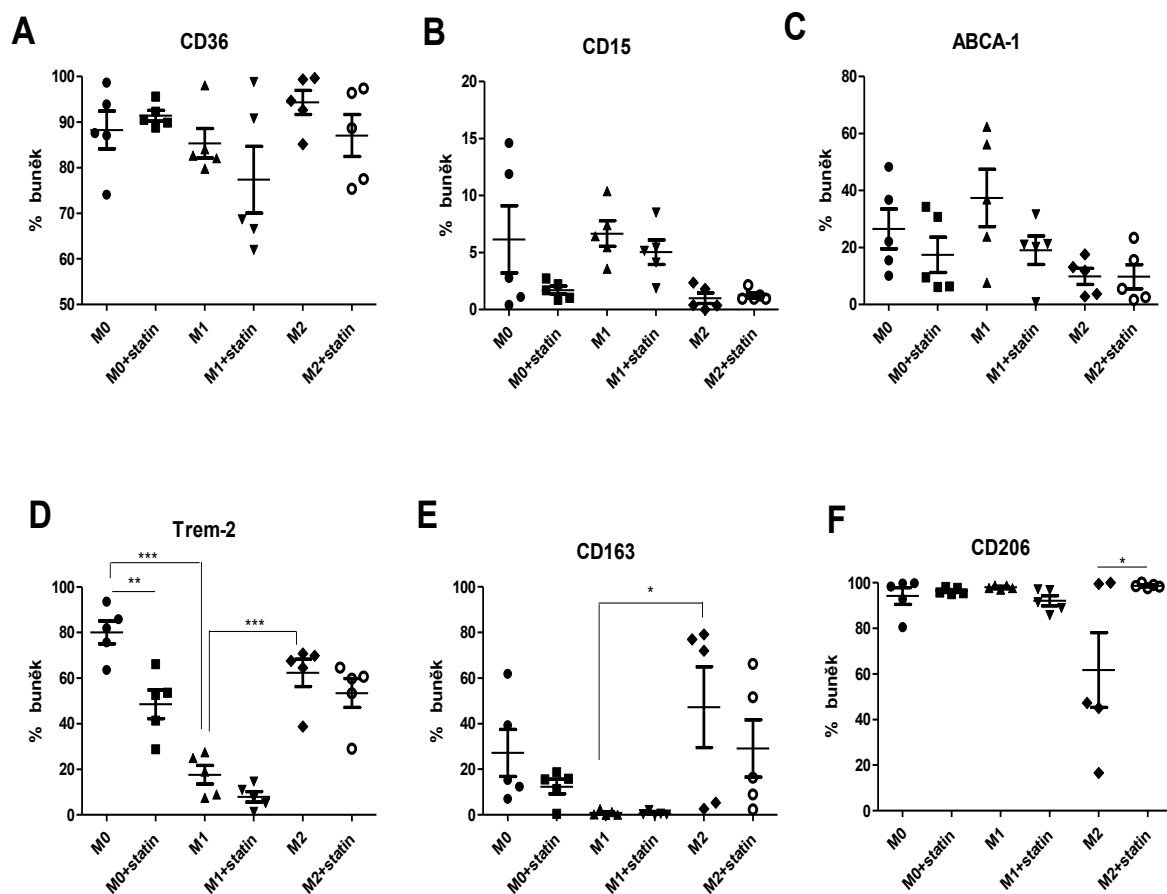
Obrázek 3: Rozdělení populací M1, M2 a M0 makrofágů na základě exprese CD14 a CD16 (n=5)
(A) Gatovací strategie pro definici subpopulací makrofágů: po vybrání CD14⁺ populace byl gate pro CD16 vytvořen podle FMO kontroly na nestimulovaných M0 makrofázích; (B) Porovnání procentuálního zastoupení buněk vykazující CD14⁺CD16⁻ fenotyp (M1, vlevo); CD14⁺CD16⁺ (M0 a M2, vpravo). Výsledky vyjádřeny jako % ± SD, *** p < 0,0001.

6.2.1.1 Kvantifikace povrchových znaků

U definovaných subpopulací makrofágů bylo stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých povrchových znaků a změny v expresi jednotlivých znaků u buněk bez statinů a se statiny (viz Obrázek 4). Expresie povrchových znaků i životnost byly vztaženy ke kombinaci znaků CD14 a CD16 odpovídající definovaným populacím (viz kapitola 6.1.1), tedy CD14⁺CD16⁻ pro M1 a CD14⁺CD16⁺ pro M2 a M0. Pro každý znak byla vytvořena FMO kontrola.

Ke statisticky významné změně v expresi došlo pouze v případě znaků Trem-2 a CD206. Expresie Trem-2 (Obrázek 4D) byla signifikantně snížena u M0 makrofágů ošetřených statiny ($48,52 \pm 14,07$ %) vůči M0 makrofágům bez statinů ($80,12 \pm 11,27$ %). Graf dále ukazuje signifikantně vyšší zastoupení buněk M0 ($80,12 \pm 11,27$ %) a M2 ($62,34 \pm 13,38$ %) exprimující tento znak oproti subpopulaci M1 ($17,64 \pm 9,07$ %). Expresie znaku CD206 (Obrázek 4F) byla naopak významně zvýšena, a to u M2 makrofágů se statiny ($98,98 \pm 0,89$ %) oproti stejné populaci buněk bez statinů ($61,72 \pm 36,78$ %). Dále byl prokázán signifikantní rozdíl v množství M2 makrofágů exprimující znak CD163 ($47,26 \pm 39,54$ %) oproti makrofágům M1 ($0,85 \pm 1,130$ %; Obrázek 4E).

Dále působení statinů snížilo expresi znaků CD36 u populace M1 ($85,36 \pm 7,29$ % vs. M1+statin $77,38 \pm 16,33$ %) a M2 ($94,34 \pm 5,93$ % vs. M2+statin $87,08 \pm 10,3$ %); CD15 (Obrázek 4B) v případě populací M0 ($6,16 \pm 6,6$ % vs. M0+statin $1,71 \pm 0,78$ %) a M1 ($6,67 \pm 2,52$ % vs. M1+statin $5,034 \pm 2,39$ %); ABCA-1 (Obrázek 4C), zejména u populace M1 ($37,43 \pm 22,59$ % vs. M1+statin $19,02 \pm 11,21$ %); Trem-2 u populací M1 ($17,64 \pm 9,07$ % vs. M1+statin $7,95 \pm 5,15$ %) a M2 ($62,34 \pm 13,38$ % vs. M2+statin $53,48 \pm 14,26$ %) a znaku CD163 (Obrázek 4E) u populací M2 ($47,26 \pm 39,54$ % vs. M2+statin $29,09 \pm 28,13$ %) a M0 ($27,2 \pm 23,0$ % vs. M0+statin $12,39 \pm 7,17$ %).



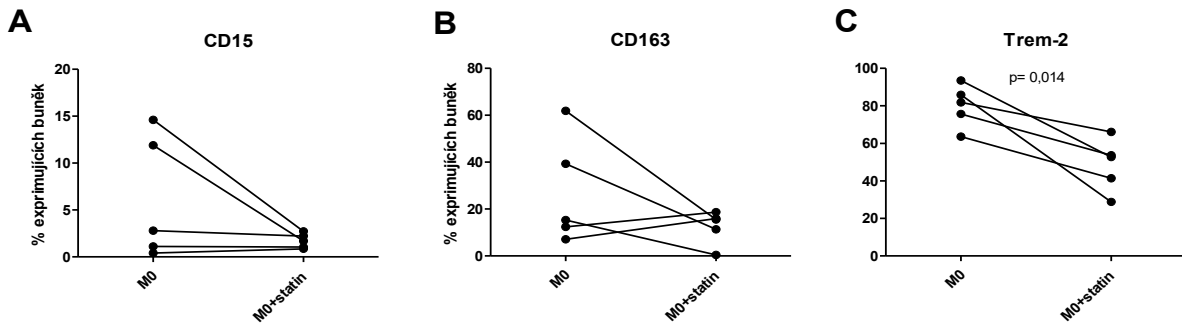
	CD36 (% ± SD)	CD15 (% ± SD)	ABCA-1 (% ± SD)	Trem-2 (% ± SD)	CD163 (% ± SD)	CD206 (% ± SD)
M0	88,28 ± 9,26	6,16 ± 6,6	25,56 ± 15,74	80,12 ± 11,27	27,2 ± 23,00	94,24 ± 8,2
M0+statin	91,42 ± 2,67	1,71 ± 0,78	17,43 ± 13,92	48,52 ± 14,07	12,39 ± 7,17	96,42 ± 1,47
M1	85,36 ± 7,29	6,67 ± 2,52	37,43 ± 22,59	17,64 ± 9,07	0,85 ± 1,130	98,06 ± 0,83
M1+statin	77,38 ± 16,33	5,034 ± 2,39	19,02 ± 11,21	7,95 ± 5,15	0,65 ± 0,88	92,1 ± 4,94
M2	94,34 ± 5,93	0,99 ± 1,038	9,87 ± 6,35	62,34 ± 13,38	47,26 ± 39,54	61,72 ± 36,78
M2+statin	87,08 ± 10,3	1,252 ± 0,511	9,75 ± 9,42	53,48 ± 14,26	29,09 ± 28,13	98,98 ± 0,89

Obrázek 4: Změny v expresi sledovaných povrchových znaků po ošetření buněk statiny (n=5)

Grafy vyjadřují míru exprese povrchových znaků a změnu v jejich expresi po stimulaci makrofágů statiny. V tabulce jsou vyneseny průměrné hodnoty buněk exprimující daný znak. Výsledky vyjádřeny jako % ± SD buněk populací M1 CD14⁺CD16⁻; M2 CD14⁺CD16⁺ a M0 CD14⁺CD16⁻; Trem-2 ***p < 0,0001; CD163 *p < 0,02; CD206 *p < 0,01.

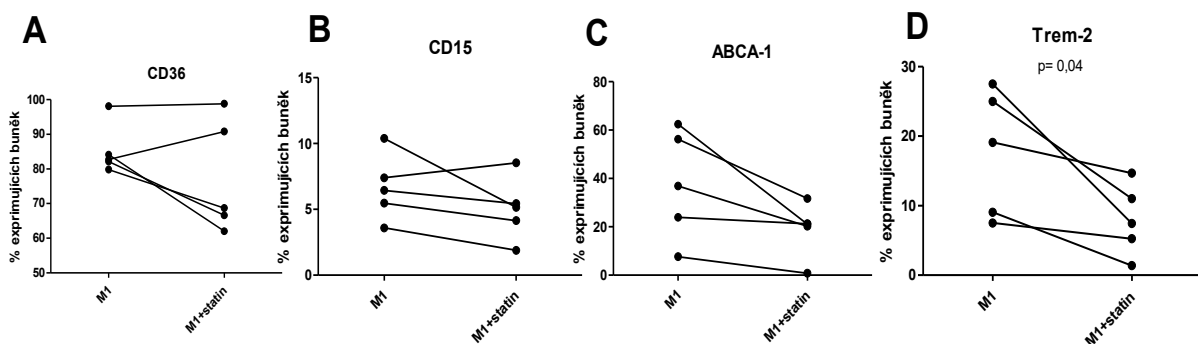
Ačkoliv rozdíly v expresi znaků CD15, CD36 ABCA-1 a Trem-2 a CD163 nedosáhly ve většině případech signifikance, je z grafů obr.4 patrný trend vlivu statinů na jejich expresi v rámci jednotlivých měření. Následující grafy ukazují nejvýraznější trendy u jednotlivých populací. Ke statistickému zhodnocení výsledků byl využit studentův t test.

Grafy na obrázku 5 vyjadřují vliv statinů na expresi znaků CD15 (5A), CD163 (5B) a Trem-2 (5C) na makrofágy populace M0 u jednotlivých měření. Graf 5C demonstruje významný vliv statinové terapie na expresi znaku Trem-2 (M0 80,12 ± 11,27 % vs. M0+statin 48,52 ± 14,07 %; * p= 0,014). Dále přítomnost statinů snížila expresi znaků CD15 (M0 6,16 ± 6,6 % vs. M0+statin 1,706 ± 0,78 %) a CD163 (M0 27,2 ± 23 % vs. M0+statin 12,39 ± 7,17 %).



Obrázek 5: Trendy ve změnách exprese znaků CD15, CD163 a Trem-2 u populace M0
 Jednotlivé grafy vyjadřují trendy ve změnách exprese povrchových znaků makrofágy M0 u jednotlivých vzorků po ošetření buněk statiny. Výsledky vyjádřeny jako % ± SD buněk z populace M0 CD14⁺CD16⁺.

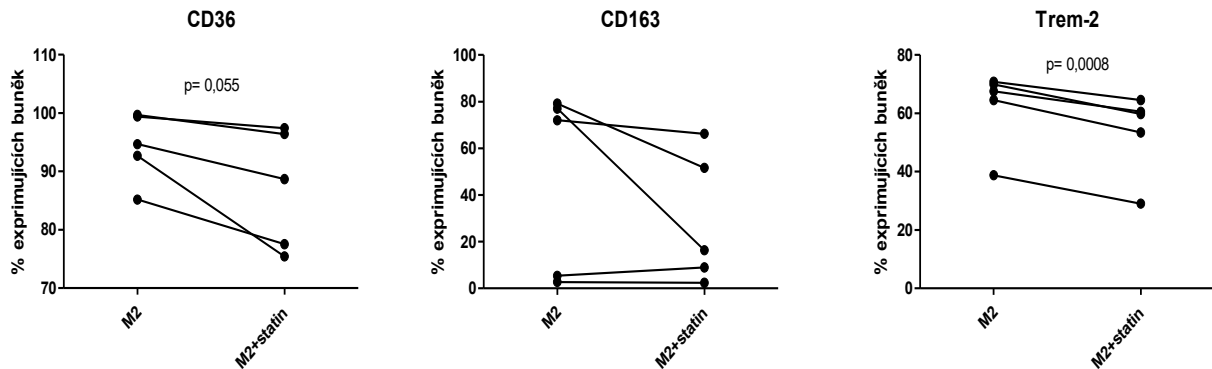
Grafy na obrázku 6 vyjadřují vliv statinů na expresi znaků CD36 (6A), CD15 (6B), ABCA-1 (6C) a Trem-2 (6D) na makrofágy populace M1. Statinová terapie významně omezila expresi znaku Trem-2 (M1 17,64 ± 9,07 % vs. M1+statin 7,95 ± 5,15 %; * p= 0,04). Dále statiny snížily expresi znaků CD36 (M1 85,36 ± 7,89 % vs. M1+statin 77,38 ± 16,33 %), CD15 (M1 6,66 ± 2,52 % vs. M1+statin 5,03 ± 2,40 %) a ABCA-1 (M1 37,43 ± 22,59 % vs. M1+statin 19,02 ± 11,21 %).



Obrázek 6: Trendy ve změnách exprese znaků CD36, CD15, ABCA-1 a Trem-2 u populace M1
 Jednotlivé grafy vyjadřují trendy ve změnách exprese povrchových znaků u makrofágů M1 u jednotlivých vzorků po ošetření buněk statiny. Výsledky vyjádřeny jako % ± SD buněk z populace M1 CD14⁺CD16⁻.

Grafy na obrázku 7 vyjadřují vliv statinů na expresi znaků CD36 (7A), CD163 (7B) a Trem-2 (7C) u M2 makrofágů. I v případě této subpopulace došlo po ošetření buněk statiny k významnému poklesu exprese znaku Trem-2 (M2 62,34 ± 13,38 % vs. M2+statin

53,48 ± 14,26 %; *** p= 0,0008). Vlivem statinové terapie byla na M2 makrofázích snížena i exprese znaku CD36 (M2 94,34 ± 5,93 % vs. M2+statin 87,08 ± 10,3 %). Tento výsledek se nachází na hranici signifikance (p= 0,055). Po ošetření M2 makrofágů statiny došlo také ke snížení exprese znaku CD163 (M2 47,26 ± 36,54 % vs. M2+statin 29,09 ± 28,13 %).



Obrázek 7: Trendy ve změnách exprese znaků CD36, CD163 a Trem-2 u populace M2

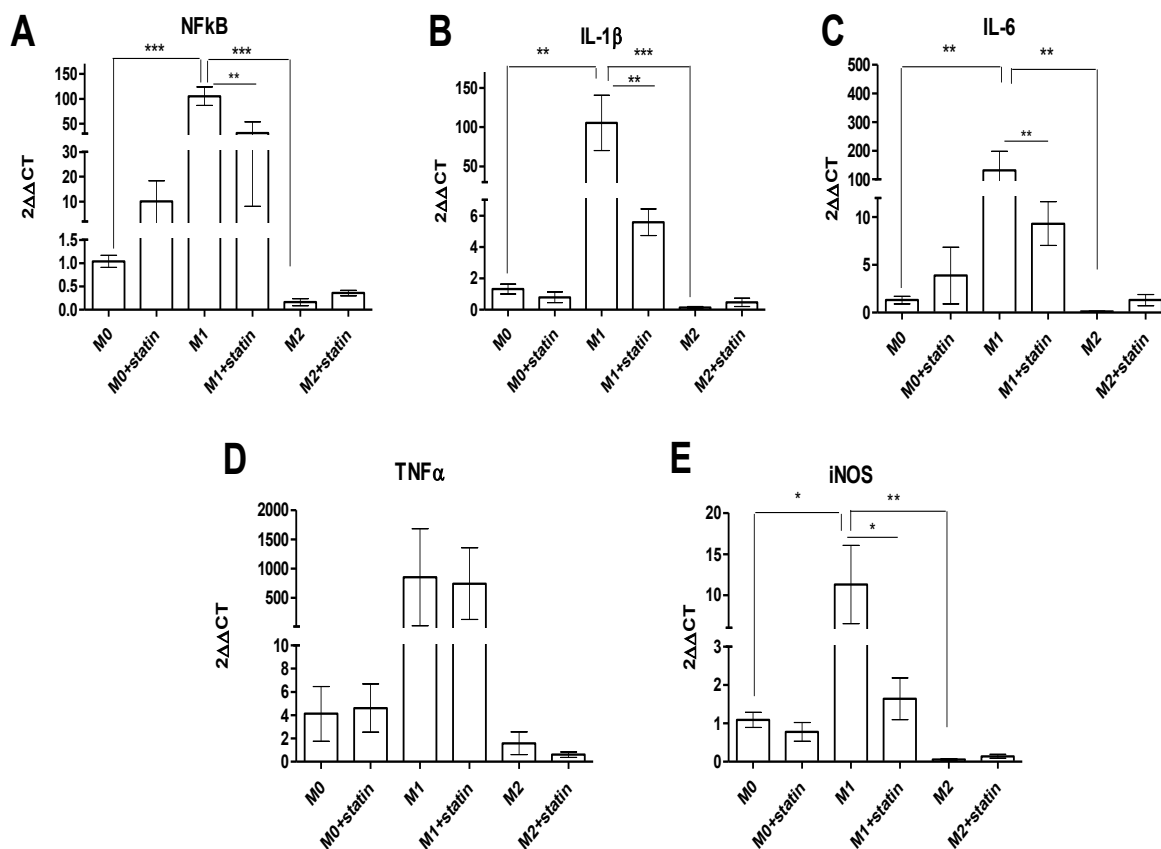
Jednotlivé grafy vyjadřují trendy ve změnách exprese povrchových znaků makrofágy M2 u jednotlivých vzorků po ošetření buněk statiny. Výsledky vyjádřeny jako procenta ± SD buněk z populace M2 CD14⁺CD16⁺.

6.3 Analýza genové exprese

Pro ověření protizánětlivého vlivu statinů na genové úrovni byl sledován jejich vliv na genovou expresi znaků účastnících se 1. migrace a adheze monocytů a makrofágů MCP-1, VCAM-1; 2. genů zprostředkovávajících zánětlivé reakce NFκB, IL-1β, IL-6, TNFα, iNOS a 3. genů typických pro protizánětlivý fenotyp imunitních reakcí Arg-1 a TGF-β. Na základě výsledků průtokové cytometrie a dostupných publikací bylo očekáváno snížení exprese genů *MCPI*, *VCAMI*, *NFKB*, *IL1B*, *IL6*, *TNFA* a *iNOS*, opačný trend byl očekáván u genů *ARG1* a *TGFB*. Jako housekeeping gen byl využit β2-mikroglobulin (viz DISKUZE).

K vyhodnocení dat genové exprese z qPCR byla využita delta-delta Ct metoda ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), uvedené výsledky jsou demonstrovány jako relativní hodnota genové exprese ± SD.

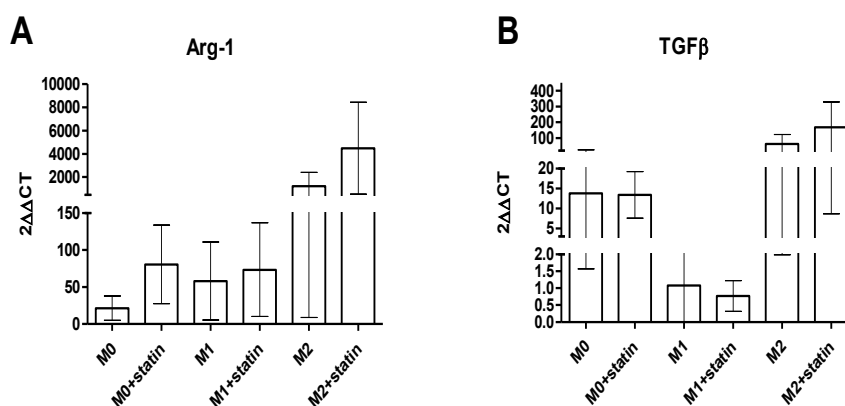
Graf A obr. 8 ukazuje signifikantně vyšší expresi genu *NFKB* u M1 ($105 \pm 45,72$) makrofágů oproti subpopulacím M0 ($1,040 \pm 0,3205$) a M2 ($0,3585 \pm 0,143$). Dále ukazuje signifikantní efekt statinové terapie na jeho expresi u subpopulace M1 (M1 $105 \pm 45,72$ vs. M1+statin $31,06 \pm 56,20$). U subpopulace M0 je patrná, ale ne signifikantní, zvýšená exprese tohoto genu po ošetření buněk statiny (M0 $1,040 \pm 0,3205$ vs. M0+statin $10,09 \pm 20,4$). Gen *IL1B* (8B) byl exprimován významně více u subpopulace M1 ($105,4 \pm 70,44$) oproti buňkám subpopulace M0 ($1,327 \pm 0,5622$) a M2 ($0,1454 \pm 0,1353$). Dále byl u M1 makrofágů potvrzen signifikantní význam statinové terapie na snížení exprese genu *IL1B* (M1 $105,4 \pm 70,44$ vs. M1+statin $5,577 \pm 1,695$). Dalším sledovaným proinflamačním genem byl gen *IL6* (8C), u kterého byla také prokázána signifikantně vyšší exprese u makrofágů M1 ($131,2 \pm 163,9$) oproti makrofágům subpopulací M0 ($1,302 \pm 1,132$) a M2 ($0,1109 \pm 0,008$). Signifikantní efekt statinů na expresi tohoto genu byl prokázán u subpopulace M1 (M1 $131,2 \pm 163,9$ vs. $9,316 \pm 6,911$). U genu znaku iNOS (8E) byla demonstrována signifikantně významnější exprese u buněk subpopulace M1 ($11,29 \pm 11,67$) oproti buňkám subpopulací M0 ($1,089 \pm 0,4883$) a M2 ($0,0549 \pm 0,0595$). Významný vliv statinů na expresi tohoto genu byl potvrzen u M1 subpopulace ($11,29 \pm 11,67$ vs. $1,641 \pm 1,338$). Posledním sledovaným prozánětlivým genem byl gen *TNFA* (8D). V případě tohoto genu nebyl detekován významný rozdíl v expresi mezi jednotlivými subpopulacemi, i tak se liší (M0 $4,129 \pm 6,656$ vs. M1 $854,1 \pm 2344$ vs. M2 $1,589 \pm 2,751$). Největšího rozdílu v expresi došlo v případě M1 makrofágů ($854,1 \pm 2344$ vs. M1+statin $742,8 \pm 1835$), rozdíly u ostatních subpopulací byly zanedbatelné.



Obrázek 8: Změny v genové expresi zánětlivých genů (n=3)

Grafy vyjadřují změnu genové exprese jednotlivých prozánětlivých genů u subpopulací M0, M1 a M2 po ošetření buněk statiny. Výsledky jsou průměrem měření 3 vzorků po 3 opakováních, relativní genová exprese \pm SD buněk z populací M1 CD14⁺CD16⁻; M2 CD14⁺CD16⁺ a M0 CD14⁺CD16⁻; NFκB ***p < 0,0001; IL-1β ***p < 0,0002; IL-6 ***p < 0,0009; iNOS ***p < 0,002.

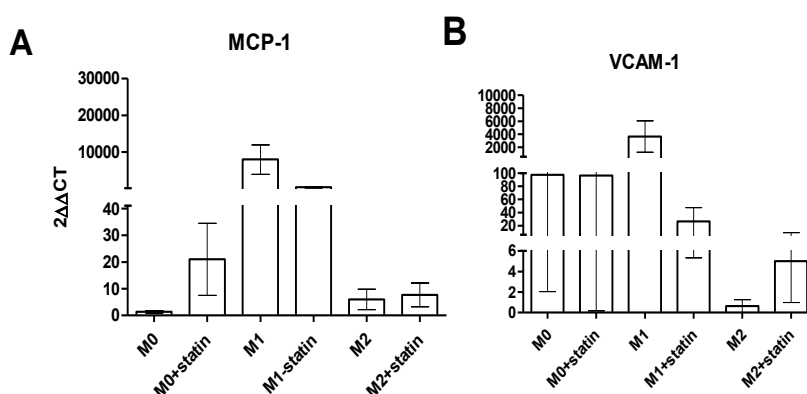
Na grafu A obr.9 je vynesena míra exprese genu *ARG1*. Ačkoliv nebyl detekován signifikantní rozdíl v expresi mezi jednotlivými populacemi, z grafu je patrné, že nejvíc byl exprimován u makrofágů M2 (M0 21,5 \pm 51,91 vs. M1 58,08 \pm 158,8 vs. M2 1207 \pm 3790). Z grafů je také patrné, že statiny zvýšily expresi tohoto genu u makrofágů M0 (21,5 \pm 51,91 vs. M0+statin 80,63 \pm 158,7), M1 (58,08 \pm 158,8 vs. 73,45 \pm 219,6) i M2 (1207 \pm 3790 vs. 4478 \pm 13706). Graf B obr.9 vyjadřuje míru exprese genu *TGFB*, ani zde nebyl prokázán významný rozdíl v expresi mezi jednotlivými populacemi. I tak graf ukazuje, že byl tento gen nejvíce exprimován makrofágy subpopulace M2 a také, že v případě těchto buněk došlo po ošetření statiny ke zvýšení exprese (M2 62,48 \pm 135,3 vs. M2+statin 168 \pm 391,2). V případě populací M0 a M1 nedošlo k významnému rozdílu v expresi u buněk ošetřených statiny.



Obrázek 9: Změny v genové expresi protizánětlivých genů (n=3)

Grafy vyjadřují změnu genové exprese protizánětlivých genů u subpopulací M0, M1 a M2 po ošetření buněk statiny. Výsledky jsou průměrem měření 3 vzorků po 3 opakováních, relativní genová exprese \pm SD buněk z populací M1 CD14⁺CD16⁻; M2 CD14⁺CD16⁺ a M0 CD14⁺CD16⁻.

Graf A obr. 10 ukazuje míru genové exprese *MCPI*. Ačkoliv nebyla prokázána signifikance, je z grafu patrné, že nejvíce je exprimovaný buňkami subpopulace M1 (M0 1,355 \pm 1,255 vs. M1 7925 \pm 12036 vs. M2 6,003 \pm 9,308). U makrofágů M1 došlo po ošetření buněk statiny ke snížení exprese *MCPI* (M1 7925 \pm 12036 vs. M1+statin 342,8 \pm 524,9), u makrofágů M0 byl výsledek opačný, po jejich ošetření statiny došlo ke zvýšení exprese genu (1,355 \pm 1,255 vs. M0+statin 20,98 \pm 27,02). Na expresi genu u subpopulace M2 neměly statiny významný vliv. Posledním analyzovaným genem byl *VCAMI*. Ani v případě tohoto genu nebyla exprese významně zvýšena u žádné subpopulace makrofágů oproti dalším subpopulacím. Graf B obr. 10 ukazuje, že v případě makrofágů M1 došlo ke snížení exprese *VCAMI* po ošetření buněk statiny (M1 3648 \pm 5970 vs. M1+statin 26,33 \pm 55,53). V případě M2 makrofágů došlo po ošetření buněk statiny naopak ke zvýšení exprese tohoto genu (M2 0,6312 \pm 1,653 vs. M2+statin 5,020 \pm 9,901). V případě subpopulace M0 nebyla exprese *VCAMI* statiny ovlivněna.



Obrázek 10: Změny v genové expresi genů účastnících se migrace monocytů/makrofágů (n=3)

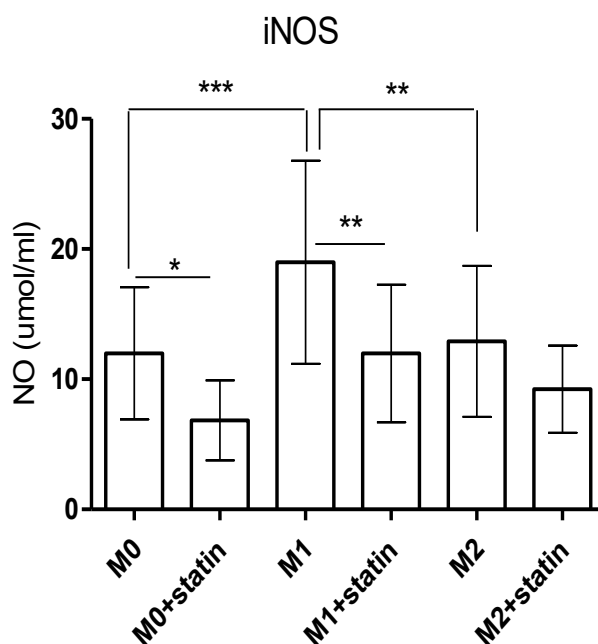
Grafy vyjadřují změnu genové exprese genů účastnících se migrace monocytů/makrofágů u subpopulací M0, M1 a M2 po ošetření buněk statiny. Výsledky jsou průměrem měření 3 vzorků po 3 opakováních, relativní genová exprese \pm SD buněk z populací M1 CD14⁺CD16⁻; M2 CD14⁺CD16⁺ a M0 CD14⁺CD16⁻.

6.4 Aktivita inducibilní NO syntázy

Změna aktivity enzymu iNOS působením statinu na buňky byla stanovena na základě kvantifikace množství uvolněného oxidu dusnatého do kultivačního média pomocí Griessovy metody. iNOS je jeden ze základních markerů M1 makrofágů. Na základě dostupné literatury shrnuté v této práci a předešlých analýz byl předpokládán negativní efekt na jeho aktivitu, tedy snížení jeho aktivity po ošetření buněk statiny.

Graf 4 ukazuje signifikantně vyšší aktivitu iNOS u M1 makrofágů ($18,98 \pm 7,8 \mu\text{mol/ml}$) oproti populacím M0 ($11,99 \pm 5,08 \mu\text{mol/ml}$) a M2 ($12,91 \pm 5,81 \mu\text{mol/ml}$). Graf dále demonstruje významné snížení aktivity tohoto enzymu u M1 makrofágů ošetřených statiny ($11,98 \pm 5,28 \mu\text{mol/ml}$) oproti stejné populaci bez statinů ($18,98 \pm 7,8 \mu\text{mol/ml}$). Mírnější, ale stále signifikantní vliv statinů byl prokázán i u populace M0 makrofágů (M0 $11,99 \pm 5,076 \mu\text{mol/ml}$, M0+statin $6,85 \pm 3,07 \mu\text{mol/ml}$).

Tyto výsledky jsou podpořeny také analýzou genové exprese, kde statiny signifikantně snížily expresi genu pro iNOS (kapitola 6.3).



Graf 4: Změny v aktivitě inducibilní No syntázy (n=5)

Kvantifikace koncentrace oxidu dusnatého uvolněného do kultivačního média makrofágy bez statinů nebo se statiny. Výsledky jsou průměrem měření 5 vzorků po 4 opakováních, $\mu\text{mol/ml} \pm \text{SD}$ buněk z populací M1 $\text{CD14}^+\text{CD16}^-$; M2 $\text{CD14}^+\text{CD16}^+$ a M0 $\text{CD14}^+\text{CD16}^-$; *** $p < 0,0001$.

6.5 Produkce cytokinů

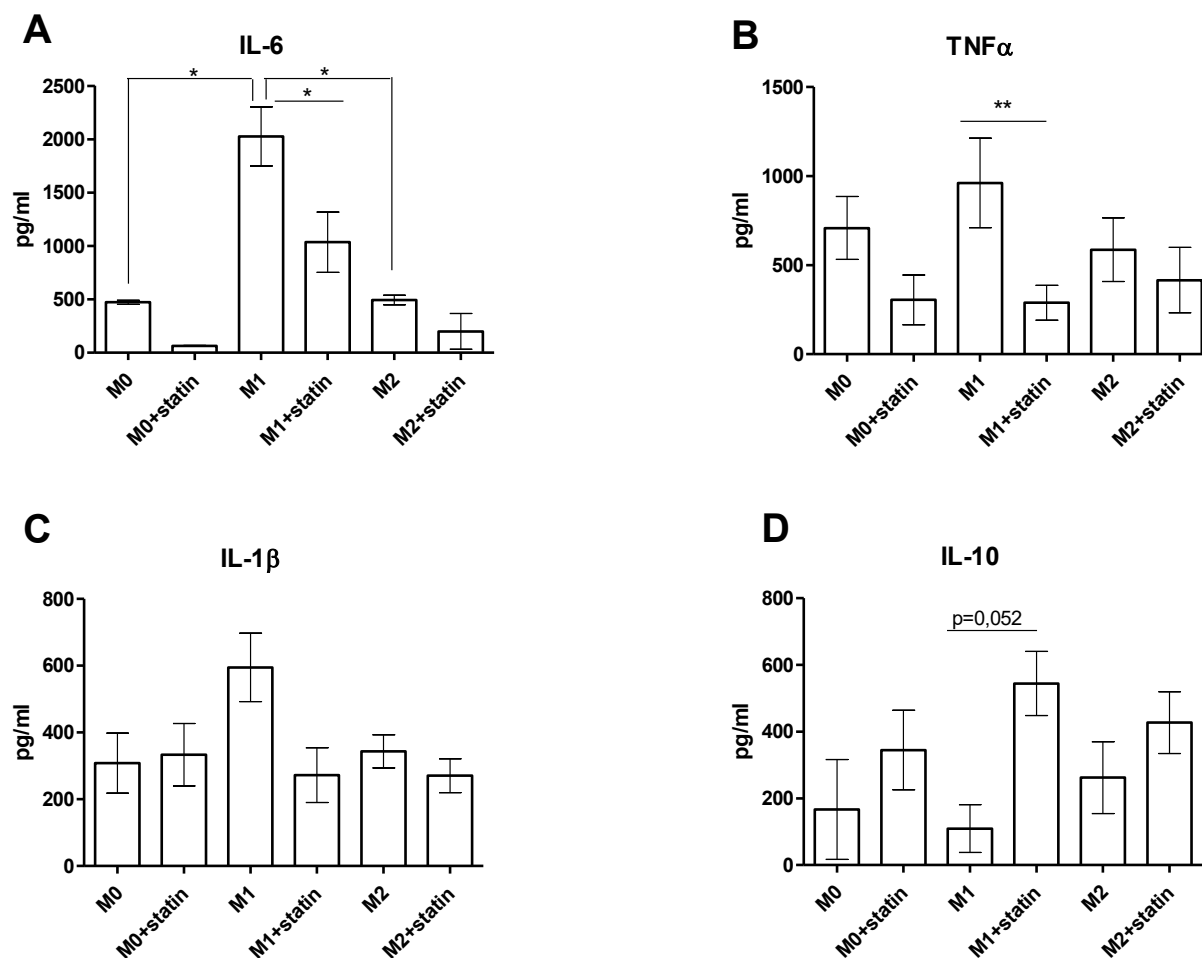
Pro ověření protizánětlivého vlivu statinů na proteinové úrovni byly využity ELISA testy, jimiž byly kvantifikovány změny produkce prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, TNF α) a protizánětlivého cytokinu (IL-10) do kultivačního média. Vzhledem k předešlým výsledkům a dostupné literatuře byl předpokládán inhibiční efekt na produkci prozánětlivých cytokinů, u IL-10 bylo naopak očekávané zvýšení produkce.

Obrázek 11A ukazuje významně vyšší produkci cytokinu IL-6 u M1 makrofágů v porovnání s makrofágy M0 a M2. Ačkoliv je to jediný znak, u něž bylo takové signifikance dosaženo, je z grafů jasné, že i znaky TNF α (11B) či IL-1 β (11C) jsou silněji produkovány makrofágy prozánětlivého fenotypu. V případě protizánětlivého cytokinu IL-10 (11D) byly vyšší hladiny detekovány u makrofágů M2, ani zde ale nebylo dosaženo signifikance.

Nejvýrazněji v této práci statiny ovlivnily uvolňování cytokinu IL-6 u M1 makrofágů. Přítomnost těchto léčiv vedla v případě zmíněné subpopulace ke statisticky významnému poklesu produkce (M1 2025 \pm 829,3 pg/ml vs. M1+statin 1034 \pm 798,7 pg/ml). V případě subpopulací M0 a M2 byl efekt statinové terapie na snížení produkce tohoto cytokinu také detekován, ale nebylo dosaženo signifikance (M0 471,4 \pm 33,20 pg/ml vs. M0+statin 63,99 \pm 4,05 pg/ml; M2 492,7 \pm 92,86 pg/ml vs. M2+statin 199,9 \pm 237,3 pg/ml). U M1 makrofágů bylo v médiu vlivem statinové terapie signifikantním způsobem redukováno množství uvolněného TNF α (M1 1348 \pm 11,29 pg/ml vs. M1+statin 172,3 \pm 175,9 pg/ml). Vliv statinů na omezení produkce tohoto cytokinů je demonstrován i u subpopulací M0 a M2, nebyla ale prokázána signifikantní spojitost (M0 795,0 \pm 618,5 pg/ml vs. M0+statin 293,6 \pm 88,8 pg/ml; M2 363,0 \pm 36,80 pg/ml vs. M2+statin 263,1 \pm 4,62 pg/ml). Posledním sledovaným cytokinem spojovaným s zánětlivou imunitní odpovědí byl IL-1 β . V případě tohoto znaku nebyla prokázána signifikantní spojitost mezi statinovou terapií a množstvím uvolněného cytokinu v médiu. K nejvýraznějšímu omezení došlo v případě makrofágů M1 (M1 595,3 \pm 308,1 pg/ml vs. 272,4 \pm 272,8 pg/ml). U subpopulací M0 a M2 došlo k zanedbatelnému vlivu.

Posledním sledovaným cytokinem byl protizánětlivý IL-10. Vliv statinové terapie na makrofágy měla v případě tohoto cytokinu opačný účinek, jejich přítomnost podpořila uvolňování IL-10 do kultivačního média. Byť u žádné populace nedošlo vlivem statinů k signifikantnímu zvýšení produkce IL-10, výsledky u M1 makrofágů se pohybují na hraně signifikance (M1 109,8 \pm 214,3 pg/ml vs. M1+statin 544,6 \pm 303,8 pg/ml). I v případě makrofágů M0 a M2 je z grafu patrná role statinů ve zvýšení produkce tohoto cytokinu

(M0 $166,9 \pm 300,3$ pg/ml vs. M0+statin $345 \pm 377,8$ pg/ml; M2 $262,3 \pm 322,8$ vs. M2+statin $427,5 \pm 306,3$ pg/ml).



Obrázek 11: Změny v produkci cytokinů IL-6, TNF α , IL-1 β a IL-10 (n=5)

Jednotlivé grafy vyjadřují změny v produkci cytokinů u buněk ošetřených statiny oproti buňkám bez statinů. Výsledky jsou průměrem měření 5 vzorků, bylo pracováno v duplikátech nebo tetraplikátech. Výsledky vyjádřeny jako pg/ml \pm SD; IL-6 p $<0,01$; TNF α p $<0,003$.

7 DISKUZE

7.1 Zvolení modelu, optimalizace, separace CD14⁺ buněk z krve

Metody využití v této diplomové práci vyžadují relativně velký objem monocytů, resp. makrofágů, a tedy i velké množství krve, odpovídající množství minimálně 250 ml v závislosti na bohatosti krve dárce na monocyty. Původním záměrem této diplomové práce bylo vedle monocytů izolovaných z periferní krve využít také buněčnou linii THP-1. Ta by, pakliže by byla vhodným modelem, umožnila výrazně snazší získání dat. První optimalizační analýzy nicméně ukázaly, že pro studium vlivu statinů na polarizaci makrofágů tyto buňky nesplňují v podmínkách naší laboratoře vhodné předpoklady (viz VÝSLEDKY). Dle dostupné literatury nejsou buňky THP-1 linie ani pod vlivem stejných cytokinů (tedy IFN γ +LPS pro M1 populaci a IL-4+IL-13 pro M2 populaci) schopny uspokojivě mimikovat vlastnosti makrofágů diferencovaných z monocytů periferní krve. Liší se produkcí cytokinů i expresí povrchových znaků (Tedesco *et al.*, 2018), což se shoduje s výsledky v této práci (viz Obrázek 2). Dále bylo ideou práce využít také makrofágy izolované z tukové tkáně, v současné době ale neexistuje pracoviště, kde by bylo zpracovááno tak velké množství tuku, ze kterého by bylo možné izolovat dostatečné množství neporušených makrofágů potřebných pro všechny analýzy. Veškeré analýzy byly tak provedeny na makrofázích diferencovaných z monocytů lidské periferní krve.

Pro získání statisticky i klinicky relevantních výsledků by bylo vhodné nejen rozšířit množství analyzovaných vzorků, ale také testovat vliv více typů běžně předepisovaných statinů na zánětlivý profil makrofágů. Práce s lidským biologickým materiálem je v porovnání s biologickým materiálem zvířecích modelů nebo dokonce s prací s buněčnými liniemi v mnoha směrech mnohem náročnější. Zejména pak v zajištění etických hodnot vědecké práce a zajištění dostatečného množství vzorku a dobrovolníků.

Tato práce se omezila při testování protizánětlivých efektů statinů pouze na jeden statin, fluvastatin, který je snadno rozpustný ve vodě. Samozřejmě by mohlo být namítnuto, že pro statiny, které nejsou ve vodě rozpustné, by mohla být použita rozpouštědla typu DMSO (dimethyl sulfoxid), která jsou běžně v laboratoři využívána. Využití takového rozpouštědla by ale muselo být zohledněno v analýze dat a výsledků, neboť samotný solvent může buňky ovlivňovat. Studium vlivu všech typů statinů by navíc bylo nejen finančně, ale také velmi časově a organizačně náročné. Pro studium vlivu všech typů statinů na velkém vzorku na typu biologického materiálu, který byl využit v této práci, není tak rozsah diplomové práce vhodný.

V rámci optimalizace byl sledován vliv doby inkubace statinů (168 h; 96 h; 72 h; 48 h a 16 h) s buňkami na aktivitu iNOS pomocí Griessovy metody. Tato metoda byla ke stanovení vhodné inkubační doby buněk se statiny vybrána zejména z důvodu nejmenší finanční, materiálové i časové náročnosti. Výsledky reprezentované změnou v koncentraci oxidu NO do kultivačního média u buněk inkubovaných se statiny byly porovnány s aktivitou tohoto enzymu u buněk bez statinů. Jako optimální byla vybrána koinkubace buněk se statiny po dobu 48 hodin, odpovídající i inkubační době buněk s cytokiny. Nejvýraznějších výsledků ve změně aktivity tohoto enzymu tak došlo v případě statinové terapie souběžné s polarizací makrofágů. Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky publikace Fu *et al.*, 2019. Nutno zmínit, že u M2 makrofágů ke stejné nebo velmi podobné změně aktivity iNOS došlo i při inkubaci statinů s buňkami po dobu 168 h a 16 h (M2+statin_{168h} 10,62 ± 1,93 μmol/ml vs. M2+statin_{48h} 10,04 ± 1,89 μmol/ml vs. M2+statin_{16h} 10,23 ± 3,86 μmol/ml). V rámci zachování stejných podmínek u všech subpopulací makrofágů byla vybrána koinkubace po dobu 48 hodin. Koncentrace fluvastatinu nebyla optimalizována, byla přejata ze studie Fu *et al.*, 2019 a je v souladu i s výsledky studie McFarland *et al.*, 2017.

Veškeré analýzy v této práci jsou provedeny na makrofázích diferencovaných z monocytů z periferní krve, které byly izolovány pomocí ficoll gradientu a separovány pomocí tzv. pozitivní selekce. Pozitivní selekce, selekce na základě exprese povrchového znaku, zde CD14, je, v rámci izolačních metody vhodných pro získání těchto buněk, nejúčinnější metodou. Nejen, že je vůči buňkám nejšetrnější, což se odráží v přežívání buněk, ale je také metodou s nejvyšší výtěžností (Nielsen *et al.*, 2020). Namísto magnetických kuliček použitých v uvedeném zdroji byly využity polystyrenové kuličky s navázanými monoklonálními protilátkami proti znaku CD14. Separace polystyrenovými kuličkami má oproti separaci magnetickými kuličkami tu výhodu, že k ní není třeba žádného speciálního vybavení. Životnost buněk i jejich výtěžnost v této práci byly oproti uvedenému zdroji značně sníženy, největší část těchto „ztrát“ bylo pravděpodobně způsobeno nedostatečně opatrnou manipulací během separačních kroků. Za pozitivní lze považovat zlepšující se tendenci se zvyšujícím se počtem opakování.

Mohlo by být namítnuto, že k separaci monocytárních buněk by byla vhodná například metoda buněčného sortingu. V době vypracovávání této práce nicméně nebyla na pracovišti možnost využití této separační metody a zároveň udržet sterilní podmínky inkubace buněk.

7.2 Diskuze výsledků

Výsledky prezentované v této práci podporují převládající vědecký názor, že statiny působí protizánětlivě, a přispívají k bližšímu pochopení jejich vlivu na fenotyp makrofágů. Je nicméně samozřejmě nutné mít neustále na paměti, že *in vitro* podmínky nejsou schopny plnohodnotně kopírovat stav *in vivo*, a je jistě vždy důležité zohlednit buněčný typ a kontext prostředí, ve kterém jsou statiny studovány.

7.2.1 Kvantifikace povrchových znaků a stanovení životnosti buněk

Ještě před analýzou vlivu statinů na expresi povrchových znaků byl stanoven také jejich efekt na přežívání buněk. V této práci bylo zjištěno, že statiny nemají negativní vliv na životnost buněk u žádné subpopulace makrofágů. Naopak se překvapivě ukázalo, že statiny jsou schopny zvýšit životnost M2 makrofágů. Tyto výsledky jsou v částečné shodě se studií Parihar *et al.*, 2014, kde statinová terapie neměla na přežívání makrofágů diferencovaných z monocytů periferní krve žádný vliv. Jsou v rozporu se studií Croons *et al.*, 2010, kde byl studován vliv statinů na životnost makrofágů J774.A1 a kde byla prokázána negativní korelace se životností buněk a užitím statinů. Možným důvodem tohoto rozkolu je, že v uvedených studiích byly makrofágy stimulovány jiným způsobem a nebyl studován vliv statinové terapie na různé fenotypy makrofágů.

Prvním analyzovaným povrchovým znakem byl znak CD14, kterým byla definována celá monocytární populace. CD14, známý také jako lipopolysacharidový receptor, je klíčový pro aktivaci TLR2/4 a spuštění jejich signalizačních drah (Muta and Takeshige, 2001). Výsledky této diplomové práce ukazují, že statiny nemají vliv na expresi tohoto znaku na makrofázích žádného zde zkoumaného fenotypu a naznačují tak, že *in vitro* statiny neovlivňují makrofágy jako takové. Tohoto závěru došli i autoři studie Izadpanah *et al.*, 2015. Tento výsledek je v rozporu s výsledky studie Frey and De Maio, 2007, kde byl *in vitro* popsán efekt statinové terapie na zvýšení exprese membránového CD14 na povrchu myších peritoneálních makrofágů. Autoři tento efekt přisuzují inhibici Rho GTPázy, respektive inhibici postranlační modifikace geranylgeranylace vlivem zablokování biosyntetické dráhy cholesterolu. Jak bylo zmíněno už v kapitole 2.2, izoprenoidní molekuly účastnící se prenylace (tedy i geranylgeranylace) proteinů jsou meziproduktem mevalonátové dráhy a jejich produkce je tak statiny také omezena. A právě inhibice geranylgeranylace dle autorů způsobila inhibici Rho GTPázy, která vyústila ve zvýšenou expresi znaku CD14. Studie Funderburg *et al.*, 2014 naopak přednesla poznatky o snížení množství solubilní formy tohoto znaku v séru pacientů

s HIV-1 po ošetření statiny a demonstrovala tak jejich negativní efekt na aktivaci monocytů v rámci tohoto onemocnění. Studie Izadpanah *et al.*, 2015 pak popsala efekt statinů na snížení exprese tohoto znaku na povrchu mesenchymálních kmenových buněk. Zde je nutné zmínit, že statiny omezily už diferenciační schopnost těchto kmenových buněk a je tak možné, že omezení CD14 není přímým vlivem statinů na tento povrchový znak, ale důsledkem změn kmenových buněk jako takových. Nicméně tato teorie není podepřena výzkumem. Důvodů tohoto rozkolu může být jistě mnoho, je pravděpodobné, že, stejně jako v případě ostatních povrchových znaků, hraje klíčovou roli vliv okolního prostředí. Ve chvíli, kdy jsou makrofágy, byť *in vitro*, stimulovány jiným způsobem, pak nutně musí dojít také k rozdílům v jejich vlastnostech. Znak CD14 je exprimován i dalšími buněčnými typy a je pravděpodobné, že i buněčná příslušnost bude hrát v možném vlivu statinů na expresi tohoto znaku roli.

Dále byl analyzován i efekt statinů na populace makrofágů definované znaky CD14 a CD16, respektive tedy jejich vliv na expresi znaku CD16. Dle zde prezentovaných výsledků nemá statinová terapie na expresi tohoto znaku významný vliv. To dále podporuje hypotézu, že statiny *in vitro* neovlivňují makrofágy jako takové.

Kromě zmíněných povrchových znaků CD14, CD16 byly dále vybrány znaky CD15, CD36, CD163, CD206, Trem-2, ABCA-1. Znak CD86 byl použit pouze v rámci optimalizačních kroků, dále nemohl být využit z důvodu silné autofluorescence makrofágů v kanálu, ve kterém byl měřen.

Receptory CD163 a CD206 jsou typickými znaky M2 makrofágů (Buechler *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2020), jejich exprese pak byla spojena také s M2 fenotypem makrofágů účastnících se aterosklerózy (Bisgaard *et al.*, 2016; Kralova Lesna *et al.*, 2016). Jsou tak běžně využívány jako markery alternativně aktivovaných M2 makrofágů (Soldano *et al.*, 2018; Veloso *et al.*, 2020). I v rámci této práce byly tyto markery zvoleny pro rozlišení M2 makrofágů. Zatímco znak CD163 kopíroval očekávaný trend, byl tedy v signifikantně vyšší míře exprimován u M2 makrofágů v porovnání s M1 makrofágy, exprese znaku CD206 byla nezvykle vysoká nejen u M1 makrofágů, ale také u nestimulovaných M0 makrofágů, které byly vystaveny pouze působení faktoru M-CSF. Zdá se tedy, že za vysokou expresi tohoto znaku je zodpovědná právě inkubace monocytů s tímto diferenciačním faktorem, který je běžně v *in vitro* experimentech využíván k navození diferenciace makrofágů z monocytů (Sadh *et al.*, 2020). Tuto teorii podporují i recentní výsledky studie Chen *et al.*, které ukazují, že M-CSF stimuluje některé fenotypové charakteristiky alternativně aktivovaných makrofágů, včetně zvýšené exprese znaku CD206. Tento efekt je u buněk pozorovatelný i několik dní

po výměně média již bez M-CSF (Chen *et al.*, 2021). Překvapivě, nejmenší měrou byl CD206 exprimován na povrchu M2 makrofágů.

Statiny signifikantním způsobem zvýšily expresi CD206 u subpopulace M2. Tento výsledek je v souladu s předpokládanou antiinflamační funkcí statinů a je ve shodě s výsledky studie Zhang *et al.*, 2017 na lidských makrofázích z monocytů periferní krve, kde autoři zvýšení exprese tohoto znaku spojují se zvýšením exprese a aktivace PPAR- γ v makrofázích. Byl prokázán antiinflamační efekt tohoto receptoru a jeho zvýšená exprese je spojována s markery M2 makrofágů (shrnuto v Zhang *et al.*, 2017).

Ač nebylo dosaženo signifikance, výsledky prezentované v této práci naznačují také vliv statinů na expresi znaku CD163. V rámci populaci M0 a M2 byl detekován trend statinů na omezení exprese tohoto znaku. Negativní efekt statinů na expresi tohoto markeru byl překvapující, vzhledem k jeho protizánětlivému charakteru, nicméně je ve shodě s výsledky *in vitro* studií Zhang *et al.*, 2017b a Fu *et al.*, 2019. Ač byl CD163 dlouho považován za ateroprotektivní znak, byly studií Bengtsson *et al.*, 2020 publikovány výsledky naznačující jeho proaterogenní efekt. Zvýšená exprese tohoto receptoru byla detekovaná u pacientů v symptomatické fázi aterosklerózy, byla spojena s nestabilními aterosklerotickými pláty a v neposlední řadě bylo popsáno, že jeho přítomnost negativně koreluje s množstvím HDL cholesterolu (Bengtsson *et al.*, 2020).

Transportér ABCA-1 je exprimován na povrchu makrofágů, kde zabezpečuje reverzní transport intracelulárního cholesterolu z buňky (de Gaetano *et al.*, 2016). Přiřazení tohoto znaku k zánětlivému nebo protizánětlivému fenotypu není jednoznačné. Některé studie jej řadí k prozánětlivému fenotypu (de Gaetano *et al.*, 2016), jiné k protizánětlivému (Tang *et al.*, 2009). V této práci byla jeho vyšší exprese detekována u subpopulace klasicky aktivovaných M1 makrofágů. Na expresi tohoto markeru nebyl prokázáný signifikantní význam statinové terapie, výsledky ale ukazují, že zejména u M1 subpopulace došlo po ošetření buněk statiny k omezení exprese tohoto znaku. V tom, zda statiny expresi ABCA-1 podporují, inhibují či ji vůbec neovlivňují nejsou studie jednotné. *In vivo* v lidských aterosklerotických plátech statiny podporují expresi tohoto transportéru (Santovito *et al.*, 2020). Vzhledem k jeho roli v reverzním transportu cholesterolu, lze jistě zvýšení exprese znaku ABCA-1 alespoň v kontextu aterosklerózy považovat za pozitivní. Na druhou stranu, *in vitro* na makrofázích odvozených z THP-1 linie byl popsán opačný efekt (Niesor *et al.*, 2015) a studie He *et al.*, 2019 nedetekovala *in vitro* na expresi ABCA-1 v lidských plicních epitelálních buňkách vůbec žádný efekt.

V rámci studia vlivu statinů na expresi tohoto znaku je jistě velice důležité zohlednit kontext okolního prostředí i buňky, na jejichž povrchu je transportér exprimován.

Přítomnost Trem-2^{high} makrofágů byla detekována v aterosklerotickém plátu myši (Cochain *et al.*, 2018) a na myším modelu bylo také popsáno, že jsou tyto makrofágy velmi náchylné k přeměně v pěnovité buňky (Kim *et al.*, 2018). V rámci této diplomové práce byla signifikantně vyšší exprese tohoto znaku detekovaná na povrchu M0 a M2 makrofágů oproti M1 makrofágům. To odpovídá výsledkům studie Baidžajevs *et al.*, 2020, ve které bylo prokázáno, že M2 makrofágy jsou k přeměně v pěnovité buňky významně náchylnější než M1 makrofágy. U M0 makrofágů by tato významně vyšší exprese mohla být ovlivněna již diskutovaným M-CSF a jeho vlivem na některé protizánětlivé vlastnosti makrofágů (Chen *et al.*, 2021). Exprese tohoto znaku byla významně snížena u subpopulace M0 po koinkubaci buněk se statiny. Grafy trendů ukazují významný vliv statinové terapie na expresi znaku Trem-2 u jednotlivých vzorků i v případě populací M1 a M2 makrofágů. Přesněji, v rámci jednotlivých měření byla exprese Trem-2 nejvýrazněji snížena v případě subpopulace M2, což je opět v souladu s již diskutovanými výsledky studie Baidžajevs *et al.*, 2020. Omezení exprese tohoto znaku bylo demonstrováno studií Liu *et al.*, 2017 na myším modelu bronchiálního astmatu. S výsledky této studie jsou zde prezentované výsledky ve shodě.

CD15 (Sialyl-Lewis^X) je v rámci studia aterosklerózy běžně sledovaným znakem, typicky je využíván ke stanovení profilu neutrofilů (Rothe *et al.*, 1996), ale je exprimován také monocyty a dalšími leukocytárními buňkami (Nakayama *et al.*, 2001). Zvýšená exprese tohoto znaku je obvykle spojována s adhezivitou leukocytů k endotelu, s indukci formace aterosklerotického plátu (Tasneem *et al.*, 2021) i s jeho rupturou. CD15 zprostředkovává uvolnění tkáňového faktoru z leukocytů, interakci s krevními destičkami a tím vznik trombu (Rauch *et al.*, 2000). Jeho zvýšená exprese je tak spojována s pokročilou fází aterosklerózy, rupturou aterosklerotického plátu (Pertwi *et al.*, 2020; Sarlon *et al.*, 2013). Ačkoliv v této práci nebyla prokázána signifikantní spojitost mezi expresí CD15 a statinovou terapií, v rámci jednotlivých měření u subpopulací M0 a M1 byl detekován trend statinů na inhibici jeho exprese. Zejména pak u subpopulace M1. Zda a jak statiny ovlivňují přímo tento znak, nebylo doposud více studováno, nicméně v roce 2015 byla publikována studie, kde byl popsán efekt statinové terapie na zvýšení sializace makrofágů (Wang *et al.*, 2015).

CD36 se řadí mezi scavengerové receptory a je exprimován na povrchu řady buněčných typů včetně makrofágů (Mäkinen *et al.*, 2010) či adipocytů (Vroegrijk *et al.*, 2013). Jeho rolí je nejen fagocytóza ox-LDL částic (Mäkinen *et al.*, 2010), ale podílí se také na vychytávání

mastných kyselin s dlouhým řetězcem (Vroegrijk *et al.*, 2013). Vysoká exprese znaku CD36 byla detekována na povrchu zánětlivých makrofágů v lidské tukové tkáni (Kralova Lesna *et al.*, 2016). V této práci byl CD36 silně exprimován všemi subpopulacemi makrofágů. Nejvíce byl však exprimován makrofágy M2. Tento překvapivý výsledek koresponduje s výsledky recentní studie Baidžajevs *et al.*, 2020, kde bylo zjištěno, že M2 makrofágy mají v porovnání s M1 makrofágy silnější schopnost fagocytózy a internalizace volných LDL částic, a jejich následné přeměny v pěnovité buňky. Lze tak předpokládat, že jsou to právě M2 makrofágy, které CD36 na svém povrchu exprimují silněji.

Bylo prokázáno, že CD36 je exprimován po stimulaci ox-LDL (prozánětlivý stimul), ale také IL-4 či M-CSF (Feng *et al.*, 2000). Vzhledem k tomu, že všechny subpopulace makrofágů byly v této práci stimulovány M-CSF, je možné, že vysoká míra exprese znaku CD36 je způsobena právě jeho přítomností. Ač nebyl prokázán signifikantní efekt statinové terapie na expresi tohoto znaku, grafy trendů jasně naznačují její efekt na snížení exprese CD36 v rámci jednotlivých měření u subpopulací M1 a zejména M2. V případě subpopulace M2 rozdíl mezi expresí znaku u buněk se statiny a bez statinů dosáhl téměř signifikance ($p=0,055$). Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky studie Han *et al.*, 2004, kde byl efekt statinů demonstrován jak na makrofázích z THP-1 linie, tak lidských makrofázích odvozených z monocytů periferní krve stimulovaných ox-LDL. Autoři tento efekt zdůvodňují omezením fosforylace PPAR- γ v rámci MAP kinázové dráhy.

Ačkoliv u většiny povrchových znaků nebyl prokázán signifikantní vliv statinové terapie na jejich expresi, trendy jednotlivých měření jejich antiinflamační efekt poměrně jasně demonstrují. Signifikance pravděpodobně nebylo dosaženo vlivem relativně vysoké heterogenity dárců a jejich malého počtu. Při dostatečném rozšíření měření by statiny jistě prokázaly jejich antiinflamační potenciál na polarizaci makrofágů v plné šíři. Nicméně populační studie nebyla předmětem diplomové práce.

7.2.2 Analýza genové exprese

Jako housekeeping gen, který je nutný pro výpočet relativní genové exprese metodou $2^{-\Delta\Delta C_t}$, byl využit $\beta 2$ mikroglobulin. U něj bylo prokázáno, že je v rámci studia genové exprese u makrofágů jedním z nejstabilnějších běžně využívaných housekeeping genů (Kalagara *et al.*, 2016), jeho volba v této diplomové práci se tak zdá být vhodná. Jak je z výsledků patrné, genová exprese byla stanovována pouze na buňkách tří vzorků. Buňky bylo nutno využít i pro metodu průtokové cytometrie, ve dvou případech nebyla výtěžnost buněk po izolaci z krve dostatečně

vysoká na to, aby mohly být provedeny obě analýzy. Vzhledem k tomu, že jednotlivé vzorky byly při qPCR vždy pipetovány v replikátech a v případě FACS analýzy replikáty využity nebyly, byly buňky použity právě na FACS.

Zvýšená genová exprese znaků NFκB, IL-1β, IL-6 a TNFα i iNOS je běžně v biologii považována za marker zánětu, respektive prozánětlivých makrofágů (Comalada *et al.*, 2006), proto byla analyzována i v této práci. Byla detekována významně vyšší exprese prozánětlivých genů *NFKB*, *IL1B*, *IL6* a *iNOS* u klasicky aktivovaných makrofágů M1 oproti subpopulacím M0 a M2. Stejný trend byl pozorován i v případě genu *TNFA*, v případě tohoto genu ale nebylo dosaženo signifikance. Tato data odpovídají obecnému povědomí o genovém profilu klasicky aktivovaných makrofágů a jsou ve shodě s výsledky studií Jaguin *et al.*, 2013 a Bakondi *et al.*, 2019.

Výsledky této práce ukazují významný vliv statinové terapie na omezení genové exprese genu pro jaderný faktor NFκB. Stejněho výsledku dosáhla například studie Tu *et al.*, 2017. V případě této diplomové práce mohlo být snížení exprese tohoto nukleárního faktoru způsobeno inhibicí TLR2/4, který byl stimulován LPS při polarizaci M1 makrofágů. Tyto TLRs hrají významnou roli v aktivaci NFκB dráhy lipopolysacharidem (Muta and Takeshige, 2001). Vliv statinů na potlačení exprese TLR4 na povrchu monocytárních buněk a posléze i NFκB byl prokázán ve studii Fang *et al.*, 2014.

Dále byl sledován efekt koinkubace buněk se statiny na expresi genu *IL1B*, výsledky prezentované v této práci demonstrují významnou spojitost mezi užitím těchto léčiv a omezením exprese tohoto genu makrofágy subpopulace M1. Tyto výsledky jsou podpořeny i výsledky ELISA testů, kde byl ověřen vliv statinů na omezení množství tohoto cytokinu na proteinové úrovni. Omezení genové exprese *IL1B* byla prokázána Altaf and Peng, 2014, ve studii tento efekt diskutují jako výsledek inhibice NLRP3 inflamazomu. Je tedy pravděpodobné, že v rámci této diplomové práce má klíčovou roli inhibice NFκB, zprostředkovaná inhibicí TLR4, který v aktivaci NLRP3 inflamazomu hraje důležitou roli (Boaru *et al.*, 2015). Případně může být genová exprese IL-1β omezena i přímou inhibicí TLR4, respektive jeho expresí na povrchu makrofágů. Omezením TLR4 je pak ovlivněna i IRAK-1 (z angl. *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) kináza. Vlivem snížení její aktivity dochází k omezení produkce prozánětlivých cytokinů (Methe *et al.*, 2005).

Zde prezentované výsledky nesouhlasí s výsledky studie Healy *et al.*, 2020, které ukázaly opačný vliv statinů na expresi tohoto genu u ApoE^{-/-} myši. Tento efekt ve zmíněné práci diskutují jako výsledek inhibice isoprenylace proteinu Rac1, která dle jejich závěru působí

v rámci některých imunitních reakcí protizánětlivě. Stejných výsledků pak dosáhla i studie Linnenberger *et al.*, 2021 *in vitro* na makrofázích kostní dřene. Autoři této studie se domnívají, že antiinflamační efekt statinů *in vivo* není vázán na makrofágy, ale souvisí spíše s jejich vlivem na jiné imunitní buňky nebo s jejich systémovým účinkem. V této diplomové práci byl ale prokázán přímý vliv statinů na zánětlivý profil makrofágů, tím se práce rozchází s názorem autorů studie Linnenberger *et al.*

Významně byla také snížena exprese genu *IL6* u M1 makrofágů, což v rámci této práce velmi pravděpodobně souvisí s inhibicí NFκB nebo IL-1β, jejichž signalizace může spustit syntézu IL-6. Tento výsledek je v souladu s výsledky studií Jougasaki *et al.*, 2010 či Fu *et al.*, 2019. Je podpořen také výsledkem ELISA testu, kdy byl prokázán efekt statinů na snížení uvolňování tohoto cytokinu makrofágy do kultivačního média.

Dalším sledovaným znakem byl gen pro iNOS, u něj byl detekován významný pokles v expresi v případě M1 makrofágů. Výsledek analýzy genové exprese je v souladu s výsledkem Griessovy reakce, kterou byl prokázán inhibiční efekt statinů na aktivitu tohoto enzymu (viz kapitola 6.4). Výsledek genové exprese je ve shodě se studií Huang *et al.*, 2003, kde byl prokázán antiinflamační efekt na expresi tohoto genu v myších makrofázích i se studií Yang *et al.*, 2016, kde byl stejný efekt prokázán *in vivo* v makrofázích peritoneální dutiny v animálním modelu infarktu myokardu.

V této práci nebyla prokázána signifikantní spojitost mezi statinovou terapií a expresí genu *TNFA*. V přítomnosti statinu došlo jen k mírnému posunu ve směru omezení genové exprese v případě M1 makrofágů. Stejného výsledku bylo dosaženo ve studii Utomo *et al.*, 2016. Výsledky této diplomové práce se částečně rozcházejí s výsledky studie Ruleva *et al.*, 2020, kde byla sice statiny snížena syntéza cytokinu TNFα, nicméně byla detekována zvýšená hladina mRNA. Výsledky zmíněné studie tak naznačují, že statiny omezují tento znak až na post transkripční úrovni. Z výsledků prezentovaných v této diplomové práci tento závěr ale nevyplývá.

Dále byla analyzována genová exprese genů spojovaných s protizánětlivým fenotypem imunitní odpovědi, *ARG1* a *TGFB*. Ač nebylo dosaženo signifikance, je z výsledků jasné, že oba geny jsou výrazně více exprimovány makrofágy subpopulace M2 oproti makrofágům M1. Oba tyto znaky jsou běžně spojovány s alternativně aktivovanými M2 makrofágy (Assunção *et al.*, 2017). K nejvýznamnější změně v expresi *ARG1* došlo v případě makrofágů M2, zde statiny přispěly k jejímu zvýšení. Stejný, ale méně výrazný, trend je pozorovatelný

také u makrofágů M0 a M1. Pozitivní efekt statinů na expresi tohoto genu je v souladu s počáteční hypotézou této práce i s předpokládaným antiinflamačním efektem statinů. Stejného výsledku bylo dosaženo i ve studii Yang *et al.*, 2016 na makrofázích potkanů po infarktu myokardu. V případě genu *TGFB* nedošlo k přílišné změně v expresi u žádné z populací, nejvýrazněji byla exprese ovlivněna v případě M2 makrofágů, kde statiny jeho expresi zvýšily. Zvýšení exprese tohoto genu jako efekt statinové terapie bylo dokumentováno ve studii Larson-Casey *et al.*, 2019 v bronchoalveolárních buňkách izolovaných od pacientů s idiopatickou plicní fibrózou.

V neposlední řadě byl studován efekt statinové terapie na expresi genů znaků, které se účastní adheze a migrace monocytů a makrofágů, MCP-1 a VCAM-1. V případě MCP-1 došlo působením statinů ke snížení jeho exprese u M1 makrofágů, což je v souladu s výsledkem studie Jougasaki *et al.*, 2010. Ke snížení jeho exprese pravděpodobně došlo omezením exprese IL-6, jak bylo také popsáno ve studii Jougasaki *et al.*, 2010. V případě subpopulace M0 došlo po ošetření buněk statiny k výraznému, ale ne signifikantnímu zvýšení exprese proti M0 makrofágům bez statinů. K mírnému zvýšení vlivem statinů došlo i v případě M2 makrofágů.

Posledním studovaným genem v této práci byl *VCAM1*. V případě M1 makrofágů došlo ke snížení exprese tohoto genu, u subpopulace M2 došlo po ošetření buněk statiny k jeho zvýšení. Ani v jednom případě ale nebylo dosaženo signifikance. Statiny v minulosti prokázaly schopnost omezit syntézu a aktivitu VCAM-1 v endoteliálních buňkách (Khanicheh *et al.*, 2013). Výsledky různého vlivu statinové terapie na expresi znaků MCP-1 a VCAM-1 na subpopulace M1, M2 a M0 naznačují, že je nutné také zohlednit kontext prostředí.

Vliv statinů na expresi těchto znaků se zdá být protizánětlivý. Makrofágy jsou v určité chvíli schopny samy produkovat MCP-1 i adhezivní molekulu VCAM-1. V případě prozánětlivých M1 makrofágů tak mohou tímto způsobem přispět k dalšímu influxu monocytů/makrofágů do místa vznikajícího zánětu a dále tak podpořit a prohloubit zánět. Omezením exprese těchto znaků v případě M1 makrofágů tak statiny přispívají k redukci zánětu. V případě subpopulací M0 a M2 může být role opačná. Je-li zvýšená exprese těchto znaků u M2 makrofágů, může po influxu monocytů nebo makrofágů dojít k jejich diferenciaci a polarizaci do M2 fenotypu. M2 makrofágy pak můžou v místě uplatnit své protizánětlivé schopnosti a postarat se o redukci zánětlivých procesů a jejich pozůstatků a tím například přispívat ke stabilizaci aterosklerotického plátu. Tím tak statiny znovu přispívají k redukci zánětu.

7.2.3 Stanovení aktivity iNOS

Výsledky této práce prokázaly významně vyšší aktivitu enzymu iNOS u M1 makrofágů oproti subpopulacím M0 a M2. Tyto výsledky jsou v souladu se zažitými poznatky o typických znacích klasicky aktivovaných makrofágů, ale například i se studií Jablonski *et al.*, 2016.

Statinová terapie prokázala významný vliv na snížení aktivity iNOS u subpopulací M1 i M0. V tom, jak statiny ovlivňují aktivitu tohoto enzymu, se literatura rozchází. Výsledky této práce jsou ve shodě s výsledky studie Huang *et al.*, 2003, kde byl *in vitro* demonstrován inhibiční efekt statinů na aktivitu tohoto enzymu v makrofázích diferencovaných v prozánětlivém směru (LPS+IFN γ). Omezení aktivity tohoto enzymu může být výsledkem již diskutované inhibice TLR/NF κ B signalizace. A jsou ve shodě i se studií Zhang *et al.*, 2018, kde byl sledován vliv statinů na aktivitu iNOS na myších makrofázích izolovaných z aterosklerotického plátu v aortě. Zdánlivě se výsledky diplomové práce rozcházejí s výsledky studie Ikeda *et al.*, 2001, kde byl *in vitro* demonstrován opačný efekt statinů na aktivitu enzymu ve svalových buňkách srdce. Ve svalových buňkách má nicméně iNOS jinou funkci (Dayal *et al.*, 2014). Možným vysvětlením rozkolu našich, i dalších výsledků, se studií Ikeda *et al.*, 2001 je využití jiných buněčných modelů, respektive různý efekt statinů na imunitní buňky a buňky neimunitní. Výsledek této analýzy je podpořen i výsledkem genové exprese.

Je nutno zmínit, že ve studii Kauerova *et al.*, 2021, jíž je autorka této diplomové práce spoluautorem, byly publikovány výsledky o vlivu statinů na aktivitu iNOS v makrofázích. Ve zmíněné publikaci bylo využito stejné metodiky a analýza byla provedena autorkou diplomové práce. Pro potřeby diplomové práce byla ale analýza rozšířena o větší počet vzorků, nejedná se tak o totožné výsledky, byť demonstrují stejný efekt.

7.2.4 Stanovení cytokinů

V této práci byl demonstrován významný vliv statinové terapie na omezení produkce prozánětlivého cytokinu IL-6 u M1 makrofágů. Srovnatelné výsledky byly publikovány ve studii Hohensinner *et al.*, 2018 *in vitro* na lidských makrofázích a jsou ve shodě i s výsledky studie de Oliveira *et al.*, 2020 na lidských makrofázích diferencovaných z monocytů periferní krve. Výsledky této práce se rozcházejí s výsledky studie Gasbarrino *et al.*, 2019, kde byl *in vitro* na makrofázích diferencovaných z THP-1 linie demonstrován opačný efekt na produkci tohoto cytokinu.

Dále byl v této práci demonstrován významný efekt statinů na snížení produkce cytokinu TNF α u M1 makrofágů. Stejný efekt byl demonstrován i u subpopulací M0 a M2, zde ale nebyla prokázána signifikantní spojitost. Stejný účinek statinové terapie byl prokázán studií Wang *et al.*, 2014, kde statiny snížily produkci cytokinu TNF α myšimi makrofágy. Výsledky prezentované v této diplomové práci jsou ve shodě také s výsledky studie Ruleva *et al.*, 2020, kde byl demonstrován efekt statinové terapie na snížení produkce tohoto cytokinu makrofágy diferencovanými z periferní krve. Ve studii Heming *et al.*, 2018 bylo zjištěno že, produkce TNF α neúměrně koreluje s expresí PPAR- γ , respektive že omezení aktivity tohoto receptoru vede ke zvýšení genové exprese *TNFA*. Jedním z logických vysvětlení vlivu statinů na TNF α je tak jejich vliv na zvýšení aktivity PPAR- γ , která by vedla ke snížení exprese zmíněného znaku. Studií Zhang *et al.*, 2017 byl tento efekt statinové terapie skutečně prokázán. Výsledky se opět rozcházejí s výsledky studie Gasbarrino *et al.*, 2019.

Omezena byla také produkce silně prozánětlivého cytokinu IL-1 β , především u makrofágů M1. Toto pozorování je v souladu s výsledky studie McFarland *et al.*, 2017, kde byl vliv statinů na produkci tohoto cytokinu stanovován na makrofázích diferencovaných z linie THP-1 i studie Fu *et al.*, 2019, kde byl studován vliv statinů na makrofázích diferencovaných z krevních monocytů. Efekt statinů na snížení IL-1 β byl prokázán i ve studii Suresh *et al.*, 2013, kde byl analyzován vliv statinů na produkci IL-1 β v exsudátu dásní u pacientů s chronickou periodontitidou. Výsledky diplomové práce se opět rozcházejí s výsledky studie Gasbarrino *et al.*, 2019, či studií Healy *et al.*, 2020, kde byla taktéž demonstrována schopnost statinů zvýšit produkci tohoto cytokinu nejen na proteinové úrovni, ale také na genové úrovni na makrofázích z kostní dřeně u ApoE^{-/-} myši. Studie Akula *et al.*, 2019 tento efekt diskutuje jako výsledek inhibice prenylace proteinu Rac1, jehož aktivita vede k prozánětlivé signalizaci v rámci vrozených imunitních reakcí. Podle autorů této studie, prenylace brání aktivaci tohoto proteinu, omezuje tak inflamační charakter imunitní reakce a působí tedy protizánětlivě. Dle jejich závěrů statiny podporují prozánětlivý fenotyp imunitních reakcí právě omezením protizánětlivého efektu prenylace (Akula *et al.*, 2019).

V neposlední řadě byl analyzován efekt statinů na produkci protizánětlivého cytokinu IL-10. Výsledky této práce ukazují potenciál statinů zvýšit jeho produkci u všech zde sledovaných populací makrofágů, byť nebylo dosaženo signifikance. Za hraničně signifikantní lze považovat vliv statinové terapie na tento znak v případě M1 makrofágů ($p=0,052$). Výsledky jsou v souladu s předpokládaným protizánětlivým účinkem statinů a s výsledky studie Stumpf *et al.*, 2009, které demonstrovaly významný efekt na zvýšení hladin

IL-10 v séru laboratorních potkanů, kteří byli vystaveni působení statinů po infarktu myokardu. Souhlasí také s výsledky studie Xu *et al.*, 2017, kdy po ošetření statiny došlo ke zvýšení hladin IL-10 u myšího modelu traumatického poranění mozku. Zdá se, že i v případě tohoto cytokinu může hrát roli vliv statinů na aktivaci PPAR γ receptoru, který zvyšuje produkci IL-10 (Zhang *et al.*, 2017a). I tyto výsledky jsou v rozporu se studií Gasbarrino *et al.*, 2019. V případě tohoto cytokinu autoři popisují, že významnou roli hraje doba inkubace buněk se statiny. Při koinkubaci makrofágů se statiny po dobu 24 hodin došlo ke zvýšení jeho produkce, po prodloužení inkubační doby na 72 hodin byla naopak jeho produkce snížena. Podobný efekt byl pak prokázán i v této diplomové práci (viz Optimalizace). Jak výsledky optimalizační analýzy ukázaly, relativně významnou roli v antiinflamačním účinku statinů hraje čas koinkubace s buňkami. V určitém časovém úseku statiny *in vitro* naopak podporují zánětlivý profil makrofágů, v diplomové práci demonstrováno zvýšením aktivity iNOS. Je možné, že autoři studie Gasbarrino *et al.*, 2019 dostatečně nezohlednili efekt času koinkubace buněk se statiny a jejich výsledky jsou tím ovlivněny.

V této práci byl demonstrován antiinflamační efekt statinů i na proteinové úrovni prostřednictvím snížení produkce prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF α . Naopak byl prokázán jejich pozitivní vliv na zvýšení protizánětlivého IL-10. Ač nedosáhly všechny výsledky hranice statistické významnosti, stále podporují převládající názor vědecké obce, sice že statiny mají antiinflamační schopnosti, respektive že na polarizaci makrofágů a jejich fenotyp působí protizánětlivě.

Jen relativně malá část výsledků, které jsou prezentované v této, práci dosáhla signifikantních změn. To je dáno vysokou variabilitou buněk způsobenou variabilitou a malým počtem dárců. Ačkoliv odebrané monocyty byly do makrofágů diferencovány stejným způsobem, je stále nutné brát v potaz, že byly ovlivněny už svou existencí v různém prostředí organismu. Tento efekt by byl eliminován, pokud by v práci byly využity buněčné linie např. THP-1. Ta ale nevykazovala dostatečnou senzitivitu k protokolu k diferenciaci makrofágů. Toto je jistě nejzávažnější limitací diplomové práce.

8 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala studiem vlivu statinové terapie na zánětlivý profil makrofágů, k tomuto účelu byly využity makrofágy diferencované z monocytů lidské periferní krve a fluvastatin. Snahou této práce bylo prokázat přímý antiinflamační efekt statinů na polarizaci makrofágů.

Výsledky analýz v této práci ukazují, že *in vitro*:

- Statiny výrazně ovlivňují metabolismus makrofágů
- Statiny omezují expresi povrchových znaků spojovaných se zánětlivým fenotypem makrofágů nebo progresí aterosklerózy
- Statiny významně zvyšují expresi protizánětlivého CD206 u alternativně aktivovaných makrofágů M2
- Genová exprese prozánětlivých genů *NFKB*, *IL1B*, *IL6* a *INOS* je statiny významně snížena
- Genová exprese genu *TNFA* je také snížena, ale nebyla prokázána signifikance
- Genová exprese protizánětlivých genů *ARG1*, *TGFB* je statiny zvýšena
- Genová exprese genů účastnících se adheze a migrace monocytů/makrofágů (*MCPI*, *VCAMI*) je statiny omezena
- Statiny významným způsobem omezují aktivitu inducibilní NO syntázy
- Statiny redukuje uvolňování cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF α
- Statiny podporují produkci cytokinu IL-10

Závěrem. Počáteční hypotéza, sice že statiny působí v *in vitro* prostředí na polarizaci makrofágů protizánětlivě, byla analýzami v této práci potvrzena. Byl potvrzen nejen antiinflamační efekt na markery zánětu, ale analýzy prokázaly také jejich schopnost přímo podpořit znaky spojované s protizánětlivým fenotypem imunitní odpovědi. Je znovu třeba zdůraznit, že *in vitro* prostředí přesně nedopovídá stavům *in vivo*, v rámci výzkumu statinů a jejich imunomodulačních schopností je dozajista nutné zohlednit kontext prostředí, buněčný typ a v neposlední řadě také vliv času a jejich koncentrace.

9 POUŽITÉ ZDROJE

- Adutler-Lieber, S., Ben-Mordechai, T., Naftali-Shani, N., Asher, E., Loberman, D., Raanani, E., and Leor, J. (2013). Human Macrophage Regulation Via Interaction With Cardiac Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 18, 78–86. <https://doi.org/10.1177/1074248412453875>.
- Akula, M.K., Ibrahim, M.X., Ivarsson, E.G., Khan, O.M., Kumar, I.T., Erlandsson, M., Karlsson, C., Xu, X., Brisslert, M., Brakebusch, C., *et al.* (2019). Protein prenylation restrains innate immunity by inhibiting Rac1 effector interactions. *Nat Commun* 10, 3975. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11606-x>.
- Alexander, R.W. (1995). Hypertension and the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Hypertension* 25, 155–161. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.25.2.155>.
- Altaf, A., and Peng, Q. (2014). GW25-e5371 Response of NLRP3 inflammasome in human peripheral blood monocytes to statin therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 64, C135–C135. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.624>.
- Anzinger, J.J., Chang, J., Xu, Q., Buono, C., Li, Y., Leyva, F.J., Park, B.-C., Greene, L.E., and Kruth, H.S. (2010). Native Low-Density Lipoprotein Uptake by Macrophage Colony-Stimulating Factor-Differentiated Human Macrophages Is Mediated by Macropinocytosis and Micropinocytosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 2022–2031. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.210849>.
- Appay, V., and Rowland-Jones, S.L. (2001). RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology* 22, 83–87. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(00\)01812-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(00)01812-3).
- Aprahamian, T., Bonegio, R., Rizzo, J., Perlman, H., Lefter, D.J., Rifkin, I.R., and Walsh, K. (2006). Simvastatin treatment ameliorates autoimmune disease associated with accelerated atherosclerosis in a murine lupus model. *J Immunol* 177, 3028–3034. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3028>.
- Arnaud, C., Burger, F., Steffens, S., Veillard, N.R., Nguyen, T.H., Trono, D., and Mach, F. (2005). Statins Reduce Interleukin-6-Induced C-Reactive Protein in Human Hepatocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25, 1231–1236. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000163840.63685.0c>.
- Assunção, L.S., Magalhães, K.G., Carneiro, A.B., Molinaro, R., Almeida, P.E., Atella, G.C., Castro-Faria-Neto, H.C., and Bozza, P.T. (2017). Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine triggers M2 polarization of macrophages through PPAR γ dependent mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.11.006>.
- Baidžajevs, K., Hadadi, É., Lee, B., Lum, J., Shihui, F., Sudbery, I., Kiss-Tóth, E., Wong, S.C., and Wilson, H.L. (2020). Macrophage polarisation associated with atherosclerosis differentially affects their capacity to handle lipids. *Atherosclerosis* 305, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.003>.
- Bakondi, E., Singh, S.B., Hajnady, Z., Nagy-Pénczes, M., Regdon, Z., Kovács, K., Hegedűs, C., Madácsy, T., Maléth, J., Hegyi, P., *et al.* (2019). Spilanthol Inhibits Inflammatory Transcription Factors and iNOS Expression in Macrophages and Exerts Anti-inflammatory Effects in Dermatitis and Pancreatitis. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 4308. <https://doi.org/10.3390/ijms20174308>.
- Beall, C.J., Mahajan, S., Kuhn, D.E., and Kolattukudy, P.E. (1996). Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity. *Biochemical Journal* 313, 633–640. <https://doi.org/10.1042/bj3130633>.
- Behr-Roussel, D., Rupin, A., Simonet, S., Bonhomme, E., Coumilleau, S., Cordi, A., Serkiz, B., Fabiani, J.-N., and Verbeuren, T.J. (2000). Effect of Chronic Treatment With the Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor N-Iminoethyl-L-Lysine or With L-Arginine on Progression of Coronary and Aortic Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Rabbits. *Circulation* 102, 1033–1038. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.9.1033>.

- Bengtsson, E., Hultman, K., Edsfeldt, A., Persson, A., Nitulescu, M., Nilsson, J., Gonçalves, I., and Björkbacka, H. (2020). CD163+ macrophages are associated with a vulnerable plaque phenotype in human carotid plaques. *Sci Rep* 10, 14362. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71110-x>.
- Bertocchi, C., Traunwieser, M., Dörler, J., Hasslacher, J., Joannidis, M., and Dunzendorfer, S. (2011). Atorvastatin Inhibits Functional Expression of Proatherogenic TLR2 in Arterial Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem* 28, 625–630. <https://doi.org/10.1159/000335758>.
- Bisgaard, L.S., Mogensen, C.K., Rosendahl, A., Cucak, H., Nielsen, L.B., Rasmussen, S.E., and Pedersen, T.X. (2016). Bone marrow-derived and peritoneal macrophages have different inflammatory response to oxLDL and M1/M2 marker expression – implications for atherosclerosis research. *Sci Rep* 6, 35234. <https://doi.org/10.1038/srep35234>.
- Blasetto, J.W., Stein, E.A., Brown, W.V., Chitra, R., and Raza, A. (2003). Efficacy of rosuvastatin compared with other statins at selected starting doses in hypercholesterolemic patients and in special population groups. *The American Journal of Cardiology* 91, 3–10. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(03\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(03)00003-1).
- Boaru, S.G., Borkham-Kamphorst, E., Van de Leur, E., Lehnen, E., Liedtke, C., and Weiskirchen, R. (2015). NLRP3 inflammasome expression is driven by NF- κ B in cultured hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458, 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.029>.
- Bobryshev, Y.V., Ivanova, E.A., Chistiakov, D.A., Nikiforov, N.G., and Orekhov, A.N. (2016). Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *BioMed Research International* 2016, e9582430. <https://doi.org/10.1155/2016/9582430>.
- Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J., and Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology* 67, 97–103. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.1.97>.
- Butcher, M.J., Wu, C.-I., Waseem, T., and Galkina, E.V. (2016). CXCR6 regulates the recruitment of pro-inflammatory IL-17A-producing T cells into atherosclerotic aortas. *INTIMM* 28, 255–261. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv068>.
- Buttari, B., Profumo, E., Segoni, L., D’Arcangelo, D., Rossi, S., Facchiano, F., Saso, L., Businaro, R., Iuliano, L., and Riganò, R. (2014). Resveratrol Counteracts Inflammation in Human M1 and M2 Macrophages upon Challenge with 7-Oxo-Cholesterol: Potential Therapeutic Implications in Atherosclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014, e257543. <https://doi.org/10.1155/2014/257543>.
- Cai, B., Thorp, E.B., Doran, A.C., Sansbury, B.E., Daemen, M.J.A.P., Dorweiler, B., Spite, M., Fredman, G., and Tabas, I. (2017). MerTK receptor cleavage promotes plaque necrosis and defective resolution in atherosclerosis. *J Clin Invest* 127, 564–568. <https://doi.org/10.1172/JCI90520>.
- Chávez-Sánchez, L., Garza-Reyes, M.G., Espinosa-Luna, J.E., Chávez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, M.V., and Blanco-Favela, F. (2014). The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans. *Human Immunology* 75, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.01.012>.
- Chen, P., Zhang, X., Venosa, A., Lee, I.H., Myers, D., Holloway, J.A., Prud’homme, R.K., Gao, D., Szekely, Z., Laskin, J.D., *et al.* (2020). A Novel Bivalent Mannosylated Targeting Ligand Displayed on Nanoparticles Selectively Targets Anti-Inflammatory M2 Macrophages. *Pharmaceutics* 12, 243. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030243>.
- Chen, Y.-C., Lai, Y.-S., Hsuuw, Y.-D., and Chang, K.-T. (2021). Withholding of M-CSF Supplement Reprograms Macrophages to M2-Like via Endogenous CSF-1 Activation. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 3532. <https://doi.org/10.3390/ijms22073532>.

- Clinton, S.K., Underwood, R., Hayes, L., Sherman, M.L., Kufe, D.W., and Libby, P. (1992). Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* *140*, 301–316. .
- Cochain, C., Vafadarnejad, E., Arampatzi, P., Pelisek, J., Winkels, H., Ley, K., Wolf, D., Saliba, A.-E., and Zerneck, A. (2018). Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circulation Research* *122*, 1661–1674. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312509>.
- Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., Medina, F.S. de, and Zarzuelo, A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure–activity relationship. *Biochemical Pharmacology* *72*, 1010–1021. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.016>.
- Cordes, T., and Metallo, C.M. (2020). Statins Limit Coenzyme Q Synthesis and Metabolically Synergize with MEK Inhibition in Pancreatic Tumors. *Cancer Research* *80*, 151–152. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3415>.
- Croons, V., De Meyer, I., Houten, S.M., Martinet, W., Bult, H., Herman, A.G., and De Meyer, G.R.Y. (2010). Effect of Statins on the Viability of Macrophages and Smooth Muscle Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* *55*, 269–275. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181d0bec3>.
- Cubeddu, L.X., and Seamon, M.J. (2006). Statin Withdrawal: Clinical Implications and Molecular Mechanisms. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* *26*, 1288–1296. <https://doi.org/10.1592/phco.26.9.1288>.
- Cunningham, K.S., and Gotlieb, A.I. (2005). The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* *85*, 9–23. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700215>.
- Cybulsky, M.I., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., Davis, V., Gutierrez-Ramos, J.-C., Connelly, P.W., and Milstone, D.S. (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* *107*, 1255–1262. <https://doi.org/10.1172/JCI11871>.
- Dahl, M., Bauer, A.K., Arredouani, M., Soinen, R., Tryggvason, K., Kleeberger, S.R., and Kobzik, L. (2007). Protection against inhaled oxidants through scavenging of oxidized lipids by macrophage receptors MARCO and SR-AI/II. *J Clin Invest* *117*, 757–764. <https://doi.org/10.1172/JCI29968>.
- Dale, K.M., Coleman, C.I., Henyan, N.N., Kluger, J., and White, C.M. (2006). Statins and Cancer Risk: A Meta-analysis. *JAMA* *295*, 74–80. <https://doi.org/10.1001/jama.295.1.74>.
- Dayal, S., Blokhin, I.O., Erger, R.A., Jensen, M., Arning, E., Stevens, J.W., Bottiglieri, T., Faraci, F.M., and Lentz, S.R. (2014). Protective Vascular and Cardiac Effects of Inducible Nitric Oxide Synthase in Mice with Hyperhomocysteinemia. *PLOS ONE* *9*, e107734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107734>.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., *et al.* (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* *464*, 1357–1361. <https://doi.org/10.1038/nature08938>.
- Dutta, P., Hoyer, F.F., Grigoryeva, L.S., Sager, H.B., Leuschner, F., Courties, G., Borodovsky, A., Novobrantseva, T., Ruda, V.M., Fitzgerald, K., *et al.* (2015). Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. *Journal of Experimental Medicine* *212*, 497–512. <https://doi.org/10.1084/jem.20141642>.
- Efebera, Y.A., Geyer, S., Andritsos, L., Vasu, S., Jaglowski, S., Bingman, A., Blum, W., Klisovic, R., Hofmeister, C.C., Benson, D.M., *et al.* (2016). Atorvastatin for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease in Patients Undergoing HLA-Matched Related Donor Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (allo-HCT). *Biology of Blood and Marrow Transplantation* *22*, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.07.034>.

- Endo, A. (2004). The origin of the statins. *International Congress Series 1262*, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2003.12.099>.
- Endo, A., Kuroda, M., and Tsujita, Y. (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* *29*, 1346–1348. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.29.1346>.
- Erbel, C., Tyka, M., Helmes, C.M., Akhavanpoor, M., Rupp, G., Domschke, G., Linden, F., Wolf, A., Doesch, A., Lasitschka, F., *et al.* (2015a). CXCL4-induced plaque macrophages can be specifically identified by co-expression of MMP7+S100A8+in vitro and in vivo. *Innate Immun* *21*, 255–265. <https://doi.org/10.1177/1753425914526461>.
- Erbel, C., Wolf, A., Lasitschka, F., Linden, F., Domschke, G., Akhavanpoor, M., Doesch, A.O., Katus, H.A., and Gleissner, C.A. (2015b). Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. *International Journal of Cardiology* *186*, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.03.151>.
- Fang, D., Yang, S., Quan, W., Jia, H., Quan, Z., and Qu, Z. (2014a). Atorvastatin suppresses Toll-like receptor 4 expression and NF- κ B activation in rabbit atherosclerotic plaques. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* *18*, 242–246. .
- Fang, D., Yang, S., Quan, W., Jia, H., Quan, Z., and Qu, Z. (2014b). Atorvastatin suppresses Toll-like receptor 4 expression and NF- κ B activation in rabbit atherosclerotic plaques. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* *18*, 242–246. .
- Feldt, M., Menard, J., Rosendahl, A.H., Lettiero, B., Bendahl, P.-O., Belting, M., and Borgquist, S. (2020). The effect of statin treatment on intratumoral cholesterol levels and LDL receptor expression: a window-of-opportunity breast cancer trial. *Cancer Metab* *8*, 25. <https://doi.org/10.1186/s40170-020-00231-8>.
- Feng, J., Han, J., Pearce, S.F.A., Silverstein, R.L., Gotto, A.M., Hajjar, David.P., and Nicholson, A.C. (2000). Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR- γ . *Journal of Lipid Research* *41*, 688–696. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32377-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32377-4).
- Fenyo, I.M., and Gafencu, A.V. (2013). The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology* *218*, 1376–1384. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.005>.
- Földes, G., von Haehling, S., Okonko, D.O., Jankowska, E.A., Poole-Wilson, P.A., and Anker, S.D. (2008). Fluvastatin reduces increased blood monocyte Toll-like receptor 4 expression in whole blood from patients with chronic heart failure. *International Journal of Cardiology* *124*, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.12.024>.
- Franzoni, F., Quiñones-Galvan, A., Regoli, F., Ferrannini, E., and Galetta, F. (2003). A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *International Journal of Cardiology* *90*, 317–321. [https://doi.org/10.1016/S0167-5273\(02\)00577-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(02)00577-6).
- Frey, T., and De Maio, A. (2007). Increased Expression of CD14 in Macrophages after Inhibition of the Cholesterol Biosynthetic Pathway by Lovastatin. *Mol Med* *13*, 592–604. <https://doi.org/10.2119/2007-00054.Frey>.
- Frostegård, J., Ulfgrén, A.-K., Nyberg, P., Hedin, U., Swedenborg, J., Andersson, U., and Hansson, G.K. (1999). Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* *145*, 33–43. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00011-8).
- Fu, H., Alabdullah, M., Großmann, J., Spieler, F., Abdosh, R., Lutz, V., Kalies, K., Knöpp, K., Rieckmann, M., Koch, S., *et al.* (2019). The differential statin effect on cytokine production of monocytes or

- macrophages is mediated by differential geranylgeranylation-dependent Rac1 activation. *Cell Death & Disease* *10*, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2109-9>.
- Fuhrman, B., Volkova, N., and Aviram, M. (2002). Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis* *161*, 307–316. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00646-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00646-3).
- Funderburg, N.T., Jiang, Y., Debanne, S.M., Storer, N., Labbato, D., Clagett, B., Robinson, J., Lederman, M.M., and McComsey, G.A. (2014). Rosuvastatin Treatment Reduces Markers of Monocyte Activation in HIV-Infected Subjects on Antiretroviral Therapy. *Clinical Infectious Diseases* *58*, 588–595. <https://doi.org/10.1093/cid/cit748>.
- de Gaetano, M., Crean, D., Barry, M., and Belton, O. (2016). M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis. *Frontiers in Immunology* *7*.
- Gasbarrino, K., Hafiane, A., Zheng, H., and Daskalopoulou, S.S. (2019). Intensive Statin Therapy Compromises the Adiponectin-AdipoR Pathway in the Human Monocyte-Macrophage Lineage. *Stroke* *50*, 3609–3617. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.026280>.
- Geovanini, G.R., and Libby, P. (2018). Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clinical Science* *132*, 1243–1252. <https://doi.org/10.1042/CS20180306>.
- Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.-C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone, M.A., Luster, A.D., Lusinskas, F.W., and Rosenzweig, A. (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* *398*, 718–723. <https://doi.org/10.1038/19546>.
- van Gils, J.M., Derby, M.C., Fernandes, L.R., Ramkhalawon, B., Ray, T.D., Rayner, K.J., Parathath, S., Distel, E., Feig, J.L., Alvarez-Leite, J.I., *et al.* (2012). The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat Immunol* *13*, 136–143. <https://doi.org/10.1038/ni.2205>.
- Gong, M., Zhuo, X., and Ma, A. (2017). STAT6 Upregulation Promotes M2 Macrophage Polarization to Suppress Atherosclerosis. *Med Sci Monit Basic Res* *23*, 240–249. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.904014>.
- Gonzalez, L., and Trigatti, B.L. (2017). Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *Canadian Journal of Cardiology* *33*, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.12.010>.
- Gosselin, D., Link, V.M., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Eichenfield, D.Z., Spann, N.J., Stender, J.D., Chun, H.B., Garner, H., Geissmann, F., *et al.* (2014). Environment Drives Selection and Function of Enhancers Controlling Tissue-Specific Macrophage Identities. *Cell* *159*, 1327–1340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.023>.
- Grønholdt, M.-L.M., Nordestgaard, B.G., Bentzon, J., Wiebe, B.M., Zhou, J., Falk, E., and Sillesen, H. (2002). Macrophages are associated with lipid-rich carotid artery plaques, echolucency on B-mode imaging, and elevated plasma lipid levels. *Journal of Vascular Surgery* *35*, 137–145. <https://doi.org/10.1067/mva.2002.119042>.
- Hakala, J.K., Oksjoki, R., Laine, P., Du, H., Grabowski, G.A., Kovanen, P.T., and Pentikäinen, M.O. (2003). Lysosomal Enzymes Are Released From Cultured Human Macrophages, Hydrolyze LDL In Vitro, and Are Present Extracellularly in Human Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *23*, 1430–1436. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000077207.49221.06>.
- Hamadani, M., Awan, F.T., and Devine, S.M. (2008). The impact of HMG-CoA reductase inhibition on the incidence and severity of graft-versus-host disease in patients with acute leukemia undergoing allogeneic transplantation. *Blood* *111*, 3901–3902. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132050>.

- Han, J., Zhou, X., Yokoyama, T., Hajjar, D.P., Gotto, A.M., and Nicholson, A.C. (2004). Pitavastatin Downregulates Expression of the Macrophage Type B Scavenger Receptor, CD36. *Circulation* *109*, 790–796. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000112576.40815.13>.
- Håversen, L., Danielsson, K.N., Fogelstrand, L., and Wiklund, O. (2009). Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis* *202*, 382–393. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.033>.
- He, P., Smith, A., Gelissen, I.C., and Ammit, A.J. (2019). The effect of statins and the synthetic LXR agonist T0901317 on expression of ABCA1 transporter protein in human lung epithelial cell lines in vitro. *Pharmacological Reports* *71*, 1219–1226. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.08.006>.
- Healy, A., Berus, J.M., Christensen, J.L., Lee, C., Mantsounga, C., Dong, W., Watts, J.P., Assali, M., Ceneri, N., Nilson, R., *et al.* (2020). Statins Disrupt Macrophage Rac1 Regulation Leading to Increased Atherosclerotic Plaque Calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *40*, 714–732. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313832>.
- Heming, M., Gran, S., Jauch, S.-L., Fischer-Riepe, L., Russo, A., Klotz, L., Hermann, S., Schäfers, M., Roth, J., and Barczyk-Kahlert, K. (2018). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Modulates the Response of Macrophages to Lipopolysaccharide and Glucocorticoids. *Frontiers in Immunology* *9*. .
- Huang, K.-C., Chen, C.-W., Chen, J.-C., and Lin, W.-W. (2003). HMG-CoA reductase inhibitors inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in macrophages. *J Biomed Sci* *10*, 396–405. <https://doi.org/10.1007/BF02256431>.
- Ikeda, U., Shimpo, M., Ikeda, M., Minota, S., and Shimada, K. (2001). Lipophilic Statins Augment Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Cytokine-Stimulated Cardiac Myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* *38*, 69–77. .
- Izadpanah, R., Schächtele, D.J., Pfnür, A.B., Lin, D., Slakey, D.P., Kadowitz, P.J., and Alt, E.U. (2015). The impact of statins on biological characteristics of stem cells provides a novel explanation for their pleiotropic beneficial and adverse clinical effects. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* *309*, C522–C531. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00406.2014>.
- Jablonski, K.A., Gaudet, A.D., Amici, S.A., Popovich, P.G., and Guerau-de-Arellano, M. (2016). Control of the Inflammatory Macrophage Transcriptional Signature by miR-155. *PLOS ONE* *11*, e0159724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159724>.
- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., and Lecureur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular Immunology* *281*, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010>.
- Jeong, C.W., Ku, J.H., Kim, H.H., Kwak, C., and Kang, M. (2017). Statin inhibits the proliferation of human castration-resistant prostate cancer cells by controlling NF κ B-LIN28B-let7 miRNA signaling pathway. *JCO* *35*, 269–269. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.6_suppl.269.
- Jiang, P., Mukthavaram, R., Chao, Y., Nomura, N., Bharati, I.S., Fogal, V., Pastorino, S., Teng, D., Cong, X., Pingle, S.C., *et al.* (2014). In vitro and in vivo anticancer effects of mevalonate pathway modulation on human cancer cells. *Br J Cancer* *111*, 1562–1571. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.431>.
- Jinnouchi, H., Guo, L., Sakamoto, A., Torii, S., Sato, Y., Cornelissen, A., Kuntz, S., Paek, K.H., Fernandez, R., Fuller, D., *et al.* (2020). Diversity of macrophage phenotypes and responses in atherosclerosis. *Cell. Mol. Life Sci.* *77*, 1919–1932. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03371-3>.
- Jougasaki, M., Ichiki, T., Takenoshita, Y., and Setoguchi, M. (2010). Statins suppress interleukin-6-induced monocyte chemo-attractant protein-1 by inhibiting Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathways in human vascular endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* *159*, 1294–1303. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00612.x>.

- Kadhim, S.S., Al-Windy, S.A., Al-Nami, M.S., Al-kuraishy, H.M., and Al-Gareeb, A.I. (2019). Possible Role of Statins on the Inflammatory Biomarkers in Patients With Periodontal Disease: A Cross-Sectional Study. *Dental Hypotheses* 10, 70. https://doi.org/10.4103/denthyp.denthyp_60_19.
- Kalagara, R., Gao, W., Glenn, H.L., Ziegler, C., Belmont, L., and Meldrum, D.R. (2016). Identification of stable reference genes for lipopolysaccharide-stimulated macrophage gene expression studies. *Biology Methods and Protocols* 1, bpw005. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpw005>.
- Kauerova, S., Bartuskova, H., Muffova, B., Janousek, L., Froněk, J., Petras, M., Poledne, R., and Kralova Lesna, I. (2021). Statins Directly Influence the Polarization of Adipose Tissue Macrophages: A Role in Chronic Inflammation. *Biomedicines* 9, 211. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020211>.
- Keophiphath, M., Rouault, C., Divoux, A., Clément, K., and Lacasa, D. (2010). CCL5 Promotes Macrophage Recruitment and Survival in Human Adipose Tissue. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 39–45. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.197442>.
- Khan, B.V., Parthasarathy, S.S., Alexander, R.W., and Medford, R.M. (1995). Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 95, 1262–1270. <https://doi.org/10.1172/JCI117776>.
- Khanicheh, E., Mitterhuber, M., Xu, L., Haeuselmann, S.P., Kuster, G.M., and Kaufmann, B.A. (2013). Noninvasive Ultrasound Molecular Imaging of the Effect of Statins on Endothelial Inflammatory Phenotype in Early Atherosclerosis. *PLOS ONE* 8, e58761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058761>.
- Kim, H., Ahn, M., Choi, S., Kim, M., Sim, K.-B., Kim, J., Moon, C., and Shin, T. (2013). Potential role of fibronectin in microglia/macrophage activation following cryoinjury in the rat brain: An immunohistochemical study. *Brain Research* 1502, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.043>.
- Kim, K., Shim, D., Lee, J.S., Zaitsev, K., Williams, J.W., Kim, K.-W., Jang, M.-Y., Seok Jang, H., Yun, T.J., Lee, S.H., *et al.* (2018). Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models. *Circ Res* 123, 1127–1142. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312804>.
- Kim, Y.C., Kim, K.K., and Shevach, E.M. (2010). Simvastatin induces Foxp3⁺ T regulatory cells by modulation of transforming growth factor- β signal transduction. *Immunology* 130, 484–493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03269.x>.
- Kliwer, S.A., Goodwin, B., and Willson, T.M. (2002). The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocrine Reviews* 23, 687–702. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0038>.
- Kobiyama, K., and Ley, K. (2018). Atherosclerosis. *Circulation Research* 123, 1118–1120. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313816>.
- Koutouzis, M., Nomikos, A., Nikolidakis, S., Tzavara, V., Andrikopoulos, V., Nikolaou, N., Barbatis, C., and Kyriakides, Z.S. (2007). Statin treated patients have reduced intraplaque angiogenesis in carotid endarterectomy specimens. *Atherosclerosis* 192, 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.01.035>.
- Kow, C.S., and Hasan, S.S. (2020). Meta-analysis of Effect of Statins in Patients with COVID-19. *American Journal of Cardiology* 134, 153–155. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2020.08.004>.
- Kowala, M.C., Recce, R., Beyer, S., Gu, C., and Valentine, M. (2000). Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. *Atherosclerosis* 149, 323–330. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00342-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00342-1).
- Kralova Lesna, I., Kralova, A., Cejkova, S., Froněk, J., Petras, M., Sekerkova, A., Thieme, F., Janousek, L., and Poledne, R. (2016). Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human

subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue. *Journal of Translational Medicine* 14, 208. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0962-1>.

Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., and Freeman, M.W. (2002). Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages *. *Journal of Biological Chemistry* 277, 49982–49988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209649200>.

Larson-Casey, J.L., Vaid, M., Gu, L., He, C., Cai, G.-Q., Ding, Q., Davis, D., Berryhill, T.F., Wilson, L.S., Barnes, S., *et al.* (2019). Increased flux through the mevalonate pathway mediates fibrotic repair without injury. *J Clin Invest* 129, 4962–4978. <https://doi.org/10.1172/JCI127959>.

Lehrke, M., Millington, S.C., Lefterova, M., Cumarantunge, R.G., Szapary, P., Wilensky, R., Rader, D.J., Lazar, M.A., and Reilly, M.P. (2007). CXCL16 Is a Marker of Inflammation, Atherosclerosis, and Acute Coronary Syndromes in Humans. *Journal of the American College of Cardiology* 49, 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.09.034>.

Li, D.Y., Chen, H.J., and Mehta, J.L. (2001). Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovascular Research* 52, 130–135. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00371-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00371-6).

Li, G., Zhao, J., Li, B., Zhang, X., Ma, J., Ma, X., and Liu, J. (2018). The anti-inflammatory effects of statins on patients with rheumatoid arthritis: A systemic review and meta-analysis of 15 randomized controlled trials. *Autoimmunity Reviews* 17, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.10.013>.

Li, H., Wang, C.-C., Zhang, M., Li, X.-L., Zhang, P., Yue, L.-T., Miao, S., Wang, S., Liu, Y., Li, Y.-B., *et al.* (2015). Statin-modified dendritic cells regulate humoral immunity in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Molecular and Cellular Neuroscience* 68, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.08.010>.

Li, X.-L., Liu, Y., Cao, L.-L., Li, H., Yue, L.-T., Wang, S., Zhang, M., Li, X.-H., Dou, Y.-C., and Duan, R.-S. (2013). Atorvastatin-modified dendritic cells in vitro ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by up-regulated Treg cells and shifted Th1/Th17 to Th2 cytokines. *Molecular and Cellular Neuroscience* 56, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.03.005>.

Liao, F., Shirakawa, A.-K., Foley, J.F., Rabin, R.L., and Farber, J.M. (2002). Human B Cells Become Highly Responsive to Macrophage-Inflammatory Protein-3 α /CC Chemokine Ligand-20 After Cellular Activation Without Changes in CCR6 Expression or Ligand Binding. *J Immunol* 168, 4871–4880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.4871>.

Libby, P., and Aikawa, M. (2003). Mechanisms of plaque stabilization with statins. *The American Journal of Cardiology* 91, 4–8. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)03267-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)03267-8).

Libby, P., Lichtman, A.H., and Hansson, G.K. (2013). Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans. *Immunity* 38, 1092–1104. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.009>.

Linnenberger, R., Hoppstädter, J., Wrublewsky, S., Ampofo, E., and Kiemer, A.K. (2021). Statins and Bempedoic Acid: Different Actions of Cholesterol Inhibitors on Macrophage Activation. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 12480. <https://doi.org/10.3390/ijms222212480>.

Lu, J., Cao, Q., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C., Yu, X., Wang, Y., Lee, V.W.S., Zheng, G., Tan, T.K., *et al.* (2013). Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney International* 84, 745–755. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.135>.

- Lurier, E.B., Dalton, D., Dampier, W., Raman, P., Nassiri, S., Ferraro, N.M., Rajagopalan, R., Sarmady, M., and Spiller, K.L. (2017). Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology* 222, 847–856. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.02.006>.
- Lv, Y., Hou, X., Ti, Y., and Bu, P. (2013). Associations of CXCL16/CXCR6 with carotid atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. *Clinical Nutrition* 32, 849–854. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.01.008>.
- Maeda, T., Kawane, T., and Horiuchi, N. (2003). Statins Augment Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Osteoblastic Cells via Inhibition of Protein Prenylation. *Endocrinology* 144, 681–692. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220682>.
- Mäkinen, P.I., Lappalainen, J.P., Heinonen, S.E., Leppänen, P., Lähteenvu, M.T., Aarnio, J.V., Heikkilä, J., Turunen, M.P., and Ylä-Herttua, S. (2010). Silencing of either SR-A or CD36 reduces atherosclerosis in hyperlipidaemic mice and reveals reciprocal upregulation of these receptors. *Cardiovascular Research* 88, 530–538. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq235>.
- Manea, A., Manea, S.-A., Gan, A.M., Constantin, A., Fenyó, I.M., Raicu, M., Muresian, H., and Simionescu, M. (2015). Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.021>.
- Maretti-Mira, A.C., Golden-Mason, L., Salomon, M.P., Kaplan, M.J., and Rosen, H.R. (2021). Cholesterol-Induced M4-Like Macrophages Recruit Neutrophils and Induce NETosis. *Front Immunol* 12, 671073. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.671073>.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol* 177, 7303–7311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>.
- Marx, C., Novotny, J., Salbeck, D., Zellner, K.R., Nicolai, L., Pekayvaz, K., Kilani, B., Stockhausen, S., Bürgener, N., Kupka, D., *et al.* (2019). Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis with eosinophil extracellular traps. *Blood* 134, 1859–1872. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000518>.
- Massaro, M., Zampolli, A., Scoditti, E., Carluccio, M.A., Storelli, C., Distanto, A., and De Caterina, R. (2010). Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. *Cardiovascular Research* 86, 311–320. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp375>.
- McFarland, A.J., Davey, A.K., and Anoopkumar-Dukie, S. (2017). Statins Reduce Lipopolysaccharide-Induced Cytokine and Inflammatory Mediator Release in an In Vitro Model of Microglial-Like Cells. *Mediators of Inflammation* 2017, e2582745. <https://doi.org/10.1155/2017/2582745>.
- McGregor, G.H., Campbell, A.D., Fey, S.K., Tumanov, S., Sumpton, D., Blanco, G.R., Mackay, G., Nixon, C., Vazquez, A., Sansom, O.J., *et al.* (2020). Targeting the Metabolic Response to Statin-Mediated Oxidative Stress Produces a Synergistic Antitumor Response. *Cancer Research* 80, 175–188. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0644>.
- Mendez, A.J. (1997). Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion. *Journal of Lipid Research* 38, 1807–1821. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37155-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37155-8).
- Methe, H., Kim, J.-O., Kofler, S., Nabauer, M., and Weis, M. (2005). Statins Decrease Toll-Like Receptor 4 Expression and Downstream Signaling in Human CD14+ Monocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25, 1439–1445. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000168410.44722.86>.

- Miller, M., Stone, N.J., Ballantyne, C., Bittner, V., Criqui, M.H., Ginsberg, H.N., Goldberg, A.C., Howard, W.J., Jacobson, M.S., Kris-Etherton, P.M., *et al.* (2011). Triglycerides and Cardiovascular Disease. *Circulation* *123*, 2292–2333. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3182160726>.
- Mohammadkhani, N., Gharbi, S., Rajani, H.F., Farzaneh, A., Mahjoob, G., Hoseinsalari, A., and Korsching, E. (2019). Statins: Complex outcomes but increasingly helpful treatment options for patients. *European Journal of Pharmacology* *863*, 172704. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172704>.
- Mora, S., and Ridker, P.M. (2006). Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)—Can C-Reactive Protein Be Used to Target Statin Therapy in Primary Prevention? *The American Journal of Cardiology* *97*, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.11.014>.
- Mullick, A.E., Soldau, K., Kiosses, W.B., Bell, T.A., Tobias, P.S., and Curtiss, L.K. (2008). Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *Journal of Experimental Medicine* *205*, 373–383. <https://doi.org/10.1084/jem.20071096>.
- Muta, T., and Takeshige, K. (2001). Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4. *European Journal of Biochemistry* *268*, 4580–4589. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02385.x>.
- Nahrendorf, M., Jaffer, F.A., Kelly, K.A., Sosnovik, D.E., Aikawa, E., Libby, P., and Weissleder, R. (2006). Noninvasive Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Imaging Identifies Inflammatory Activation of Cells in Atherosclerosis. *Circulation* *114*, 1504–1511. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646380>.
- Nakayama, F., Nishihara, S., Iwasaki, H., Kudo, T., Okubo, R., Kaneko, M., Nakamura, M., Karube, M., Sasaki, K., and Narimatsu, H. (2001). CD15 Expression in Mature Granulocytes Is Determined by α 1,3-Fucosyltransferase IX, but in Promyelocytes and Monocytes by α 1,3-Fucosyltransferase IV *. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 16100–16106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007272200>.
- Nielsen, M.C., Andersen, M.N., and Møller, H.J. (2020). Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro. *Immunology* *159*, 63–74. <https://doi.org/10.1111/imm.13125>.
- Niesor, E.J., Schwartz, G.G., Perez, A., Stauffer, A., Durrwell, A., Bucklar-Suchankova, G., Benghozi, R., Abt, M., and Kallend, D. (2015). Statin-Induced Decrease in ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression via microRNA33 Induction may Counteract Cholesterol Efflux to High-Density Lipoprotein. *Cardiovasc Drugs Ther* *29*, 7–14. <https://doi.org/10.1007/s10557-015-6570-0>.
- Niessner, A., Steiner, S., Speidl, W.S., Pleiner, J., Seidinger, D., Maurer, G., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., Kopp, C.W., Huber, K., *et al.* (2006). Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo. *Atherosclerosis* *189*, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.022>.
- Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y.L. (2011). Autophagy Regulates Cholesterol Efflux from Macrophage Foam Cells via Lysosomal Acid Lipase. *Cell Metabolism* *13*, 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.023>.
- Pae, H.-O., Oh, G.-S., Lee, B.-S., Rim, J.-S., Kim, Y.-M., and Chung, H.-T. (2006). 3-Hydroxyanthranilic acid, one of l-tryptophan metabolites, inhibits monocyte chemoattractant protein-1 secretion and vascular cell adhesion molecule-1 expression via heme oxygenase-1 induction in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* *187*, 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.09.010>.
- Parihar, S.P., Guler, R., Khutlang, R., Lang, D.M., Hurdayal, R., Mhlanga, M.M., Suzuki, H., Marais, A.D., and Brombacher, F. (2014). Statin Therapy Reduces the Mycobacterium tuberculosis Burden in Human Macrophages and in Mice by Enhancing Autophagy and Phagosome Maturation. *The Journal of Infectious Diseases* *209*, 754–763. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit550>.

- Passi, S., Stancato, A., Aleo, E., Dmitrieva, A., and Littarru, G.P. (2003). Statins lower plasma and lymphocyte ubiquinol/ubiquinone without affecting other antioxidants and PUFA. *Biofactors* 18, 113–124.
- Pentikäinen, M.O., Öörni, K., Ala-Korpela, M., and Kovanen, P.T. (2000). Modified LDL – trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *Journal of Internal Medicine* 247, 359–370. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2000.00655.x>.
- Pertiwi, K.R., de Boer, O.J., Gabriels, P.A.M., and van der Wal, A.C. (2020). Etosis, rather than apoptosis or cell proliferation, typifies thrombus progression – An immunohistochemical study of coronary aspirates. *IJC Heart & Vasculature* 26, 100439. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2019.100439>.
- Poledne, R., Malinska, H., Kubatova, H., Froněk, J., Thieme, F., Kauerova, S., and Kralova Lesna, I. (2020). Polarization of Macrophages in Human Adipose Tissue is Related to the Fatty Acid Spectrum in Membrane Phospholipids. *Nutrients* 12, 8. <https://doi.org/10.3390/nu12010008>.
- Poznyak, A.V., Wu, W.-K., Melnichenko, A.A., Wetzker, R., Sukhorukov, V., Markin, A.M., Khotina, V.A., and Orekhov, A.N. (2020). Signaling Pathways and Key Genes Involved in Regulation of foam Cell Formation in Atherosclerosis. *Cells* 9, 584. <https://doi.org/10.3390/cells9030584>.
- Rader, D.J., Alexander, E.T., Weibel, G.L., Billheimer, J., and 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. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800088-JLR200>.
- Rauch, U., Bonderman, D., Bohrmann, B., Badimon, J.J., Hember, J., Riederer, M.A., and Nemerson, Y. (2000). Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 96, 170–175. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.1.170>.
- Reiner, Ž., Hatamipour, M., Banach, M., Pirro, M., Al-Rasadi, K., Jamialahmadi, T., Radenkovic, D., Montecucco, F., and Sahebkar, A. (2020). Statins and the COVID-19 main protease: in silico evidence on direct interaction. *Arch Med Sci* 16, 490–496. <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.94655>.
- Ricci, C., Ruscica, M., Camera, M., Rossetti, L., Macchi, C., Colciago, A., Zanotti, I., Lupo, M.G., Adorni, M.P., Cicero, A.F.G., *et al.* (2018). PCSK9 induces a pro-inflammatory response in macrophages. *Sci Rep* 8, 2267. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20425-x>.
- Riccobono, D., Nikovics, K., François, S., Favier, A.-L., Jullien, N., Schrock, G., Scherthan, H., and Drouet, M. (2018). First Insights Into the M2 Inflammatory Response After Adipose-Tissue-Derived Stem Cell Injections in Radiation-Injured Muscles. *Health Physics* 115, 37–48. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000000822>.
- Rodríguez-Perea, A.L., Montoya, C.J., Olek, S., Chougnnet, C.A., and Velilla, P.A. (2015). Statins Increase the Frequency of Circulating CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells in Healthy Individuals. *Journal of Immunology Research* 2015, e762506. <https://doi.org/10.1155/2015/762506>.
- Rothe, G., Gabriel, H., Kovacs, E., Klucken, J., Stöhr, J., Kindermann, W., and Schmitz, G. (1996). Peripheral Blood Mononuclear Phagocyte Subpopulations as Cellular Markers in Hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16, 1437–1447. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.16.12.1437>.
- Rotta, M., Storer, B.E., Storb, R.F., Martin, P.J., Heimfeld, S., Peffer, A., Maloney, D.G., Deeg, H.J., Sandmaier, B.M., Appelbaum, F.R., *et al.* (2010a). Donor statin treatment protects against severe acute graft-versus-host disease after related allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 115, 1288–1295. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-240358>.
- Rotta, M., Storer, B.E., Storb, R., Martin, P.J., Flowers, M.E.D., Vernon, M.S., Peffer, A., Maloney, D.G., Deeg, H.J., Sandmaier, B.M., *et al.* (2010b). Impact of Recipient Statin Treatment on Graft-versus-Host

Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 16, 1463–1466. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.05.006>.

Ruiz-Limon, P., Barbarroja, N., Perez-Sanchez, C., Aguirre, M.A., Bertolaccini, M.L., Khamashta, M.A., Rodriguez-Ariza, A., Almadén, Y., Segui, P., Khraiwesh, H., *et al.* (2015). Atherosclerosis and cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus: effects of in vivo statin treatment. *Ann Rheum Dis* 74, 1450–1458. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204351>.

Ruleva, N.Yu., Radyukhina, N.V., Zubkova, E.S., Filatova, A.Yu., and Aref'eva, T.I. (2020). Inhibitors of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme a Reductase (Statins) Suppress Differentiation and Reduce LPS/IFN γ -Induced Cytokine Production in Human Monocyte/Macrophage Culture. *Bull Exp Biol Med* 170, 236–240. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-05042-x>.

Sadh, S., Hajjar, S., Ariana, A., Phuong, M.S., Cai, D., Thakker, P., and Sad, S. (2020). Coating M-CSF on plastic surface results in the generation of increased numbers of macrophages in vitro. *Journal of Immunological Methods* 481–482, 112788. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112788>.

Samstad, E.O., Niyonzima, N., Nymo, S., Aune, M.H., Ryan, L., Bakke, S.S., Lappegård, K.T., Brekke, O.-L., Lambris, J.D., Damås, J.K., *et al.* (2014). Cholesterol crystals induce complement-dependent inflammasome activation and cytokine release. *J Immunol* 192, 2837–2845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302484>.

Santovito, D., Marcantonio, P., Mastroiacovo, D., Natarelli, L., Mandolini, C., De Nardis, V., Paganelli, C., De Cesare, D., Affaitati, G., Giamberardino, M.A., *et al.* (2020). High dose rosuvastatin increases ABCA1 transporter in human atherosclerotic plaques in a cholesterol-independent fashion. *International Journal of Cardiology* 299, 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.07.094>.

Sarlon, -Bartoli Gabrielle, Bennis, Y., Lacroix, R., Piercecchi, -Marti Marie Dominique, Bartoli, M.A., Arnaud, L., Mancini, J., Boudes, A., Sarlon, E., Thevenin, B., *et al.* (2013). Plasmatic Level of Leukocyte-Derived Microparticles Is Associated With Unstable Plaque in Asymptomatic Patients With High-Grade Carotid Stenosis. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 1436–1441. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.03.078>.

Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R.Y., Kockx, M.M., Herman, A.G., and Martinet, W. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages Is Impaired in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25, 1256–1261. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000166517.18801.a7>.

Shin, S.K., Cho, J.H., Kim, E.J., Kim, E.-K., Park, D.K., Kwon, K.A., Chung, J.-W., Kim, K.O., and Kim, Y.J. (2017). Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of rosuvastatin by regulation of oxidative stress in a dextran sulfate sodium-induced colitis model. *World J Gastroenterol* 23, 4559–4568. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i25.4559>.

da Silva, R.F., Lappalainen, J., Lee-Rueckert, M., and Kovanen, P.T. (2016). Conversion of human M-CSF macrophages into foam cells reduces their proinflammatory responses to classical M1-polarizing activation. *Atherosclerosis* 248, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.012>.

Soldano, S., Trombetta, A.C., Contini, P., Tomatis, V., Ruaro, B., Brizzolara, R., Montagna, P., Sulli, A., Paolino, S., Pizzorni, C., *et al.* (2018). Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 77, 1842–1845. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213648>.

Stumpf, C., Petzi, S., Seybold, K., Wasmeier, G., Arnold, M., Raaz, D., Yilmaz, A., Daniel, W.G., and Garlachs, C.D. (2009). Atorvastatin enhances interleukin-10 levels and improves cardiac function in rats after acute myocardial infarction. *Clinical Science* 116, 45–52. <https://doi.org/10.1042/CS20080042>.

Tang, C., Liu, Y., Kessler, P.S., Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2009). The Macrophage Cholesterol Exporter ABCA1 Functions as an Anti-inflammatory Receptor. *J Biol Chem* 284, 32336–32343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047472>.

- Tao, J., Qiu, J., Lu, L., Zhang, L., Fu, Y., Wang, M., Han, J., Shi, M., Li, L., Zhao, Z., *et al.* (2021). ZBTB20 Positively Regulates Oxidative Stress, Mitochondrial Fission, and Inflammatory Responses of ox-LDL-Induced Macrophages in Atherosclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021, e5590855. <https://doi.org/10.1155/2021/5590855>.
- Tasneem, A., Parashar, S., Jain, T., Aittan, S., Rautela, J., Raza, K., and Sampathkumar, S.-G. (2021). Glycan engineering using synthetic ManNAc analogues enhances sialyl-Lewis-X expression and adhesion of leukocytes. 2021.12.22.473788. <https://doi.org/10.1101/2021.12.22.473788>.
- Tedesco, S., De Majo, F., Kim, J., Trenti, A., Trevisi, L., Fadini, G.P., Bolego, C., Zandstra, P.W., Cignarella, A., and Vitiello, L. (2018). Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Frontiers in Pharmacology* 9. .
- van Tits, L.J.H., Stienstra, R., van Lent, P.L., Netea, M.G., Joosten, L.A.B., and Stalenhoef, A.F.H. (2011). Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: A crucial role for Krüppel-like factor 2. *Atherosclerosis* 214, 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.018>.
- Tsiantoulas, D., Sage, A.P., Mallat, Z., and Binder, C.J. (2015). Targeting B Cells in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35, 296–302. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303569>.
- Tu, J., Li, W., Zhang, Y., Wu, X., Song, Y., Kang, L., Liu, W., Wang, K., Li, S., Hua, W., *et al.* (2017). Simvastatin Inhibits IL-1 β -Induced Apoptosis and Extracellular Matrix Degradation by Suppressing the NF- κ B and MAPK Pathways in Nucleus Pulposus Cells. *Inflammation* 40, 725–734. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0516-6>.
- Ungaro, R., Chang, H.L., Cote-Daigneaut, J., Mehandru, S., Atreja, A., and Colombel, J.-F. (2016). Statins Associated With Decreased Risk of New Onset Inflammatory Bowel Disease. *American Journal of Gastroenterology* 111, 1416–1423. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.233>.
- Utomo, L., van Osch, G.J.V.M., Bayon, Y., Verhaar, J.A.N., and Bastiaansen-Jenniskens, Y.M. (2016). Guiding synovial inflammation by macrophage phenotype modulation: an in vitro study towards a therapy for osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 24, 1629–1638. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.04.013>.
- Van den Bossche, J., Baardman, J., Otto, N.A., van der Velden, S., Neele, A.E., van den Berg, S.M., Luque-Martin, R., Chen, H.-J., Boshuizen, M.C.S., Ahmed, M., *et al.* (2016). Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Reports* 17, 684–696. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.008>.
- Veillard, N.R., Braunersreuther, V., Arnaud, C., Burger, F., Pelli, G., Steffens, S., and Mach, F. (2006). Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis* 188, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.015>.
- Veloso, P., Fernández, A., Terraza-Aguirre, C., Álvarez, C., Vernal, R., Escobar, A., and Hernández, M. (2020). Macrophages skew towards M1 profile through reduced CD163 expression in symptomatic apical periodontitis. *Clin Oral Invest* 24, 4571–4581. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03324-2>.
- Vendrov, A.E., Hakim, Z.S., Madamanchi, N.R., Rojas, M., Madamanchi, C., and Runge, M.S. (2007). Atherosclerosis Is Attenuated by Limiting Superoxide Generation in Both Macrophages and Vessel Wall Cells. *ATVB* 27, 2714–2721. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.152629>.
- Vladykovskaya, E., Sithu, S.D., Haberzettl, P., Wickramasinghe, N.S., Merchant, M.L., Hill, B.G., McCracken, J., Agarwal, A., Dougherty, S., Gordon, S.A., *et al.* (2012). Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-trans-2-nonenal Causes Endothelial Activation by Inducing Endoplasmic Reticulum Stress *. *Journal of Biological Chemistry* 287, 11398–11409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.320416>.

- Volpe, S., Cameroni, E., Moepps, B., Thelen, S., Apuzzo, T., and Thelen, M. (2012). CCR2 Acts as Scavenger for CCL2 during Monocyte Chemotaxis. *PLOS ONE* 7, e37208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037208>.
- 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., Glatz, J.F.C., Havekes, L.M., Voshol, P.J., Rensen, P.C.N., *et al.* (2013). CD36 is important for adipocyte recruitment and affects lipolysis. *Obesity* 21, 2037–2045. <https://doi.org/10.1002/oby.20354>.
- Wågsäter, D., Olofsson, P.S., Norgren, L., Stenberg, B., and Sirsjö, A. (2004). The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon γ . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325, 1187–1193. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.160>.
- Wang, D., Nie, H., Ozhegov, E., Wang, L., Zhou, A., Li, Y., and Sun, X.-L. (2015). Globally profiling sialylation status of macrophages upon statin treatment. *Glycobiology* 25, 1007–1015. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv038>.
- Wang, X., Fang, X., Zhou, J., Chen, Z., Zhao, B., Xiao, L., Liu, A., Li, Y.-S.J., Shyy, J.Y.-J., Guan, Y., *et al.* (2013). Shear stress activation of nuclear receptor PXR in endothelial detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 13174–13179. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312065110>.
- Wang, Y., Wang, G.Z., Rabinovitch, P.S., and Tabas, I. (2014). Macrophage Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Atherosclerosis and Nuclear Factor- κ B–Mediated Inflammation in Macrophages. *Circulation Research* 114, 421–433. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302153>.
- Wang, Z., Monti, S., and Sherr, D.H. (2017). The diverse and important contributions of the AHR to cancer and cancer immunity. *Current Opinion in Toxicology* 2, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.01.008>.
- Xu, X., Gao, W., Cheng, S., Yin, D., Li, F., Wu, Y., Sun, D., Zhou, S., Wang, D., Zhang, Y., *et al.* (2017). Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation* 14, 167. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0934-2>.
- Xu, X.H., Shah, P.K., Faure, E., Equils, O., Thomas, L., Fishbein, M.C., Luthringer, D., Xu, X.-P., Rajavashisth, T.B., Yano, J., *et al.* (2001). Toll-Like Receptor-4 Is Expressed by Macrophages in Murine and Human Lipid-Rich Atherosclerotic Plaques and Upregulated by Oxidized LDL. *Circulation* 104, 3103–3108. <https://doi.org/10.1161/hc5001.100631>.
- Yang, N., Cheng, W., Hu, H., Xue, M., Li, X., Wang, Y., Xuan, Y., Li, X., Yin, J., Shi, Y., *et al.* (2016). Atorvastatin attenuates sympathetic hyperinnervation together with the augmentation of M2 macrophages in rats postmyocardial infarction. *Cardiovascular Therapeutics* 34, 234–244. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12193>.
- Yang, Y.-Y., Hu, C.-J., Chang, S.-M., Tai, T.-Y., and Leu, S.-J. (2004). Aspirin inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 expression in TNF- α stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 174, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.01.024>.
- Yoshimura, K., Nagasawa, A., Kudo, J., Onoda, M., Morikage, N., Furutani, A., Aoki, H., and Hamano, K. (2015). Inhibitory Effect of Statins on Inflammation-Related Pathways in Human Abdominal Aortic Aneurysm Tissue. *IJMS* 16, 11213–11228. <https://doi.org/10.3390/ijms160511213>.
- Youssef, S., Stüve, O., Patarroyo, J.C., Ruiz, P.J., Radosevich, J.L., Hur, E.M., Bravo, M., Mitchell, D.J., Sobel, R.A., Steinman, L., *et al.* (2002). The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420, 78–84. <https://doi.org/10.1038/nature01158>.

- Yu, X., Zhao, R., Lin, S., Bai, X., Zhang, L., Yuan, S., and Sun, L. (2016). CXCL16 induces angiogenesis in autocrine signaling pathway involving hypoxia-inducible factor 1 α in human umbilical vein endothelial cells. *Oncology Reports* 35, 1557–1565. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4520>.
- Yue, R., Zuo, C., Zeng, J., Su, B., Tao, Y., Huang, S., and Zeng, R. (2017a). Atorvastatin attenuates experimental contrast-induced acute kidney injury: a role for TLR4/MyD88 signaling pathway. *Renal Failure* 39, 643–651. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2017.1361838>.
- Yue, Y., Yang, X., Feng, K., Wang, L., Hou, J., Mei, B., Qin, H., Liang, M., Chen, G., and Wu, Z. (2017b). M2b macrophages reduce early reperfusion injury after myocardial ischemia in mice: A predominant role of inhibiting apoptosis via A20. *International Journal of Cardiology* 245, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.07.085>.
- Zeiser, R. (2018). Immune modulatory effects of statins. *Immunology* 154, 69–75. <https://doi.org/10.1111/imm.12902>.
- Zeiser, R., Youssef, S., Baker, J., Kambham, N., Steinman, L., and Negrin, R.S. (2007). Preemptive HMG-CoA reductase inhibition provides graft-versus-host disease protection by Th-2 polarization while sparing graft-versus-leukemia activity. *Blood* 110, 4588–4598. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-106005>.
- Zeng, Z., Lan, T., Wei, Y., and Wei, X. (2021). CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments. *Genes Dis* 9, 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.08.004>.
- Zeybek, B., Costantine, M., Kilic, G.S., and Borahay, M.A. (2018). Therapeutic Roles of Statins in Gynecology and Obstetrics: The Current Evidence. *Reprod Sci* 25, 802–817. <https://doi.org/10.1177/1933719117750751>.
- Zhang, G., Xing, J., Wang, Y., Wang, L., Ye, Y., Lu, D., Zhao, J., Luo, X., Zheng, M., and Yan, S. (2018). Discovery of Novel Inhibitors of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Through Structure-Based Virtual Screening. *Front. Pharmacol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00277>.
- Zhang, T., Shao, B., and Liu, G.-A. (2017a). Rosuvastatin promotes the differentiation of peripheral blood monocytes into M2 macrophages in patients with atherosclerosis by activating PPAR- γ . *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21, 4464–4471. .
- Zhang, T., Shao, B., and Liu, G.-A. (2017b). Rosuvastatin promotes the differentiation of peripheral blood monocytes into M2 macrophages in patients with atherosclerosis by activating PPAR- γ . *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21, 4464–4471. .
- Zhang, X., Jin, J., Peng, X., Ramgolam, V.S., and Markovic-Plese, S. (2008). Simvastatin Inhibits IL-17 Secretion by Targeting Multiple IL-17-Regulatory Cytokines and by Inhibiting the Expression of IL-17 Transcription Factor RORC in CD4⁺ Lymphocytes. *J Immunol* 180, 6988–6996. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6988>.
- Živković, L., Asare, Y., Bernhagen, J., Dichgans, M., and Georgakis, M.K. (2021). CCL2/CCR2 inhibition in atherosclerosis: a meta-analysis of preclinical studies. 2021.04.16.439554. <https://doi.org/10.1101/2021.04.16.439554>.
- Zizzo, G., and Cohen, P.L. (2013). IL-17 Stimulates Differentiation of Human Anti-Inflammatory Macrophages and Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils in Response to IL-10 and Glucocorticoids. *J.I.* 190, 5237–5246. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203017>.
- Zizzo, G., Hilliard, B.A., Monestier, M., and Cohen, P.L. (2012). Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction. *The Journal of Immunology* 189, 3508–3520. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200662>.

10 PŘÍLOHA

Poster prezentovaný na 25. kongrese o ateroskleróze, Olomouc
- zisk druhého místa



Vliv statinů na polarizaci makrofágů *in vitro*

Barbora Muffová^{1,2}, Soňa Kauerová¹, Hana Bartušková¹,
Ivana Králová-Lesná¹, Rudolf Poledne¹

25. Kongres o ateroskleróze, 2. - 4.12.2021, Olomouc

¹Laborator pro výzkum aterosklerózy, Centrum experimentální medicíny,
Institut klinické a experimentální medicíny
²Katedra buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Úvod

Je prokázáno, že vedle poruchy distribuce, ukládání cholesterolu a tvoření lipidových lézí je ateroskleróza definována zejména přítomností chronického zánětu a v něm základní roli má přítomnost a aktivita makrofágů. Právě koexistence obou těchto patologických dějů silně ovlivňuje různé fáze aterosklerózy. Protektivní význam cílené protizánětlivé terapie na kardiovaskulární chorobu byl prokázán v klinických studiích. Publikovaná data prokázala i protizánětlivý účinek statinů, přičemž byl tento efekt prokázán jak *in vitro*¹, tak *in vivo*^{2,3}. Mechanismus tohoto jevu není objasněn, naše recentní data prokázala⁴ možný vliv na polarizaci makrofágů v tkáních. V prezentovaném projektu jsme tento efekt testovali v *in vitro* podmínkách.

Hypotéza, cíle a metody

Na základě výše uvedených i dalších studií předpokládáme, že statiny *in vitro* působí na polarizaci makrofágů v protizánětlivém směru a snižují markery zánětu.

Pro potvrzení naší hypotézy byly stanoveny následující cíle:

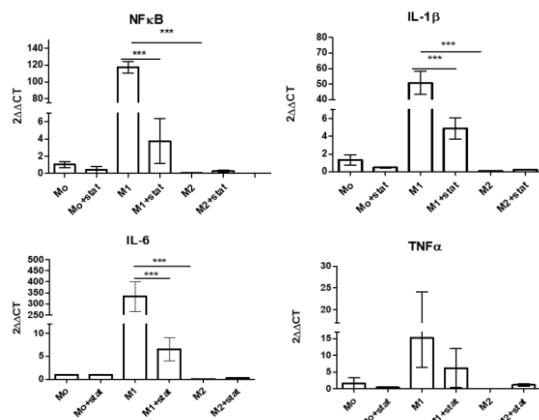
- 1) Kvantifikace vlivu statinů na expresi povrchových markerů monocytárních buněk pomocí průtokové cytometrie
- 2) Stanovení vlivu statinů na expresi genů pro NF-κB, IL-1β, IL-6 a TNFα a NO syntázu pomocí qRT-PCR
- 3) Definice vlivu statinů na aktivitu NO syntázy (Greissova reakce) a Argininy-1
- 4) Stanovení změn v produkci cytokinů IL-1β, IL-6, IL-10 a TNFα ELISA testem

Pro potřeby tohoto výzkumu byl využit model makrofágů získaných diferenciací lidských periferních monocytů, příslušná polarizace byla simulována LPS+IFNγ (M1 makrofágy) a IL-13+IL-4 (M2 makrofágy). Jako modelový statin byl vybrán fluvastatin.

Stěžejní metody pro tento projekt jsou uvedeny výše.

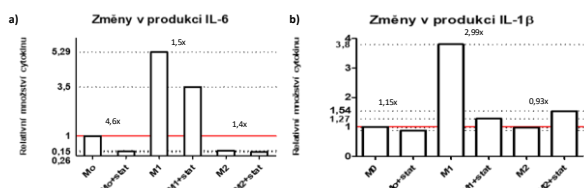
Výsledky

3. Kvantifikace exprese genů metodou qRT-PCR



Obrázek 3.1: Grafy exprese jednotlivých genů pro zánětlivé proteiny
Výsledky z qRT-PCR jsou prokázány protizánětlivý vliv statinů na expresi zánětlivých markerů. Příkrm statinů vedlo k významnému snížení exprese NF-κB, IL-1β a IL-6. Z grafů pro TNFα je patrné, že i u tohoto genu statiny značně snížily jeho expresi, není zde ale významný rozdíl mezi vnořky a a bez statinů.
Data vyjádřena log₂ násobnou změnou neolefené kontroly (Mo) ve srovnání s makrofágy M1 či M2, měřeno v triplicátech, průměr ± SD, *** p < 0,001.

4. Kvantifikace produkce cytokinů ELISA test

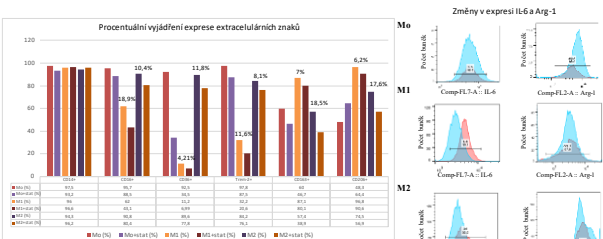
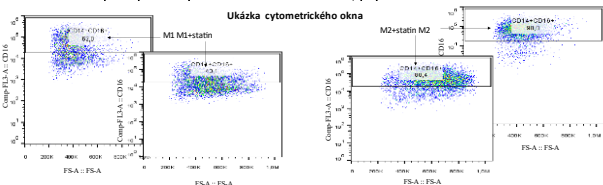


Graf 4.1: Změny produkce cytokinů IL-6 (a) a IL-1β (b) u buněk stimulovaných statiny a bez statinů
4.1 a) Graf ukazuje významný vliv statinů na snížení exprese cytokinu IL-6. U M0 makrofágů se statiny došlo k 4,6 násobnému snížení produkce IL-6, u M1 k 1,5 násobnému a u M2 k 1,4 násobnému snížení vůči buňkám stejného fenotypu bez statinů. Data demonstrována 2 bodovými
4.1 b) Graf ukazuje významný vliv statinů na snížení exprese cytokinu IL-1β. U M0 makrofágů statiny snížily expresi cytokinu 1,5x, u M1 2,99x a u M2 makrofágů 0,93x vůči buňkám stejného fenotypu bez statinů. Měřeno v triplicátech

Na ose Y je vyjádřen násobný rozdíl v produkci cytokinu oproti Mo kontrolním buňkám.

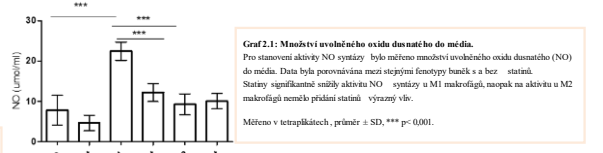
Výsledky

1. Kvantifikace exprese povrchových a intracelulárních markerů, průtoková cytometrie



Graf 1.1: Shrnující graf procentuálního vyjádření změny v expresi povrchových znaků mezi buňkami se statiny a bez statinů
Procentuální vyjádření snížení počtu buněk exprimujících daný extracelulární znak. Procenta nad sklopci v grafu vyjadřují rozdíl exprese znaků mezi buňkami se statiny a bez nich, Me(%) - Mě(%) - statin (%).
Data ukazují významnou korelaci mezi užitím statinů a snížením exprese CD14, Trem-2, CD163, CD26 a CD136. Z grafu vyplývá, že statiny mají silný vliv na snížení exprese zánětlivých markerů a receptorů zodpovědných za fagocytickou aktivitu makrofágů. Vliv statinů na expresi CD14 receptoru nebyl prokázán.

2. Stanovení aktivity NO syntázy Griessovou metodou



Graf 2.1: Množství uvolněného oxidu dusnatého do média.
Pro stanovení aktivity NO syntázy bylo měřeno množství oxidu dusnatého (NO) do média. Data byla porovnávána mezi stejnými fenotypy buněk a a bez statinů. Statiny významně snížily aktivitu NO syntázy u M1 makrofágů, naopak na aktivitu u M2 makrofágů nemělo přidání statinů výrazný vliv.
Měřeno v tetraplicátech, průměr ± SD, *** p < 0,001.

Rekapitulace a závěr

- výsledky cytometrické analýzy ukazují, že statiny snižují expresi některých zánětlivých povrchových znaků
- metodou qRT-PCR bylo prokázáno, že statiny významně snižují expresi genů zánětlivých markerů NF-κB, IL-1β a IL-6 a významně také expresi TNF α u M1 makrofágů
- Griessovou metodou bylo prokázáno, že statiny významně snižují aktivitu NO syntázy u M1 makrofágů
- ELISA test ukázal významné snížení produkce IL-6 a IL-1β u M1, z dosavadních dat lze předpokládat, že i u TNF α dojde k podobnému výsledku

Výsledky 2-4 byly vyhodnocovány pomocí statistického programu GraphPad.
Pro analýzu dat 2 a 3 byly použity Anova test a Bonferroni's Multiple Comparison Test.

Dosadivním závěrem této práce je potvrzení počáteční hypotézy, sice, že statiny ovlivňují polarizaci makrofágů v protizánětlivém směru a že snižují přítomnost markerů zánětu.

Citované zdroje

1. (Fu et al., 2019)
2. (Akbari et al., 2001)
3. (Ridker et al., 2008)
4. (Krausová-Lesná et al., 2018)

Finanční podpora MZ ČR RVO („Institut klinické a experimentální medicíny IKEM IČO 00023001)