

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Nauk o Zdrowiu

Paulina Kowalczyk

**Wpływ otyłości indukowanej dietą wysokotłuszczową na  
reakcję nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez  
komórki NK u myszy**

*Praca doktorska*

Promotor: **prof. dr hab. Marian Szczepanik**

Pracę wykonano w: Katedra Biologii Medycznej UJ CM

Kierownik jednostki: prof. dr hab. Marian Szczepanik

Kraków, 2020

*Szczególne słowa podziękowania kieruję do  
Pana Promotora prof. dr hab. Mariana Szczepanika,  
za opiekę merytoryczną, za cenne uwagi i sugestie,  
za zaangażowanie, dzięki któremu możliwe było napisanie tej pracy.*

*Pragnę także serdecznie podziękować  
Pracownikom Katedry Biologii Medycznej UJ CM,  
za pomoc w wykonaniu doświadczeń oraz za wsparcie merytoryczne w pracy.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności składam rodzinie oraz przyjaciołom,  
za nieustanne wsparcie oraz motywację.*

## Spis treści

Spis treści.....	3
Wykaz użytych skrótów.....	5
Wstęp.....	9
1 Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry.....	9
2 Reakcja nadwrażliwości kontaktowej.....	10
3 Reakcja nadwrażliwości kontaktowej mediowana przez wątrobowe komórki NK/ILC1.....	11
4 Wpływ otyłości na układ immunologiczny.....	15
4.1 Wpływ otyłości na komórki NK/ILC1.....	19
4.2 Wpływ otyłości na reakcję nadwrażliwości kontaktowej.....	22
5 Naturalna mikrobiota jelitowa.....	24
5.1 Wpływ naturalnej mikrobioty jelitowej na układ immunologiczny.....	25
5.2 Mikrobiota jelitowa w otyłości.....	29
5.3 Oś jelitowo – wątrobowa.....	32
5.4 Mikrobiota jelitowa w nadwrażliwości kontaktowej.....	34
Cel pracy i problemy badawcze.....	36
Materiały i metody.....	37
1 Zwierzęta laboratoryjne.....	37
2 Odczynniki.....	37
3 Metodyka.....	39
3.1 Indukcja otyłości.....	39
3.2 Ocena przyjmowania pokarmu i profil metaboliczny.....	39
3.3 Ocena stanu zapalnego w tkance tłuszczowej.....	40
3.4 Model reakcji CHS <i>in vivo</i> .....	40
3.5 Ocena stanu zapalnego w wątrobie.....	43
3.6 Analiza cytometryczna wyizolowanych komórek.....	44
3.7 Ocena aktywności komórek LMNC – model adopcyjnego transferu.....	46
3.8 Analiza składu mikrobioty jelitowej.....	47
3.9 Ocena stanu zapalnego w obrębie jelit.....	51
4 Opracowanie statystyczne wyników.....	51
Wyniki.....	52
1 Wpływ przyjmowania diety wysokotłuszczowej przez 8 tygodni na masę ciała oraz wybranych tkanek i narządów myszy <i>Rag1<sup>-/-</sup></i> .....	52
2 Wpływu przyjmowania diety wysokotłuszczowej przez 8 tygodni na profil metaboliczny myszy <i>Rag1<sup>-/-</sup></i> .....	53
3 Wpływ przyjmowania diety wysokotłuszczowej przez 8 tygodni na profil adipokin produkowanych przez tkankę tłuszczową.....	55
4 Wpływ DIO na reakcję nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez wątrobowe komórki NK.....	57

5	Wpływ DIO na profil cytokinowy i fenotyp komórek wątrobowych biorących udział w reakcji nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez komórki NK.....	61
6	Wpływ DIO na aktywność komórek wątrobowych biorących udział w reakcji nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez komórki NK.....	65
7	Wpływ diety wysokotłuszczowej na skład mikrobioty jelitowej.....	66
8	Wpływ diety wysokotłuszczowej na błony śluzowe jelit.....	69
	Dyskusja.....	72
	Wnioski.....	85
	Streszczenie.....	86
	Abstract.....	89
	Spis ilustracji.....	92
	Piśmiennictwo.....	94

## Wykaz użytych skrótów

---

- ACD - alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ang. allergic contact dermatitis)
- AhR – receptor węglowodorów aromatycznych (ang. aryl hydrocarbon receptor)
- AMP - peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. antimicrobial peptides)
- APC – komórki prezentujące antygen (ang. antigen presenting cell)
- AT – tkanka tłuszczowa (ang. adipose tissue)
- scAT – tkanka tłuszczowa podskórna (ang. subcutaneous adipose tissue)
- viscAT – tkanka tłuszczowa wisceralna (ang. visceral adipose tissue)
- ATM – makrofag tkanki tłuszczowej (ang. adipose tissue macrophage)
- BCA – kwas bis-cynchoninowy (ang. bichinchonic acid)
- BMI – wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)
- BSA - albumina z surowicy bydłowej (ang. bovine serum albumin)
- CD – antygen różnicowania komórkowego (ang. cluster of differentiation)
- CFU - jednostka koloniotwórcza (ang. colony forming unit)
- CHS - nadwrażliwość kontaktowa (ang. contact hypersensitivity)
- CRP - białko C-reaktywne (ang. C-reactive protein)
- Ct – cykl graniczny (ang. threshold cycle)
- DAMPs - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem tkanki (ang. damage-associated molecular patterns)
- DC – komórka dendrytyczna (ang. dendritic cell)
- dDC –skórna komórka dendrytyczna (ang. dermal dendritic cell)
- DIO – otyłość indukowana dietą (ang. diet-induced obesity)
- DNFB - dinitrofluorobenzen (ang. dinitrofluorobenzene)
- DNP-BSA - hapten DNP (2,4-dinitrofenol) skoniugowany z albuminą surowicy bydłowej (ang. DNP hapten-labeled BSA)
- DPBS - zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna bez jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$
- ELISA - test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
- EB - błękit Evansa (ang. Evans Blue)
- EDTA – kwas wersenowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
- FBS - płodowa surowica cielęca (ang. fetal bovine serum)
- FITC – izotiocyanian fluoresceiny (ang. fluorescein isothiocyanate)
- FFA – wolne kwasy tłuszczowe (ang. free fatty acids)
- FOS – fruktooligosacharyd (ang. fructo-oligosaccharide)

GALT – tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego (ang. gut-associated lymphoid tissue)

GF – zwierzęta akseniczne/ wolne od drobnoustrojów (ang. germ-free)

HDL – lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. high density lipoprotein)

HFD – dieta wysoko tłuszczowa (ang. high fat diet)

IECs – komórki nabłonka jelit (ang. intestinal epithelial cells)

IFN – interferon (ang. interferon)

IL – interleukina (ang. interleukin)

ILC – naturalne komórki limfoidalne (ang. innate lymphoid cells)

ILF - samotne grudki limfatyczne (ang. isolated lymphoid follicles)

KC - komórka Kupffera (ang. Kupffer cell)

LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. low density lipoprotein)

LN - węzeł chłonny (ang. lymph node)

    ALN - węzeł chłonny pachowy (ang. axillary lymph node)

    ELN - węzły chłonne drenujące małżowinę uszną (ang. auricular ear-draining lymph node)

    ILN - węzeł chłonny pachwinowy (ang. inguinal lymph node)

    MLN – węzeł chłonny krezkowy (ang. mesenteric lymph node)

LMNC – wątrobowe komórki jednojądrzaste (ang. liver mononuclear cells)

LP – blaszka właściwa śluzówki jelit (ang. lamina propria)

LPS – lipopolisacharyd (ang. lipopolysaccharide)

MAMPs - molekularne wzorce związane z drobnoustrojami (ang. microbe associated molecular patterns)

MCP-1 – białko 1 chemotaktyczne dla monocytów (ang. monocyte chemoattractant protein-1)

MHC - główny układ zgodności tkankowej (ang. Major Histocompatibility Complex)

MPO – mieloperoksydaza (ang. myeloperoxidase)

NAFLD – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. non-alcoholic fatty liver disease)

NASH - niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby (ang. non-alcoholic hepatitis steatosis)

ND – dieta kontrolna (ang. normal diet)

NK – komórka naturalny zabójca (ang. natural killer cell)

cNK – konwencjonalna komórka NK (ang. conventional NK cell)  
iNK - niedojrzała komórka NK (ang. immature NK cell)  
mNK – dojrzała komórka NK (ang. mature NK cell)  
trNK – tkankowa komórka NK (ang. tissue resident NK cell)  
NKT – komórka NKT (ang. natural killer T cell)  
iNKT – klasyczna komórka NKT (ang. invariant natural killer T cell)  
NLR – receptor NOD – podobny [ang. NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) - like receptor]  
Ob-R - receptor dla leptyny (ang. obesity receptor)  
OVA – owalbumina (ang. ovalbumin)  
OX – oksazolone (ang. oxazolone)  
PGN – peptydoglikan (ang. peptidoglycan)  
PP – kępkę Peyera (ang. Peyer's patches)  
PRR - receptory rozpoznające wzorce, (ang. pattern recognition receptors)  
rpm – obroty na minutę (ang. revolutions per minute)  
RT – temperatura pokojowa (ang. room temperature)  
qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. quantitative polymerase chain reaction)  
SCFA - krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. Short-Chain Fatty Acids)  
SDS - dodecylosiarczan sodu (ang. Sodium Dodecyl Sulfate)  
SEM - błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean)  
SPL - śledziona (ang. spleen)  
T – limfocyty/komórka T (ang. T lymphocyte)  
T<sub>c</sub> - limfocyt T cytotoksyczny (ang. cytotoxic T lymphocyte)  
T<sub>CM</sub> – limfocyt T pamięci centralnej (ang. central memory T lymphocyte)  
T<sub>h</sub> - limfocyt T pomocniczy (ang. T helper lymphocyte)  
T<sub>RM</sub> – limfocyt T pamięci rezydujący w skórze (ang. tissue-resident memory T lymphocyte)  
Treg – limfocyt T regulatorowy (ang. T regulatory lymphocyte)  
TCR - receptor antygenowy limfocytu T (ang. T-cell receptor)  
TGF – transformujący czynnik wzrostu (ang. transforming growth factor)  
TLR – receptor Toll-podobny (ang. Toll-like receptor)  
TNP-Cl – trinitrochlorobenzen (ang. trinitrophenyl chloride)

TMA – trimetyloamina (ang. trimethylamine)

TMAO - N-tlenek trimetyloaminy (ang. trimethylamine N-oxide)

TNF – czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor)

VLDL - lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (ang. very low density lipoprotein)

WT – myszy typu dzikiego (ang. wild type mice)



## Wstęp

---

### 1.1 Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry

Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ACD - allergic contact dermatitis) jest chorobą zapalną, u podstaw której leży reakcja nadwrażliwości typu późnego. Do indukcji alergii kontaktowej dochodzi w wyniku pierwszego kontaktu skóry lub błon śluzowych z niskocząsteczkowymi (<500 Da) związkami chemicznymi zwanymi haptenami. Substancje te zdolne są wywołać odpowiedź immunologiczną dopiero po związaniu się z aminokwasami białek organizmu, w wyniku czego powstaje neoantygen. Kolejna ekspozycja na ten sam hapten prowadzi do wywołania alergii kontaktowej. ACD jest jedną z najczęściej występujących chorób zawodowych skóry (30%) i najczęstszą postacią alergii kontaktowej. Alergię kontaktową stwierdza się u około 20% całej populacji, występuje ona częściej u kobiet niż mężczyzn. W 80% przypadków dotyczy skóry rąk, zwłaszcza jej części grzbietowej [1, 2]. W obrazie klinicznym dominuje rumień, nadmierne rogowacenie, obrzęk i pęcherze z towarzyszącym świądem.

Do tej pory zidentyfikowano około 4000 związków chemicznych o charakterze haptenów będących czynnikiem etiologicznym alergii kontaktowej. Wzrastająca zapadalność na ACD jest m.in. wynikiem narastającej chemizacji środowiska i w konsekwencji zwiększonej ekspozycji człowieka na hapteny. Tylko w latach 2008-2015, zidentyfikowano 119 nowych substancji odpowiedzialnych za wywołanie ACD z czego jedną trzecią stanowiły składniki kosmetyków [3]. Najczęściej występuje alergia kontaktowa na metale np. nikiel, chrom i kobalt, a ponadto na środki zapachowe oraz leki. W przypadku alergii kontaktowych nie związanych z miejscem pracy najczęstszym czynnikiem etiologicznym jest nikiel.

W związku z coraz częstszą ekspozycją na substancje chemiczne o charakterze haptenów w życiu codziennym oraz w miejscu pracy w wyniku, której dochodzi do uczulenia, ACD stanowi coraz poważniejszy problem społeczno-ekonomiczny.

## 2 Reakcja nadwrażliwości kontaktowej

Źródłem wiedzy na temat patomechanizmu ACD są głównie wyniki doświadczeń prowadzonych z wykorzystaniem modelu zwierzęcego reakcji nadwrażliwości kontaktowej (CHS - contact hypersensitivity). CHS składa się z dwóch faz odpowiedzi na hapten - fazy indukcji/uczulenia i fazy wywołania/efektorowej. Do najczęściej stosowanych haptenu w badaniach naukowych zaliczamy: trinitrochlorobenzen (TNP-Cl - trinitrophenyl chloride), dinitrofluorobenzen (DNFB - dinitrofluorobenzene), oksazolone (OX - oxazolone) i izotiocyanian fluoresceiny (FITC - fluorescein isothiocyanate). Podanie haptenu na skórę (np. brzucha) zwierzęcia prowadzi do powstania neoantygeny (kompleksu haptenu-białko nośnikowe), który zostaje pochłonięty przez komórki prezentujące antygen (APCs - antigen presenting cells) - skórne komórki dendrytyczne (dDCs - dermal dendritic cell) [4]. Zaktywowane komórki APC migrują do węzłów chłonnych (LNs - lymph nodes) gdzie neoantygenu po uprzednim przygotowaniu jest prezentowany w kontekście antygenów zgodności tkankowej (MHC - major histocompatibility complex) naiwnym limfocytom T TCR $\alpha\beta$  (T-cell receptor). Pobudzone limfocyty T, w ciągu 4-5 dni, namnażają się i różnicują w komórki efektorowe oraz komórki pamięci immunologicznej [5]. Powstałe komórki migrują z LNs do krwioobiegu i dalej na obwód. Część komórek T migruje do skóry tworząc pulę komórek pamięci rezydujących w skórze (T<sub>RM</sub> - tissue-resident memory T lymphocyte), natomiast część pozostaje w krążeniu tworząc pulę komórek T pamięci centralnej (T<sub>CM</sub> - central memory T lymphocyte) [6, 7]. Uczulenie haptenu prowadzi również do aktywacji otrzewnowych limfocytów B1 w obecności IL-4 produkowanej przez wątrobowe komórki NKT (natural killer T cells) [8]. Zaktywowane limfocyty B1 uwalniają przeciwciała IgM swoiste dla neoantygeny [9]. Fazę efektorową CHS wywołuje się poprzez ponowną ekspozycję (w innym miejscu niż uczulenie np. małżowinę uszu) na niską dawkę tego samego haptenu. W początkowym etapie fazy efektorowej tzw. fazie wczesnej wykrywalnej już 2 godz. od ponownego podania haptenu dochodzi do tworzenia się kompleksów immunologicznych neoantygenu - IgM, które aktywują układ dopełniacza [10, 11]. Powstałe fragmenty C5a dopełniacza aktywują mastocyty oraz płytki krwi do uwalniania mediatorów stanu zapalnego, co zwiększa przepuszczalność naczyń

i ekspresję molekuł adhezyjnych na komórkach śródbłonka [12, 13, 14, 15]. Umożliwia to napływ antygenowo swoistych komórek T, neutrofilów oraz makrofagów do miejsca depozycji haptenu i rozwinięcie się tzw. fazy późnej wykrywalnej po 24 godz. W zależności od zastosowanego szczepu myszy oraz haptenu komórkami efektorowymi reakcji mogą być limfocyty cytotoksyczne CD8<sup>+</sup>Tc1 lub limfocyty pomocnicze CD4<sup>+</sup>Th1/Th17 [16, 17].

### **3 Reakcja nadwrażliwości kontaktowej mediowana przez wątrobowe komórki NK/ILC1**

Komórki naturalni zabójcy (NK – natural killer), w klasycznym ujęciu, to populacja limfocytów pochodzących ze szpiku kostnego, stanowiąca komponentę odporności wrodzonej. Komórki NK są ziarnistymi limfocytami, które odgrywają istotną rolę w odporności przeciwwirusowej i odpowiedzi przeciwnowotworowej. Przez długi czas uważane były za jedyną istotną populację limfocytów biorącą udział w odpowiedzi wrodzonej, jednak niedawno zidentyfikowano nową grupę limfocytów - naturalne komórki limfoidalne (ILC – innate lymphoid cells) [18]. Obecnie zidentyfikowano trzy różne grupy ILC. ILC grupy 1 obejmują komórki NK i ILC1 inne niż komórki NK [19]. Analiza różnicująca komórki NK i ILC1 nie-NK jest trudna do wykonania ze względu na występowanie wielu wspólnych markerów w oraz na komórkach obu grup [20]. Dotychczas do identyfikacji komórek NK badacze rutynowo używali markerów występujących zarówno na komórkach NK i ILC1 nie-NK (np. NKp46, NK1.1, NKG2D), co nie pozwalało jednoznacznie określić które z tych komórek są zdolne do wytwarzania pamięci immunologicznej na hapteny. Ponadto komórki tej samej grupy różnią się fenotypem w zależności od tkanki, z której są izolowane. Uważa się, że komórki ILC1 nie-NK występują tylko w tkankach (m.in. w wątrobie, jelitach, płucach) natomiast konwencjonalne komórki NK (cNK – conventional NK cell) występują w krążeniu [21]. Niektórzy badacze definiują również komórki ILC1 CD49a<sup>+</sup> jako komórki tkankowe-NK (trNK – tissue resident NK cell) [22].

W 2006 roku O’Leary i wsp. dowiedli, że rolę komórki efektorowej w reakcji CHS mogą również pełnić komórki NK. Reakcja CHS, NK-zależna, podobnie do klasycznej odpowiedzi T-zależnej posiada swoistość antygenową na zastosowany

hapten oraz wykazuje pamięć immunologiczną. W badaniach tych, stwierdzono zniesienie odpowiedzi CHS po ablacji komórek NK u myszy *Rag2<sup>-/-</sup>*, oraz stwierdzono brak reakcji CHS u myszy *Rag1<sup>-/-</sup>Il2rγ<sup>-/-</sup>* nie posiadających limfocytów T, B oraz komórek NK. Ponadto wykazano, że tylko wątrobowe komórki NK są w stanie przenieść reakcję CHS na naiwnych biorców [23, 24]. Z kolei Rouzair i wsp., nie byli w stanie wywołać reakcji CHS po uprzedniej immunizacji myszy DNFB. Wykazali natomiast, że transfer wątrobowych komórek NK przenosi reakcję CHS na naiwnych biorców. Jednak reakcja ta ma inną kinetykę niż reakcja mediowana przez komórki CD8<sup>+</sup>T. Reakcja NK-zależna nie ulega wzmocnieniu w wyniku powtarzającego się kontaktu z haptenem, co sugeruje, że komórki te słabo proliferują. Dodatkowo w miejscu depozycji haptenu brak charakterystycznego dla klasycznej odpowiedzi CHS napływu neutrofilów, monocytów i odwrotnie niż zostało to wykazane przez Paust i wsp. [24] brak napływu hapteno-specyficznych komórek NK [25].

Początkowo wątrobowe komórki NK mediujące odpowiedź CHS na DNFB lub OX scharakteryzowano jako populację NK1.1<sup>+</sup>Ly49C/I<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup> [23, 24]. Eksperyment z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko Thy-1<sup>+</sup>, wykazał, że molekula ta jest konieczna do rozwoju NK-zależnej reakcji CHS. W doświadczeniu z zastosowaniem transferu uczulonych komórek DX5<sup>+</sup> (inaczej CD49b<sup>+</sup>) z wątrób myszy BALB/c lub C57BL/6 do naiwnych biorców, udowodniono, że komórki NK posiadające na swojej powierzchni receptor hamujący Ly49C/I<sup>+</sup> lepiej przenoszą odpowiedź niż populacja Ly49C/I<sup>-</sup>. Kolejne badania wykazały, że niedobór receptorów Ly49 uniemożliwia wywołanie reakcji CHS i, że receptory te biorą bezpośredni udział w rozpoznaniu neoantygeny. Według autorów rozpoznanie neoantygeny może, odbywać się w kontekście MHC klasy I (wiąże Ly49), gdyż myszy pozbawione MHC klasy I oraz zastosowanie peptydu, który prezentowany jest tylko w kontekście MHC klasy II, uniemożliwia wywołanie reakcji CHS [26]. Również zablokowanie (przed wywołaniem reakcji) receptora aktywującego NKG2D i molekuł adhezyjnych CD18, P-selektyna i E-selektyna u myszy *Rag2<sup>-/-</sup>* hamuje odpowiedź CHS, co dowodzi udział tych cząstek w fazie efektorowej reakcji. Autorzy również, sugerują, że miejscem uczulenia komórek NK mogą być LNs, ponieważ zablokowanie L-selektyny (molekuła ta ma kluczowe znaczenie dla „homingu” - osiedlania się

naiwnych komórek T w LNs drenujących skórę, w których komórki T są aktywowane przez DCs prezentujące hapten) przed immunizacją również częściowo hamuje reakcję CHS [23]. Jednak nie stwierdzono aby immunizacja wpływała na ekspresję receptorów Ly49 oraz NKG2D czy mRNA dla któregośkolwiek ze znanych receptorów aktywujących komórki NK [23, 24]. Dalsze badania wskazały, że komórki NK1.1<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>CD11b/CD18<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> izolowane od myszy uczulonych DNFB przenoszą odpowiedź CHS, podczas gdy komórki NK1.1<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>*Itgam*(CD11b/CD18)<sup>-/-</sup> oraz NK1.1<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> nie są do tego zdolne [27]. Udowodniono także istotną rolę receptora CXCR6 w odpowiedzi reakcji CHS NK-zależnej. Ligandem dla tego receptora jest chemokina CXCL16 konstytutywnie występująca na powierzchni śródbłonna sinusoid wątrobowych [28]. Warto zaznaczyć, że komórki NK izolowane z wątroby wykazują znacznie wyższą ekspresję receptora CXCR6 w porównaniu do komórek śledzionowych oraz węzłów chłonnych [24]. Może to tłumaczyć dlaczego komórki NK pamięci izolowane są właśnie z wątroby. Niedobór CXCR6, oraz podanie przeciwciał blokujących ten receptor 24 godz. przed wywołaniem reakcji CHS prowadzi do jej zahamowania. Dodatkowo wykazano, że tylko komórki NK1.1<sup>+</sup> wyizolowane od myszy *CXCR6*<sup>+/-</sup> uczulonych DNFB mają zdolność zabijania komórek B znakowanych DNP-BSA (hapten DNP skoniugowany z albuminą surowicy bydłowej) oraz, że zablokowanie CXCR6 *in vitro* nie wpływa na cytotoksyczność względem komórek B znakowanych antygenem. Wyniki te sugerują, że receptor CXCR6 bierze udział w indukcji odpowiedzi natomiast nie uczestniczy w rozpoznaniu antygeny [24]. W innych badaniach wskazano również na istotny udział aryłowego receptora węglowodorów (AhR - aryl hydrocarbon receptor). U myszy pozbawionych tego receptora stwierdzono niższą liczbę komórek NK1.1<sup>+</sup>CD49a<sup>+</sup>CXCR6<sup>+</sup> rezydujących w wątrobie i brak zdolności do wywołania hapteno-specyficznej odpowiedzi CHS [29].

Badania przeprowadzone w Katedrze Biologii Medycznej UJ CM wykazały, że odpowiedź CHS można przenieść na naiwnych biorców za pośrednictwem wątrobowych komórek NK wyizolowanych godzinę od uczulenia DNFB, oraz że przebieg tej reakcji jest zależny od IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oraz IL-12, natomiast nie zależy od IL-4 oraz IL-13. Jednak warto zaznaczyć, że w badaniach tych nie stwierdzono wzrostu liczby komórek NK produkujących IFN- $\gamma$ , po ich restymulacji DNFB *in vitro*.

Reakcja ta, w przeciwieństwie do klasycznej nadwrażliwości kontaktowej zależnej od limfocytów CD8<sup>+</sup> Tc1 oraz CD4<sup>+</sup> Th1/Th17, przebiega niezależnie od limfocytów B-1 i NKT [27].

Ciekawych informacji dostarczyły inne badania prowadzone z użyciem monobenzonu będącego pro-haptenem, który dopiero pod wpływem tyrozynazy znajdującej się w melanosomach komórek pigmentowych (melanocytów) ulega przekształceniu w hapten. Doświadczenia te wykazały, że do wytworzenia komórek pamięci NK konieczna jest aktywacja inflamasomu NLRP3 z późniejszą produkcją IL-18. W modelu tym komórki efektorowe, infiltrujące skórę stanowiły populację komórek CD49b<sup>+</sup>Ly49C/I<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> [30].

W dalszych badaniach w modelu reakcji CHS indukowanej OX u myszy C57BL/6 scharakteryzowano populację wątrobowych komórek NK pamięci jako komórki CD49a<sup>+</sup>, ale DX5<sup>-</sup>. Ponadto stwierdzono, że komórki te występują tylko w tkankach, w przeciwieństwie do komórek DX5<sup>+</sup> występujących w krążeniu. Komórki NK CD49a<sup>+</sup> (w piśmiennictwie często określane jako ILC1, a nie komórki NK) wykazują aktywność cytotoksyczną i wysoką ekspresję CXCR6 [31]. Ponadto Wang i wsp. udowodnili, że uczulenie OX prowadzi do szybkiej, zależnej od CXCR3, rekrutacji komórek IL-7Rα<sup>+</sup>ILC1 (CD3-NK1.1<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>) do LNs drenujących skórę. Brak pachwinowych LNs (ILNs – inguinal lymph nodes) uniemożliwił wywołanie reakcji CHS, a komórki IL-7Rα<sup>+</sup>ILC1 izolowane z ILNs po 72 godz. od immunizacji były w stanie przenieść reakcję CHS na naiwnych biorców podczas gdy komórki ILC1 wyizolowane z wątroby przenosiły odpowiedź dopiero 96 godz. po uczuleniu. Wykazano, że komórki pochodzące z ILNs następnie selektywnie zasiedlają wątrobę, prawdopodobnie dzięki interakcji CXCR6-CXCL1, gdyż użycie myszy *CXCR6*<sup>-/-</sup> znacząco zahamowało migrację komórek ILC1 do wątroby. Autorzy wskazali również na istotną rolę przekaźnictwa sygnałowego od receptora IL-7Rα w podtrzymaniu pamięci komórek ILC1, gdyż długotrwała blokada tego receptora powodowała zmniejszenie odpowiedzi. Przekaznictwo to jednak nie jest konieczne w fazie efektorowej gdyż zablokowanie receptora IL-7Rα przed wywołaniem reakcji nie wpływa na przebieg reakcji CHS [32].

Podsumowując dotychczasowe badania zgodnie wskazują na istnienie populacji wątrobowych komórek NK/ILC1 zdolnych do wywołania i przenoszenia reakcji CHS hapteno-specyficznej. W oparciu o aktualny stan wiedzy, możemy wyróżnić dwie populacje komórek, jedną charakteryzującą się ekspresją NKp46<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>Ly49C/I<sup>+</sup> oraz drugą NKp46<sup>+</sup>CD49a<sup>+</sup>CXCR6<sup>+</sup>7Rα<sup>+</sup>. Jednak pomimo wielu badań, nadal dokładny mechanizm reakcji i fenotyp umożliwiający jednoznaczne zidentyfikowanie tych komórek nie jest do końca poznany. Zadanie to dodatkowo komplikuje plastyczność komórek ILC tj. zdolność konwersji jednego typu komórek w drugi. Konwersja ta powoduje, że komórki ILC wykazują fenotyp i funkcje komórek, w które uległy przekształceniu. Głównymi regulatorami plastyczności ILC są cytokiny i mikrośrodowisko w jakim się znajdują [33]. Na uwagę zasługuje również fakt, że komórki NK/ILC1 mogą nabywać pamięć immunologiczną przy braku zdefiniowanego antygeny. Krótka ekspozycja, w warunkach *in vitro*, mysich komórek NK/ILC1 na działanie cytokin IL-12, IL-15 i IL-18, prowadzi do powstania komórek NK/ILC1 które wykazują, podwyższoną zdolność do produkcji IFN-γ *in vivo*. Komórki pre-aktywowane po przeniesieniu do naiwnych biorców proliferują, ale nie wydzielają konstytutywnie IFN-γ, natomiast ich restymulacja cytokinami prowadzi do wzrostu produkcji IFN-γ [34, 35]. Wykazano również, że stymulacja komórek NK izolowanych z krwi IL-12 i IL-15 może prowadzić do powstania *in vitro* komórek CXCR6<sup>+</sup>CD49a<sup>+</sup>. Komórki te charakteryzują się podobieństwem fenotypowym i funkcjonalnym do komórek CD49a<sup>+</sup> izolowanych z wątroby, w tym wyższą ekspresją IFN-γ i NKG2C [36].

#### **4 Wpływ otyłości na układ immunologiczny**

Otyłość i związane z nią choroby są obecnie wiodącym światowym problemem zdrowia publicznego. Otyłość na przestrzeni ostatnich 15 lat przyczyniła się do wzrostu wydatków związanych z opieką zdrowotną o ponad 25% [37], a częstość występowania otyłości wzrosła trzykrotnie od 1975 r. Według raportu WHO w 2016 r., 39% populacji osób dorosłych stanowiły osoby z nadwagą (BMI≥25 - 29,9 kg/m<sup>2</sup>), a osoby otyłe (BMI≥30 kg/m<sup>2</sup>) stanowiły ponad 16%, co oznacza, że ponad 1,9 miliarda ludzi na świecie było dotkniętych nadwagą lub otyłością [38]. Według danych z 2016 r. w Polsce 58,3% (51,1% kobiet i 65,6% mężczyzn) ludzi miało nadwagę [39], a 23,1% (22,2% kobiet i 23,7% mężczyzn) cierpiało na

otyłość [40]. W związku z rosnącą epidemią otyłości liczba badań nad wpływem nadmiernej masy ciała i jej następstw zdrowotnych stale rośnie. Liczne badania wykazały związek pomiędzy otyłością a częstością występowania szeregu schorzeń obejmujących m.in. cukrzycę typu drugiego, zespół metaboliczny, choroby układu krążenia, stłuszczenie wątroby i niektóre nowotwory [41].

Biała tkanka tłuszczowa (AT – adipose tissue) stanowi magazyn energii, ale również wykazuje funkcje endokrynne, dzięki czemu utrzymuje homeostazę metaboliczną organizmu. W skład AT, poza adipocytami i pre-adipocytami, wchodzi komórki zrębu w tym komórki układu odpornościowego. Długotrwałe przyjmowanie nadmiernej ilości pożywienia prowadzi do wyczerpania pojemności magazynowej AT i odkładania lipidów w innych narządach [42]. Akumulacja lipidów w komórkach prowadzi do lipotoksyczności. Toksyczne działanie lipidów może objawiać się poprzez wpływ na funkcjonowanie organelli komórkowych (szczególnie mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej) oraz bezpośredni wpływ na przekaźnictwo komórkowe. Ponadto lipotoksyczność wiąże się również z długotrwałym stresem oksydacyjnym i stresem retikulum endoplazmatycznego, co zwiększa podatność na uszkodzenia komórek, a w efekcie prowadzi do ich śmierci. Lipotoksyczność może szczególnie występować w tkankach które zaangażowane są w metabolizm lipidów takich jak mięśnie, AT oraz wątroba [43]. Lipotoksyczność oraz hipoksja, związane z nadmiernym rozrostem AT (hipertrofia i hiperplazja adipocytów) sprzyjają rozwojowi reakcji zapalnej [44]. U osób otyłych stwierdza się obecność przewlekłego stanu zapalnego o niskim nasileniu zwanego „zapaleniem metabolicznym” lub „metazapaleniem”. Stan ten wpływa na równowagę cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz może powodować znaczne zmiany w składzie fenotypowym komórek układu odpornościowego [45]. Uważa się, że obecność zapalenia metabolicznego u otyłych ludzi i zwierząt może predysponować do rozwoju wielu chorób, w tym chorób alergicznych.

Nadmierny rozrost AT prowadzi do śmierci komórek i uwolnienia wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem tkanki (DAMPs – damage-associated molecular patterns), które aktywują receptory rozpoznające wzorce molekularne (PRR – pattern recognition receptors). Wyróżniamy dwie główne grupy PRR, receptory Toll – podobne (TLR – Toll-like receptor) i NOD-podobne [NLR – NOD



(nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptor] [46]. Zaobserwowano, że reakcja stresowa sprzyja lokalnemu wzrostowi liczby i aktywności m.in. makrofagów, mastocytów, neutrofilów, ILC1, limfocytów Th1 CD4<sup>+</sup> i Tc CD8<sup>+</sup>, przy jednoczesnym spadku liczby eozynofiliów, limfocytów Th2, Treg oraz iNKT (inwariant NKT) stanowiących subpopulację limfocytów NKT [47]. Makrofagi AT (ATMs – adipose tissue macrophages) są najliczniejszą grupą komórek układu odpornościowego AT, oraz stanowią główne źródło cytokin prozapalnych (m.in. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Analiza komórek AT otyłych myszy wykazała, że komórki te należą głównie do populacji M1 (klasycznie aktywowane makrofagi), natomiast w przypadku myszy z prawidłową masą ciała są to komórki M2 (alternatywnie aktywowane makrofagi). Funkcjonalnie populacja makrofagów M2 odpowiada za naprawę uszkodzonych tkanek działając przeciwzapalnie wydzielając IL-10, natomiast makrofagi M1 działają prozapalnie i uwalniają TNF- $\alpha$  [48]. Dotychczasowe badania wskazują, że limfocyty T w dużej mierze odpowiadają za regulację równowagi pomiędzy komórkami M2/M1 w trakcie otyłości. Limfocyty T CD8<sup>+</sup> sprzyjają powstawaniu komórek M1 i stanu zapalnego, czemu dodatkowo sprzyja spadek liczby komórek Treg [49, 50].

Liczne badania wykazały, że zarówno u zwierząt doświadczalnych, jak i u osób otyłych występuje wyższe osoczowe stężenie mediatorów zapalenia, w tym białka C-reaktywnego (CRP - C-reactive protein), IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  [51, 52, 53, 54]. Na uwagę zasługuje fakt, że AT produkuje wiele cytokin prozapalnych oraz chemokin, wśród których można wyróżnić m.in. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , oraz białko chemotaktyczne dla monocytów (MCP-1 - monocyte chemoattractant protein-1) [55, 56]. Ekspresja cytokin prozapalnych wzrasta u otyłych myszy jak i u ludzi, podczas gdy produkcja adipokin o aktywności przeciwzapalnej ulega znacznemu obniżeniu [57]. Leptyna jest jedną z najistotniejszych adipokin produkowanych przez AT. Główną funkcją leptyny jest regulacja sytości i wydatkowania energii przez organizm, natomiast coraz częściej podkreśla się jej rolę w regulacji działania układu odpornościowego [58, 59]. Za produkcję leptyny odpowiadają adipocyty, które im są większe tym więcej hormonu wytwarzają, a stężenie leptyny w surowicy jest silnie skorelowane z ogólną zawartością AT w organizmie [60]. Stężenie leptyny ulega nie tylko podwyższeniu w otyłości, ale również stwierdzono wyższy jej poziom u pacjentów z ACD [61].

Zatem jest możliwe, że zrozumienie immunomodulacyjnych funkcji leptyny może pomóc w wyjaśnieniu jej roli w ACD. Leptyna indukuje produkcję IL-6, CXCL-1, IL-18 i MCP-1 oraz wzmacnia ekspresję molekuly adhezyjnej ICAM-1 na fibroblastach skóry [62]. Drugą bardzo istotną adipokina jest adiponektyna. Stężenie adiponektyny negatywnie koreluje z poziomem CRP u otyłych osób [63]. Poza swoim udziałem w regulacji metabolizmu, moduluje również funkcje i fenotyp makrofagów [64]. Hamuje przekształcanie się makrofagów w komórki piankowe oraz hamuje akumulację lipidów wewnątrz makrofagów [65]. Adiponektyna stymuluje także produkcję przeciwzapalnej cytokiny IL-10 przez makrofagi ludzkie [66].

Przewlekły stan zapalny związany z otyłością odgrywa kluczową rolę w rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease), które wraz z nasilającym się stanem zapalnym może prowadzić do niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH - non-alcoholic hepatitis steatosis). Wątroba w 60-80% składa się z hepatocytów, zaś pozostałe komórki to populacja nie-parenchymalnych komórek do których zaliczamy między innymi komórki układu odpornościowego, komórki endotelialne, komórki gwiaździste (inaczej Ito), czy cholangiocyty [67].

DAMP oraz wzorce molekularne związane z drobnoustrojami (MAMPs - microbe-associated molecular patterns) wiązane są przez PRR i indukują lokalną odpowiedź zapalną tworząc tym samym samonapędzającą się spiralę prowadzącą do uszkodzenia wątroby. Reakcja ta jest intensyfikowana przez produkcję cytokin prozapalnych [68]. Receptory TLR są szeroko rozpowszechnione w wątrobie, występują na komórkach Kupffera (KCs – Kupffer cells), komórkach gwiaździstych, cholangiocytach i komórkach sinusoid [69]. KCs odgrywają kluczową rolę w patogenezie i postępie NAFLD/NASH. Usunięcie KCs powoduje znaczne zahamowanie rozwoju stłuszczenia wątroby, co wskazuje że stan zapalny nie jest tylko konsekwencją, ale także czynnikiem koniecznym do akumulacji lipidów [70]. Wzrost liczby KCs stanowi pierwszy etap w rozwoju choroby i poprzedza napływ innych komórek układu odpornościowego [71]. Wolne kwasy tłuszczowe (FFAs – free fatty acids), szczególnie kwas palmitynowy i oleinowy, mogą aktywować TLR2 i TLR4 w KCs, co skutkuje wzrostem ekspresji cytokin prozapalnych [72]. FFAs powodują insulinooporność, ale także wzrost wątrobowej ekspresji cytokin prozapalnych

m.in. TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-6 [73]. KCs wykazują, podobnie jak ATMs, polaryzację w kierunku bardziej prozapalnego fenotypu, przypominającego komórki M1 [74]. Użycie myszy otyłych z niedoborem leptyny (*ob/ob*) wykazało, że podanie adiponektyny łagodzi NAFLD poprzez obniżenie produkcji TNF- $\alpha$  [75]. Adiponektyna promuje polaryzację KCs w kierunku przeciwzapalnych komórek M2. W otyłości obniżony poziom adiponektyny może przyczyniać się do rozwoju stanu zapalnego w wątrobie [76]. W NASH biorą również udział komórki DCs oraz neutrofile. Badania ostatnich lat wykazały istnienie co najmniej dwóch subpopulacji komórek NKT, które mogą pełnić przeciwstawne funkcje w zapaleniu wątroby. Typ I limfocytów NKT stanowią komórki prozapalne, natomiast typ II limfocytów NKT chroni przed uszkodzeniem wątroby [77]. Typ I komórek NKT jest łatwo indukowany przez lipidy w związku z czym może brać udział w rozwoju NAFLD. Badania na myszach wykazały, że zwierzęta pozbawione komórek NKT są bardziej podatne na rozwój stłuszczenia wątroby i znacznie przybierają na masie po zastosowaniu diety wysokotłuszczowej (HFD - high fat diet) [78]. Progresja NASH koreluje również z napływem do wątroby komórek T CD4<sup>+</sup> i T CD8<sup>+</sup>, oraz limfocytów B [79].

Na podstawie przytoczonych badań możemy postulować, że metazapalenie oraz stan zapalny w obrębie wątroby, mogą wpływać na funkcjonowanie komórek NK/ILC1 a tym samym na reakcję CHS mediowaną przez te komórki.

#### **4.1 Wpływ otyłości na komórki NK/ILC1**

Wiele badań na temat wpływu otyłości na komórki NK, dotyczy komórek izolowanych z krwi. Badania te wskazują, że komórki NK osób otyłych są mniej cytotoksyczne w porównaniu do komórek izolowanych od osób z normalną masą ciała [80, 81, 82, 83]. Dodatkowo wykazano, że utrata masy ciała po operacji bariatrycznej powoduje, że cytotoksyczność tych komórek wraca do normy [84]. Również utrata masy ciała wynikająca z zastosowania odpowiedniej diety i ćwiczeń wpływa na wzrost produkcji IFN- $\gamma$  przez komórki NK [85]. Podjęto również próbę scharakteryzowania komórek NK/ILC1 w obrębie tkanki tłuszczowej u ludzi otyłych w porównaniu do osób z prawidłową masą ciała. O'Rourke i wsp. wykazali, że liczba komórek NK w AT podskórnej (scAT – subcutaneous adipose tissue) i wisceralnej (viscAT – visceral adipose tissue) nie zmienia się u osób otyłych, natomiast komórki

izolowane z tkanki viscAT charakteryzują się zwiększoną ekspresją markerów aktywacji [86]. Wykazano także, że komórki izolowane z scAT osób otyłych wykazują niższą ekspresję receptorów aktywujących NKp30 i NKp44, oraz wykazują mniejszą cytotoksyczność względem komórek nowotworowych w porównaniu do osób z prawidłową masą ciała [87].

Jednym z czynników istotnie wpływających na działanie komórek NK jest leptyna. Komórki NK wykazują ekspresję receptora dla leptyny (Ob-R – obesity receptor). Krótkotrwałe podanie leptyny *in vitro* zwiększa produkcję IFN- $\gamma$ , oraz cytotoksyczność komórek NK. Natomiast długotrwałe traktowanie komórek NK leptyną zmniejsza zdolność do proliferacji tych komórek [88]. Prawdopodobnie fakt ten związany jest ze spadkiem wrażliwości komórek NK na działanie leptyny [89]. W badaniach z udziałem ludzi stwierdzono, że w otyłości spada liczba komórek wątrobowych NK/ILC z ekspresją Ob-R [90], natomiast nie stwierdzono różnicy w ekspresji tego receptora na komórkach izolowanych z krwi obwodowej [91]. U myszy *db/db* (brak receptora dla leptyny) wykazano, że do rozwoju i aktywacji komórek DX5<sup>+</sup> konieczne jest przekazywanie sygnałów związane z leptyną [92]. Wykazano również, że adiponektyna hamuje cytotoksyczność komórek NK [93]. W kolejnych badaniach wykazano, że dodanie do hodowli, ludzkich i mysich komórek NK, FFAs powoduje zaburzenie działania tych komórek. Dodatkowo stwierdzono, że większe zaburzenia występują w obrębie komórek które zakumulowały więcej lipidów [83].

W ostatnim czasie wykazano również udział komórek NK/ILC1 w modulacji stanu zapalnego w obrębie tkanki tłuszczowej otyłych ludzi i zwierząt. W przypadku ludzi z prawidłową masą ciała ILC1 stanowią około 5-10% wszystkich limfocytów AT, natomiast u myszy wykazano, że stanowią aż 22-30%, tym samym są najliczniejszą populacją limfocytów [94, 95]. Większość badań z tego zakresu opiera się na identyfikacji komórek NK na podstawie braku ekspresji markera CD3 i obecności NK1.1, ewentualnie NKp46. Dlatego też trudno jednoznacznie określić jaką funkcję w otyłości pełnią komórki NK a jaką ILC1 nie-NK. Dla uproszczenia w tej części posługiwano się określeniem komórki ILC1 w odniesieniu do komórek NK i nie-NK ILC1, jeżeli w przytoczonym badaniu nie ma rozróżnienia na poszczególne populacje. Dotychczasowe badania w modelu zwierzęcym wykazały, że otyłość indukowana

dieta (DIO – diet-induced obesity) zwiększa liczbę komórek głównie w viscAT [95, 96, 97, 98]. Otyłość wpływa na produkcję cytokin przez komórki ILC1 - już 2 tygodnie od zastosowania HFD myszy produkowały więcej INF- $\gamma$  w porównaniu do myszy którym podawano dietę kontrolną (ND - normal diet) [97]. Stan ten utrzymuje się nawet po 12 tygodniach od rozpoczęcia diety i związany jest raczej ze wzrostem liczby komórek, niż ze zwiększoną produkcją poszczególnych komórek [96]. Dodatkowo stwierdzono, że długotrwałe stosowanie HFD zwiększa liczbę komórek ILC1 produkujących TNF- $\alpha$ , a także zwiększa ekspresję tej cytokiny w poszczególnych komórkach. Zaobserwowano także wzrost liczby komórek ILC1 IL-6<sup>+</sup> [96]. Wskazano również, że wzrost liczby komórek ILC1 związany jest ze wzrostem proliferacji komórek w obrębie AT, a także ze zwiększeniem rekrutacji komórek obwodowych [96, 97]. Dożylny transfer komórek NK1.1<sup>+</sup> izolowanych ze śledziony otyłych zwierząt myszy typu dzikiego (WT – wilde type) do otyłych myszy *E4bp*<sup>-/-</sup> (szczep ten charakteryzuje się znacznie obniżoną liczbą komórek ILC1) wykazał, że komórki transferowane zasiedlają AT. Otyłość powoduje wzrost ekspresji czynnika chemotaktycznego *Ccl2* dla makrofagów w komórkach ILC1, natomiast w komórkach ATMs wzrost ekspresji *Ccl3*, *Ccl4* i *Cxcl10* odpowiedzialnych za kumulację komórek NK [96, 94]. Wykazano także wzrost ekspresji *Il15* – cytokiny, która odgrywa istotną rolę w proliferacji, rozwoju i aktywności komórek ILC1 – w ATMs tkanki viscAT [96]. Stwierdzono również, że zwiększony poziom IL-12 w AT u otyłych myszy może aktywować komórki ILC1 co prowadzi do zwiększenia produkcji IFN- $\gamma$  [94]. Następnie wykazano, że otyłość zwiększa ekspresję ligandu dla receptora aktywującego ILC1 – NKp46 – co indukuje produkcję IFN- $\gamma$  przez te komórki. Deplecja komórek NK1.1<sup>+</sup> lub NKp46<sup>+</sup> zmniejsza insulinooporność wywołaną DIO, nie wpływając jednocześnie na stan otyłości [94, 97, 99]. Teurich i wsp. opisali również populację komórek NK1.1<sup>+</sup>IL-6Ra<sup>+</sup>, która wzrasta w AT w otyłości. Deplecja tych komórek powoduje spadek masy ciała i poprawia metabolizm glukozy i insulinowrażliwość [98].

O' Sullivan i wsp. bardziej szczegółowo scharakteryzowali komórki CD3-NK1.1<sup>+</sup> występujące w AT - podzielili je na komórki DX5<sup>+</sup>Eomes<sup>+</sup> (nazwane tu mNK – mature NK), DX5<sup>+</sup>Eomes<sup>-</sup> (nazwane tu iNK – immature NK) oraz DX5<sup>-</sup>Eomes<sup>-</sup> (ILC1). Podział ten opiera się na założeniu, że komórki ILC1 nie wykazują ekspresji

Eomes, jednak w tym momencie już wiemy, że założenie to nie jest do końca prawdziwe [100]. W swoich badaniach wykazali, że nawet krótkotrwałe (< 4 tygodni) zastosowanie HFD powoduje wzrost produkcji IFN- $\gamma$  przez komórki mNK, iNK oraz ILC1. Natomiast największy wzrost występował w obrębie komórek ILC1. Deplecja komórek NK1.1<sup>+</sup> lub IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> u myszy *Rag2*<sup>-/-</sup> karmionych HFD przez 10 tygodni wykazała, istotny spadek prozapalnych makrofagów M1 w viscAT i scAT oraz poprawę tolerancji glukozy [94]. Dalej wykazano również, że komórki ILC1 są zdolne do wybiórczego zabijania komórek M2 w normalnych warunkach, natomiast w otyłości dochodzi do zaburzenia cytotoksyczności co sprzyja konwersji komórek M2 w kierunku M1 [95].

Badania z udziałem pacjentów, u których występuje NASH nie wskazują jednoznacznie czy liczba komórek CD3-CD56<sup>+</sup> ulega zmianie w porównaniu do osób zdrowych [101]. W mysim modelu NASH (brak choliny i metioniny w diecie) wykazano również, że komórki DX5<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> zapobiegają progresji NASH poprzez regulację polaryzacji M1/M2 w wątrobie. Wykazano, że liczba tych komórek rośnie w trakcie choroby, a immunoregulacyjne funkcje komórek DX5<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> zależą od produkcji IFN- $\gamma$  oraz, że deplecja tych komórek prowadzi do zwiększonej śmiertelności komórek wątroby, stanu zapalnego i zwiększonej ekspresji DAMPs [102]. Szczególną rolę w rozwoju NASH może odgrywać prozapalna cytokina IL-15. Cytokina ta bierze udział w regulacji komórek NK, ale także NKT, T $\gamma$  $\delta$  i komórek pamięci T CD8<sup>+</sup>. U myszy *IL-15*<sup>-/-</sup> wykazano zahamowanie akumulacji lipidów i stanu zapalnego w wątrobie [103]. Częściowo udział IL-15 w NASH może być związany z oddziaływaniem z komórkami NK/ILC1. Ponadto wykazano, że komórki NK1.1<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>CD49a<sup>-</sup> izolowane od myszy z NAFLD wykazywały mniejszą zdolność do degranulacji i niższą ekspresję perforyny. Spadek cytotoksyczności tych komórek związany jest z ze zmianą fenotypu komórek na zbliżony do komórek ILC1 (tu NK1.1<sup>+</sup>DX5<sup>-</sup>CD49a<sup>+</sup> CD200R1<sup>+</sup>). Dodatkowo wykazano, że u pacjentów z NAFLD komórki NK (tu CD3-CD56<sup>+</sup>Tbet<sup>hi</sup> Eomes<sup>lo</sup>) również są mniej cytotoksyczne [104].

#### **4.2 Wpływ otyłości na reakcję nadwrażliwości kontaktowej**

W chwili obecnej nie ma badań jednoznacznie określających wpływ otyłości na występowanie ACD u ludzi. Związane to może być z trudnościami diagnostycznymi.

Standardowo stosowane testy płatkowe posiadają ograniczony repertuar alergenów. Dodatkowo mogą występować reakcje krzyżowe między alergenami, oraz pacjent może być uczulony więcej niż jednym alergenem [105]. Dotychczas zbadano wpływ utraty masy ciała na nadwrażliwość typu późnego na toksoid tężcowy, antygeny wirusa nagminnego zapalenia przyusznic i *Candida albicans*. W przebadanej grupie kobiet, stwierdzono, że utrata masy ciała koreluje ze zmniejszaniem skórnej reakcji nadwrażliwości [106]. U pacjentów z ACD zauważono również, istotnie zwiększone stężenie leptyny w surowicy krwi oraz, że stężenie to koreluje z obniżoną liczbą komórek regulatorowych Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [61]. Ponadto wykazano, że otyli pacjenci rozwijają stan zapalny w tkance podskórnej co sprzyja rozwojowi chorób dermatologicznych [107]. Choć oczywiste wydaje się, że stan zapalny towarzyszący otyłości jest istotnym czynnikiem mogącym wpływać na rozwój i przebieg chorób dermatologicznych, w tym na ACD, jednak w chwili obecnej brak jest na to jednoznacznych dowodów. Większość doniesień na temat wpływu otyłości na ACD pochodzi z badań z wykorzystaniem zwierzęcego modelu reakcji CHS.

Pierwsze badania wpływu otyłości na przebieg klasycznej reakcji CHS, przeprowadzone na myszach C57BL/6, wykazały, że zastosowanie HFD przez 4 i 2 tygodnie, hamuje reakcję CHS na haptenu TNP-Cl [108]. Natomiast następane doświadczenia z zastosowaniem HFD przez 10-12 tygodni i DNFB jako haptenu, pokazały, że DIO nasila reakcję CHS. Dodatkowo wykazano, że wynika to z opóźnionego usuwania komórek zapalnych z miejsca depozycji haptenu oraz, że otyłe myszy wykazują znaczne zaburzenia w obrębie układu limfatycznego, w tym m.in. mniejszą gęstość naczyń limfatycznych [109]. Obserwacje te zgodne są z wynikami naszych badań, prowadzonych w Katedrze Biologii Medycznej UJ CM, które wykazały, że karmienie HFD przez 8 tygodni nasila reakcję CHS na TNP-Cl. Komórki wyizolowane ze śledziony (SPL - spleen) oraz węzłów chłonnych krezkowych (MLN - mesenteric lymph nodes) od myszy, u których wywołano otyłość produkują więcej IL-17A oraz IFN- $\gamma$  w porównaniu do myszy otrzymujących ND. Analiza cytometryczna wykazała wzrost odsetka komórek TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> i TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> w MLN oraz komórek TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> w SPL myszy karmionych HFD [110].

## 5 Naturalna mikrobiota jelitowa

Mikrobiota to zbiór mikroorganizmów (bakterii, wirusów, grzybów) zasiedlających dany organizm, natomiast zespół genów kodowanych przez te organizmy nazywamy mikrobiomem [111]. Mikrobiom zawiera ponad 5 milionów genów, tym samym znacznie przewyższa potencjał genetyczny gospodarza [112]. Tak ogromny arsenał genów i ich produktów, zapewnia szeroki zakres aktywności biochemicznych i metabolicznych, uzupełniając w ten sposób procesy zachodzące w organizmie gospodarza. Zdolność metaboliczną mikrobioty jelitowej można porównać do potencjału metabolicznego wątroby, a zatem powinno się traktować ją jak dodatkowy organ [113]. Mikroorganizmy te mają istotny udział w metabolizmie, trawieniu, syntezie witamin oraz ochronie gospodarza przed kolonizacją przez drobnoustroje patogenne. Badania prowadzone w ciągu wielu lat wykazały, że bakterie żyjące w przewodzie pokarmowym mają istotny udział w utrzymaniu homeostazy układu odpornościowego [114].

Jelita człowieka stanowią najbardziej zasiedloną przez mikrobiotę część organizmu. Zasadnicza część jelitowej mikrobioty bakteryjnej należy do czterech głównych typów. *Firmicutes* i *Bacteroidetes* stanowią dominującą większość, natomiast *Actinobacteria* oraz *Proteobacteria* są mniej liczne [115]. Jednak warto zaznaczyć, że mikrobiota nie jest jednakowo rozdystrybuowana wzdłuż przewodu pokarmowego, pod względem jakościowym i ilościowym [114]. Ilość drobnoustrojów zwiększa się od proksymalnej do dystalnej części przewodu pokarmowego (żołądek zawiera  $10^1$ , dwunastnica –  $10^2$ , jelito czcze  $-10^4$ , jelito kręte –  $10^7$ , a okrężnica –  $10^{12}$  drobnoustrojów/gram zawartości) oraz wzdłuż osi tkanka – światło (z niewielką liczbą bakterii przylegających do tkanki lub śluzu, ale z dużą liczbą w świetle przewodu) [116]. Kolonizacja gospodarza rozpoczyna się w trakcie narodzin jednak istnieją doniesienia wskazujące, że proces ten może rozpoczynać się już w okresie prenatalnym [117] i podlega zmianom wraz rozwojem gospodarza. Około 2-3 roku życia profil mikrobioty jelitowej ulega względnej stabilizacji i utrzymuje się w tej postaci przez dorosłe życie [116]. Profil ten ulega również modyfikacji u osób starszych (w wieku > 65 lat), u których odnotowano szereg zmian w składzie mikrobioty jelitowej [118]. Ponadto wyjątkami od tej normy są zmiany składu mikrobioty związane z chorobą zapalną jelit [119], zespołem jelita drażliwego [120],



otyłością [121, 122], cukrzycą typu 2 [123], radykalną zmianą diety oraz stosowaniem antybiotyków [124]. Zmianom tym często towarzyszy ogólne zmniejszenie różnorodności mikrobiologicznej przewodu pokarmowego [125].

### **5.1 Wpływ naturalnej mikrobioty jelitowej na układ immunologiczny**

Jelita odpowiadają za dwa potencjalnie przeciwstawne zadania, mają zapewnić absorpcję składników odżywczych, przy jednoczesnym blokowaniu translokacji mikroorganizmów przez ścianę jelit do wnętrza organizmu. W tym celu powstało kilka mechanizmów obronnych, takich jak wydzielane do światła jelita przeciwciała IgA oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs – antimicrobial peptids) jak również bariera fizyczna w postaci ścisłych połączeń między komórkami nabłonka jelit (IECs – intestinal epithelial cells). Dodatkowo IECs oddzielone są od mikrobioty cienkim (kilka do kilkaset mikrometrów) pasmem śluzu, składającego się głównie z mucyn [126]. Tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego (GALT - gut-associated lymphoid tissue) musi przy braku reakcji na mikroorganizmy komensalne, utrzymywać stały skład korzystnej mikrobioty, przez hamowanie przerostu mikroorganizmów w tym drobnoustrojów patogennych. Jak również musi wytwarzać odpowiedź immunologiczną na bakterie, którym uda się przełamać barierę ochronną jelit. Oddziaływanie pomiędzy gospodarzem i mikrobiotą nie jest jednak jednokierunkowe. Mikroorganizmy odgrywają istotną rolę w rozwoju i regulacji układu immunologicznego gospodarza.

Śluz wytwarzany przez komórki kubkowe, składa się z dwóch warstw - wewnętrznej i zewnętrznej. Głównie warstwa zewnętrzna zasiedlana jest przez nieliczne bakterie, które wytworzyły molekuly adhezyjne zdolne do wiązania się do cząsteczek śluzu [127]. Badania z wykorzystaniem szczurów aksenicznych – pozbawionych mikrobioty jelitowej (GF – germ free), wykazały, że zwierzęta te w porównaniu do hodowanych konwencjonalnie mają mniej komórek kubkowych, cieńszą warstwę śluzu i zmieniony skład mucyn w jelicie grubym [128]. W kolejnych doświadczeniach, stwierdzono również, że stymulacja produktami bakteryjnymi, takimi jak lipopolisacharyd (LPS - lipopolisaccharides) czy peptydoglikan (PGN - peptidoglycan), jest wystarczająca aby grubość warstwy śluzu wróciła do normy obserwowanej u zwierząt hodowanych w warunkach konwencjonalnych [129].

Poporodowa kolonizacja drobnoustrojów wpływa także na rozwój obwodowych tkanek limfoidalnych, w tym na ich wielkość i tworzenie centrów rozrodczych [130]. Dlatego też u myszy GF wykazano niedorozwój kępek Peyer'a (PP – Peyer's patches), MLN oraz białej miazgi SPL. Brak centrów rozrodczych przyczynia się do zmniejszenia liczby komórek produkujących lokalnie IgA oraz systemowego niedoboru przeciwciał [131]. Obserwuje się także zaburzenie rozwoju samotnych grudek limfatycznych (ILF – isolated lymphoid follicles), a ich tworzenie można indukować poprzez eksponowanie myszy GF na PGN [132].

Rozpoznawanie mikrobioty odbywa się z udziałem dwóch głównych grup PRR, TLR i NLR [133]. Receptory te rozpoznają MAMPs, m.in. LPS, PGN, flagelinę, polisacharydy grzybicze (np.  $\beta$  – glukan) oraz kwasy nukleinowe wirusów [134]. Interesujący jest fakt, że aktywacja receptorów TLR lub przekąźnictwa NOD2 może indukować wydzielanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych [135]. Przykładowo, Gram (-) bakteria *Bacteroides thetaiotaomicron*, indukuje wytwarzanie peptydu RegIII $\gamma$  (lektyna przeciwbakteryjna produkowana przez komórki Panetha), który działa głównie przeciwko bakteriom Gram (+) [136]. Z ewolucyjnego punktu widzenia, najlepsze dla przetrwania gospodarza i naturalnej mikrobioty jelitowej, jest utrzymanie homeostazy, bez indukcji stanu zapalnego. Zarówno aktywacja jak i hamowanie przekąźnictwa receptorów PRR bierze udział w tym procesie. Dowodem na istotną rolę tych receptorów w utrzymaniu homeostazy pomiędzy gospodarzem a naturalną mikrobiotą jelitową, są badania z wykorzystaniem myszy knock-out dla określonych PRR. W doświadczeniach z użyciem myszy *MyD88*<sup>-/-</sup>, *TLR2*<sup>-/-</sup>, *TLR4*<sup>-/-</sup>, *TLR5*<sup>-/-</sup>, *TLR9*<sup>-/-</sup>, *NOD1*<sup>-/-</sup>, *NOD2*<sup>-/-</sup> wykazano, że zwierzęta te są bardziej podatne na zapalenie jelita grubego wywołane przez siarczan sodowy dekstranu, a niektóre z nich podatne są również na spontaniczne występowanie zapalenia jelit. Dodatkowo wykazano, że myszy z niedoborami receptorów PRR wykazują zmieniony skład mikrobioty jelitowej w stosunku do myszy WT [137, 138]. W przypadku myszy *NOD2*<sup>-/-</sup> oraz *NLRP6*<sup>-/-</sup> stwierdzono, również, że transfer zmienionej mikrobioty powoduje u biorców przeniesienie podatności na rozwój zapalenia jelit [139, 140]. Przytoczone dane wskazują na istotną rolę przekąźnictwa sygnałowego receptorów PRR w utrzymaniu homeostazy gospodarz-naturalna mikrobiota jelitowa.

Mikrobiota jelitowa, m.in. dzięki aktywacji receptorów PRR, może modulować różnicowanie i funkcjonowanie różnych populacji komórek układu odpornościowego. Zaobserwowano, że myszy GF oraz myszy poddane terapii antybiotykowej wykazują spadek produkcji IL-7 przez IECs co zaburza prawidłowe funkcjonowanie komórek ILC2 oraz ILC3. Ponadto wykazano, że do produkcji IL-7 konieczny jest także IFN- $\gamma$ , wydzielany przez komórki T pod wpływem mikrobioty jelitowej [141]. Zależna od mikrobioty i IFN- $\gamma$  produkcja IL-7 jest konieczna do ekspresji czynnika transkrypcyjnego ROR $\gamma$ t przez komórki ILC3 [142]. Zaobserwowano, że myszy GF oraz noworodki myszy kontrolnych są praktycznie pozbawione komórek Th17 w blaszce właściwej śluzówki jelit (LP – lamina propia). Kolonizacja jelita pojedynczą bakterią SFB (segmented filamentous bacteria) jest wystarczająca do rozwoju komórek CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Th17, produkujących IL-17A/IL-17F, IL-21 oraz IL-22 [143]. Poza bakteriami SFB, wykazano również, kilka innych zewnątrzkomórkowych patogenów, m.in. *Candida albicans* i *Citrobacter rodentium*, stymulujących powstanie komórek Th17. Komórki Th17 indukują rekrutację neutrofilów i aktywację IECs, co prowadzi do zwiększonego usuwania patogenów zewnątrzkomórkowych (takich jak *Salmonella Typhimurium* oraz nicien *Nippostrongylus brasiliensis*). W procesie tym biorą udział również inne komórkami układu odpornościowego, takie jak komórki ILC3 i plazmatyczne wydzielające sIgA [144, 145, 146]. W przeciwieństwie do komórek Th17 i komórek IgA<sup>+</sup>, powstawanie ILC3 IL-22<sup>+</sup> może być stymulowane przez bakterie nieprzylegające do IECs. Dlatego komórki Th17 i IgA<sup>+</sup> kontrolują drobnoustroje przylegające do IECs, podczas gdy ILC3 IL-22<sup>+</sup> mogą odgrywać bardziej ogólną rolę w regulacji mikrobioty jelitowej, gdyż zdecydowana większość mikroorganizmów jest fizycznie oddzielona warstwą śluzu od IECs [146].

Drobnoustroje komensalne mogą również wywoływać odpowiedź tolerogenną poprzez obniżenie produkcji cytokin prozapalnych (IL-8, IL-12, IL-23) oraz zwiększenie syntezy IL-10, cytokiny przeciwzapalnej produkowanej m.in. przez komórki Treg. W procesie różnicowania się limfocytów T naiwnych w komórki Treg kluczową rolę odgrywają DC prezentujące antygeny bakteryjne. Bakterie komensalne również zmniejszają migrację fagocytów, które przenoszą antygeny drobnoustrojów do lokalnych tkanek limfatycznych gdzie promują aktywację komórek B i T [147]. W indukcji komórek tolerogenach szczególną rolę przypisuje się bakteriom z gatunku

*Clostridium*. Wykazano, że kolonizacja myszy GF tymi bakteriami prowadzi do znacznej akumulacji indukowalnych komórek Treg w obrębie LP jelita grubego, podczas gdy podanie bakterii *Bacteroides* spp., *Lactobacillus*, czy SFB słabo lub w ogóle nie indukuje komórek Treg. Atarashi i wsp. zidentyfikowali 46 szczepów bakterii *Clostridium*, należących do klasteru IV (grupa *Clostridium leptum*) i XIVa (grupa *Clostridium Coccoides*), zdolnych do indukcji komórek Treg [148].

Jedno z pierwszych doniesień wskazujących na wpływ mikrobioty na funkcjonowanie komórek NK wykazało, że kolonizacja myszy GF przez bakterie powoduje wzrost cytotoksyczności tych komórek [149]. Potwierdzono to w nowszych badaniach, w których stwierdzono, że brak bakterii komensalnych zarówno u myszy GF oraz myszy traktowanych antybiotykiem powoduje obniżenie cytotoksyczności oraz produkcji IFN- $\gamma$  przez śledzionowe komórki NK. Nie stwierdzono natomiast, aby mikrobiota była konieczna w rozwoju komórek NK oraz aby wpływała na ekspresję molekuł Ly49, NKp46, NKG2D, CD122 i CD49b [150]. Wykazano, że osłabione funkcjonowanie komórek NK związane jest z obniżeniem produkcji IFN typu I przez komórki DCs i makrofagi [150]. Następnie wykazano, że bakterie komensalne aktywują molekuły NOD na komórkach niehematopoetycznych, co promuje produkcję IL-15 przez komórki mieloidalne. Z kolei IL-15 indukuje końcowe różnicowanie się komórek NK, powodując obniżenie się puli niedojrzałych KLRG1<sup>-</sup> (killer cell lectin-like receptor G1) będących progenitorami komórek pamięci przeciwwirusowej [151]. Również nasze własne badania, wykazały, że podanie antybiotyku myszom *Rag1*<sup>-/-</sup> przez 2 tygodnie powoduje osłabienie NK-zależnej reakcji CHS [dane nie opublikowane]. Badania prowadzone nad wpływem doustnego podawania bakterii probiotycznych wykazały, że jeden ze szczepów bakterii kwasu mlekowego (*Lactobacillus pentosus* szczep S-PT84) silnie indukuje produkcję IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 oraz zwiększa cytotoksyczność komórek NK, a także zmniejsza produkcję przeciwciał IgE w zwierzęcym modelu alergii indukowanej owalbuminą (OVA - ovalbumin) [152].

Warto zaznaczyć, że mikroorganizmy produkują szeroki wachlarz metabolitów pośród, których znajdują się foliany, indole, drugorzędowe kwasy żółciowe, N-tlenek trimetyloaminy (TMAO - trimethylamine N-oxide), neuroprzekaźniki (np. serotonina, kwas gammaamino-masłowy), histamina oraz

krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA – short chain fatty acids). Liczne badania wskazują, że metabolity te mogą istotnie wpływać na funkcjonowanie układu odpornościowego [153]. Przykładowo SCFA, do których zaliczamy m.in. kwas masłowy, propionowy i octowy, wykazują działanie modulujące m.in. na komórki IECs, DCs, T, ILC. SCFA stanowią źródło energii dla IECs (szczególnie kwas masłowy), ale działają również jako czynniki hamujące proliferację komórek macierzystych [154]. Ponadto SCFA wzmacniają działanie bariery jelitowej poprzez indukcję różnicowania się komórek kubkowych, wzrost transkrypcji genów dla mucyn oraz wzmocnienie połączeń ścisłych między komórkami [155, 156]. Poprzez aktywację inflamasomu indukują wydzielanie IL-18 przez komórki IECs [157]. Wykazano, że SCFA hamują ekspresję niektórych prozapalnych cytokin m.in. TNF- $\alpha$ , IL-6 i IFN- $\gamma$  oraz wzmacniają wydzielanie IL-10 przez DCs [158, 159, 160]. Wykazano również, że wpływają na odpowiedź nabytą, głównie za pośrednictwem DCs. Kwas propionowy i masłowy wzmagają polaryzację naiwnych komórek T CD4<sup>+</sup> w kierunku Treg, zmniejszając tym samym liczbę komórek Th1 i Th17 [161]. Promują także śluzówkową produkcję IgA przez komórki B [162]. Warto zaznaczyć, że działanie SCFA nie ogranicza się tylko do śluzówki, ale może mieć wpływ na działanie całego organizmu [163].

Jak widać na podstawie przytoczonych przykładów interakcja mikrobiota-organizm gospodarza, wpływa na wiele komponent układu odpornościowego. Prawidłowe utrzymanie działania tej interakcji jest konieczne do utrzymania homeostazy organizmu. Wszelkie zaburzenia w obrębie mikrobioty jelitowej lub układu odpornościowego mogą wpłynąć na zachwianie tej równowagi i w konsekwencji mogą prowadzić do rozwoju różnych schorzeń.

## **5.2 Mikrobiota jelitowa w otyłości**

Otyłość uwarunkowana niewłaściwą dietą wywiera negatywny wpływ na mikrobiotę bakteryjną przewodu pokarmowego oraz powoduje wzrost przepuszczalności jelit. Zaburzenie w składzie mikrobioty nazywamy dysbiozą. Zmiany te mogą wpływać na funkcjonowanie układu immunologicznego i promować rozwój stanu zapalnego o niskim nasileniu, który towarzyszy otyłości. Mikrobiota jelitowa jest niezbędna do rozwoju otyłości, ponieważ zwierzęta GF są odporne na

DIO, co wskazuje, że sama wysokokaloryczna żywność nie jest wystarczająca do wywołania otyłości i insulinooporności. Natomiast transfer mikrobioty od myszy otyłych do myszy GF powoduje znaczny wzrost masy ciała [164].

Porównanie dominujących typów bakterii w jelitach u osobników otyłych i szczupłych nie dają jednoznacznej odpowiedzi co do różnic w składzie mikrobioty. Istnieją doniesienia z wykorzystaniem mysich modeli [165] i przeprowadzone udziałem ludzi [166, 167], wskazujące na znaczny wzrost stosunku *Bacteroidetes:Firmicutes* w otyłości, jednak inni autorzy nie zaobserwowali zmian w obrębie jakiegokolwiek typu bakterii [168, 169, 170, 171]. Badania przeprowadzone na myszach *ob/ob* wykazały, że zwierzęta te mają niższy odsetek bakterii *Bacteroidetes* przy jednoczesnym wzroście bakterii *Firmicutes* w porównaniu do myszy WT [167]. Dalsze badania potwierdziły podobne zmiany w obrębie proporcji *Bacteroidetes:Firmicutes*, w bardziej fizjologicznym modelu, przy użyciu myszy z DIO [164]. Zmiany w składzie mikrobioty zaobserwowano także u ludzi. U otyłych osób stwierdzono spadek *Bacteroidetes* [172, 173] oraz wzrost *Actinobacteria* [166] i *Prevotella* [172]. Co ciekawe, zmiany mikrobioty jelitowej na poziomie typów bakterii nie zawsze korelują ze zmianami na niższych (bardziej zdefiniowanych) poziomach taksonomicznych (np. rodzaj, gatunek). Przykładowo spadek *Bacteroidetes* nie oznacza, że nie może wzrosnąć rodzaj *Bacteroides*. Bakterie z tego rodzaju odpowiadają, za degradację polisacharydów roślinnych i wykazano, że u osób otyłych wspomnianych bakterii jest więcej [174]. W obrębie innych bakterii, *Ruminococcus* spp. (należące do *Firmicutes*) czy *Bifidobacterium*, odpowiedzialnych za degradację polisacharydów również stwierdzono spadek ich ilości u osób otyłych [174, 175]. Zaobserwowano również, że u otyłych osób zawartość *Akermansia muciniphila* koreluje z lepszym profilem metabolicznym i jest odwrotnie proporcjonalna do ilości tkanki tłuszczowej [176]. U niektórych osób otyłych zaobserwowano także większą ilość rodzaju *Lactobacillus* [175, 173]. Dalej wykazano, że niektóre gatunki *Lactobacillus* takie jak *L. plantarum* i *L. paracasei* występują w większej liczbie u osób szczupłych, natomiast *L. reuteri* więcej jest u osób z prawidłową wagą [175]. Różnice w doniesieniach literaturowych mogą wynikać z rodzaju próbek, użytej metody, a w szczególności od rodzaju metody indukcji otyłości w modelach zwierzących czy diety w przypadku badań u ludzi.

W badaniach z wykorzystaniem modeli zwierzęcych często używa się HFD, ale także dietę wysokowęglowodanową lub „zachodnią” (bogatą w tłuszcze i węglowodany). Sama proporcja składników białko: tłuszcz: węglowodany nie jest wystarczającym czynnikiem różnicującym, gdyż duże znaczenie ma pochodzenie i skład biochemiczny użytej diety np. czy użyto tłuszczu roślinnego czy zwierzęcego.

Jedną z istotnych konsekwencji dysbiozy jest wzrost przepuszczalności ściany jelita, co powoduje wzrost przenikania do organizmu składników bakterii oraz ich produktów. Wzrost przepuszczalności jelit może być związany ze spadkiem ekspresji białek tworzących połączenia ścisłe między IECs. Mechanizm ten nie jest do końca poznany, ale na pewno istotną rolę odgrywają tu bakterie, gdyż podanie antybiotyku hamuje wzrost przepuszczalności jelit wynikający z zastosowania diety HFD [177]. Również istotna jest interakcja składników pokarmowych i bakterii, gdyż SCFA, pochodzące głównie z fermentacji błonnika pokarmowego, hamują proces zapalny w jelitach i wzmacniają barierę jelit [178].

Modyfikacja składu mikrobioty może powodować zmianę przekaźnictwa sygnałów pomiędzy mikrobiotą a gospodarzem poprzez zmianę składu oraz ilości molekuł i antygenów pochodzenia bakteryjnego oddziałujących m.in na receptory PRR, oraz zmianę składu i ilości metabolitów pochodzenia bakteryjnego, które przedostają się do wątroby i krążenia. Cani i wsp. wykazali, że LPS podawany przez 4 tygodnie dożylnie myszom GF wywołuje taki sam poziom metabolicznej endotoksemii jak stosowanie HFD. Dodatkowo u myszy *TLR4<sup>-/-</sup>* (receptor dla LPS) nie wykazano takiego działania LPS [179]. LPS ma kluczowe znaczenie w rozwoju metazapalenia, gdyż stymuluje wzrost uwalniania czynników prozapalnych np. TNF- $\alpha$  oraz stres oksydacyjny w *viscAT* poprzez receptor CD14 [180]. Myszy z niedoborem TLR5 (receptor dla flageliny) wykazują hiperfagię i wykazują objawy zespołu metabolicznego. Transfer mikrobioty od myszy TLR5 przenosi objawy na myszy WT [181]. W badaniach na myszach wykazano, że podanie SCFA hamuje powstanie DIO, przy czym zauważano, że lepiej działają kwas masłowy i propionowy niż kwas octowy [182]. SCFA poprzez receptor GPR41, stymulują ekspresję leptyny *in vitro* w adipocytach mysich. Podanie doustne SCFA powoduje wzrost poziomu leptyny w krążeniu [183]. U otyłych zwierząt ilość SCFA w jelitach rośnie. Szczególnie wzrost obserwuje się w ilości kwasu octowego i masłowego oraz w ekspresji genów bakterii

odpowiedzialnych za metabolizm polisacharydów [184]. Podobne obserwacje poczyniono u ludzi, gdzie wykazano, że u osób otyłych występuje więcej bakterii zdolnych do fermentacji węglowodanów a tym samym do wzrostu syntezy SCFA, co stanowi dodatkowe źródło energii, magazynowane w AT i wątrobie [185]. SCFA mogą również zwiększać akumulację lipidów w adipocytach [185]. Jak widać pomimo licznych doniesień o działaniu przeciwzapalnym, SCFA u otyłych osobników mogą negatywnie wpływać na masę ciała, tym samym sprzyjać podtrzymaniu stanu metazapalenia.

### 5.3 Oś jelitowo – wątrobowa

W 1980 wykazano, że u pacjentów po wykonaniu zespolenia jelitowego dochodziło do rozwoju NASH i przerostu bakterii w obrębie jelita cienkiego, które można było wyleczyć przez podanie antybiotyku (metronidazolu) [186]. Obserwacja ta wskazała na udział mikrobioty jelitowej w rozwoju NASH. Dzisiaj już wiadomo, że dysbioza może brać udział w patomechanizmie wielu chorób wątroby m.in. NAFLD, alkoholowej chorobie wątroby oraz marskości [187]. Dysbioza oraz/i zmiany w przepuszczalności jelit przyczyniają się do przedostawania się drobnoustrojów oraz ich metabolitów do krążenia wrotnego a następnie do wątroby. Wątroba stanowi organ najbardziej narażony na substancje toksyczne pochodzące z jelit co wynika z jej anatomicznego położenia. 70% krwi docierającej do wątroby pochodzi z krążenia wrotnego, dlatego organ ten stanowi pierwszą linię obrony przed antygenami pochodzącymi z jelit. Badania mikrobioty jelitowej u osób z NASH wykazały wzrost ilości bakterii *Bacteroides* i *Ruminococcus* oraz spadek bakterii *Prevotella* [188]. Dokładniejsza analiza wykazała, że pacjenci z NAFLD, z zaawansowanym włóknieniem wątroby, wykazują wzrost obecności *Escherichia coli* i *Bacteroides vulgatus* [189].

Wraz z krążeniem wrotnym do wątroby przedostają się także MAMPs i mogą modulować działanie komórek układu immunologicznego w wątrobie. Przykładowo  $\beta$ -glukan oraz LPS aktywują komórki KCs do produkcji TNF- $\alpha$  [190]. LPS działa jak hepatotoksyna powodując morfologiczne i funkcjonalne zmiany w wątrobie. W wyniku działania LPS dochodzi do akumulacji granulocytów indukujących stan zapalny, uwalniających reaktywne formy tlenu, proteazy i inne enzymy, co prowadzi



do uszkodzenia wątroby [191]. W literaturze istnieją również doniesienia na temat aktywacji wątrobowych limfocytów iNKT oraz komórek NK przez MAMPS [192, 193]. Użycie myszy z niedoborem receptora TLR4 wykazało, że wystąpienie indukowanej fruktozą NAFLD związane jest z przerostem mikrobioty jelitowej i wzrostem przepuszczalności jelit, czego konsekwencją jest aktywacja komórek KCs zależna od LPS [194]. Wykorzystanie myszy z niedoborem komponentów dwóch inflamasomów NLRP6 i NLRP3, wykazało, że biorą one udział w kształtowaniu się składu mikrobioty jelitowej. U myszy tych wykazano m.in. wzrost ilości *Bacteroidetes* i redukcję bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [195]. Zmiana ta powoduje zaostrzenie stłuszczenia wątroby i stanu zapalnego poprzez przedostanie się do krążenia wrotnego ligandów receptorów TLR4 i TLR9. Następnie aktywacja tych receptorów prowadzi do wzrostu ekspresji TNF- $\alpha$  w wątrobie, który przyczynia się do progresji NASH. Wykazano również, że ko-hodowla myszy z niedoborem inflamasomu i myszy WT powoduje rozwój stłuszczenia wątroby, nietolerancję glukozy i otyłość u myszy WT [196].

Cholina stanowi istotny składnik wpływający na funkcje wątroby, rozwój mózgu i funkcjonowanie nerwów, ruch mięśni oraz utrzymanie prawidłowego metabolizmu [197]. W organizmie cholina jest przetwarzana na fosfatydylocholinę (lecytynę), która pomaga w transporcie cząstek lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL - very low density lipoprotein) z wątroby. Zapobiega to gromadzeniu się w wątrobie triglicerydów a tym samym stłuszczeniu wątroby. Dodatkowo cholina może być przekształcona w trimetyloaminę (TMA - trimethylamine) przez bakterie jelitowe. TMA może przemieszczać się do wątroby poprzez krążenie wrotne, gdzie jest przekształcany w TMAO. Wzrostowi TMAO w krążeniu towarzyszy spadek produkcji przez organizm fosfatydylocholiny. W efekcie może się to przyczyniać do wzrostu akumulacji triglicerydów w wątrobie [198] i dalej do rozwoju NAFLD [199]. Wykazano, że pacjenci z NAFLD [199] i osoby otyłe [200] wykazują wyższy poziom TMAO w krążeniu. U pacjentów z NAFLD wykazano także spadek produkcji fosfatydylocholiny [201]. Wzrost produkcji TMAO koreluje ze wzrostem w jelitach bakterii *Firmicutes* i *Proteobacteria* oraz spadkiem *Bacteroidetes* [202]. Jak dotąd nie zbadano dokładnego wpływu SCFA na rozwój NAFLD, jednak wiadomo, że SCFA regulują syntezę cholesterolu w wątrobie wpływając tym samym na syntezę kwasów żółciowych [203]. Mikrobiota jelitowa natomiast odpowiada, za produkcję wtórnych

kwasów żółciowych. Pacjenci z NFALD wykazują podwyższony poziom kwasów żółciowych w wątrobie, krążeniu oraz moczu. Szczególnie podwyższeniu wznoszą hydrofobowe i bardziej cytotoksyczne kwasy żółciowe [204, 205]. W mysim modelu DIO wykazano, że zarówno mikrobiota jak i sygnały z receptora FXR, dla którego agonistami są kwasy żółciowe, są konieczne do indukcji otyłości [206, 207].

Obserwowane zmiany w funkcjonowaniu komórek układu odpornościowego wątroby indukowane przez produkty zmodyfikowanej diety mikrobioty potencjalnie mogą wpływać na lokalną oraz obwodową odpowiedź immunologiczną.

#### **5.4 Mikrobiota jelitowa w nadwrażliwości kontaktowej**

Wpływ mikrobioty jelitowej na ACD i CHS jest słabo zbadany. Dotychczasowe badania kliniczne przeprowadzone na osobach z ACD uczulonych na nikiel wykazały, że doustne podanie bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* (Danone patent EP 1 838 158 B1), zmniejszyło objawy choroby u tych pacjentów. Jednak mechanizm tego działania pozostaje jak dotąd nie wyjaśniony. W badaniach na myszach w modelu reakcji CHS indukowanym DNFB wykazano, że podanie doustne bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* DN-114 001 zaburza różnicowanie komórek T CD8<sup>+</sup> w komórki efektorowe i zmniejsza ich rekrutację do miejsca depozycji haptenu. Dodatkowo powoduje rekrutację komórek Treg do skóry oraz LN drenujących skórę, zmniejszając tym samym stan zapalny [208, 209]. W kolejnych badaniach wykazano również, że prebiotyki także mogą wpływać na przebieg CHS. Podawanie myszom fruktooligosacharydów (FOS - fructo-oligosaccharide), które zwiększają liczbę bakterii *Bifidobacterium pseudolongum*, powoduje obniżenie reakcji CHS na DNFB u myszy NC/Nga [210]. Dotychczas nie ustalono dokładnego mechanizmu działania mikrobioty na reakcję CHS, jednak w badaniach z wykorzystaniem myszy *MAVS* (Mitochondrial antiviral-signaling protein)<sup>-/-</sup> wykazano, że bierze w tym udział przekaźnictwo związane z mitochondrialnym białkiem MAVS biorącym udział w rozpoznawaniu wirusowego RNA. Autorzy wykazali, że niedobór tego białka prowadzi do zmian w składzie naturalnej mikrobioty jelitowej, która powoduje zaostrzenie reakcji CHS na DNFB. Reakcję tę hamuje antybiotykoterapia, natomiast zaostrzenie reakcji CHS można przenieść poprzez transfer mikrobioty z myszy *MAVS*<sup>-/-</sup> na myszy WT [211]. Badania

prorowadzone w Katedrze Biologii Medycznej UJ CM, wykazały, że traktowanie myszy antybiotykiem o szerokim spektrum działania hamuje reakcję CHS na TNP-CI. Zahamowaniu temu towarzyszy zmniejszona produkcją TNP-swoistych przeciwciał IgG1 oraz wzrost odsetka komórek regulacyjnych  $TCR\alpha\beta^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Treg,  $CD19^+B220^+CD5^+IL-10^+$ ,  $IL-10^+$  Tr1 i  $IL-10^+$   $TCR\gamma\delta$ . Dodatkowo antybiotykoterapia modyfikuje skład naturalnej mikrobioty jelitowej, w wyniku czego zwiększa się proporcja bakterii *Clostridium* klaster XIVa, *Bacteroidetes* i *Bifidobacterium* spp, natomiast spada proporcja bakterii SFB. Transfer mikrobioty bakteryjnej od myszy pojonych antybiotykiem hamuje reakcję CHS u biorców [212]. Dodatkowo badania wykazały, że dysbioza indukowana aplikacją antybiotyku, kreuje środowisko przeciwzapalne w jelicie oraz na obwodzie czemu towarzyszy zwiększona produkcja cytokin przeciwzapalnych IL-10 i TGF- $\beta$ . Zwiększona synteza tych cytokin, koreluje z wyższą liczbą komórek dendrytycznych o charakterze tolerogennym, które odgrywają kluczową rolę w indukcji komórek regulatorowych [213].

Przytoczone powyżej badania jednoznacznie sugerują istotny wpływ naturalnej mikrobioty na przebieg reakcji CHS.

W chwili obecnej brak jest jakichkolwiek informacji na temat wpływu diety wysokotłuszczowej oraz mikrobioty jelitowej na przebieg reakcji CHS mediowanej przez wątrobowe komórki NK, dlatego celowe wydaje się podjęcie badań w tym kierunku.

## Cel pracy i problemy badawcze

---

Celem pracy jest zbadanie wpływu otyłości indukowanej dietą na mechanizmy immunologiczne leżące u podstaw reakcji nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez wątrobowe komórki NK.

W związku z tym w niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy dieta wysokotłuszczowa wpływa na profil metaboliczny u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>?
2. Czy dieta wysokotłuszczowa wpływa na profil cytokinowy komórek tkanki tłuszczowej u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>?
3. Czy otyłość indukowana dietą wpływa na reakcję nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez wątrobowe komórki NK u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>?
4. Czy otyłość indukowana dietą wpływa na profil cytokinowy i fenotyp komórek wątrobowych biorących udział w reakcji nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez komórki NK u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>?
5. Czy otyłość indukowana dietą wpływa na aktywność komórek wątrobowych biorących udział w reakcji nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez komórki NK u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>?
6. Czy dieta wysokotłuszczowa wpływa na skład mikrobioty jelitowej myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>?
7. Czy dieta wysokotłuszczowa wpływa na lokalne mechanizmy obronne związane z błonami śluzowymi u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>?

## Materiały i metody

---

### 1 Zwierzęta laboratoryjne

W badaniach użyto myszy, szczepu *Rag1<sup>tm1Mom</sup>* (*Rag1<sup>-/-</sup>*), 8-12 tygodniowe samce hodowane i utrzymywane w zwierzętarni Katedry Biologii Medycznej UJ CM. Myszy genetycznie zmodyfikowane *Rag1<sup>-/-</sup>* nie posiadają dojrzałych komórek B oraz T na skutek braku enzymu odpowiedzialnego za rearanżację genów V(D)J immunoglobulin oraz receptorów antygenowych limfocytów T (TCR), co sprawia że niniejszy szczep jest idealny do badań reakcji CHS z udziałem komórek NK. Doświadczenia zostały przeprowadzone w oparciu o uchwałę nr 5/2016 wydaną przez I Lokalną Komisję Etyczną w Krakowie.

### 2 Odczynniki

Odczynnik/zestaw do oznaczeń	Producent
BD OptEIA Set Mouse IFN- $\gamma$ BD OptEIA Set Mouse IFN- $\gamma$ (AN-18) BD OptEIA Set Mouse IL-10 BD OptEIA Set Mouse IL-12p70 BD OptEIA Set Mouse TNF- $\alpha$ GolgiSTOP TMB Substrate Reagent Set (tetrametylobenzodyna substrat do ELISA)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
ELISA MAX Delux Set Mouse IL-1 $\beta$ ELISA MAX Delux Set Mouse IL-6 FcBlock /anty-CD16/32	Biolegend, San Diego, CA, USA
hapten DNP (2,4-dinitrofenol) skoniugowany z albuminą surowicy bydlęcej (DNP-BSA)	Bioserch Technologies, London, UK
kuleczki krzemionkowe	BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA
ketamina 100mg/ml	Biowet, Puławy, Polska
aceton etanol 99,8% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	Chempur, Piekary Śląskie, Polska

oliwa z oliwek Extra Virgine	Costad'Oro, Spoleto, Włochy
Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	eBioscience, San Diego, CA, USA
Percoll	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Szwecja
penicylina i streptomycyna (Pen Strep) RPMI 1640	Gibco, Grand Island, NY, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> bezwodny NaCl	J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA
płatowa surowica cielęca (FBS)	PAA Laboratories, Pasching, Austria
Mouse adiponectin DuoSet ELISA Mouse leptin DuoSet ELISA	R&D Systems Inc., McKinley Place, NE, USA
liberaza DH proteinaza K	Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy
1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (DNFB) 2-merkaptioetanol 2-propanol aminokwasy endogenne (NEAA) błękit trypanu (TB) bufor HEPES bromek n-heksadecylotrimetyloaminy dichlorowodorek o-dianizydyny dodecylosiarczan sodu(SDS) Evans blue (EB) formamid fenol:chloroform:alkohol izoamylowy 25:24:1 jonomycyna JumpStart™ Taq ReadyMix™ dla qPCR kwas pirogronowy (PA) L-glutamina lizozym octan metoksypropanolu (PMA) paraformaldehyd perhydrol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

standard dla MPO surowicza albumina wołowa (BSA) SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ w/o MgCl <sub>2</sub> Tris - EDTA bufor TritonX Tween20 woda do biologii molekularnej zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna bez jonów Ca <sup>2+</sup> i Mg <sup>2+</sup> (DPBS ) zestaw do pomiaru stężenia białka metodą z kwasem bis-cynchoninowym (BCA )	
T-PER	Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY, USA
ksylazyna 20mg/ml	Vetoquinol Biowet, Gorzów Wielkopolski, Polska

### 3 Metodyka

#### 3.1 Indukcja otyłości

W celu wywołania otyłości myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> były karmione dietą wysokotłuszczową przez okres 4 lub 8 tygodni. W grupie kontrolnej zwierzęta karmiono dietą standardową (kontrolną).

- Dieta wysokotłuszczowa [HFD – 60% energii pochodzi z tłuszczów, (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA)]
- Dieta kontrolna [ND – 11% energii pochodzi z tłuszczów, (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany)]

#### 3.2 Ocena przyjmowania pokarmu i profil metaboliczny

Przyrost masy ciała monitorowano raz w tygodniu przy użyciu elektronicznej wagi technicznej Scout Pro Balance (Ohaus Corporation, Parsippany, NJ, USA).

Po zakończeniu eksperymentów oceniono również masę wybranych narządów (wątroby, śledziony) i tkanek (tkanka scAT , viscAT, bioptaty jelita grubego i cienkiego) przy użyciu wagi analitycznej (Sartorius AG, Göttingen, Germany). W celu określenia wpływu DIO na wybrane parametry biochemiczne po zakończeniu eksperymentu pobierano krew i pozostawiono ją w temperaturze pokojowej (RT) do momentu powstania skrzepu. Następnie materiał wirowano 5000 rpm, 5 min, 4°C, przy użyciu wirówki z systemem chłodzącym Heraeus™ Fresco 21 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY, USA) i oddzielano surowicę do dalszej analizy. Oznaczono następujące parametry: aktywność aminotransferazy asparaginowej (AST), aminotransferazy alaninowej (ALT),  $\gamma$ -glutamylotransferazy (GGTP), stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, cholesterolu LDL, triglicerydów oraz glukozy przy użyciu automatycznego analizatora do chemii klinicznej SPOTCHEM (ARKRAY Inc., Kyoto, Japan). W uzyskanych próbkach surowicy oznaczono również stężenie leptyny i adiponektyny metodą ELISA.

### **3.3 Ocena stanu zapalnego w tkance tłuszczowej**

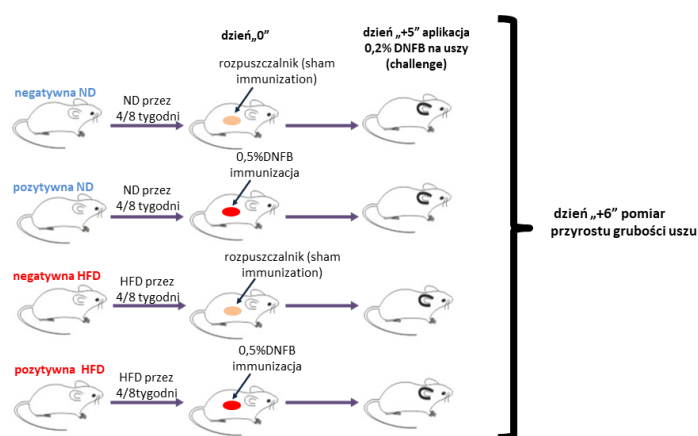
W tym celu tkankę tłuszczową od myszy karmionych HFD lub ND pobrano po zakończeniu eksperymentów, a następnie komórki uzyskane przez mechaniczne rozdrobnienie tkanek z każdej grupy eksperymentalnej hodowano w medium hodowlanym (2 ml/g tkanki) w obecności antygenu DNP-BSA 100  $\mu$ g/ml medium hodowlanego przez 48 godz. Medium hodowlane stanowił RPMI 1640 suplementowany 100 U/ml penicyliny, 100  $\mu$ g/ml streptomycyny, 2 mM L-glutaminy, 10 mM buforu HEPES,  $5 \times 10^{-2}$  mM 2-merkaptoetanolu, 0,1mM NEAA, 1 mM PA oraz 10% FBS. W uzyskanych supernatantach hodowlanych oznaczano immunoenzymatycznie stężenie cytokin IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oraz IL-10. W supernatantach oznaczono również immunoenzymatycznie stężenie leptyny i adiponektyny.

### **3.4 Model reakcji CHS *in vivo***

W celu wywołania reakcji CHS u myszy na ogoloną skórę brzucha aplikowano 25  $\mu$ l 0,5% DNFB w roztworze aceton-oliwa z oliwek (4:1). Myszy kontrolne (kontrola negatywna ND i HFD) traktowano samym rozpuszczalnikiem [(aceton-oliwa z oliwek)



sham immunization]. Pięć dni po uczuleniu dokonano pomiaru grubości uszu (pomiar zerowy), a następnie wywołano reakcję (challenge) poprzez aplikację 5  $\mu$ l 0,2% DNFB w roztworze aceton-oliwa z oliwek (4:1) na każdą stronę obu uszu. Przyrost grubości uszu oceniano 24 godz. po wywołaniu reakcji. Pomiar grubości uszu wykonano za pomocą śruby mikrometrycznej (Mitutoyo, Tokio, Japonia). Obrzęk uszu wyrażony w  $\mu$ m  $\pm$  SEM uzyskano poprzez odjęcie pomiaru zerowego od grubości uszu uzyskanej 24 godz. po wywołaniu reakcji [Schemat 3.1].



Schemat 3.1 Schemat modelu doświadczalnego.

#### 3.4.1 Ocena aktywności MPO w biopsjach małżowiny usznej

W tym celu po wykonaniu testu nadwrażliwości CHS *in vivo* zwierzęta zostały uśmiercone i pobierano biopsaty z uszu przy pomocy sztancy biopsyjnej o średnicy 6mm (Fray Products Corp., Buffalo, NY, USA.). Aktywność MPO, produkowanej przez neutrofile, w tkance usznej koreluje z toczącym się procesem zapalnym. Biopsaty umieszczano w 0,5 ml buforu do homogenizacji (0,5% roztwór bromku n-heksadecylotrimetyloamoniowego w 50 mM buforze fosforanowym  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Następnie biopsaty rozdrabniano mechanicznie przez 20 min, 40 Hz przy użyciu homogenizatora tkankowego Tissue Lyser LT (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy). Uzyskane homogenaty tkankowe poddano następnie 3-krotnemu zamrożeniu w  $-20^\circ\text{C}$  i rozmrożeniu, aby uwolnić MPO z ziarnistości neutrofilów. Materiał do analizy uzyskano poprzez zwirowanie próbek 4000 rpm, 30 min,  $4^\circ\text{C}$  i zebranie supernatantów.

Standard MPO (50 jednostek/g białka) rozpuszczono w sterylnej wodzie destylowanej i rozcieńczono w buforze do homogenizacji, aby uzyskać krzywą

standardową w zakresie 0,5-0,008 jednostek aktywności MPO. 20 µl supernatantów oraz standard naniesiono na płytkę 96 – dołkową i inkubowano 20 min, RT z 200 µl substratu dla MPO. Substrat stanowił roztwór 167 mg/ml dichlorowodoru o-dianizydyny w 50 mM buforze fosforanowym  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  z dodatkiem  $\text{H}_2\text{O}_2$  o końcowym stężeniu 0,0005%. Po inkubacji zmierzono absorbancję przy długości fali 460 nm za pomocą spektrofotometru Synegru HT (BioTek Instruments Inc., Winooski, VE, USA) i wyznaczono aktywność MPO przy pomocy krzywej standardowej. Tak uzyskane wyniki następnie przeliczono na zawartość białka w supernatantach. Białko oznaczono w reakcji z BCA w środowisku zasadowym. Absorbancję barwnego kompleksu mierzono przy długości fali 560 nm. Stężenie białka w próbkach obliczono na podstawie krzywej standardowej w zakresie 0-800 µg/ml.

#### 3.4.2 Ocena przepuszczalności naczyń w bioptatach małżowiny usznej z wykorzystaniem barwnika EB

W celu kreślenia przepuszczalności naczyń 24 godz. po wywołaniu reakcji CHS, myszom podano dożylnie (*i.v.*) 8,3 µl /g masy ciała 1% EB. Ilość barwnika obecnego w tkankach uzależniona jest od przepuszczalności ściany naczyń krwionośnych, determinowanej toczącym się stanem zapalnym w otaczającej tkance. Godzinę później, pobrano wycinki z małżowiny usznej, i wyekstrahowano barwnik znajdujący się w tkance, a jego stężenie w uzyskanych eluatach określono kolorymetrycznie mierząc absorbancję roztworów przy długości fali 565 nm. Uzyskane wartości absorbancji przeliczono na wartości stężenia przy pomocy krzywej standardowej poprzez wykonanie seryjnych rozcieńczeń EB w formamidzie.

#### 3.4.3 Ocena stężenia cytokin w bioptatach małżowiny usznej

Ocenę stężenia cytokin wykonano w bioptatach pobranych z uszu 24 godz. po wywołaniu reakcji CHS. Bioptaty pobrano do 0,4 ml buforu T-PER. Następnie tkanki rozdrabniano 20 min, 40 Hz. Materiał do analizy uzyskano poprzez zwirowanie próbek 4000 rpm, 30 min, 4°C, i zebranie supernatantów. Stężenie IFN-γ, IL-10 oraz IL-12p70 w supernatantach, zmierzono metodą ELISA.

#### 3.4.4 Ocena komórek infiltrujących małżowinę uszną

W tym celu po wykonaniu testu nadwrażliwości kontaktowej *in vivo* zwierzęta zostały uśmiercone a następnie pobrano całe uszy, które rozdzielono na dwie połówki wzdłuż chrząstki. Obie połówki umieszczono w 0,75 ml roztworu liberazy DH w RPMI 1640 o stężeniu 0,2 mg/ml. Tkanki inkubowano w cieplarni przez 2,5 godz. Następnie, działanie enzymu hamowano poprzez dodanie 0,75 ml czystego RPMI 1640 i rozcierano tkanki przez sitko komórkowe o średnicy porów 70  $\mu\text{m}$ . Uzyskane komórki płukano dwukrotnie DPBS (roztwór soli fizjologicznej zbuforowany fosforanami, pozbawiony jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ) z 2% FBS, zwirowano 1600 rpm, 10 min, 10°C, a uzyskane pelety zawieszono w medium hodowlanym i pozostawiono na 8 godz. w temp. 10°C. Dalej uzyskane komórki wybarwiono TB, nałożono na komorę Bürkera i oceniano ich żywotność oraz liczbę w mikroskopie świetlnym (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Niemcy). Następnie komórki wyznakowano i oceniano przy pomocy cytometru przepływowego FACS Canto II.

#### 3.4.5 Ocena komórek infiltrujących węzły chłonne drenujące małżowinę uszną

W tym celu po wykonaniu testu nadwrażliwości kontaktowej *in vivo* zwierzęta zostały uśmiercone a następnie pobrano węzły chłonne przyuszne (ELN - auricular ear-draining lymph node) do DPBS z 1% FBS oraz 1% Pen Strep. Węzły rozcierano i przesączano przez sitko komórkowe (70  $\mu\text{m}$ ), a następnie wirowano 1600 rpm, 10 min, 10°C. Tak uzyskane komórki przepłukano DPBS z 1% FBS, zwirowano 1600 rpm, 10 min, 10°C, a uzyskane pelety zawieszono w DPBS z 1% FBS. Następnie komórki wybarwiono TB, nałożono na komorę Bürkera i oceniano ich żywotność oraz liczbę w mikroskopie świetlnym. Następnie komórki wyznakowano i oceniono przy pomocy cytometru przepływowego FACS Canto II.

### 3.5 **Ocena stanu zapalnego w wątrobie**

#### 3.5.1 Izolacja jednojądrzastych komórek wątrobowych (LMNC)

Wątroby pobrano po czterech dniach od uczulenia myszy 0,5 % DNFB na ogoloną skórę brzucha. Myszy w głębokiej anestezji (ketamina 120 mg/kg m.c. i ksylazyna 10 mg/kg m.c.) nacięto na wysokości wyrostka mieczykowatego i otworzono klatkę piersiową. Przecięto prawy przedsionek aby umożliwić krwi ucieczkę z układu

krążenia. W celu usunięcia krwi z wątroby podano 10 ml DPBS igłą 26G przez żyłę wrotną. Po wykonaniu perfuzji i usunięciu pęcherzyka żółciowego, wątroby rozcierano przez filtr nylonowy o średnicy porów 100  $\mu\text{m}$  i zawieszono w 18 ml RMPI 1640 z 5% FBS. Następnie do roztworu dodano 12 ml 100% Percoll i nawarstwiono na 10 ml 60% Percoll. Próbkę wirowano przy 2300 rpm przez 20 min, RT, z wyłączonym hamowaniem. Warstwę tłuszczu odciągnięto, natomiast górną warstwę wraz z interfazą zebrano i zwirowano przy 1800 rpm, 10 min, w RT. Uzyskane komórki przepłukano RMPI 1640 z 5% FBS, zwirowano i zawieszono w odpowiednim buforze lub medium. Komórki wybarwiono TB, nałożono na komorę Bürkera i oceniano ich żywotność oraz liczbę w mikroskopie świetlnym.

## **Ocena profilu cytokin produkowanych przez komórki LMNC**

---

Komórki LMNC w koncentracji  $5 \times 10^5$  komórek/ml medium hodowlanym, hodowano w obecności antygeny 100  $\mu\text{g/ml}$  DNP-BSA przez 48 godz. W uzyskanych supernatantach z nad hodowli oznaczono stężenie IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, adiponektyny i leptyny metodą ELISA.

### **1 Analiza cytometryczna wyizolowanych komórek**

Zawiesiny komórek przygotowano z uszu, ELN i wątroby zgodnie z wyżej opisaną procedurą. Komórki przepłukano w DPBS z 1% FBS, zwirowano 1600 rpm, 10 min, 4°C, a pelety zawieszono w 100  $\mu\text{l}$  DPBS z 1% FBS (do znakowania powierzchniowego) lub w 200  $\mu\text{l}$  medium hodowlanego (do znakowania markerów wewnątrzkomórkowych).

Barwienie zewnątrzkomórkowe polegało na inkubacji (30 min w 6°C) zawiesiny komórek z mieszaniną przeciwciał skierowanych przeciwko markerom powierzchniowym. Po tym czasie komórki przepłukano w DPBS z 1% FBS, zwirowano 2000 rpm, 10 min, 4°C, a pelety zawieszono w 200  $\mu\text{l}$  1% paraformaldehydu o pH=7,1.

Barwienie wewnątrzkomórkowe poprzedzono 4 godz. stymulacją komórek poprzez dodanie PMA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) oraz jonomycyny (1  $\mu\text{g/ml}$ ) z równoczesnym hamowaniem wydzielania białek przez dodanie GolgiSTOP (40  $\mu\text{g/ml}$ ). Wiązanie przeciwciał przez receptory FcR blokowano przez 15min inkubację komórek z przeciwciałami (klon

2.4G2) monoklonalnymi przeciwko mysim receptorom CD16/32 (FcBlock). Następnie komórki przepłukano w DPBS z 1% FBS, zwirowano 1600 rpm, 5 min, 4°C, a pelety zawieszono w 100 µl DPBS z 1% FBS i wybarwiono markery zewnątrzkomórkowe. Następnie komórki przepłukano i utrwalono dodając 100 µl buforu do utrwalania (Fixation buffer) i inkubując przez 20 min, RT. Po inkubacji dodano 1 ml Permabilization solution i całość zwirowano 1600 rpm, 5 min, 4°C. Nadsącz zlano i przeprowadzono barwienie antygenów wewnątrzkomórkowych dodając odpowiednich przeciwciał i inkubując komórki przez 30 min, 6°C. Następnie komórki przepłukano w DPBS z 1% FBS, zwirowano 2000 rpm, 10 min, 4°C, a pelety zawieszono w 200 µl 1% paraformaldehydu o pH=7,1.

Kontrole stanowiły komórki nieznakowane oraz odpowiednie kontrole izotypowe. Pomiaru dokonano przy pomocy analizatora FACS Canto II (Becton Dickinson & Co., San Jose, CA, USA) a wyniki analizowano za pomocą programu FACSDiva.

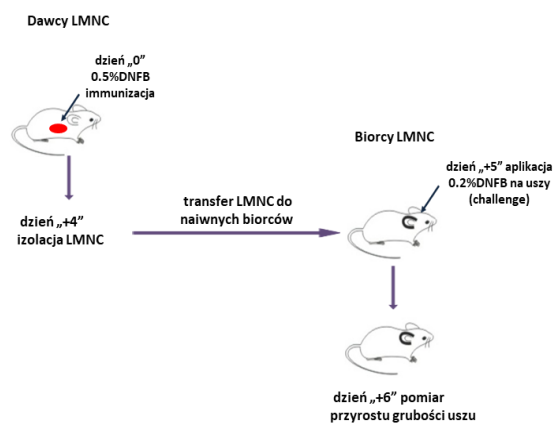
Wykorzystane w doświadczeniach przeciwciała monoklonalne skoniugowane z fluorochromami, oraz ich rozcieńczenie i pochodzenie zamieszczono w tabeli poniżej [**Tabela 1.1**].

**Tabela 1.1 Przeciwciała wykorzystane w pracy**

Marker	Klon	Fluorochrom	Rozcieńczenie	Producent
NK1.1	PK136	APC	1:400	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD27	LG.7F9	FITC	1:400	
CD11b	M1/70	Pe-Cy7	1:400	
CD11b	M1/70	PerCP-Cy5.5	1:400	
CD11c	N418	PerCP-Cy5.5	1:400	
Ly-6G	1A8	FITC	1:400	
NKGD2	CX5	APC	1:400	
IFN- $\gamma$	XMG1.2	APC	1:400	
IL-10	JES5-16E3	FITC	1:400	
NK1.1	PK136	PE	1:400	
H2D <sup>b</sup>	KH95	FITC	1:400	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Granzym B	NGZB	PE	1:400	eBioscience, San Diego, CA, USA

### 1.1 Ocena aktywności komórek LMNC – model adoptywnego transferu

W celu zbadania czy HFD modyfikuje aktywność komórek wątrobowych od myszy, karmionych dietą HFD lub ND przed uczuleniem DNFB wyizolowano komórki LMNC, które następnie podano *i.v.* naiwnym, syngenicznym biorcom, u których wywołano fazę efektorową reakcji CHS. **Schemat 1.1** przedstawia model adoptywnego transferu reakcji CHS. **Tabela 1.2** zawiera opis poszczególnych grup kontrolnych i badanych oraz opis procedur jakim poddano zwierzęta w poszczególnych grupach.



Schemat 1.1 Schemat adoptywnego transferu komórek LMNC.

Tabela 1.2 Opis grup kontrolnych oraz badanych w modelu adoptywnego transferu CHS.

Grupa badana	Karmienie dietą HFD przez 8 tyg.	Transfer komórek LMNC	Wywołanie reakcji poprzez aplikację 5 µl 0,2% DNFB	Pomiar reakcji CHS
Kontrola negatywna ND	-	-	+	+
Kontrola pozytywna ND	-	+ (LMNC po ND)	+	+
Kontrola negatywna HFD	+	-	+	+
Grupa badana HFD	+	+ (LMNC po ND)	+	+
Grupa badana ND	-	+ (LMNC po HFD)	+	+

## 1.2 Analiza składu mikrobioty jelitowej

### 1.2.1 Posiew mikrobioty jelitowej

W celu oceny ilościowej bakterii tlenowych i beztlenowych pobrano i zważono 1 cm jelita cienkiego (od strony wyrostka robaczkowego) i jelita grubego (od strony

wyrostka robaczkowego). Pobrany fragment jelita rozcięto wzdłuż, umieszczono w 0,5 ml sterylnego DPBS i wytrząsano. Z uzyskanej zawiesiny wykonano seryjne rozcieńczenia w zakresie  $10^{-8}$  –  $10^{-2}$  i wysiano na podłoże krwawe Sheadler Agar + witamina K + 5% krew barania. Płytki hodowano w 37°C w warunkach tlenowy przez 72 godz. oraz przez 120 godz. w warunkach beztlenowych. Do uzyskania warunków beztlenowych użyto generatorów GENbox anaera i pojemników do hodowli (BIOMÉRIEUX, Marcy-l'Étoile, France). Następnie zliczano jednostki tworzące kolonie (CFU). Wyniki przedstawiono jako logCFU/g pobranego materiału.

### 1.2.2 Izolacja DNA bakteryjnego z zawartości jelit

Materiał (po odseparowaniu supernatantu do oznaczenia cytokin) przepłukano trzy razy 5 ml sterylnego DPBS i wirowano przy 500 rpm, 3 min, RT. Supernatant zbierano do nowej probówki. Uzyskany w ten sposób roztwór wirowano przy 4000 rpm, 10 min, RT. Pelety zawieszono w 1 ml wody do biologii molekularnej i przeniesiono do próbówki o objętości 2 ml. Ponownie materiał zwirowano 14000 rpm, 5 min, RT. Pelety rozbito w 300  $\mu$ l Tris-EDTA i dokładnie wytrząsnięto. Następnie próbki poddano 5 krotnemu cyklowi zamrożenia ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) i rozmrożenia w łaźni wodnej ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Następnie do próbek dodano po 72  $\mu$ l lizozymu 200 mg/ml i inkubowano na łaźni wodnej ( $37^{\circ}\text{C}$ ) przez 3 godz. Po zakończonej inkubacji dodano 20  $\mu$ l 10% SDS i 2  $\mu$ l proteiny K 20 mg/ml i całość inkubowano na łaźni wodnej kolejną godzinę. Następnie do próbek dodano 100 mg kuleczek krzemionkowych i 72  $\mu$ l 5M NaCl, inkubowano na bloku grzewczym w temp.  $65^{\circ}\text{C}$ . Do ostudzonych próbek dodano 450  $\mu$ l mieszaniny fenol: chloroform: alkohol izoamylowy 25:24:1, intensywnie wytrząsano i zwirowano przy 6500 rpm, 6 min,  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant przeniesiono do nowych probówek i dodano 400  $\mu$ l 2-propanolu w celu precypitacji DNA i zwirowano 13300 rpm, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ . Pelety przepłukano 1 ml 70% etanolu i zwirowano 7000 rpm, 7 min,  $4^{\circ}\text{C}$ . Uzyskane pelety osuszono i rozpuszczono w 100  $\mu$ l wody do biologii molekularnej. Stężenie i czystość próbek oceniano spektrofotometrycznie przy pomocy aparatu MaestroNano (Maestrogen Inc., Hsinchu City, Taiwan). Następnie próbki doprowadzono do stężenia roboczego 3 ng/ $\mu$ l.



### 1.2.3 Ocena relatywnego poziomu wybranych grup bakterii w zawartości jelita cienkiego i grubego

W celu określenia zmian w składzie mikrobioty jelitowej występujących w wyniku zastosowania diety HFD oceniono ilość poszczególnych grup bakterii przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) za pomocą CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Każdą reakcję przeprowadzano używając 3,5 µl, 3 ng/µl DNA. Sekwencje starterów użytych w analizie przedstawione są w tabeli poniżej [Tabela 1.3]. Określono poziom konserwatywnego dla wyselekcjonowanych grup bakterii 16S rDNA. Mieszanina reakcyjna zawierała SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ w/o MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM starterów R i F, MgCl<sub>2</sub> (w stężeniu odpowiednim dla poszczególnych starterów) i 0,1% TritonX.

Uzyskane wyniki znormalizowano do całkowitej ilości DNA bakteryjnego ( $\Delta Ct$ ) i przeliczono na wartości uzyskane u myszy z grupy kontrolnej ( $\Delta\Delta Ct$ ) [214]. Całkowitą ilość DNA bakteryjnego oceniono używając uniwersalnych starterów rozpoznających konserwatywny dla bakterii 16S rDNA oraz sondy. Mieszanina reakcyjna składała się z JumpStart™ Taq ReadyMix™ for Quantitative PCR, 0,1 µM starterów R i F, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, sondy i 0,1% Triton X.

Pomiar względny ilości kopii jest wystarczający dla naszego eksperymentu, gdyż informuje o zmianie stosunku ilościowego pomiędzy grupą badaną (HFD) i kontrolną (ND).

**Tabela 1.3 Warunki reakcji i startery zastosowane w analizie składu mikrobioty jelitowej**

<b>Cel /temperatura hybrydyzacja odcinków starterowych/ stężenie MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Sekwencja starterów</b>
<b><i>grupa Clostridium coccooides – Eubacterium rectale (Clostridium klaster XIVab)</i></b> <b>/55°C/4 mM</b>	F: 5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3' R: 5'-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA-3'
<b><i>grupa Clostridium coccooides (Clostridium klaster XIVa)</i></b> <b>/ 50°C/2,5 mM</b>	F: 5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3' R: 5'-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA-3'

<p><b>grupa <i>Clostridium leptum-Fecalibacterium prausnitzii</i> (<i>Clostridium</i> klaster IV)</b></p> <p>/50°C/ 1,5 mM</p>	<p>F: 5'-GCACAAGCAGTGGAGT-3'</p> <p>R: 5'-CTTCCTCCGTTTTGTCAA -3'</p>
<p><b>grupa <i>Clostridium perfringens</i> (<i>Clostridium</i> klaster I)</b></p> <p>/55°C/3 mM</p>	<p>F: 5'-ATGCAAGTCGAGCGAGG -3'</p> <p>R: 5'-TATGCGGTATTAATCTTCCTTT -3'</p>
<p><b><i>Enterococcus</i> spp.</b></p> <p>/61°C /3 mM</p>	<p>F: 5'-CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT-3'</p> <p>R: 5'-ACTCGTTGTACTIONTCCCATTGT-3'</p>
<p><b><i>Lactobacillus</i> grupa</b></p> <p>/58°C /2 mM</p>	<p>F: 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'</p> <p>R: 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'</p>
<p><b><i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> (typ <i>Bacteroidetes</i>)</b></p> <p>/68°C /3 mM</p>	<p>F: 5'-GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT-3'</p> <p>R: 5'-CGGACGTAAGGGCCGTGC-3'</p>
<p><b><i>Bifidobacterium</i> spp.</b></p> <p>/58°C /3 mM</p>	<p>F: 5'-TCGCGTCTGGTGTGAAAG-3'</p> <p>R: 5'-CCACATCCAGCATCCAC-3'</p>
<p><b>SFB (Segmented Filamentous Bacteria)</b></p> <p>/58°C/ 3 mM</p>	<p>F: 5'-GACGCTGAGGCATGAGAGCAT-3'</p> <p>R: 5'-GACGGCACGGATTGTTATTCA-3'</p>
<p><b>Bakterie</b></p> <p>/60°C/ 3 mM</p>	<p>F: 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'</p> <p>R: 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'</p> <p>sonda:</p> <p>(6-FAM)-5'-CGTATTACCGGGCTGCTGGCAC-3'-(TAMRA)</p>

### **1.3 Ocena stanu zapalnego w obrębie jelit**

#### **1.3.1 Ocena długości jelit i masy bioptatów pobranych z jelita**

W tym celu po zakończeniu eksperymentu pobrano jelito cienkie oraz grube i zmierzono ich długość. Następnie pobrano 2 cm jelita cienkiego (od strony wyrostka robaczkowego) i 1 cm jelita grubego (od strony odbytu). Fragmenty dokładnie wypłukano sterylnym DPBS i zważono. Tak przygotowane wycinki zamrożono do późniejszej analizy.

#### **1.3.2 Ocena aktywności MPO w bioptatach pobranych z jelita**

Wycinki zawieszono w 0,5 ml buforu do homogenizacji, zhomogenizowano, 3 – krotnie zamrożono i rozmrożono, a następnie zwirowano, odciągnięto supernatanty i oznaczono aktywność MPO. Dokładna metodyka została opisana powyżej (3.4.1 *Ocena aktywności mieloperoksydazy (MPO) w bioptatach małżowiny usznej*).

#### **1.3.3 Ocena poziomu cytokin w popłuczynach jelitowych**

W celu określenia składu mikrobioty jelitowej po 8 tygodniach diety HFD pobrano od myszy jelito grube i cienkie. Jelito cienkie przepłukano 4 ml, natomiast jelito grube 5 ml sterylnego DPBS. Materiał przeniesiono do probówki 15 ml i wirowano przy 4000 rpm, 5 min, RT. Supernatant przeniesiono do nowej probówki i zamrożono w -80°C do analizy cytokin. Z pozostałego materiału izolowano DNA bakteryjne. W supernatantach zmierzono poziom cytokin: IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$  i IL-10. Kontrolę stanowił materiał pobrany od myszy karmionych ND.

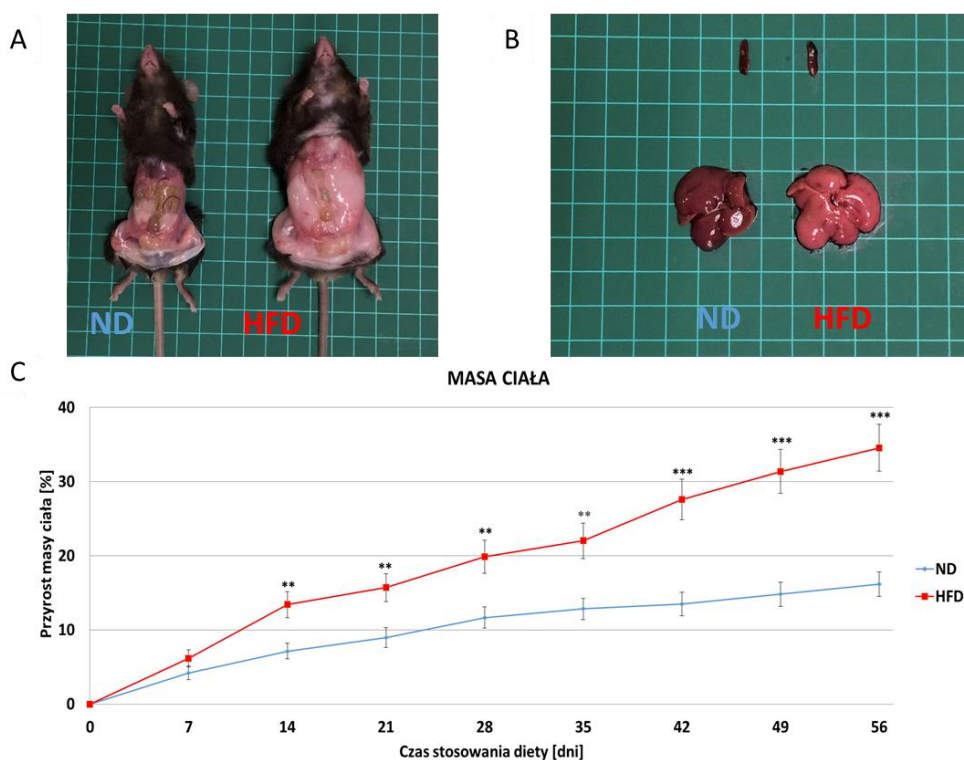
## **2 Opracowanie statystyczne wyników**

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA. Poziom istotności dla wszystkich analiz przyjęto jako  $\alpha=0,05$ . Test Shapiro-Wilka zastosowano do testowania normalności rozkładu zmiennych. Do porównania czterech grup w teście nadwrażliwości kontaktowej zastosowano analizę wariancji ANOVA lub test Kruskala-Wallisa, wraz z testami post-hoc. Do porównania dwóch grup niezależnych w testach *in vitro* zastosowano test t-Studenta lub U Manna-Whitney.

## Wyniki

### 1 Wpływ przyjmowania diety wysokotłuszczowej przez 8 tygodni na masę ciała oraz wybranych tkanek i narządów myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>

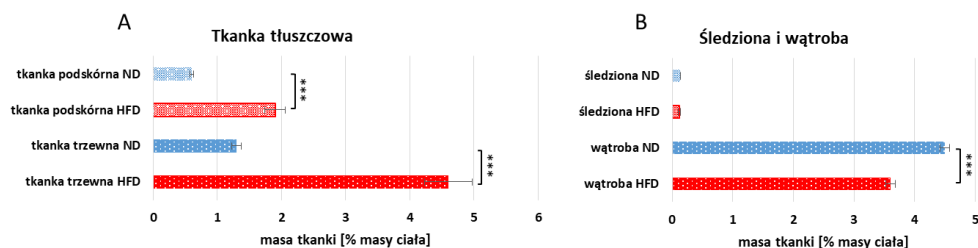
Wyniki przedstawione na Rycinie 1.1 C wskazują, że myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> karmione dietą HFD przez okres 8 tygodni wykazywały znamienne wyższy przyrost masy ciała w odniesieniu do myszy spożywających ND. Istotne różnice obserwowano już w 14 dniu od zastosowania diety HFD [Rycina 1.1 C; ND vs HFD]. Różnica pomiędzy średnim przyrostem masy ciała w grupie ND i HFD w 8 tygodniu eksperymentu wynosiła  $22,5 \pm 1,3$  % [ $p < 0,0001$ ].



Rycina 1.1 [A] Wielkość i wygląd tkanki tłuszczowej trzewnej u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> po 8 tygodniach przyjmowania ND lub HFD. [B] Wygląd śledzion (górną) i wątrób (dół) u myszy po 8 tygodniach przyjmowania ND lub HFD. [C] Przyrost masy ciała myszy karmionych ND lub HFD. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM,  $n=20$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Większej masie ciała towarzyszył wzrost zawartości tkanki scAT i viscAT w organizmie [Rycina 1.2 A; ND vs HFD]. Nie stwierdzono zmian w masie śledzion w przeliczeniu na masę ciała [Rycina 1.2 B]. Natomiast masa wątrób w przeliczeniu

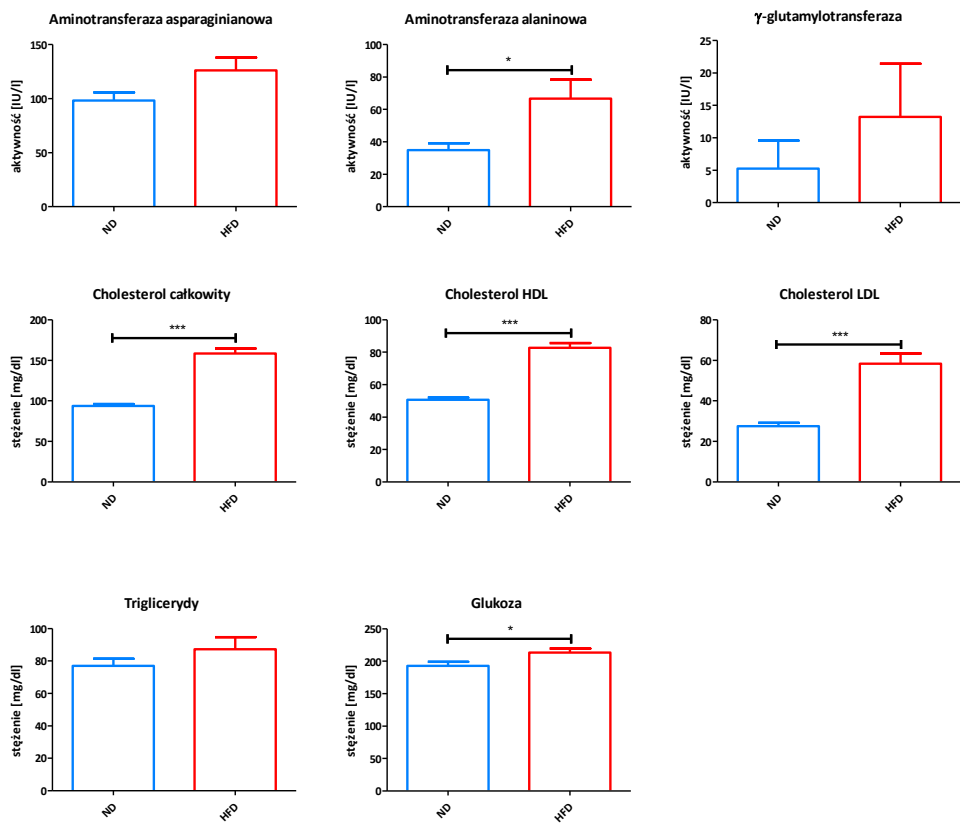
na masę ciała uległa obniżeniu [Rycina 1.2 B; ND vs HFD]. Jednak stosowanie HFD przez 8 tygodni nie wpływa na bezwzględną masę wątrób [ND  $1,26 \pm 0,02$  g vs HFD  $1,20 \pm 0,03$  g;  $p=0,09$ ].



**Rycina 1.2 [A] Masa tkanki podskórnej i trzewnej w stosunku do masy ciała u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> po 8 tygodniach przyjmowania ND lub HFD. [B] Masa śledziony i wątroby w stosunku do masy ciała u myszy po 8 tygodniach karmienia ND lub HFD. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM,  $n=6-41$ ; \*\*\* $p<0,001$ .**

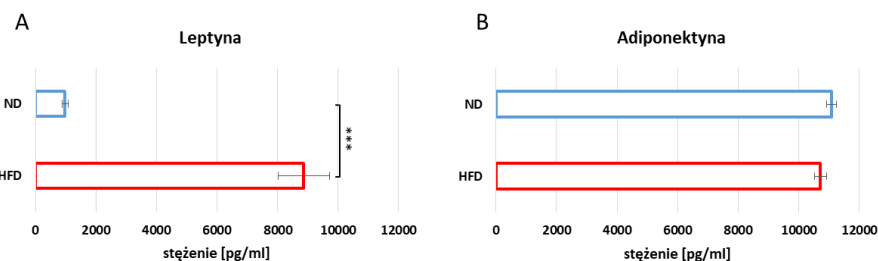
## **2 Wpływu przyjmowania diety wysokotłuszczowej przez 8 tygodni na profil metaboliczny myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>**

Badania biochemiczne wykazały, że przyjmowanie HFD przez 8 tygodni prowadzi do istotnego statystycznie wzrostu poziomu ALT, cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, cholesterolu LDL oraz glukozy w surowicy krwi myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> [Rycina 2.1; ND vs HFD]. Dieta HFD natomiast prowadziła do nieznamiennego statystycznie wzrostu poziomu AST, GGTP oraz triglicerydów [Rycina 2.1].



**Rycina 2.1 Parametry biochemiczne po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=15-19; \*p<0,05;\*\*\*p<0,001.**

Ponadto zaobserwowano, że karmienie HFD przez 8 tygodni powoduje również statystycznie znamiennej wzrost stężenia leptyny [Rycina 2.2 A; ND vs HFD] w surowicy myszy *Rag1<sup>-/-</sup>*, nie wpływa natomiast na stężenie adiponektyny [Rycina 2.2 B].

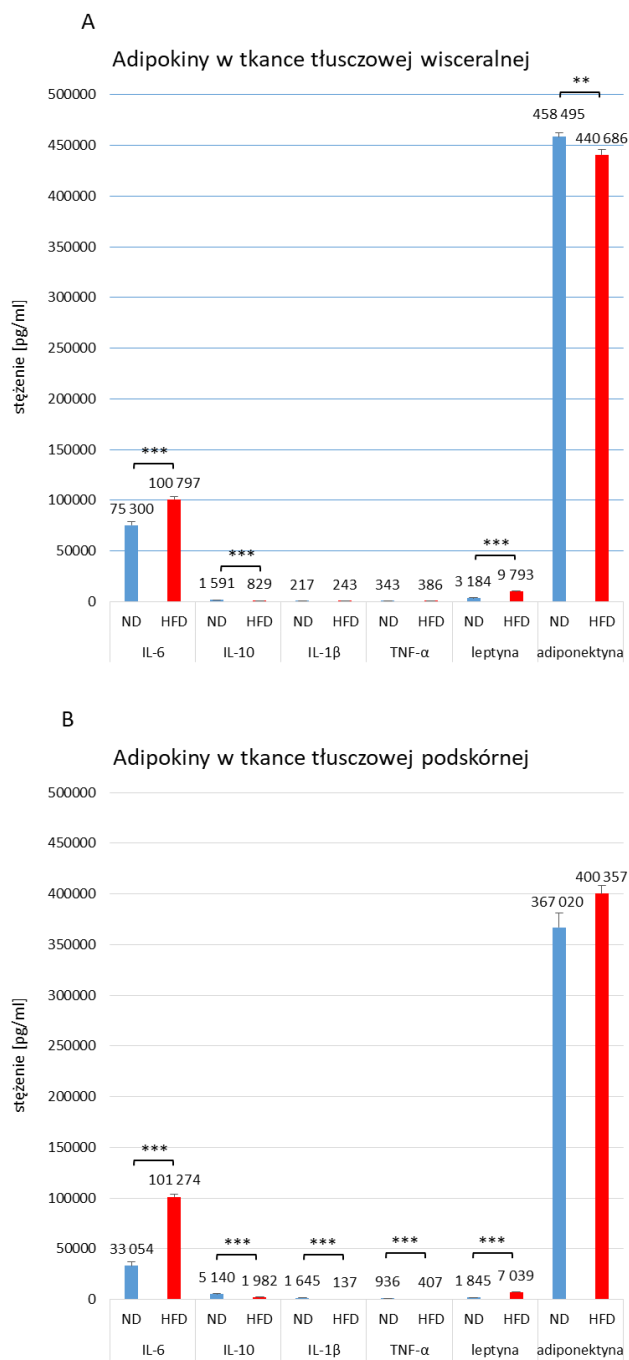


**Rycina 2.2 Stężenie leptyny [A] i adiponektyny [B] w surowicy po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=14-25; \*\*\*p<0,001.**

### 3 Wpływ przyjmowania diety wysokotłuszczowej przez 8 tygodni na profil adipokin produkowanych przez tkankę tłuszczową

Otyłość związana jest ze stanem zapalnym w obrębie AT. Pomiar cytokin w supernatantach pobranych po 48 godz. hodowli viscAT oraz scAT, posłużył do określenia statusu immunologicznego tkanki tłuszczowej u myszy z DIO. Zarówno w viscAT [Rycina 3.1 A; ND vs HFD] i scAT [Rycina 3.1 B ND vs HFD] stwierdzono wzrost stężenia prozapalnej IL-6 i leptyny oraz spadek stężenia przeciwzapalnej IL-10. Dodatkowo w viscAT stwierdzono obniżenie adiponektyny [Rycina 3.1 A; ND vs HFD]. W przypadku scAT, wystąpił spadek stężenia cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$  oraz TNF- $\alpha$  [Rycina 3.1 B; ND vs HFD].

Wyniki analizy wskazują również na różnice w poziomach wydzielanych adipokin pomiędzy tkanką scAT i viscAT. Porównując stężenia wybranych adipokin można stwierdzić, że u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> przyjmujących ND, tkanka viscAT wydziela więcej IL-6 [ND scAT vs ND visc AT; p<0,001], leptyny [ND scAT vs ND viscAT; p=0,015] i adiponektyny [ND scAT vs ND viscAT; p<0,001] aniżeli tkanka scAT. Dodatkowo stwierdzono niższe stężenie IL-10 [ND scAT vs ND viscAT; p<0,001], IL-1 $\beta$  [ND scAT vs ND viscAT; p<0,001] oraz TNF- $\alpha$  [ND scAT vs ND viscAT; p<0,001] w tkance viscAT w stosunku do scAT. Natomiast w przypadku myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> przyjmujących HFD w tkance viscAT stwierdzono jedynie wyższy poziom wydzielania hormonów, leptyny [HFD scAT vs ND visc AT; p<0,001] i adiponektyny [HFD scAT vs ND visc AT; p<0,001], w odniesieniu do tkanki scAT.

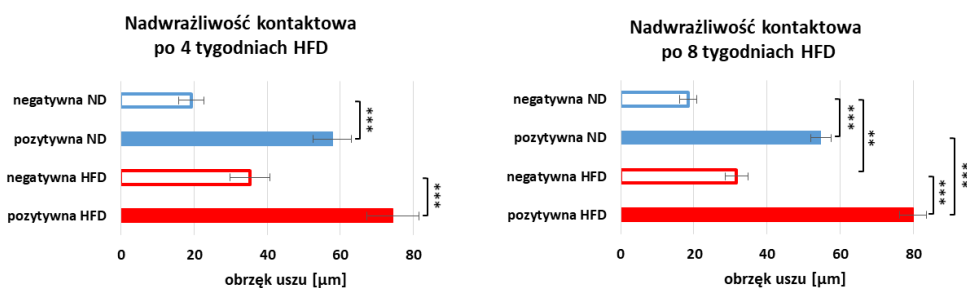


**Rycina 3.1** Stężenie IL-6, IL-10, IL-1β, TNF-α oraz leptyny i adiponektyny w supernatantach z hodowli tkanki tłuszczowej wisceralnej [A] i podskórnej [B] po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=10-18; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.



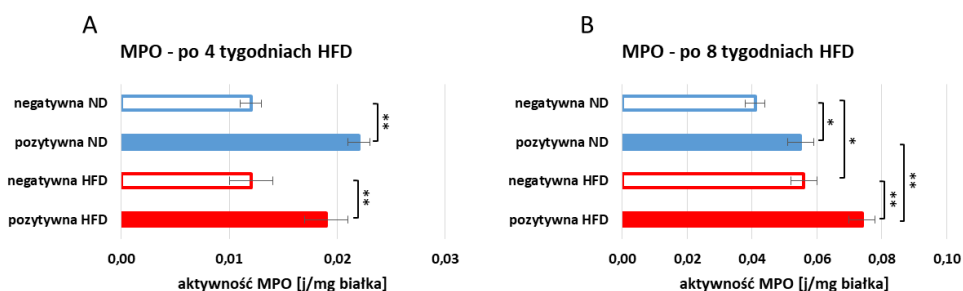
#### 4 Wpływ DIO na reakcję nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez wątrobowe komórki NK

Wyniki przedstawione na **Rycinie 4.1** wskazują, że karmienie myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> HFD przez 8 tygodni przed uczuleniem DNFB prowadzi do istotnego statystycznie wzrostu reakcji CHS w porównaniu do grupy otrzymującej ND przed immunizacją [**Rycina 4.1 B**; pozytywna ND vs pozytywna HFD]. W celu sprawdzenia czy krótszy czas stosowania diety HFD również będzie miał wpływ na reakcję CHS, wywołano reakcję po 4 tygodniach od zastosowania diety. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic pomiędzy grupami pozytywnymi [**Rycina 4.1 A**].



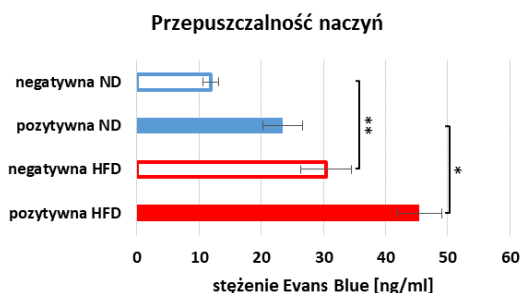
**Rycina 4.1 Nadwrażliwość kontaktowa po 4 [A] i 8 [B] tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=20-48; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.**

Wyniki badań *in vivo* zostały potwierdzone w badaniu aktywności MPO w wycinkach z małżowiny usznej. Średnia aktywność MPO w wycinkach pobranych z uszu myszy karmionych HFD przez 8 tygodni przed immunizacją jest wyższa od średniej aktywności MPO myszy karmionych ND przed uczuleniem [**Rycina 4.2 B**; pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Nie stwierdzono takiej zależności po 4 tygodniach od zastosowania diety HFD [**Rycina 4.2 A**].



**Rycina 4.2 Aktywność mieloperoksydazy (MPO) w wycinkach z małżowiny usznej po 4 [A] i 8 [B] tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=6-16; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.**

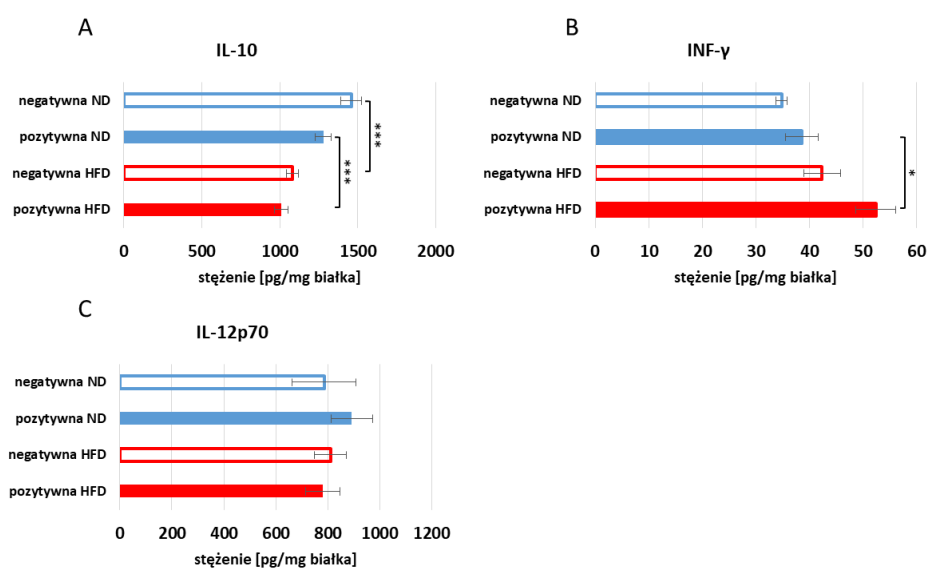
Dodatkowo oceniono wpływ stosowania diety HFD przez 8 tygodni na przepuszczalność naczyń w tkance usznej po wywołaniu reakcji CHS. Wyniki przedstawione na **Rycina 4.3** wykazują, że przepuszczalność naczyń u myszy karmionych HFD jest wyższa w porównaniu do myszy karmionych ND zarówno w grupie negatywnej [**Rycina 4.3**; negatywna ND vs negatywna HFD] jak i pozytywnej [**Rycina 4.3**; pozytywna ND vs pozytywna HFD].



**Rycina 4.3 Przepuszczalność naczyń po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=14-16; \*p<0,05; \*\*p<0,01.**

W dalszym etapie badań, w celu oceny intensywności reakcji zapalanej w tkance uszu, dokonano pomiaru stężenia IL-10, IFN- $\gamma$  oraz IL-12p70 w supernatantach z homogenatów tkankowych małżowiny usznej. Analiza wykazała znaczne obniżenie stężenie IL-10 zarówno w grupie negatywnej HFD [**Rycina 4.4 A**; negatywna ND vs negatywna HFD] jak i pozytywnej HFD [**Rycina 4.4 A**; pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Zaobserwowano również znamiennej wzrost stężenia IFN- $\gamma$  w grupie pozytywnej HFD w stosunku do grupy pozytywnej ND [**Rycina 4.4 B**;

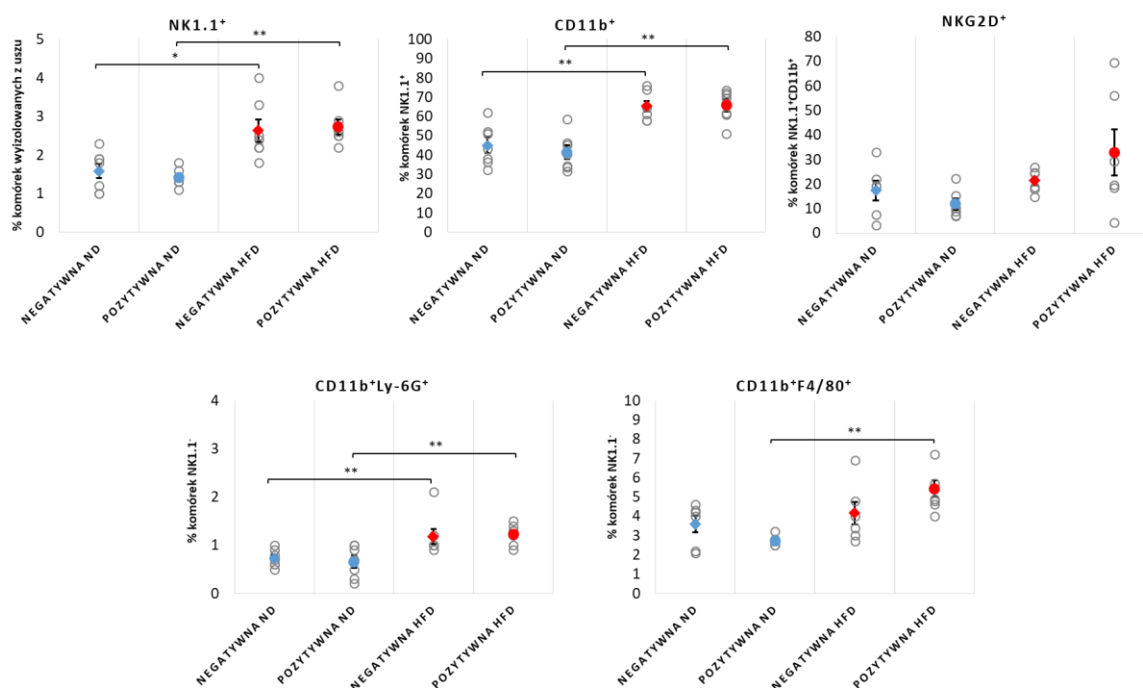
pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Nie stwierdzono różnic w stężeniu IL-12p70 pomiędzy grupami [Rycina 4.4 C].



**Rycina 4.4** Stężenie IL-10 [A], IFN-γ [B] oraz IL-12p70 [C] w supernatantach z homogenatów tkanki usznej po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=10-21; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

Analiza cytometryczna komórek wyizolowanych z tkanki usznej 24 godz. po wywołaniu reakcji CHS wykazała, że w obrębie komórek izolowanych z uszu u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> karmionych HFD przez 8 tygodni przed immunizacją wzrasta odsetek komórek NK1.1<sup>+</sup> w porównaniu do grupy karmionej ND przed uczuleniem [Rycina 4.5 A; pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Wzrost odsetka komórek NK1.1<sup>+</sup> zaobserwowano również u myszy po samym stosowaniu HFD bez immunizacji w odniesieniu do zwierząt tylko karmionych ND [Rycina 4.5 A; negatywna HFD vs negatywna ND]. Dalsza charakterystyka komórek NK1.1<sup>+</sup> wykazała, że populację tę stanowią w dużej mierze komórki CD11b<sup>+</sup>, a pod wpływem otyłości dochodzi do wzrostu ekspresji tej molekuly na komórkach NK1.1<sup>+</sup> [Rycina 4.5 B; negatywna HFD vs negatywna ND; pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Dalsza analiza komórek NK1.1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> wykazała nieznamiennego wzrost ekspresji receptora aktywującego NKG2D w grupie pozytywnej HFD w stosunku do grupy pozytywnej ND [Rycina 4.5 C].

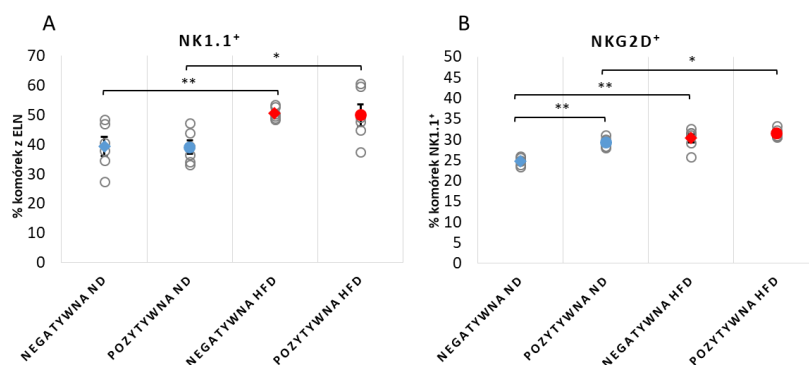
Ponadto stwierdzono zwiększony napływ neutrofilów – CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup> [Rycina 4.5 D; negatywna HFD vs negatywna ND; pozytywna ND vs pozytywna HFD] do tkanki usznej oraz wyższy odsetek makrofagów – CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> [Rycina 4.5 E; pozytywna ND vs pozytywna HFD] w uszach myszy po HFD w stosunku do myszy karmionych ND.



**Rycina 4.5 Analiza cytometryczna komórek wyizolowanych z małżowiny usznej.**

[A] Procentowa zawartość komórek NK1.1<sup>+</sup>. [B] Procentowa zawartość komórek CD11b<sup>+</sup> w obrębie populacji komórek NK1.1<sup>+</sup>. [C] Procentowa zawartość komórek NKG2D<sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. [D] Procentowa zawartość komórek CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>. [E] Procentowa zawartość komórek CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=6-7; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

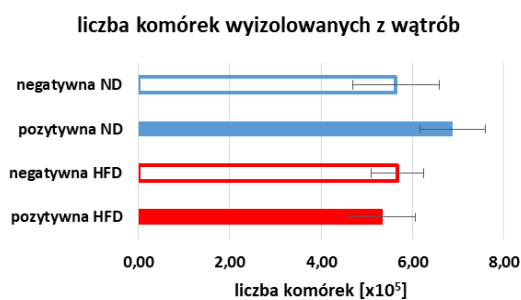
Analiza komórek infiltrujących ELN, również wykazała wzrost odsetka komórek NK1.1<sup>+</sup> po stosowaniu diety HFD [Rycina 4.6 A; negatywna HFD vs negatywna ND; pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Stwierdzono także wzrost ekspresji receptora NKG2D na komórkach NK1.1<sup>+</sup> [Rycina 4.6 B; negatywna HFD vs negatywna ND; pozytywna ND vs pozytywna HFD].



**Rycina 4.6** Analiza cytometryczna komórek wyizolowanych z ELN. [A] Procentowa zawartość komórek NK1.1+. [B] Procentowa zawartość komórek NKG2D+ w obrębie populacji komórek NK1.1+. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=6; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

## 5 Wpływ DIO na profil cytokinowy i fenotyp komórek wątrobowych biorących udział w reakcji nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez komórki NK

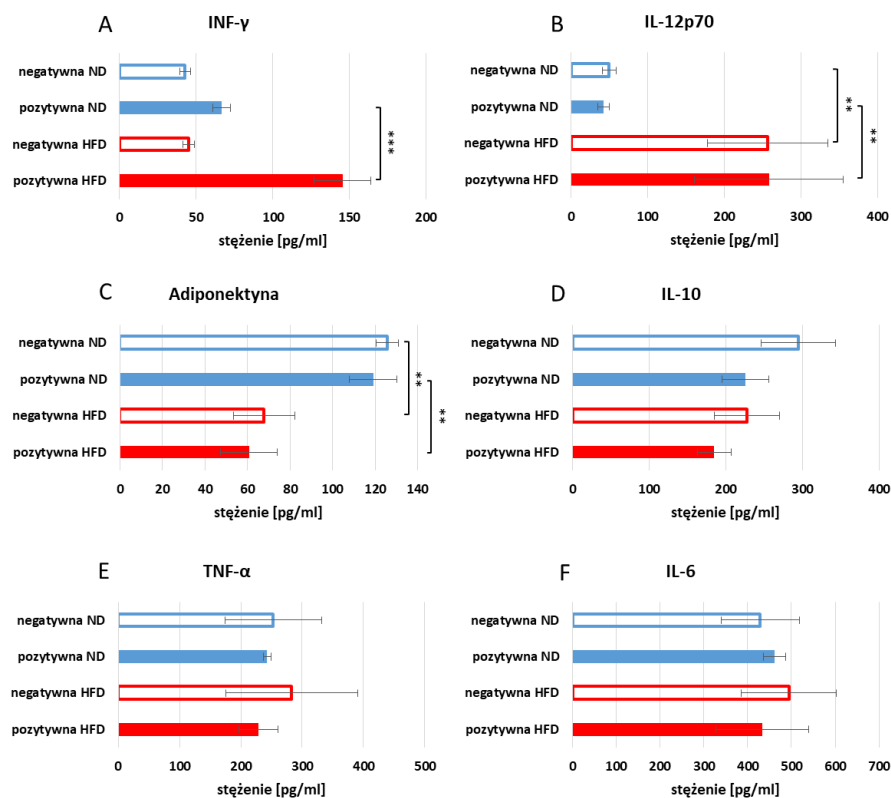
W celu oceny wpływu przyjmowania HFD na komórki immunologiczne rezydujące w wątrobie wykonano hodowlę komórek LMNC wyizolowanych cztery dni po immunizacji myszy karmionych HFD lub ND przez 8 tygodni. Liczba wyizolowanych komórek z poszczególnych grup badanych nie różniła się istotnie [Rycina 5.1].



**Rycina 5.1** Liczba komórek LMNC wyizolowanych z poszczególnych grup badanych. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=13-14.

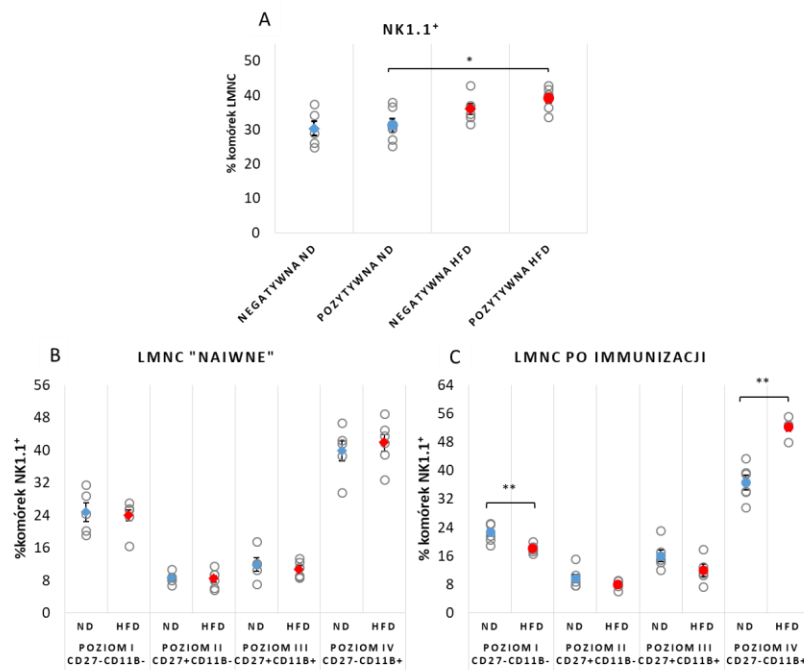
Komórki LMNC hodowane były w obecności antygeny DNP-BSA przez 48 godz. W supernatantach z hodowli zostało oznaczone stężenie cytokin. Uzyskane wyniki wskazują, że przyjmowanie HFD przed immunizacją haptenem powoduje statystycznie znamiennej wzrost produkcji IFN- $\gamma$  [Rycina 5.2 A; pozytywna HFD vs

pozytywna ND]. Dodatkowo stwierdzono, że samo stosowanie diety HFD nie wpływa na produkcję IFN- $\gamma$  - brak różnic pomiędzy grupą negatywną HFD i negatywną ND [Rycina 5.2 A]. Zwiększoną produkcję IL-12p70 zaobserwowano zarówno w grupie myszy nieimmunizowanych oraz immunizowanych po uprzednim przyjmowaniu HFD [Rycina 5.2 B; negatywna ND vs negatywna HFD, pozytywna ND vs negatywna HFD]. Ponadto wykazano, że w supernatantach z hodowli LMNC izolowanych zarówno od myszy nie immunizowanych oraz immunizowanych uprzednio karmionych HFD występuje niższe stężenie adiponektyny [Rycina 5.2 C; negatywna ND vs negatywna HFD, pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Stwierdzono również nieznaczny spadek produkcji IL-10 [Rycina 5.2 D] po zastosowaniu HFD. Natomiast w przypadku stężenia TNF- $\alpha$  [Rycina 5.2 E] oraz IL-6 [Rycina 5.2 F] nie wykazano różnic pomiędzy badanymi grupami. Poziom IL-1 $\beta$  oraz leptyny był poniżej poziomu detekcji.



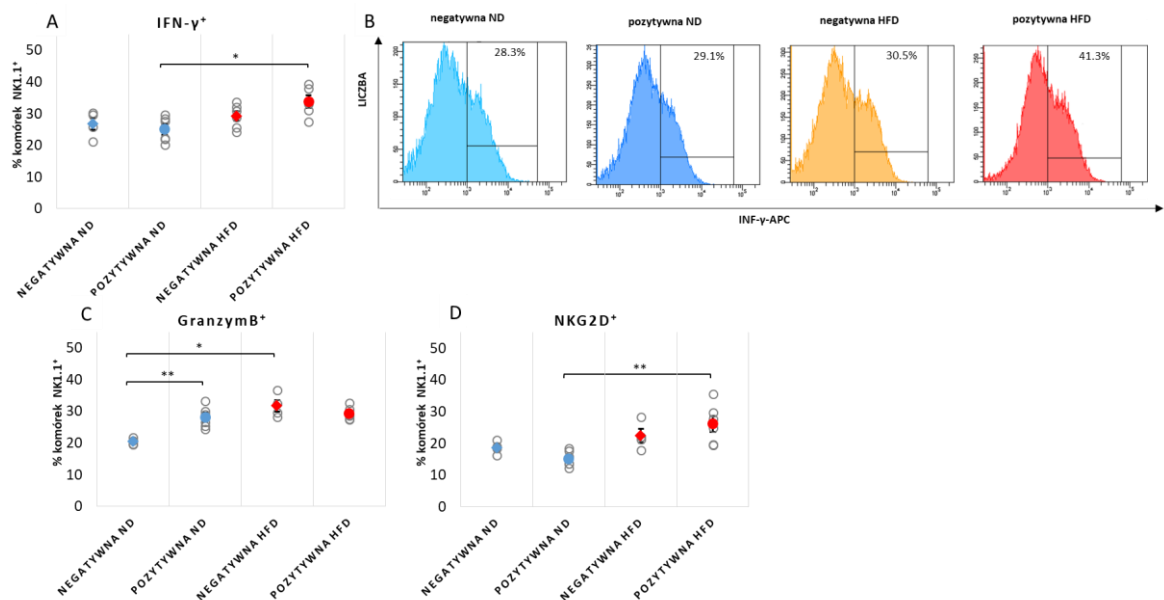
**Rycina 5.2** Stężenie IFN- $\gamma$  [A], IL-12p70 [B], adiponektyny [C], IL-10 [D], TNF- $\alpha$  [E] i IL-6 [F] w supernatantach z hodowli LMNC. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=4-16; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Analiza cytometryczna komórek LMNC wykazała natomiast, że zastosowanie przez 8 tygodni diety HFD przed immunizacją wpływa na wzrost odsetka komórek NK1.1<sup>+</sup> we frakcji LMNC [Rycina 5.3 A; pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Następnie oceniono poziom dojrzałości komórek NK1.1<sup>+</sup> izolowanych z wątroby [Rycina 5.3 A i B]. W obrębie populacji komórek NK1.1<sup>+</sup> zidentyfikowano cztery różne subpopulacje komórek: CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> i CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>. Subpopulacje te określają stopień dojrzałości komórek NK (gdzie komórki CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> to najniższy stopień dojrzałości) ich zdolność do produkcji cytokin oraz aktywność cytotoksyczną. Stwierdzono, że HFD nie wpływa na procentową zawartość poszczególnych populacji komórek NK u myszy „naiwnych” (myszy nieimmunizowanych) [Rycina 5.3 B]. Zaobserwowano natomiast, że dieta HFD zastosowana przed immunizacją powoduje wzrost odsetka komórek najbardziej dojrzałych o fenotypie CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> oraz spadek odsetka komórek najmniej dojrzałych o fenotypie CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> [Rycina 5.3 C; ND vs HFD].



**Rycina 5.3 Analiza cytometryczna komórek NK1.1<sup>+</sup> wyizolowanych z wątroby. [A] Procentowa zawartość komórek NK1.1<sup>+</sup>. Procentowa zawartość komórek NK1.1<sup>+</sup> na kolejnych poziomach dojrzałości w grupach myszy nieimmunizowanych [B] i w grupach myszy immunizowanych [C]. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=5-6; \*\*p<0,01.**

Dalsza analiza cytometryczna komórek NK1.1<sup>+</sup> wykazała, że komórki izolowane po immunizacji od myszy otyłych, wykazywały wyższą ekspresję wewnątrzkomórkową IFN- $\gamma$  [Rycina 5.4 A i B; pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Nie stwierdzono natomiast takiej zależności w grupach negatywnych [Rycina 5.3 A i B]. Ponadto komórki NK1.1<sup>+</sup> izolowane od myszy „naiwnych” karmionych HFD charakteryzowały się wyższą ekspresją granzymu B w stosunku do myszy na ND [Rycina 5.4 C; negatywna ND vs negatywna HFD]. Natomiast w grupie pozytywnej ND i HFD ekspresja tego markera była na zbliżonym poziomie [Rycina 5.4 C]. Wykazano natomiast wzrost ekspresji receptora aktywującego NKG2D na komórkach NK1.1<sup>+</sup> izolowanych od myszy karmionych HFD przed immunizacją w stosunku do myszy karmionych ND [Rycina 5.4 D; pozytywna ND vs pozytywna HFD].

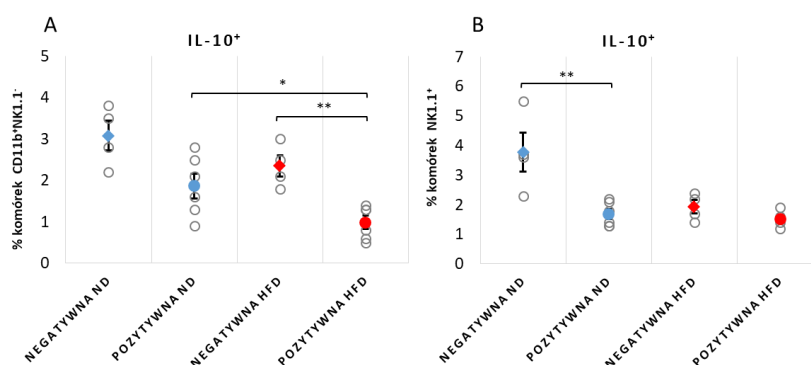


**Rycina 5.4 Analiza cytometryczna komórek NK1.1<sup>+</sup> izolowanych z wątroby.** [A] Procentowa zawartość komórek IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1<sup>+</sup>. [B] Reprezentatywne histogramy przedstawiające ekspresję IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> w komórkach NK1.1<sup>+</sup>. [C] Procentowa zawartość komórek granzym B<sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1<sup>+</sup>. [D] Procentowa zawartość komórek NKG2D<sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1<sup>+</sup>. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=5-6; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Dalsza analiza komórek LMNC wykazała spadek odsetka komórek CD11b<sup>+</sup> (innych niż NK) z ekspresją IL-10 u myszy karmionych HFD przed immunizacją w stosunku do myszy karmionych ND [Rycina 5.5 A; pozytywna ND vs pozytywna HFD]. Ponadto stwierdzono nieznamienny spadek ekspresji IL-10 wewnątrz komórek NK1.1<sup>+</sup>



izolowanych od myszy „naiwnych” karmionych HFD w stosunku do myszy karmionych ND [Rycina 5.5 B].



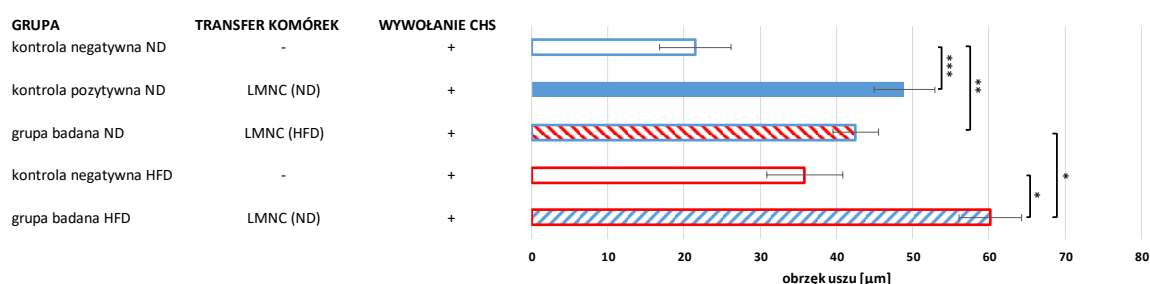
**Rycina 5.5 Analiza cytometryczna komórek LMNC. [A] Procentowa zawartość komórek IL-10<sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1-CD11b<sup>+</sup>. [B] Procentowa zawartość komórek IL-10<sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1<sup>+</sup>. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=5-6; \*p<0,05; \*\*p<0,01.**

## 6 Wpływ DIO na aktywność komórek wątrobowych biorących udział w reakcji nadwrażliwości kontaktowej mediowanej przez komórki NK

Dotychczasowe badania przeprowadzone w Katedrze Biologii UJ CM pokazały, że komórki NK izolowane z wątroby myszy uczulonych haptenem są w stanie przenieść reakcję nadwrażliwości kontaktowej na „naiwnych” biorców [27]. Przedstawiona powyżej analiza cytometryczna wykazała istotne zmiany w składzie komórek LMNC po zastosowaniu diety HFD przez 8 tygodni przed immunizacją. W związku z tym aby sprawdzić czy przeniesienie komórek LMNC indukowanych u myszy otyłych jest wystarczające do przeniesienia wzmożonej reakcji CHS na „naiwnych” nieotyłych biorców wykonano transfer *i.v.* komórek izolowanych cztery dni po immunizacji od myszy uprzednio karmionych HFD. Dodatkowo podjęto próbę sprawdzenia, czy przeniesienie komórek LMNC indukowanych u myszy nieotyłych jest w stanie zmodyfikować reakcję CHS u otyłych biorców. W tym celu przeniesiono *i.v.* komórki LMNC od myszy karmionych ND przed immunizacją do otyłych biorców.

Wyniki przedstawione na **Rycina 6.1** wskazują, że komórki LMNC izolowane od myszy karmionych dietą HFD przed immunizacją są w stanie przenieść reakcję CHS na „naiwnych” nieotyłych biorców [**Rycina 6.1**; kontrola negatywna ND vs grupa

badana ND], jednak reakcja ta nie ulega wzmocnieniu w stosunku do grupy kontroli pozytywnej, w której komórki LMNC od myszy po ND były przenoszone do biorców otrzymujących ND. Również komórki LMNC izolowane od myszy karmionych dietą HFD przed immunizacją przenoszą reakcję CHS na „naiwnych” otyłych biorców [Rycina 6.1; kontrola negatywna HFD vs grupa badana HFD]. Dodatkowo reakcja ta jest silniejsza w porównaniu do grupy badanej ND [Rycina 6.1; grupa badana ND vs grupa badana HFD].

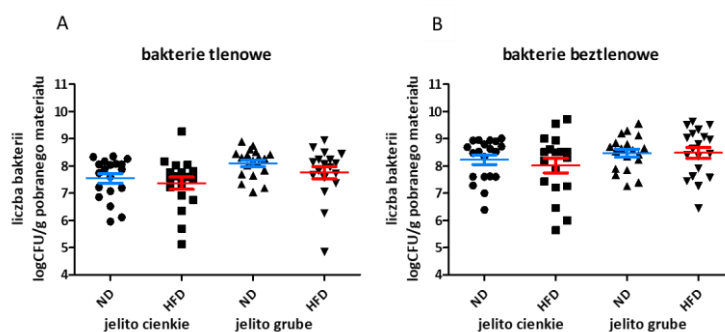


**Rycina 6.1** Adopcyjny transfer komórek LMNC. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=10-30; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## 7 Wpływ diety wysokotłuszczowej na skład mikrobioty jelitowej

Badania ostatnich lat wskazują, że dieta ma znaczący wpływ na skład mikrobioty bakteryjnej przewodu pokarmowego. Zmiany te z kolei mogą wpływać na przebieg reakcji CHS. Dlatego w kolejnym etapie badań określano wpływ przyjmowanej diety na profil naturalnej mikrobioty jelitowej.

W związku z tym zbadano, wpływ przyjmowania HFD na ilość bakterii tlenowych oraz beztlenowych w jelitach myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>. Uzyskane wyniki wskazują, że stosowanie diety HFD przez 8 tygodni nie wpływa istotnie na ilość bakterii tlenowych [Rycina 7.1 A] i beztlenowych [Rycina 7.1 B] izolowanych zarówno z jelita grubego i cienkiego.

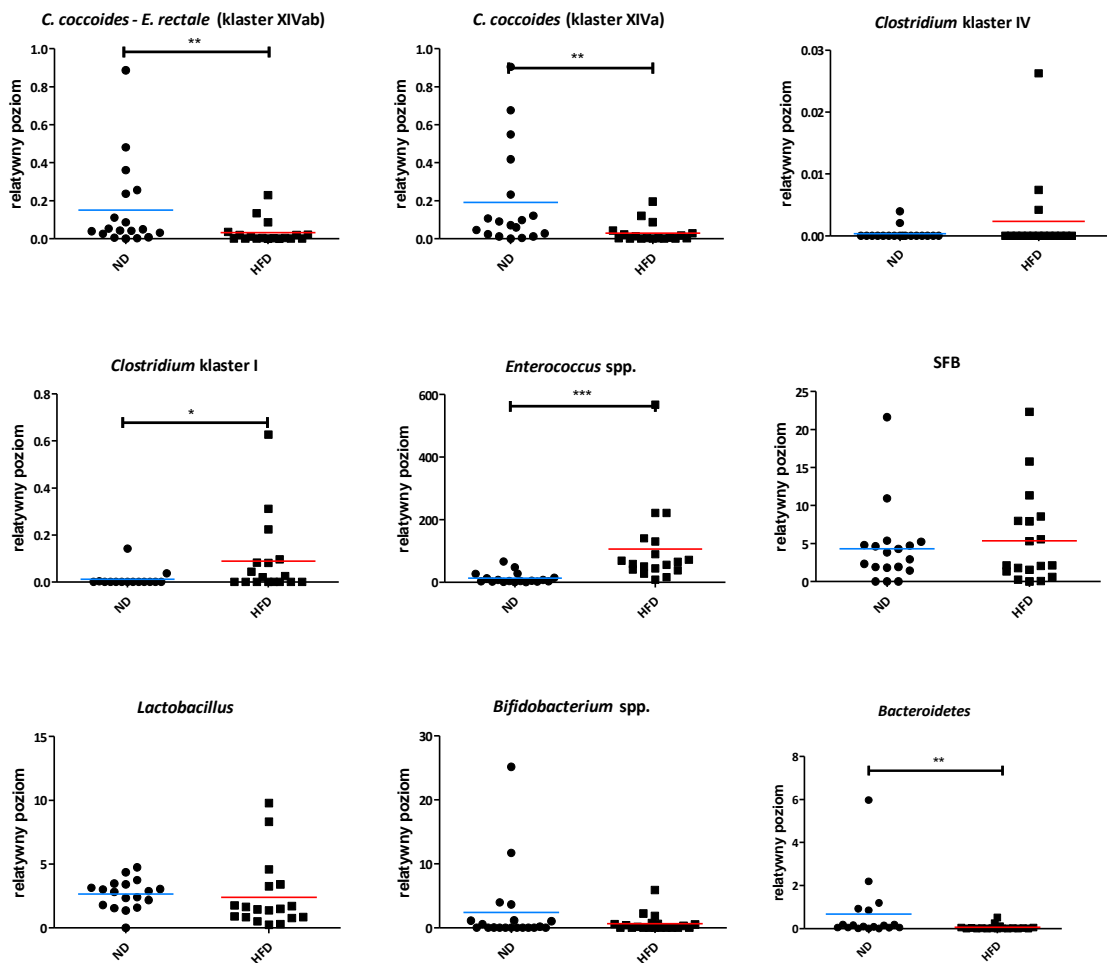


**Rycina 7.1** Ilość bakterii tlenowych [A] i beztlenowych izolowanych z jelita cienkiego i grubego myszy po HFD i ND. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=18-20.

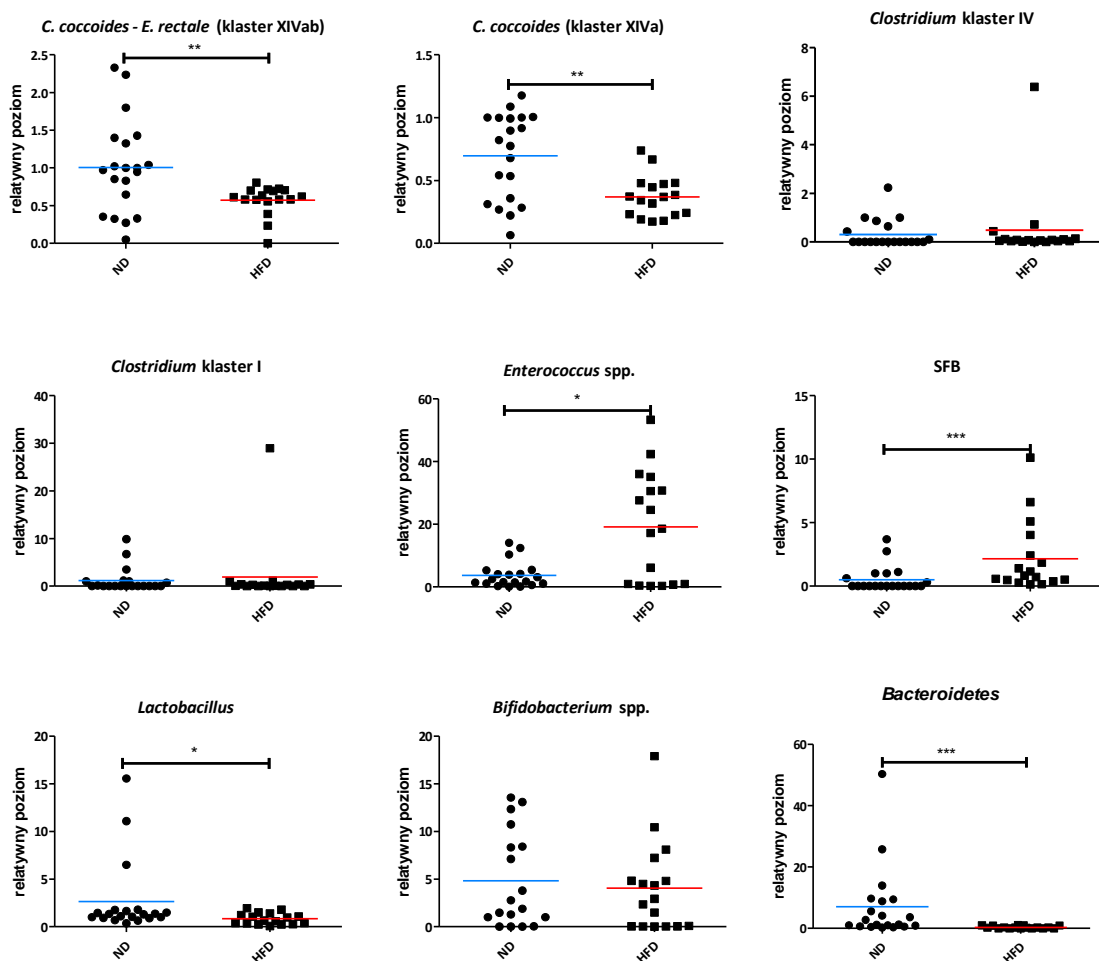
**Rycina 7.2** i **Rycina 7.3** przedstawiają wyniki analizy qPCR dla poszczególnych grup bakterii, odpowiednio izolowanych z zawartości jelita cienkiego i grubego. Wyniki analizy wskazują na spadek ilości bakterii *Clostridium coccooides* – *Eubacterium rectale* (klaster XIVab) oraz jej podgrupy *Clostridium coccooides* (klaster XIVa) zarówno w jelicie cienkim jak i grubym po 8 tygodniach HFD. W jelicie cienkim i grubym zaobserwowano również spadek relatywnego poziomu 16S rDNA dla grupy *Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas* (typ *Bacteroidetes*) oraz wzrost *Enterococcus* spp. u myszy karmionych HFD [**Rycina 7.2**; ND vs HFD; **Rycina 7.3**; ND vs HFD].

Ponadto w jelicie cienkim stwierdzono wzrost ilości bakterii z grupy *Clostridium* klaster I [**Rycina 7.2**; ND vs HFD]. Natomiast nie stwierdzono różnic w obrębie bakterii *Clostridium* klaster IV, SFB, *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* spp.

W jelicie grubym stwierdzono różnice w relatywnym poziomie 16S rDNA dla *Lactobacillus* oraz SFB, w zależności od stosowanej diety. Zastosowanie diety HFD powoduje spadek poziomu bakterii grupy *Lactobacillus* oraz wzrost bakterii SFB [**Rycina 7.3**; ND vs HFD]. Nie stwierdzono różnic w poziomie bakterii *Clostridium* klaster IV, *Clostridium* klaster I oraz *Bifidobacterium* spp.



Rycina 7.2 Poziom 16S rDNA poszczególnych grup bakterii w zawartości jelita cienkiego u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> karmionych ND lub HFD. Wyniki prezentowane jako średnia, n=16-18; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

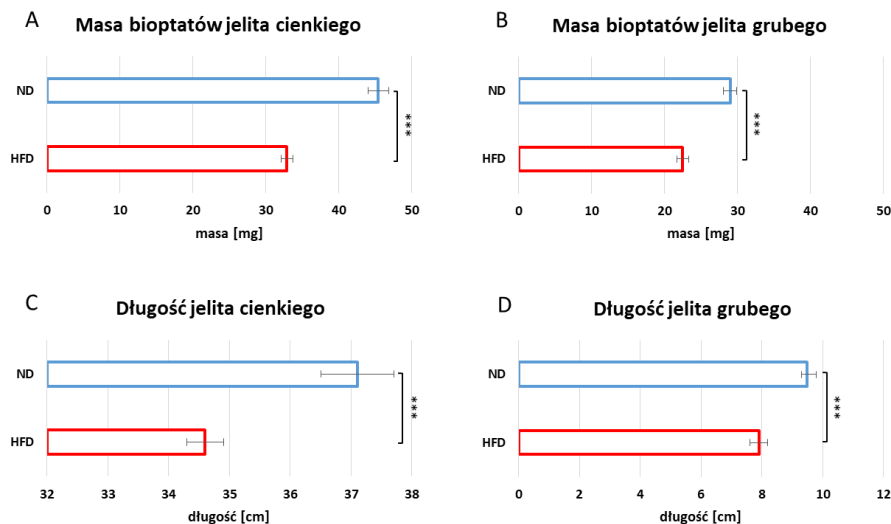


**Rycina 7.3** Poziom 16S rDNA poszczególnych grup bakterii w zawartości jelita grubego u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> karmionych ND lub HFD. Wyniki prezentowane jako średnia, n=17-20; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## 8 Wpływ diety wysokotłuszczowej na błony śluzowe jelit

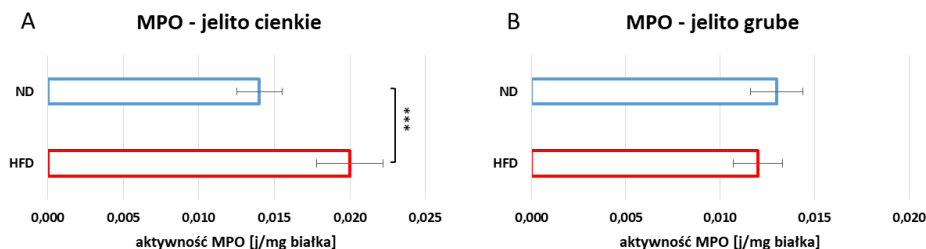
Dysbioza przewodu pokarmowego może wpływać na lokalne mechanizmy obronne związane z błonami śluzowymi, w związku z tym dodatkowo sprawdzono czy HFD wpływa na błonę śluzową jelit.

**Rycina 8.1** przedstawia średnią masę bioptatów oraz długość jelita cienkiego i grubego po 8 tygodniach przyjmowania HFD lub ND. Stosowanie diety HFD powoduje spadek masy bioptatów jelita cienkiego [**Rycina 8.1 A**; ND vs HFD] i jelita grubego [**Rycina 8.1 B**; ND vs HFD]. DIO powoduje także skrócenie długości jelita cienkiego [**Rycina 8.1 C**; ND vs HFD] i grubego [**Rycina 8.1 D**; ND vs HFD]



**Rycina 8.1** Masa bioptatów jelita cienkiego [A] i grubego [B] oraz długość jelita cienkiego [C] i jelita grubego [D]. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=14-34; \*\*\*p<0,001.

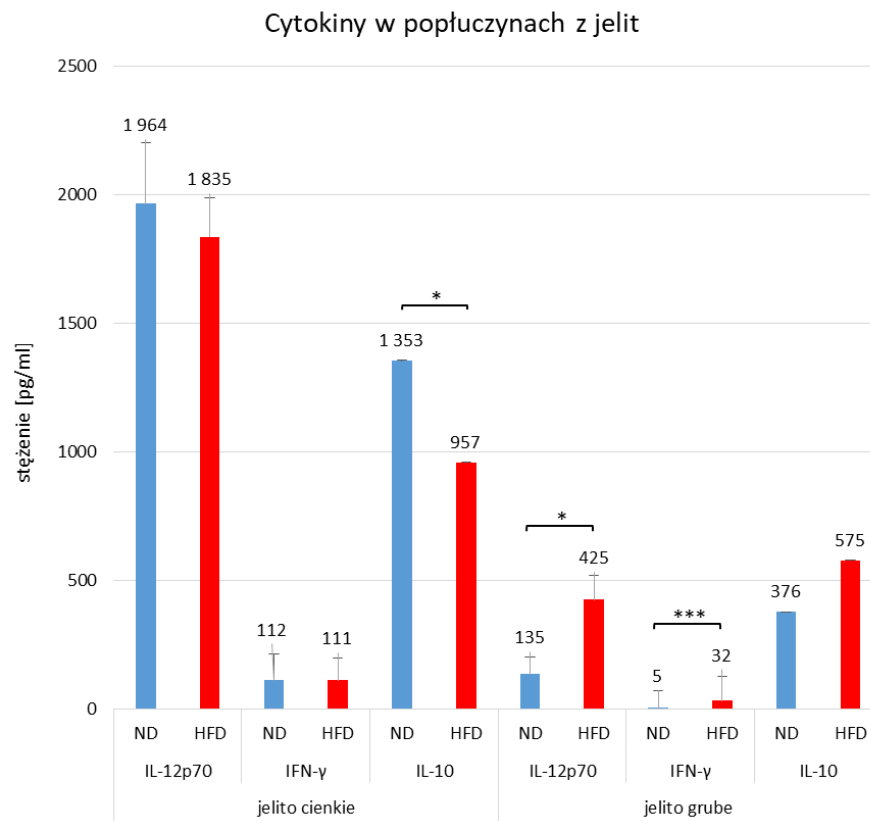
Analiza supernatantów z homogenatów tkankowych pobranych z jelita cienkiego wykazała, że stosowanie diety HFD przez 8 tygodni powoduje wzrost stężenie MPO w ścianie jelita [Rycina 8.2 A; ND vs HFD]. Zależności takiej nie stwierdzono w przypadku jelita grubego [Rycina 8.2 B].



**Rycina 8.2** Aktywność mieloperoksydazy (MPO) w bioptatach jelita cienkiego [A] i grubego [B]. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=14-34; \*\*\*p<0,001.

W celu dalszej oceny statusu immunologicznego jelit, zmierzono poziom cytokin w popłuczynach jelita cienkiego i grubego. Podawanie HFD przez 8 tygodni powoduje spadek stężenia IL-10 [Rycina 8.3; jelito cienkie ND vs HFD] w jelicie cienkim, nie wpływa natomiast na poziom IL-12p70 i IFN- $\gamma$ . W przypadku jelita grubego nie stwierdzono wpływu HFD na stężenie IL-10, natomiast zaobserwowano wzrost

stężenia IL-12p70 oraz IFN- $\gamma$  [Rycina 8.3; jelito grube ND vs HFD]. Poziom IL-6 oraz TNF- $\alpha$  był poniżej poziomu detekcji.



**Rycina 8.3** Stężenie IL-12p70, IFN- $\gamma$  oraz IL-10 w popłuczynach jelita cienkiego i grubego. Wyniki prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM, n=8-21; \*p<0,05.

## Dyskusja

---

Obecnie wiadomo, że otyłość stanowi istotny czynnik ryzyka dla wielu chorób, może również wpływać na ciężkość i przebieg wielu schorzeń, jak również na ich proces leczenia [41]. Uważa się również, że rozwój otyłości jest związany ze zmianami w składzie naturalnej mikrobioty jelit. Badania prowadzone w ciągu wielu lat wykazały, że bakterie żyjące w przewodzie pokarmowym mają znaczący udział w utrzymaniu homeostazy układu odpornościowego [114]. Otyłość uwarunkowana dietą wysokotłuszczową wywiera istotny wpływ na skład naturalnej mikrobioty jelit i w konsekwencji na funkcjonowanie układu immunologicznego [156]. Fakt ten może stanowić wyjaśnienie dla coraz większej częstości występowania chorób zapalnych m.in. alergii u osób otyłych. Choć uważa się, że niektóre czynniki metaboliczne związane z otyłością, takie jak poziomy adipokin, insulinooporność, mikrobiota jelitowa i przewlekły stan zapalny o niskim nasileniu mogą łączyć otyłość i choroby alergiczne, to dokładne mechanizmy biorące udział w tej relacji nie są do końca określone. Badania ostatnich lat wskazują, że DIO modyfikuje klasyczną, mediowaną przez komórki T, reakcję CHS [108, 109, 110]. Wykazano także zaburzenia funkcjonowania komórek układu odpornościowego w tym komórek ILC1 (do których możemy zaliczyć wątrobowe komórki NK) u otyłych ludzi [80, 81, 82, 83] i zwierząt [215, 216, 217].

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę określenia wpływu DIO oraz wynikających z tego zmian mikrobioty jelitowej na mechanizmy immunologiczne leżące u podstaw reakcji CHS mediowanej przez wątrobowe komórki NK. W tym celu użyto myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> nie posiadających komórek T i B, natomiast do wywołania otyłości zastosowano dietę HFD, w której 60% energii pochodziło z tłuszczów. Wcześniejsze badania wykazały, że myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> są podatne na indukcję otyłości przy zastosowaniu odpowiedniej diety [218, 219, 220, 221, 222]. Wyniki niniejszej pracy również wskazują, że zastosowanie diety HFD przez 8 tygodni u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> prowadzi do indukcji otyłości [**Rycina 1.1**]. Istotne różnice w zmianie masy ciała pomiędzy grupą HFD i ND obserwowano od 14 dnia podawania diety do końca trwania eksperymentu. Przyrost masy ciała wynika w dużej mierze ze wzrostu procentowej zawartości tkanki scAT i viscAT w organizmie badanych zwierząt [**Rycina 1.2**]. Otyłości, wywołanej podawaniem HFD, towarzyszy również wzrost



stężenia cholesterolu całkowitego, LDL i HDL, przy jednoczesnym braku różnic w stężeniu triglicerydów [Rycina 2.1], co jest zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi [220]. Analiza biochemiczna [Rycina 2.1] potwierdza również wcześniejsze doniesienia, o wzroście stężenia glukozy w surowicy krwi po stosowaniu HFD [218, 221, 222].

Wątroba jest jednym z najważniejszych narządów w organizmie i odpowiada za metabolizm oraz detoksykację substancji wnikających do organizmu. Choroby wątroby wynikające z otyłości stanowią istotny problem globalny. Liu X i wsp. wykazali, że stosowanie diety HFD przez 11 tygodni u myszy *Rag1<sup>-/-</sup>* prowadzi do wzrostu masy wątroby bez wpływu na jej udział procentowy w masie ciała zwierząt [221]. Natomiast wyniki niniejszej pracy wskazują, że stosowanie diety HFD przez 8 tygodni nie wpływa na bezwzględną masę wątroby, co przekłada się na niższy odsetek w przeliczeniu na masę ciała [Rycina 1.1]. W celu oceny kondycji wątroby wykonuje się oznaczenia enzymów takich jak ALT, AST, GGTP, których wzrost aktywności w surowicy wskazuje na uszkodzenia wątroby. ALT jest najbardziej wrażliwym (choć nie specyficznym) markerem uszkodzenia tego narządu [223]. W niniejszej pracy zaobserwowano wzrost aktywności ALT [Rycina 2.1] w surowicy myszy po zastosowaniu HFD przez 8 tygodni w stosunku do myszy kontrolnych, co może wskazywać na postępujący stan zapalny w wątrobie u otyłych zwierząt.

Tkanka tłuszczowa wydziela liczne hormony i biologicznie aktywne związki regulujące funkcjonowanie samej AT oraz wykazujące działanie ogólnoustrojowe. Otyłości towarzyszy stan zapalny o niskim nasileniu który, prowadzi do chronicznej aktywacji układu immunologicznego. Stan ten prawdopodobnie jest zapoczątkowany w AT, gdzie w wyniku nadmiernej akumulacji tłuszczu dochodzi do lipotoksyczności [42, 43, 45]. Stężenie adipokin, w szczególności leptyny i adiponektyny, w surowicy stanowi marker aktywności adipocytów. W przypadku obu hormonów występuje silna korelacja pomiędzy ilością tkanki tłuszczowej, a ich stężeniem w organizmie [53]. Dodatkowo hormony te mają stwierdzone działanie immunomodulujące [59, 64]. W niniejszej rozprawie, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [221, 222], stwierdzono znaczny wzrost stężenia leptyny w surowicy myszy *Rag1<sup>-/-</sup>* oraz brak różnic w stężeniu adiponektyny [Rycina 2.2]. Liczne badania

wskazują, że w zależności od pochodzenia AT, charakteryzuje się ona odmiennym profilem produkowanych adipokin, jak również odmiennym metabolizmem. Najbardziej ogólny podział różnicuje białą tkankę tłuszczową na scAT i viscAT [224]. Jak bardzo odmienne są te dwie tkanki wskazuje fakt, że przeszczepienie tkanki scAT z okolicy pachwinowej do jamy brzusznej prowadzi do poprawy funkcji metabolicznych oraz zmniejsza stan zapalny w organizmie [225, 226]. W dotychczasowych badaniach podkreślany jest szczególnie niekorzystny wpływ viscAT na organizm. Postuluje się, że u otyłych ludzi produkowane przez viscAT mediatory m.in. IL-6, leptyna, oraz FFAs, ze względu na bliskie położenie, transportowane są bezpośrednio do wątroby przez krążenie wrotne. Połączenie to może częściowo tłumaczyć związek między otyłością „wisceralną” a występowaniem chorób wątroby [227, 228]. Wyniki niniejszej pracy również uwidoczniły różnice w wydzielaniu adipokin przez scAT i viscAT [Rycina 3.1 A i B]. Porównując stężenia wybranych adipokin można stwierdzić, że u nieotyłych myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> tkanka viscAT wydziela więcej IL-6, leptyny, oraz adiponektyny oraz mniej IL-10 w porównaniu do tkanki scAT. Natomiast w przypadku otyłych myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> stwierdzono jedynie wyższy poziom wydzielania hormonów, leptyny i adiponektyny, przez tkankę viscAT w porównaniu do scAT.

Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [53, 229], indukcja otyłości u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> prowadzi do znacznego wzrostu prozapalnej IL-6 oraz leptyny, natomiast powoduje spadek stężenia przeciwzapalnej IL-10, zarówno w przypadku tkanki viscAT jak i scAT [Rycina 3.1 A i B].

Paradoksalnie, poziom klasycznych cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  w tkance scAT izolowanej od myszy nieotyłych jest wyższy w porównaniu do viscAT, oraz ich stężenie w AT jest znacznie niższe od IL-6, a nawet od przeciwzapalnej IL-10 [Rycina 3.1 A i B]. Dodatkowo w wyniku stosowania HFD poziom IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  ulega obniżeniu w tkance scAT. Podobne wyniki, uzyskali Liu X i wsp., którzy wykazali, że poziom ekspresji mRNA dla IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  w tkance viscAT myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> nie ulega zmianie po przyjmowaniu HFD przez 14 tygodni, natomiast w scAT ulega obniżeniu [230]. Wyniki te wskazują, że cytokiny te mogą nie uczestniczyć w rozwoju stanu zapalnego w tkance tłuszczowej u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>.

Komórki układu odpornościowego znajdujące się w wątrobie w normalnych warunkach utrzymują „tolerogeniczne” środowisko, promując wyjątkowo, przy obecności licznych antygenów pochodzących z diety i drobnoustrojów przewodu pokarmowego, odpowiedź przeciwzapalną. Środowisko to wpływa również na komórki NK rezydujące w wątrobie, zmniejszając ich potencjał prozapalny, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności do nadzoru immunologicznego [231]. Komórki wątrobowe NK stanowią osobną populację komórek, różniącą się pod względem fenotypu i funkcji od obwodowych komórek cNK. Pod tymi względami przypominają za to bardziej komórki ILC. Choć stanowią liczną populację komórek odpornościowych wątroby to ich rola w przebiegu infekcji i patogenezie chorób wątroby jest nadal słabo poznana [22]. Stosunkowo niedawno odkryto, że komórki NK izolowane z wątroby biorą udział w odpowiedzi swoistej skierowanej przeciwko haptenom [23, 24, 27] lub wirusom [24], oraz mogą rozwijać pamięć immunologiczną po stymulacji przez cytokiny [34, 35].

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy wskazują, że DIO zaostrza reakcję CHS mediowaną przez wątrobowe komórki NK. Posługując się modelem aktywnym CHS *in vivo* wykazano, że u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> stosowanie HFD przez 8 tygodni diety powoduje wyższy przyrost grubości małżowiny usznej w stosunku do myszy karmionych ND [Rycina 4.1 B]. Natomiast w przypadku skrócenia czasu karmienia dietą HFD do 4 tygodni, nie obserwuje się znamiennych różnic pomiędzy grupą ND i HFD [Rycina 4.1 A]. Wyniki te korelują z aktywnością MPO w małżowinie usznej [Rycina 4.2]. Co ciekawe różnice w aktywności MPO między myszami immunizowanymi przed wywołaniem reakcji a myszami nie immunizowanymi, nie pokrywają się z odsetkiem neutrofilii (CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>) izolowanych z tkanki usznej będących głównymi komórkami produkującymi ten enzym. Pomimo braku różnic w odsetku komórek CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> pomiędzy grupą negatywną i pozytywną [Rycina 4.5 D] w niniejszej pracy wykazano wzrost odsetka tych komórek u myszy z DIO. Rouzaire i wsp., również stwierdzili, brak charakterystycznego napływu neutrofilów do małżowiny usznej u nieotyłych myszy *Rag2*<sup>-/-</sup> po wywołaniu reakcji CHS [25]. Dalsza analiza cytometryczna tkanki usznej, nie wykazała także różnic w odsetku komórek NK1.1<sup>+</sup> pomiędzy grupą negatywną i pozytywną [Rycina 4.5 A]. Nie stwierdzono także różnic w ekspresji markerów CD11b oraz NKG2D, na komórkach

NK1.1<sup>+</sup> [Rycina 4.5 B i C]. Wyniki te wskazują, że molekuly te, choć istotne w przebiegu CHS [23, 24, 27], nie są wystraszające do identyfikacji komórek efektorowych. Dotychczasowe prace wskazują na akumulację efektorowych komórek NK w miejscu ponownej depozycji haptenu, jednak wykorzystują do tego celu model adoptywnego transferu komórek wątrobowych znakowanych fluorescencyjnie lub przy użyciu szczepów kongenicznych, co ułatwia identyfikację komórek efektorowych izolowanych ze skóry, bez konieczności określania ich dokładnego fenotypu [24, 25]. W 2018 roku, w modelu CHS indukowanym OX u mysz *Rag1*<sup>-/-</sup>, Wang i wsp. wykazali wzrost komórek CD45<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>CD49a<sup>+</sup>IL-7Rα<sup>+</sup> w małżowinie usznej po wywołaniu reakcji. Podobne wyniki uzyskali Wight i wsp., w modelu indukowanym DNFB, którzy przy użyciu barwienia immunohistochemicznego pokazali wzrost infiltracji komórek NKp46<sup>+</sup> do skóry u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> poddanych wcześniejszej immunizacji.

Natomiast w niniejszej pracy w zastosowanym modelu DIO widać, znaczny wzrost komórek NK1.1<sup>+</sup> [Rycina 4.5 A], neutrofilii [Rycina 4.5 D] i makrofagów [Rycina 4.5 E] w nacieku zapalnym, który odpowiada za większy przyrost grubości uszu obserwowany *in vivo* u myszy otyłych. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi z ELN [Rycina 4.6]. Ponadto zaobserwowano, że w tkance usznej otyłych myszy dochodzi do wydzielania większej ilości prozapalnego INF-γ [Rycina 4.4 B] i mniejszej ilości przeciwzapalnej IL-10 [Rycina 4.4 A] w porównaniu do myszy nieotyłych. DIO u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> wpływa również na zwiększenie przepuszczalności naczyń [Rycina 4.3].

Następnie analiza komórek LMNC wykazała, że w fazie indukcji komórek efektorowych w badanym modelu CHS, w wyniku pierwszego kontaktu z haptenu DNFB, nie dochodzi do zwiększenia liczby komórek LMNC [Rycina 5.1], ani procentowej zawartości komórek NK1.1<sup>+</sup> [Rycina 5.3 A] u myszy immunizowanych w stosunku do myszy „naiwnych”. Komórki te nie wykazują również większej ekspresji IFN-γ [Rycina 5.4 A], oraz receptora NKG2D [Rycina 5.4 D]. Wyniki te są spójne, z wcześniejszymi doniesieniami. O’Leary i wsp. którzy wykazali, że choć receptor NKG2D bierze udział w reakcji CHS to jego ekspresja nie wzrasta po immunizacji [23]. Natomiast kolejne badania pokazały, że reakcja ta jest zależna m.in. od IFN-γ, ale podczas immunizacji nie dochodzi do wzrostu odsetka

komórek NK produkujących tę cytokinę [27]. Interesujący jest natomiast fakt, że restumulacja komórek LMNC *in vitro* antygenem DNP-BSA, prowadzi do znacznego wzrostu stężenia tej cytokiny w supernatantach z hodowli komórkowej u myszy otyłych [Rycina 5.2 A]. Wyniki te potwierdziła również analiza cytometryczna, która wykazała wzrost odsetka komórek NK1.1<sup>+</sup> z ekspresją IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> [Rycina 5.4 A]. Różnice w ekspresji IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pomiędzy grupami są mniej wyraźne, w porównaniu do różnic uzyskanych w stężeniu IFN- $\gamma$  w supernatantach z hodowli LMNC, co może wynikać z jednej strony z różnicy w sposobie stymulacji komórek (w hodowli użyto antygeny, a w analizie cytometrycznej użyto nieswoistych stymulatorów - PMA i jonomycynę), z drugiej natomiast z faktu, że komórki NK1.1<sup>+</sup> nie są jedynymi komórkami produkującymi IFN- $\gamma$ . Warto w tym miejscu zaznaczyć, że wzrost IFN- $\gamma$  u myszy otyłych można częściowo tłumaczyć wzrostem poziomu IL-12p70 [Rycina 5.2 B], która ma zdolność do aktywacji komórek NK do wydzielania dużych ilości IFN- $\gamma$  [232]. Wykazano również, że IL-12 promuje *in vitro* dalsze dojrzewanie komórek NK oraz zwiększa ich cytotoksyczność [233]. Obok syntezy IFN- $\gamma$ , do funkcji efektorowych komórek NK należy aktywność cytotoksyczna oraz produkcja cytokin przeciwzapalnych [234]. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że otyłość indukowana u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> powoduje wzrost ekspresji granzymu B (który koreluje z aktywnością cytotoksyczną komórek NK) w komórkach NK1.1<sup>+</sup>, jednak tylko w przypadku komórek „naiwnych” [Rycina 5.4 C]. Sugeruje to, że otyłość może wpływać w różny sposób na aktywność komórek NK w zależności od braku lub współistnienia innych czynników pobudzających - zwiększa cytotoksyczność komórek w stanie „niepobudzonym”, oraz produkcję IFN- $\gamma$  przy pobudzeniu haptenem. Ze względu na ekspresję powierzchniową molekuł CD27 i CD11b komórki NK można podzielić na cztery subpopulacje, reprezentujące poziom dojrzałości oraz funkcje tych komórek. Różnicowanie komórek NK przebiega w kolejności od najmniej dojrzałych komórek CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>, poprzez CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> aż do najbardziej dojrzałych komórek CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>. Komórki mniej dojrzałe CD11b<sup>-</sup> charakteryzują się większą proliferacją w odpowiedzi na stymulację cytokinami, natomiast komórki bardziej dojrzałe CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+/-</sup> wykazują zwiększone funkcje efektorowe związane z produkcją IFN- $\gamma$  oraz aktywnością cytotoksyczną [235, 236]. Niektórzy badacze postulują, że wraz ze wzrostem aktywności cytotoksycznej komórek NK maleje ich zdolność do wytwarzania IFN- $\gamma$  [237]. W niniejszej pracy nie

zaobserwowano, różnic w odsetku poszczególnych populacji komórek NK1.1<sup>+</sup> u myszy „naiwnych” karmionych ND vs HFD [**Rycina 5.3 B**]. Podczas gdy u myszy otyłych po immunizacji znacznie maleje odsetek komórek niedojrzałych CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> oraz wzrasta odsetek komórek dojrzałych CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> [**Rycina 5.3 C**]. Komórki NK pamięci można uznać za subpopulację reprezentującą końcowy etap dojrzewania/różnicowania komórek NK. Jednak nie jest jeszcze jasne, czy tworzenie komórek pamięci zachodzi w przebiegu różnicowania się dojrzałych komórek w kolejne stadium rozwoju komórek NK, czy też komórki pamięci mogą powstać z mniej zróżnicowanych komórek w zależności od środowiska stymulującego [238]. W chwili obecnej część badań wskazuje, że komórki efektorowe w reakcji CHS stanowią populację CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> [27, 239]. W związku z czym można przypuszczać, że otyłość u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> zwiększa odsetek wątrobowych komórek efektorowych w reakcji CHS. Przypuszczenia te dodatkowo może potwierdzać fakt, że wcześniejsze doniesienia naukowe wskazują, że zastosowanie restrykcyjnej kalorycznej u myszy C57BL/6 powoduje wzrost odsetka komórek mniej zróżnicowanych CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> i odpowiednio niższy odsetek komórek wysoce zróżnicowanych CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> m.in. w śledzionie i płucach [240, 241].

Komórki NK stanowią bardzo heterogenną grupę komórek, która w zależności od mikrośrodowiska oraz stymulacji cytokinowej może niekiedy tworzyć subpopulację komórek tolerogennych produkujących IL-10. Szczególnie dotyczy to wątrobowych komórek NK, których jedną z funkcji jest tolerancja wobec „nieszkodliwych” antygenów i utrzymanie homeostazy wątroby. Produkowane przez komórki DCs, KCs, sinusoidalne komórki śródbłonna wątroby i komórki gwiaździste, IL-10 i TGF- $\beta$  stanowią istotne czynniki promujące powstawanie tolerogennych komórek NK [242, 243]. Badania wskazują, że działanie IL-10 na komórki NK modyfikuje fenotyp tych komórek, zwiększając odsetek komórek wykazujących ekspresję receptora NKG2A i brak ekspresji receptorów Ly49 wiążących MHC klasy I, tym samym utrzymuje je w stanie obniżonej reaktywności. [244]. Pomimo, iż otyłość wywołana u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> nieznamienne obniża stężenie IL-10 w supernatantach z hodowli LMNC [**Rycina 5.2 C**], to analiza cytometryczna wykazała, że wśród komórek CD11b<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>, izolowanych od myszy otyłych, znacząco spada ekspresja IL-10 szczególnie w grupie myszy immunizowanych [**Rycina 5.5 A**]. Mniejsza ekspresja IL-10 w wątrobie, może

tłumaczyć spadek odsetka tolerogennych komórek NK1.1<sup>+</sup> wykazujących ekspresję IL-10 [Rycina 5.5 B]. Warto również zwrócić uwagę, że w przypadku myszy z normalną masą ciała spadek odsetka tych komórek występuje po indukcji CHS [Rycina 5.5 B], co wskazuje, że czynniki środowiskowe takie jak hapteny mogą wpływać na wątrobowe komórki NK1.1<sup>+</sup> zmniejszając ich potencjał tolerogenny.

Głównym źródłem adiponektyny w organizmie są adipocyty tkanki tłuszczowej. Jednak istnieją doniesienia o lokalnym wydzielaniu tego hormonu również przez inne tkanki m.in. kości [245], kardiomiocyty [246], przysadkę mózgową [247] i mięśnie szkieletowe [248], generując w ten sposób miejscowe wysokie stężenie tego hormonu. Również w wątrobie wykryto ekspresję adiponektyny [249, 250,], choć nie wszystkie badania ten fakt potwierdzają [251, 252]. Aktualnie nie wiadomo skąd wynikają te różnice w doniesieniach, szczególnie jeśli chodzi o ekspresję mRNA dla tego hormonu. Natomiast wykrycie białka można częściowo wyjaśnić wychwytem adiponektyny przez hepatocyty [252]. Choć zastosowanie diety HFD przez 8 tygodni u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> nie wpływa na stężenie adiponektyny w surowicy krwi [Rycina 1.1] to w supernatantach z hodowli LMNC zaobserwowano istotne obniżenie stężenia tego hormonu u myszy otyłych w stosunku do myszy nieotyłych [Rycina 5.2]. Wolf i wsp. w swoich badaniach wykazali, że komórki CD11b<sup>+</sup> izolowane z wątroby mogą stanowić źródło lokalnie produkowanej adiponektyny [253]. Konieczne są dalsze badania aby jednoznacznie stwierdzić jakie komórki były źródłem adiponektyny w opisanym doświadczeniu. Warto jednak zaznaczyć, że we frakcji komórek LMNC brak jest hepatocytów, które mogłyby uwalniać ten hormon do supernatantu, co może sugerować, że adiponektyna wydzielana jest przez wyizolowane makrofagi wątrobowe. Lokalne obniżenie adiponektyny w wątrobie, której działanie immunomodulujące jest szeroko opisywane w publikacjach naukowych [64, 66, 254], może dodatkowo wpływać na indukcję i przebieg reakcji CHS indukowanej przez komórki NK. Dotychczasowe publikacje wskazują adiponektynę jako negatywny regulator cytotoksyczności komórek NK oraz produkcji IFN- $\gamma$  przez mysie komórkach NK. Komórki te wykazują niewielką ekspresję zewnątrzkomórkową receptorów dla adiponektyny w stanie spoczynku, jednak aktywacja komórek np. w przebiegu infekcji wirusowej prowadzi do zwiększenia ekspresji receptorów dla adiponektyny na powierzchni komórek. Sugeruje to,

że adiponektyna głównie ma działanie immunomodulujące na zaktywowane komórki [93, 255].

W celu sprawdzenia czy środowisko w którym zostały indukowane komórki efektorowe NK trwale wpływa na aktywność tych komórek wykonano transfer komórek LMNC wyizolowanych od wcześniej immunizowanych myszy *Rag1*<sup>-/-</sup>. Wyniki niniejszego doświadczenia wykazały, że transfer komórek LMNC z myszy otyłych do syngenicznych naiwnych biorców z normalną masą przenosi reakcję CHS, jednak nie nasila jej, jak mogłyby sugerować wcześniejsze wyniki. Dodatkowo nie stwierdzono również aby transfer komórek LMNC od myszy nieotyłych do otyłych syngenicznych naiwnych biorców nasilał przenoszoną reakcję CHS. Wskazuje to, że samo środowisko związane z otyłością i metazapaleniem u biorców nie powoduje znamienego nasilenia aktywności przenoszonych komórek [Rycina 6.1]. Różnice pomiędzy grupą badaną ND (transfer komórek LMNC po HFD) i grupą badana HFD (transfer komórek po ND), mogą natomiast sugerować, że środowisko prozapalne związane z otyłością odgrywa istotną rolę w kształtowaniu aktywności komórek NK, ale jest konieczne zarówno w fazie indukcji jak i w fazie wywołania reakcji CHS [Rycina 6.1]. Wcześniejsze badania wskazują, że komórki NK oprócz pamięci hapteno-specyficznej mogą nabywać właściwości podobne do pamięci immunologicznej poprzez *in vitro* pre-aktywację mieszaniną cytokin (IL-12, IL-15, i IL-18). Restymulacja takich komórek przez cytokiny powoduje wzrost sekrecji IFN- $\gamma$ , ale nie wpływa na cytotoksyczność tych komórek. Dodatkowo wyższa aktywność komórek zostaje zachowana *in vivo* po adoptywnym transferze [34, 35, 256]. Doświadczenie z wykorzystaniem modelu adoptywnego transferu w niniejszej pracy z założenia miało sprawdzić czy kształtowana w środowisku prozapalnym komórka pamięci NK jest zdolna do przeniesienia wyższej odpowiedzi CHS na naiwnych nieotyłych biorców. Jednak w kontekście doniesień na temat „pamięci” indukowanej cytokinami warto w przyszłości sprawdzić czy przeniesienie komórek LMNC izolowanych od otyłych myszy do myszy otyłych nie indukowałoby jeszcze wyższej odpowiedzi CHS u myszy otyłych. Jak dotąd brak dowodów naukowych na indukcję „pamięci” immunologicznej na cytokiny wewnątrz organizmu. W badaniach na szczurach wykazano także, że zmieniony pod wpływem otyłości fenotyp komórek NK wraca do stanu normalnego po przeniesieniu z osobników otyłych do osobników



z normalną masą [257]. Warto również nadmienić, że w dotychczasowych badaniach stwierdzono, że komórki ILC1, do której to grupy należą wątrobowe komórki NK, wykazują plastyczność w odpowiedzi na mikrośrodowisko w jakim się znajdują [33, 36], co również może tłumaczyć brak zwiększonej reakcji CHS w użytym modelu.

Otyłość wynikająca z niewłaściwej diety znacząco oddziałuje na skład mikrobioty jelitowej, co w efekcie wpływa na funkcjonowanie układu odpornościowego [122]. Dotychczasowe doniesienia również wskazują, że mikrobiota jelitowa może mieć wpływ na przebieg klasycznej reakcji CHS [209, 210, 211, 212, 213]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wykazały, że podawanie myszom HFD przez 8 tygodni nie wpłynęło na ilości drobnoustrojów w jelitach [Rycina 7.1] natomiast prowadzi do dysbiozy zarówno w obrębie jelita cienkiego [Rycina 7.2] jak i grubego [Rycina 7.3]. Liczne badania mikrobioty u otyłych zwierząt i ludzi wskazują na spadek poziomu bakterii Gram (-) *Bacteroidetes* oraz wzrost poziomu bakterii Gram (+) *Firmicutes* [165, 168, 169]. W niniejszej analizie również stwierdzono spadek relatywnego poziomu 16S rDNA dla bakterii *Bacteroidetes* w jelicie cienkim i grubym. Zastosowanie diety HFD u myszy *Rag1<sup>-/-</sup>* powoduje także znaczne zmiany w obrębie bakterii *Firmicutes* do których należą bakterie z rodzaju *Clostridium*, *Enterococcus* i *Lactobacillus*. Analiza wykazała spadek bakterii *C. coccoides-E. rectale* (klaster XIVab), *C. coccoides* (klaster XIVa) oraz znaczny wzrostu *Enterococcus* spp. u otyłych myszy, zarówno w jelicie cienkim jak i grubym. Dodatkowo w jelicie cienkim stwierdzono wzrost bakterii *Clostridium* klaster I [Rycina 7.2], natomiast w jelicie grubym spadek poziomu *Lactobacillus* [Rycina 7.3]. Stwierdzono również, wzrost bakterii SFB u otyłych myszy w jelicie grubym [Rycina 7.3]. Wcześniejsze badania wykazały, że transfer mikrobioty jelitowej od myszy pojonych antybiotykiem u których doszło do wzrostu poziomu bakterii *Clostridium* klaster XIVa, *Bacteroidetes* i *Bifidobacterium* spp, przy jednoczesnym spadku proporcji bakterii SFB, hamuje reakcję CHS u biorców. Otrzymany profil mikrobioty w wyniku antybiotykoterapii działał przeciwzapalnie i przyczyniał się do indukcji komórek regulatorowych [211], co może wskazywać, że otrzymany u otyłych myszy *Rag1<sup>-/-</sup>* profil bakterii może działać prozapalnie i nasilać reakcję CHS.

Zmiana biodostępności substratu może zmieniać skład populacji bakterii wytwarzających SCFA, a tym samym wpłynąć na ich produkcję [258]. Wytwarzanie SCFA odbywa się głównie w dystalnej części jelita cienkiego i proksymalnej części okrężnicy, w której węglowodany balastowe i inne słabo trawione polisacharydy są fermentowane przez bakterie, w tym bakterie z rodzaju *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria* [259]. Spośród SCFA, najbardziej przeciwdziałającym otyłości jest kwas masłowy, którego głównymi producentami są bakterie *Firmicutes*, a w szczególności *Clostridium* klaster IV i XIVa [260]. Obserwowane w niniejszej pracy zmiany w składzie mikrobioty jelitowej myszy *Rag1<sup>-/-</sup>* po zastosowaniu HFD mogą wynikać, ze zmniejszonej dostępności błonnika pokarmowego który stanowi główny substrat do produkcji SCFA [178]. Zmniejszenie liczby bakterii produkujących SCFA, może nieść za sobą wiele negatywnych konsekwencji, gdyż wykazano, że mają one silny potencjał przeciwzapalny [158, 159, 160], wpływają na metabolizm wątroby [203], oraz są istotne do utrzymania prawidłowej bariery jelitowej [178].

Dieta wysokotłuszczowa i towarzysząca jej dysbioza powodują zwiększenie przepuszczalności jelit poprzez wpływ na połączenia ścisłe pomiędzy IECs, wytwarzanie hydrofobowych kwasów żółciowych (wpływających negatywnie na barierę jelitową), aktywację szlaków prozapalnych, stresu oksydacyjnego i apoptozy IECs [261]. W niniejszej pracy również stwierdzono zmiany w obrębie morfologii przewodu pokarmowego. Przede wszystkim stwierdzono, że DIO powoduje ścięczenie ścian jelita cienkiego i grubego, co korelowało, ze zmniejszeniem masy bioptatów jelita cienkiego [**Rycina 8.1 A**] i grubego [**Rycina 8.1 B**]. Podobne wyniki uzyskali Liu X i wsp. którzy wykazali, że zastosowanie u myszy *Rag1<sup>-/-</sup>* HFD przez 11 tygodni powoduje istotny spadek masy jelita czczego, jelita krętego oraz okrężnicy [221]. Stwierdzono również skrócenie jelita cienkiego [**Rycina 8.1 C**] i grubego [**Rycina 8.1 D**] u myszy *Rag1<sup>-/-</sup>* karmionych HFD. Skrócenie jelita towarzyszy zapaleniu śluzówki wywołanym chemioterapią [262], jak i zapaleniu jelita grubego w modelu eksperymentalnym [263], co sugeruje, że DIO przyczynia się do rozwoju stanu zapalnego w ścianie jelit myszy *Rag1<sup>-/-</sup>*. W celu potwierdzenia tych wyników wykonano pomiar aktywność MPO w bioptatach pobranych z jelita cienkiego i grubego. Analiza ta wykazała, że DIO powoduje wzrost aktywność MPO w ścianie jelita cienkiego [**Rycina 8.2 A**] natomiast nie wpływa na aktywność tego enzymu

w jelicie grubym [Rycina 8.2 B]. Wcześniejsze badania wykonane na otyłych szczurach wykazały również, że w ścianie jelita krętego występuje stan zapalny któremu towarzyszy wzrost aktywności MPO, oraz aktywacji receptora TLR4 [264]. Analiza popłuczyn jelitowych w niniejszej pracy wykazała także, spadek stężenia IL-10 w jelicie cienkim, przy jednoczesnym braku różnic w stężeniu tej cytokiny w jelicie grubym u myszy karmionych HFD [Rycina 8.3]. Dotychczasowe badania wykazały istotną rolę IL-10 w utrzymaniu bariery jelitowej. Myszy IL-10 knock-out mają zwiększoną przepuszczalność jelit [265], a ekspozycja IECs na działanie tej cytokiny podtrzymuje połączenia ścisłe między komórkami nawet w obecności czynników prozapalnych [266]. Wykazano także, że spadek ekspresji mRNA IL-10 w jelicie krętym u otyłych zwierząt poprzedza wzrost ekspresji mRNA dla cytokin prozapalnych. W jelicie grubym nie stwierdzono spadku ekspresji IL-10 [267]. Wzrost ekspresji IL-10 w jelitach następuje również po kolonizacji bakteriami *Clostridium*, szczególnie klaster XIV i IV [148]. W niniejszej pracy wykazano, że zastosowanie HFD u myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> powoduje istotny spadek relatywnego poziomu *C. coccooides-E. rectale* (klaster XIVab) i *C. coccooides* (klaster XIVa), co częściowo może tłumaczyć spadek stężenia IL-10 w jelicie cienkim. Analiza popłuczyn z jelita grubego wykazała natomiast, wzrost stężenia IL-12p70 i IFN- $\gamma$  u otyłych myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> [Rycina 8.3]. Wcześniejsze badania podobnie wskazują na wzrost ekspresji IL-12p40 w proksymalnej części okrężnicy po zastosowaniu HFD [268]. Natomiast badania w modelu eksperymentalnym zapalenia jelita grubego wskazują, że IL-12 bierze udział w początkowej fazie choroby [269], co może wskazywać na to, że jelicie grubym pod wpływem zmiany diety dochodzi do stanu zapalnego. Natomiast wzrost IFN- $\gamma$  w jelicie grubym po HFD może przyczyniać się do zaburzeń w obrębie połączeń ścisłych między komórkami IECs co zwiększa przepuszczalność bariery jelitowej [270]. Choć dotychczas uzyskane wyniki mogą wskazywać na istnienie stanu zapalnego w jelitach pod wpływem HFD to jednak dalsza analiza materiału tkankowego jest niezbędna do określenia profilu cytokinowego w jelicie cienkim i grubym.

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, że otyłość indukowana dietą oraz wynikające z niej zmiany w mikrobiocie jelitowej istotnie modulują lokalną i systemową odpowiedź zapalną, przyczyniając się do zaostrzenia reakcji CHS mediowanej przez wątrobowe komórki NK.

## Wnioski

---

1. Stosowanie diety wysokotłuszczowej przez 8 tygodni powoduje rozwój otyłości u myszy *Rag1<sup>-/-</sup>*, wraz z towarzyszącymi zmianami metabolicznymi oraz stanem zapalnym w obrębie tkani tłuszczowej,
2. Otyłość wywołana stosowaniem diety wysokotłuszczowej przez 8 tygodni zaostrza reakcję nadwrażliwości kontaktowej mediowaną przez wątrobowe komórki NK u myszy,
3. Otyłość indukowana dietą wpływa na zwiększenie odsetka komórek reakcji zapalnej w małżowinie usznej u myszy *Rag1<sup>-/-</sup>*,
4. Otyłość indukowana dietą zaostrza stan zapalny w wątrobie poprzez wpływ na profil cytokin produkowanych przez jednojądrzaste komórki wątrobowe oraz przesunięcie fenotypu tych komórek w kierunku prozapalnym,
5. Stosowanie diety wysokotłuszczowej przez 8 tygodni prowadzi do spadku ilości bakterii o właściwościach przeciwzapalnych w obrębie mikrobioty jelit oraz indukuje stan zapalny w jelitach.

## Streszczenie

---

Wcześniejsze badania dowiodły, że wątrobowe komórki NK mogą mediować reakcję nadwrażliwości kontaktowej (CHS) u myszy. Układ metaboliczny i immunologiczny są ściśle ze sobą połączone i funkcjonalnie zależne. Istnieje wiele doniesień dowodzących, że otyłości towarzyszy przewlekły stan zapalny o niskim nasileniu i może promować niektóre choroby zapalne. Wykazano także, że otyłość indukowana dietą (DIO) nasila klasyczną reakcję CHS mediowaną przez limfocyty T u myszy C57BL/6. Uważa się również, że rozwój otyłości łączy się ze zmianami w składzie naturalnej mikrobioty jelitowej. Dieta wysokotłuszczowa (HFD) wywołująca DIO wpływa na skład mikrobioty jelitowej, która w konsekwencji modyfikuje aktywność układu odpornościowego. Może to tłumaczyć wzrastającą częstość występowania chorób o podłożu zapalnym, w tym alergii, u otyłych pacjentów.

Projekt ten przedstawia słabo zbadany temat, jakim jest wpływ DIO na przebieg CHS z udziałem komórek NK u myszy oraz rolę naturalnej mikrobioty jelitowej w obserwowanym zjawisku.

Przedstawione dane dowodzą, że myszy karmione HFD przez 8 tygodni, ale nie przez 4 tygodnie, rozwijają zaostrzoną reakcję CHS, ocenianą na podstawie pomiaru obrzęku uszu, w porównaniu ze zwierzętami karmionymi normalną dietą (ND) przed indukcją CHS. Zwiększony obrzęk uszu u myszy karmionych HFD potwierdzono zwiększoną aktywnością MPO w homogenatach z uszu i zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych. Ponadto analiza stężenia cytokin w homogenatach z uszu wykazała, że HFD zwiększa IFN- $\gamma$  i zmniejsza wytwarzanie IL-10. Dodatkowo, analiza komórek infiltrujących małżowinę uszną i węzły chłonne drenujące małżowinę uszną wykazała większą liczbę komórek zapalnych u myszy karmionych HFD.

Aby ustalić, w jaki sposób DIO wpływa na reakcję CHS mediowaną przez komórki NK, wątrobowe komórki jednojądrzaste (LMNC) hodowano przez 48 godzin w obecności antygeny DNP-BSA w celu uzyskania supernatantów do oceny stężenia cytokin. Ponadto LMNC wybarwiono przeciwciałami monoklonalnymi skonigowanymi z flurochromem i oceniano przy użyciu cytometrii przepływowej. Analiza cytokin wykazała, że karmienie HFD znacząco zwiększa stężenie IFN- $\gamma$  i IL-12p70 oraz

zmniejsza stężenie adiponektyny w supernatantach z hodowli LMNC. Analiza cytometryczna ujawniła, że podawanie HFD przed uczuleniem na DNFB zwiększa odsetek komórek NK1.1<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> i wpływa na rozwój i dojrzewanie komórek NK1.1<sup>+</sup>. Dodatkowo DIO zmniejsza odsetek komórek NK1.1<sup>+</sup> i NK1.1-CD11b<sup>+</sup> wytwarzających IL-10 w wątrobie. Ostatnie badania z wykorzystaniem modelu adoptywnego transferu wykazały, że LMNC są w stanie przenieść odpowiedź CHS na naiwnych syngenicznym biorców, podczas gdy komórki izolowane z węzłów chłonnych i śledziony nie mają takiej zdolności. Biorąc to pod uwagę, aby zweryfikować, czy DIO wpływa na funkcjonowanie wątrobowych komórek NK, przeprowadzono adoptywny transferu komórek. Eksperyment ten wykazał, że przeniesienie komórek LMNC z otyłych myszy do syngenicznych naiwnych biorców o normalnej wadze przenosi reakcję CHS, ale jej nie zaostrza. Jednak uzyskane dane mogą sugerować, że wywołany otyłością stan metazapalenia istotnie wpływa na aktywności komórek NK i jest niezbędny zarówno w fazie indukcji, jak i w fazie efektorowej reakcji CHS.

Następnie przeprowadzono analizę bakteryjnego DNA metodą qPCR w celu ustalenia, czy DIO prowadzi do dysbiozy mikrobioty jelitowej u mysz *Rag1*<sup>-/-</sup>. Stwierdzono, że podawanie HFD przez 8 tygodni przesuwaa profil bakterii w kierunku szczepów prozapalnych. W jelitach poziom bakterii przeciwzapalnych wytwarzających SCFA, w tym grupa *Clostridium coccoides* – *Eubacterium. rectale* (klaster XIVab), podgrupa *Clostridium coccoides* (klaster XIVa) i grupa *Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas* (typ *Bacterioidetes*), uległy znacznemu obniżeniu u myszy karmionych HFD. Ponadto bakterie *Lactobacillus*, należące do typu *Firmicutes*, były mniej liczne w zawartości jelita grubego izolowanej od otyłych myszy. Jednocześnie poziom immunomodulujących bakterii SFB w jelicie grubym i *Clostridium* klaster I w jelicie cienkim uległ zwiększeniu. Ponadto bakterie *Enterococcus* spp. były bardziej liczne w jelicie cienkim i grubym otyłych myszy. Poziom *Clostridium* klaster IV i *Bifidobacterium* spp. pozostał bez zmian.

Ponieważ dysbioza wywołana stosowaną dietą może wpływać na odporność lokalną, oceniono również morfologię ścian jelit, a stan zapalny jelit określono na podstawie aktywności MPO. Stwierdzono, że DIO powoduje ścięczenie ścian jelita cienkiego i grubego, co koreluje ze spadkiem masy bioptatów jelita. Pomiar długości jelit wykazał, że DIO powoduje również skrócenie jelita cienkiego i grubego, co jest

związane z stanem zapalnym w obrębie ścian jelit. Dalsza analiza wykazała, że DIO zwiększa aktywność MPO w ścianie jelita cienkiego, jednak nie wpływa na aktywność tego enzymu w jelicie grubym. Analiza popłuczyn jelitowych wykazała również zmniejszenie stężenia IL-10 w jelicie cienkim i wzrost stężenia IL-12p70 i IFN- $\gamma$  w jelicie grubym. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na obecność stanu zapalnego w jelitach myszy *Rag1*<sup>-/-</sup> karmionych HFD.

Podsumowując, niniejsze wyniki sugerują, że DIO i wynikające z tego zmiany w mikrobiocie jelitowej istotnie modulują miejscową i układową odpowiedź zapalną, przyczyniając się do zaostrzenia odpowiedzi CHS mediowanej przez komórki NK wątroby.



## Abstract

---

Previous studies showed that liver NK cells can mediate contact hypersensitivity (CHS) reaction in mice. The metabolic and immune systems are closely linked and functionally dependent. There are many reports showing that obesity is accompanied with chronic low-grade inflammation and it can promote several inflammatory diseases. It was shown that diet-induced obesity (DIO) aggravates classical T cell-mediated CHS in C57BL/6 mice. It is also believed that development of obesity is associated with changes in the composition of the natural gut microbiota. High fat diet (HFD) promoting DIO affects the composition of the intestinal microbiota, which then modifies activity of the immune system. This may explain the increasing prevalence of inflammatory diseases, including allergy, in the obese patients.

This project sheds light on a poorly explored subject such as the influence of DIO on the course of NK cell-mediated CHS reaction in mice and the role of natural gut microbiota in the observed phenomenon.

The presented data show that mice fed HFD for 8 weeks but not for 4 weeks developed aggravated CHS reaction determined by ear swelling measurement when compared to animals kept on normal diet (ND) prior to CHS sensitization. The increased ear swelling in HFD-fed mice was confirmed by increased MPO activity in ear homogenates and increased vascular permeability. Additionally, analysis of cytokine concentration in ear homogenates showed that HFD increases IFN- $\gamma$  and decreases IL-10 production. Moreover, analysis of cells infiltrating the auricle and the auricular ear-draining lymph nodes showed higher number of inflammatory cells in HFD-fed mice.

To determine how DIO affects NK cell-mediated CHS, liver mononuclear cells (LMNC) were cultured for 48 hours in the presence of DNP-BSA antigen to obtain supernatants for cytokine evaluation. Furthermore, LMNC were stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies and analyzed by flow cytometry. Cytokine analysis showed that feeding with HFD significantly increases IFN- $\gamma$  and IL-12p70 and decreases adiponectin concentration in LMNC culture supernatants. The flow cytometry analysis revealed that HFD treatment prior to DNFB sensitization increases percentage of NK1.1<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cell population and affects NK1.1<sup>+</sup> cells

development and maturation. Additionally, DIO decreases percentage of IL-10 producing NK1.1<sup>+</sup> and NK1.1-CD11b<sup>+</sup> cells in liver. Recent studies employing adoptive cell transfer experiments showed that LMNC are able to transfer the CHS response to naive syngeneic recipients, whereas lymph node and spleen cells do not have such ability. Taking this into account to verify whether the DIO affects function of liver NK cells, adoptive cell transfer experiment was performed. This experiment showed that the transfer of LMNC cells from the obese mice to syngeneic naive recipients with normal weight transfer the CHS reaction, but does not aggravate it. However, obtained data may suggest that the obesity-induced metainflammation plays an important role in shaping NK cell activity and is necessary in both induction and effector phases of CHS reaction.

Further analysis of bacterial DNA by qPCR was performed to determine whether DIO leads to gut microbiota dysbiosis in *Rag1*<sup>-/-</sup> mice. It was found that 8 week HFD treatment shifts the bacteria profile towards pro-inflammatory strains. In whole intestine, the level of anti-inflammatory SCFA-producing bacteria, including *Clostridium coccoides*-*Eubacterium rectale* (cluster XIVab) group, *Clostridium coccoides* (cluster XIVa) subgroup and *Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas* (phylum *Bacteroidetes*) group, was significantly decreased in HFD-fed mice. Moreover, *Lactobacillus* belonging to phylum *Firmicutes* was less abundant in large intestine content isolated from the obese mice. Simultaneously, the level of immunomodulatory SFB bacteria in large intestine and *Clostridium* cluster I in small intestine was significantly increased. Also, in small and large intestine of the obese mice, the *Enterococcus* spp. was more abundant. The level of *Clostridium* cluster IV and *Bifidobacterium* spp. remained unchanged.

As diet-induced dysbiosis may influence local immunity, the morphology of gut walls was examined and intestinal inflammation was determined by MPO activity. DIO was found to cause thinning of the small and large intestine walls, which correlated with a decrease in the weight of the intestine bioptates. Analysis of intestines length showed that DIO also causes shortening of the small and large intestines, which is associated with inflammation in the gut walls. Further analysis showed that DIO increases MPO activity in the small intestine wall, while it does not affect the activity of this enzyme in the large intestine. The analysis of gut flushes, also showed a decrease in IL-10

concentration in the small intestine, and an increase in IL-12p70 and IFN- $\gamma$  concentration in the large intestine. The obtained results may indicate the presence of inflammation in the intestines of HFD-fed *Rag1*<sup>-/-</sup> mice.

In summary, current results suggest that the DIO and the subsequent changes in intestinal microbiota significantly modulate the local and systemic inflammatory response, contributing to exacerbation of the CHS response mediated by liver NK cells.

## Spis ilustracji

---

Schemat 3.1 Schemat modelu doświadczalnego.....	41
Schemat 3.2 Schemat adopcyjnego transferu komórek LMNC. ....	47
Tabela 3.1 Przeciwciała wykorzystane w pracy.....	46
Tabela 3.2 Opis grup kontrolnych oraz badanych w modelu adopcyjnego transferu CHS. ....	47
Tabela 3.3 Warunki reakcji i startery zastosowane w analizie składu mikrobioty jelitowej....	49
Rycina 1.1 [A] Wielkość i wygląd tkanki tłuszczowej trzewnej u myszy <i>Rag1</i> <sup>-/-</sup> po 8 tygodniach przyjmowania ND lub HFD. [B] Wygląd śledzion (górną) i wątroby (dół) u myszy po 8 tygodniach przyjmowania ND lub HFD. [C] Przyrost masy ciała myszy karmionych ND lub HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=20; **p<0,01; ***p<0,001.....	52
Rycina 1.2 [A] Masa tkanki podskórnej i trzewnej w stosunku do masy ciała u myszy <i>Rag1</i> <sup>-/-</sup> po 8 tygodniach przyjmowania ND lub HFD. [B] Masa śledziony i wątroby w stosunku do masy ciała u myszy po 8 tygodniach karmienia ND lub HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=6-41; ***p<0,001. ....	53
Rycina 2.1 Parametry biochemiczne po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=15-19; *p<0,05; ***p<0,001. ....	54
Rycina 2.2 Stężenie leptyny [A] i adiponektyny [B] w surowicy po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=14-25; ***p<0,001. ....	54
Rycina 3.1 Stężenie IL-6, IL-10, IL-1β, TNF-α oraz leptyny i adiponektyny w supernatantach z hodowli tkanki tłuszczowej wisceralnej [A] i podskórnej [B] po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=10-18; **p<0,01, ***p<0,001.....	56
Rycina 4.1 Nadwrażliwość kontaktowa po 4 [A] i 8 [B] tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=20-48; **p<0,01; ***p<0,001.....	57
Rycina 4.2 Aktywność mieloperoksydazy (MPO) w wycinkach z małżowiny usznej po 4 [A] i 8 [B] tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=6-16; **p<0,01; ***p<0,001. ....	58
Rycina 4.3 Przepuszczalność naczyń po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=14-16; *p<0,05; **p<0,01. ....	58
Rycina 4.4 Stężenie IL-10 [A], IFN-γ [B] oraz IL-12p70 [C] w supernatantach z homogenatów tkanki usznej po 8 tygodniach stosowania HFD. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=10-21; *p<0,05; ***p<0,001.....	59
Rycina 4.5 Analiza cytometryczna komórek wyizolowanych z małżowiny usznej. [A] Procentowa zawartość komórek NK1.1 <sup>+</sup> . [B] Procentowa zawartość komórek CD11b <sup>+</sup> w obrębie populacji komórek NK1.1 <sup>+</sup> . [C] Procentowa zawartość komórek NKG2D <sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> . [D] Procentowa zawartość komórek CD11b <sup>+</sup> Ly-6G <sup>+</sup> . [E] Procentowa	

zawartość komórek CD11b <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> . Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=6-7; *p<0,05; **p<0,01.....	60
Rycina 4.6 Analiza cytometryczna komórek wyizolowanych z ELN. [A] Procentowa zawartość komórek NK1.1 <sup>+</sup> . [B] Procentowa zawartość komórek NKG2D <sup>+</sup> w obrębie populacji komórek NK1.1 <sup>+</sup> . Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=6; *p<0,05; **p<0,01.....	61
Rycina 5.1 Liczba komórek LMNC wyizolowanych z poszczególnych grup badanych. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=13-14.....	61
Rycina 5.2 Stężenie IFN-γ [A], IL-12p70 [B], adiponektyny [C], IL-10 [D], TNF-α [E] i IL-6 [F] w supernatantach z hodowli LMNC. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=4-16; **p<0,01; ***p<0,001.....	62
Rycina 5.3 Analiza cytometryczna komórek NK1.1 <sup>+</sup> wyizolowanych z wątroby. [A] Procentowa zawartość komórek NK1.1 <sup>+</sup> . Procentowa zawartość komórek NK1.1 <sup>+</sup> na kolejnych poziomach dojrzałości w grupach myszy nieimmunizowanych [B] i w grupach myszy immunizowanych [C]. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=5-6; **p<0,01.....	63
Rycina 5.4 Analiza cytometryczna komórek NK1.1 <sup>+</sup> izolowanych z wątroby. [A] Procentowa zawartość komórek IFN-γ <sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1 <sup>+</sup> . [B] Reprezentatywne histogramy przedstawiające ekspresję IFN-γ <sup>+</sup> w komórkach NK1.1 <sup>+</sup> . [C] Procentowa zawartość komórek granzym B <sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1 <sup>+</sup> [D] Procentowa zawartość komórek NKG2D <sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1 <sup>+</sup> . Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=5-6; *p<0,05; **p<0,01.....	64
Rycina 5.5 Analiza cytometryczna komórek LMNC. [A] Procentowa zawartość komórek IL-10 <sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1-CD11b <sup>+</sup> . [B] Procentowa zawartość komórek IL-10 <sup>+</sup> w obrębie komórek NK1.1 <sup>+</sup> . Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=5-6; *p<0,05; **p<0,01.....	65
Rycina 6.1 Adoptywny transfer komórek LMNC. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=10-30; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.....	66
Rycina 7.1 Ilość bakterii tlenowych [A] i beztlenowych izolowanych z jelita cienkiego i grubego myszy po HFD i ND. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=18-20.....	67
Rycina 7.2 Poziom ekspresji 16S rDNA poszczególnych grup bakterii w zawartości jelita cienkiego u myszy <i>Rag1</i> <sup>-/-</sup> karmionych ND lub HFD. Wyniki prezentowane jako średnia, n=16-18; *p<0,05; ***p<0,001.....	68
Rycina 7.3 Poziom ekspresji 16S rDNA poszczególnych grup bakterii w zawartości jelita grubego u myszy <i>Rag1</i> <sup>-/-</sup> karmionych ND lub HFD. Wyniki prezentowane jako średnia, n=17-20; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.....	69
Rycina 8.1 Masa biopłatów jelita cienkiego [A] i grubego [B] oraz długość jelita cienkiego [C] i jelita grubego [D]. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=14-34; ***p<0,001.....	70
Rycina 8.2 Aktywność mieloperoksydazy (MPO) w biopłatach jelita cienkiego [A] i grubego [B]. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=14-34; ***p<0,001.....	70
Rycina 8.3 Stężenie IL-12p70, IL-10 oraz IFN-γ w popłuczynach jelita cienkiego i grubego. Wyniki prezentowane jako średnia ± SEM, n=8-21; *p<0,05.....	71

## Piśmiennictwo

---

1. Diepgen TL, et al. Contact dermatitis: epidemiology and frequent sensitizers to cosmetics. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; 21 Suppl 2: 9-13.
2. Thyssen JP, et al. The epidemiology of contact allergy in the general population—prevalence and main findings. *Contact Dermat.* 2007; 57(5): 287–299.
3. De Groot AC. New contact allergens: 2008 to 2015. *Dermatitis* 2015; 26(5): 199–215.
4. Honda T, et al. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity models: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2013; 133: 303-315.
5. Askenase PW. Yes T cells, but three different T cells ( $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  and NK T cells), and also B-1 cells mediate contact sensitivity. *Clin Exp Immunol.* 2001; 125 (3): 345–350.
6. Gaide O, et al. Common clonal origin of central and resident memory T cells following skin immunization. *Nat Med.* 2015; 21: 647–653.
7. Schmidt JD, et al. Rapid allergen-induced interleukin-17 and interferon- $\gamma$  secretion by skin-resident memory CD8+ T cells. *Contact Dermatitis.* 2017; 76(4): 218-227.
8. Campos RA, et al. Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant V $\alpha$ 14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J Exp Med.* 2003; 198: 1785-1796.
9. Tsuji RF, et al. B cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity. *J Exp Med.* 2002; 196 (10): 1277-1290.
10. Tsuji RF, et al. Possible involvement of C5/ C5a in the efferent and elicitation phases of contact sensitivity. *J Immunol.* 1996; 156 (12): 4444-4450.
11. Tsuji RF, et al. Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. *J Immunol.* 2000; 165 (3): 1588–1598.
12. Geba GP, et al. Delayed-type hypersensitivity in mast cell-deficient mice: dependence on platelets for expression of contact sensitivity. *J Immunol.* 1996; 157 (2): 557-565.
13. Dudeck A, et al. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity.* 2011; 34 (6): 973-984.
14. Askenase PW, et al. T cell-dependent mast cell degranulation and release of serotonin in murine delayed-type hypersensitivity. *J Exp Med.* 1980; 152 (5): 1358-1374.
15. McHale JF, et al. Vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the onset of eliciting contact hypersensitivity in mice: evidence for a dominant role of TNF-alpha. *J Immunol.* 1999; 162 (3): 1648-1655.
16. Saint-Mezard P, et al. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol.* 2004; 14 (3): 131-138.
17. Wang B, et al. CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J Immunol.* 2000; 165 (12): 6783-6790.

- 
18. Diefenbach A, et al. Development, Differentiation, and Diversity of Innate Lymphoid Cells Immunity. 2014; 41(3): 354-365.
  19. Cortez VS, et al. Diversity and function of group 1 innate lymphoid cells. Immunology Letters. 2016; 179: 19-24.
  20. Spits H, et al. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: Partners in host defense. Nat Immunol. 2016; 17: 758-764.
  21. Gasteiger G, et al. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. Science. 2015; 350: 981-985.
  22. Peng H, et al. Diversity of tissue-resident NK cells. Semin Immunol. 2017; 31: 3-10.
  23. O'Leary JG, et al T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. Nat Immunol. 2006; 7(5): 507-516.
  24. Paust S, et al. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. Nat Immunol. 2010; 11 (12): 1127-1135.
  25. Rouzair P, et al. Natural killer cells and T cells induce different types of skin reactions during recall responses to haptens. Eur J Immunol. 2012; 42(1): 80-88.
  26. Wight A, et al. Critical role for the Ly49 family of class I MHC receptors in adaptive natural killer cell responses. Proc Natl Acad Sci USA. 2018; 115: 11579-11584.
  27. Majewska-Szczepanik M, et al. Natural killer cell-mediated contact sensitivity develops rapidly and depends on interferon- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  and interleukin-12. Immunology. 2013; 140 (1): 98-110.
  28. Knolle PA, et al. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. Cell Mol Immunol. 2016 May; 13(3): 347-353.
  29. Zhang LH, et al. The aryl hydrocarbon receptor is required for the maintenance of liver-resident natural killer cells. J Exp Med. 2016; 213(11): 2249-2257.
  30. van den Boorn JG et al. Inflammasome-Dependent Induction of Adaptive NK Cell Memory. Immunity. 2016; 44(6): 1406-1421.
  31. Peng H, et al. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. J Clin Invest. 2013; 123(4):1444-1456.
  32. Wang X, et al. Memory formation and long-term maintenance of IL-7R $\alpha$ + ILC1s via a lymph node-liver axis. Nat Commun. 2018; 9(1): 4854.
  33. Bald T, et al. Hide and seek: Plasticity of innate lymphoid cells in cancer. Semin Immunol. 2019; 41: 101273.
  34. Cooper MA, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009; 106: 1915-1919.
  35. Romee, R, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. Blood. 2012; 120, 4751-4760.
  36. Hydes T, et al. IL-12 and IL-15 induce the expression of CXCR6 and CD49a on peripheral natural killer cells. Immun Inflamm Dis. 2018; 6(1): 34-46.

- 
37. Thorpe KE, et al. The impact of obesity on rising medical spending. *Health Aff (Millwood)*. 2004; Suppl Web Exclusives:W4-480-6.
38. World Health Organization. Obesity and overweight. [dostęp: 28-10-2019]. Dostępny w Internecie: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
39. World Health Organization. Global Health Observatory data repository. Prevalence of overweight among adults, BMI  $\geq$  25, age-standardized. Estimates by country. [dostęp: 28-10-2019]. Dostępny w Internecie: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.CTRY2430A?lang=en>
40. World Health Organization. Global Health Observatory data repository. Prevalence of obesity among adults, BMI  $\geq$  25, age-standardized. Estimates by country. [dostęp: 28-10-2019]. Dostępny w Internecie: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.CTRY2450A?lang=en>
41. National Institutes of Health. NHLBI Obesity Education Initiative. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. [dostęp: 10-11-2018]. Dostępny w Internecie: [http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/ob\\_gdlns.pdf](http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/ob_gdlns.pdf)
42. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444: 860-867.
43. Ertunc ME. Lipid signaling and lipotoxicity in metabolic inflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *J Lipid Res*. 2016; 57(12): 2099-2114.
44. Engin A. Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Preadipocytes and Macrophages: Hypoxia Hypothesis. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 960: 305-326.
45. Górska M, i wsp. Mechanizmy immunologiczne towarzyszące otyłości i ich rola w zaburzeniach metabolizmu *Postepy Hig Med Dosw*. 2015; 69: 1384-1404.
46. Yu L, et al. Pattern Recognition Receptor-Mediated Chronic Inflammation in the Development and Progression of Obesity-Related Metabolic Diseases. *Mediators Inflamm*. 2019; 2019: 5271295.
47. Cildir G, et al. Chronic adipose tissue inflammation : all immune cells on the stage. *Trends Mol Med*. 2013; 19(8): 487-500.
48. Lumeng CN, et al. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*. 2008; 57(12): 3239-3246.
49. Nishimura S, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009; 15: 914-920.
50. Feuerer M, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009; 15: 930-939.
51. Patel C, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(11): 4476-4479.
52. Manning PJ, et al. Postprandial cytokine concentrations and meal composition in obese and lean women. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16 (9): 2046-2052.
53. Skurk T, et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92 (3): 1023-1033.
54. Kim CS, et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)*. 2006; 30(9): 1347-1355.



- 
55. Moraes RC, et al. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology*. 2003; 144 (11): 4773-4782.
56. Clément K, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J*. 2004; 18 (14): 1657-1669.
57. Makki K, et al. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm*. 2013; 2013: 139239.
58. Zhang Y, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372: 425-432.
59. Procaccini C, et al. Leptin as an immunomodulator. *Mol Aspects Med*. 2012; 33: 35-45.
60. Meier U, et al. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*. 2004; 50: 1511-1525.
61. Balato N, et al. "Eczemas" and leptin. *Dermatitis*. 2011; 22: 320-323.
62. Ommen P, et al. The role of leptin in psoriasis comprises a proinflammatory response by the dermal fibroblast. *Br J Dermatol*. 2016; 174: 187-190.
63. Ouchi N, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation*. 2003; 107(5): 671-674.
64. Ohashi K, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem*. 2010; 285: 6153-6160.
65. Ouchi N, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 2001; 103(8): 1057-1063.
66. Kumada M, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*. 2004; 109: 2046-2049.
67. Racanelli V, et al. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006; 43(2 Suppl 1): S54-62.
68. Peverill W, et al. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci*. 2014; 15: 8591-8638.
69. Kesar V, et al. Toll-like receptors and liver disease. *Liver Int*. 2014; 34: 184-196.
70. Lanthier N. Targeting Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why and how? *World J Hepatol*. 2015; 7: 2184-2188.
71. Gadd VL, et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014; 59: 1393-1405.
72. Shi H, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; 116(11): 3015-3025.
73. Boden G, et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- $\kappa$ B pathway in rat liver. *Diabetes*. 2005; 54: 3458-3465.

- 
74. Tacke F, et al. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol.* 2014; 60: 1090–1096.
75. Xu A. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest.* 2003; 112(1): 91-100.
76. Wan J, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014; 59(1): 130-142.
77. Kumar V. NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease. *J Hepatol.* 2013; 59: 618–620.
78. Martin-Murphy BV, et al. Mice lacking natural killer T cells are more susceptible to metabolic alterations following high fat diet feeding. *PLoS One.* 2014; 9: e80949.
79. Sutti S, et al. Adaptive immune responses triggered by oxidative stress contribute to hepatic inflammation in NASH. *Hepatology.* 2014; 59: 886–897.
80. O’Shea D; et al. Natural killer cells in obesity: Impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. *PLoS One.* 2010; 5: e8660.
81. Viel S, et al. Alteration of natural killer cell phenotype and function in obese individuals. *Clin Immunol.* 2017; 177: 12–17.
82. Tobin LM, et al. NK cells in childhood obesity are activated, metabolically stressed, and functionally deficient. *JCI Insight.* 2017; 2: 94939.
83. Michelet X, et al. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat Immunol.* 2018; 19: 1330–1340.
84. Moulin CM, et al. Bariatric surgery reverses natural killer (NK) cell activity and NK-related cytokine synthesis impairment induced by morbid obesity. *Obes Surg.* 2011, 21, 112–118.
85. Jahn, J, et al. Decreased NK cell functions in obesity can be reactivated by fat mass reduction. *Obesity.* 2015; 23: 2233–2241.
86. O’Rourke RW, et al. Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity. *Metabolism.* 2013; 62(11): 1557–1561.
87. Shoaie-Hassani A, et al. Natural Killer Cells from the Subcutaneous Adipose Tissue Underexpress the NKp30 and NKp44 in Obese Persons and Are Less Active against Major Histocompatibility Complex Class I Non-Expressing Neoplastic Cells. *Front Immunol.* 2017; 8: 1486.
88. Wrann CD, et al. Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 302(1): E108-116.
89. Nave H, et al. Resistance of Janus Kinase-2 Dependent Leptin Signaling in Natural Killer (NK) Cells: A Novel Mechanism of NK Cell Dysfunction in Diet-Induced Obesity. *Endocrinology.* 2008; 149(7): 3370-3378.
90. Lautenbach A, et al. Human Obesity Reduces the Number of Hepatic Leptin Receptor (Ob-R) Expressing NK Cells. *Endocr Res.* 2011; 36(4): 158-166.
91. Laue T, et al. Altered NK cell function in obese healthy humans. *BMC Obes.* 2015; 2: 1.

- 
92. Tian Z, et al. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 298(3): 297-302.
93. Kim KY, et al. Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol.* 2006; 176(10): 5958-5964.
94. O'Sullivan TE, et al. Adipose-Resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance. *Immunity.* 2016; 45: 428-441.
95. Boulenouar S, et al. Adipose type one innate lymphoid cells regulate macrophage homeostasis through targeted cytotoxicity. *Immunity.* 2017; 46: 273-286.
96. Lee BC, et al. Adipose natural killer cells regulate adipose tissue macrophages to promote insulin resistance in obesity. *Cell Metab.* 2016; 23: 685-698.
97. Wensveen FM, et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat. Immunol.* 2015; 16: 376-385.
98. Theurich S, et al. IL-6/Stat3-Dependent Induction of a Distinct, Obesity-Associated NK Cell Subpopulation Deteriorates Energy and Glucose Homeostasis. *Cell Metab.* 2017; 26(1): 171-184.
99. O'Rourke RW, et al. Systemic NK cell ablation attenuates intra-abdominal adipose tissue macrophage infiltration in murine obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2014; 22(10): 2109-2114.
100. O'Sullivan TE. Dazed and Confused: NK Cells. *Front Immunol.* 2019; 10: 2235.
101. Stiglund N, et al. Retained NK cell phenotype and functionality in non-alcoholic fatty liver disease. *Front Immunol.* 2019; 10: 1255.
102. Tosello-Tramont AC, et al. NKp46+ natural killer cells attenuate metabolism-induced hepatic fibrosis by regulating macrophage activation in mice. *Hepatology.* 2016; 63(3):799-812.
103. Cepero-Donates Y, et al. Interleukin-15-mediated inflammation promotes non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine.* 2016; 82: 102-111.
104. Cuff AO. Et al. The Obese Liver Environment Mediates Conversion of NK Cells to a Less Cytotoxic ILC1-Like Phenotype. *Front Immunol.* 2019; 10: 2180.
105. Siegel PD, et al. Etiological Contact Allergen Chemical Identification and Confirmation. *Dermatitis.* 2019. doi: 10.1097/DER.000000000000498. [Epub ahead of print].
106. Stallone DD, et al. Decline in delayed-type hypersensitivity response in obese women following weight reduction. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994; 1(2): 202-205.
107. Hamminga EA, et al. Chronic inflammation in psoriasis and obesity: implications for therapy. *Medical hypotheses.* 2006; 67: 768-773.
108. Katagiri K et al. Impaired contact hypersensitivity in diet-induced obese mice. *J Dermatol Sci.* 2007; 46(2): 117-126.
109. Ira L et al. Lymphatic function regulates contact hypersensitivity dermatitis in obesity. *J Invest Dermatol.* 2015; 135(11): 2742-2752.
110. Majewska-Szczepanik M, et al. Obesity aggravates contact hypersensitivity reaction in mice. *Allergy.* (under review)

- 
111. Bäckhed F, et al. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*. 2005; 25;307(5717): 1915-1920.
112. Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012; 486(7402): 215-221.
113. Gill SR, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006; 312: 1355-1359.
114. Jandhyala SM, et al. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015; 21: 8787-8803.
115. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486: 207-214.
116. Sekirov I, et al. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev*. 2010; 90,: 859-904.
117. Walker W, et al. The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr Obes*. 2017; 12 Suppl 1: 3-17.
118. Claesson MJ, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. 2012; 488: 178-184.
119. Rigottier-Gois L. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *ISME J*. 2013; 7: 1256-1261.
120. Jeffery IB, et al. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut*. 2012; 61: 997-1006.
121. Parekh PJ, et al. The role and influence of gut microbiota in pathogenesis and management of obesity and metabolic syndrome. *Front Endocrinol*. 2014; 5: 47.
122. Salonen A, et al. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME J*. 2014; 8: 2218-2230.
123. Fallucca F, et al. Influence of diet on gut microbiota, inflammation and type 2 diabetes mellitus. First experience with macrobiotic Ma-Pi 2 diet. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014; 30: 48-54.
124. Jernberg C, et al. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME journal*. 2007; 1: 56-66.
125. Mosca A, et al. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Front Microbiol*. 2016; 7: 455.
126. Johansson ME, et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 15064-15069.
127. Johansson ME, et al. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108 Suppl 1: 4659-4665.
128. Sharma R, et al. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut*. 1995; 36(2): 209-214.

- 
129. Petersson, J, et al. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011; 300: G327–G333.
130. Renz H, et al. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation *Nat Rev Immunol.* 2011; 12(1): 9-23.
131. Round JL, et al. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Rev. Immunol.* 2009; 9: 313–323.
132. Hamada H, et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.* 2002; 168: 57–64.
133. Biswas A, et al. Regulation of intestinal microbiota by the NLR protein family. *Int Immunol.* 2013; 25(4): 207-214.
134. Qiao, Q, et al. Supramolecular organizing centers (SMOCs) as signaling machines in innate immune activation. *Sci China Life Sci.* 2015; 58, 1067–1107.
135. Vaishnava S, et al. The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 2011; 334: 255–258.
136. Cash LH, et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin, *Science.* 2006; 313: 1126–1130.
137. Fukata M, et al. The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2013; 6: 451–463.
138. Kamada N, et al. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology.* 2014; 146: 1477–1488.
139. Couturier-Maillard A, et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer, *J. Clin. Investig.* 2013; 123 : 700–711.
140. Elinav E, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis, *Cell.* 2011; 145: 745–757.
141. Shalpour S, et al. Commensal microflora and interferon-gamma promote steady-state interleukin-7 production in vivo. *Eur J Immunol.* 2010; 40(9): 2391–2400.
142. Vonarbourg C, et al. Regulated expression of nuclear receptor ROR $\gamma$  confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR $\gamma$ (+) innate lymphocytes. *Immunity.* 2010; 33(5): 736–751.
143. Ivanov II, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009; 30; 139(3): 485-498.
144. Conti HR, et al. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect.* 2010; 12: 518–527.
145. Weaver CT, et al. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annu Rev Pathol.* 2013; 8: 477–512.
146. Stockinger B, et al. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17(9): 535-544.

- 
147. Diehl GE, et al. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature* 2013; 494: 116–120.
148. Atarashi K, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011; 331: 337–341.
149. Bartizal KF, et al. The effect of microbial flora, diet, and age on the tumoricidal activity of natural killer cells. *J Leukoc Biol*. 1984; 36: 739–750.
150. Ganal SC, et al. Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota. *Immunity*. 2012; 37: 171–186.
151. Kamimura Y, et al. Homeostatic control of memory cell progenitors in the natural killer cell lineage. *Cell Rep*. 2015; 10: 280–291.
152. Nonaka Y, et al. Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulation of Th1/Th2 immunobalance and induction of IL-10 production. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008; 145(3): 249–257.
153. Wang G, et al. Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76(20): 3917–3937.
154. Donohoe DR, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. 2011; 13: 517–526.
155. Willemsen LEM, et al. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E1 and E2 production by intestinal myofibroblasts. *Gut*. 2003; 52: 1442–1447.
156. Rooks MG, et al. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2016; 16: 341–352.
157. Macia, L, et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat. Commun*. 2015, 6: 6734.
158. Segain JP, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000, 47: 397–403.
159. Millard AL, et al. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2002; 130: 245–255.
160. Nastasi C, et al. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Sci Rep*. 2015; 5: 16148.
161. Furusawa Y, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013; 504: 446–450.
162. Ishikawa T, et al. Dietary cycloinulooligosaccharides enhance intestinal immunoglobulin A production in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009; 73: 677–682.
163. Schroeder BO. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016; 22(10): 1079–1089.
164. Turnbaugh PJ, et al. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008; 3(4): 213–223.

- 
165. Ley RE, et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 11070–11075.
166. Turnbaugh PJ, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009; 457(7228): 480–487.
167. Ley RE, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006; 444(7122): 1022–1023.
168. Jumpertz R, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 2011; 94(1): 58–65.
169. Zhang H, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(7): 2365–2370.
170. Duncan SH, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes*. 2008; 32(11): 1720–1724.
171. Mai V, et al. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(1): 81–85.
172. Furet JP, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*. 2010; 59(12): 3049–3057.
173. Armougom F, et al. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS One*. 2009; 4(9): e7125.
174. Schwartz A, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*. 2009; 18(1): 190–195.
175. Million M, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)*. 2011. doi: 10.1038/ijo.2011.153. [Epub ahead of print]
176. Dao MC, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2016; 65: 426–436.
177. Cani PD, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008; 57: 1470–1481.
178. Wang HB, et al. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig Dis Sci*. 2012; 57(12): 3126–3135.
179. Cani PD, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56(7): 1761–1772.
180. Cani PD, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009; 58(8): 1091–1103.
181. Vijay-Kumar M, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010; 328(5975): 228–231.
182. Lin HV, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One*. 2012; 7: e35240.

- 
183. Xiong Y, et al. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(4): 1045-1050.
184. Turnbaugh PJ, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006; 444: 1027-1031.
185. Bäckhed F, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 15718-15723.
186. Drenick EJ, et al. Hepatic steatosis after intestinal bypass—prevention and reversal by metronidazole, irrespective of protein-calorie malnutrition. *Gastroenterology*. 1982; 82: 535-548.
187. Tilg H, et al. Gut microbiome and liver diseases. *Gut*. 2016; 65(12): 2035-2044.
188. Boursier J, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*. 2016; 63: 764-775.
189. Loomba R, et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab*. 2017; 25: 1054-1062.
190. Bawa M, et al. Gut-liver axis: role of inflammasomes. *J Clin Exp Hepatol*. 2013; 3(2): 141-149.
191. Jirillo E, et al. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J Endotoxin Res*. 2002; 8(5): 319-327.
192. Askenase PW, et al. TLR-4 dependent IL-4 production by invariant Valpha14+Jalpha18+ NKT cells to initiate contact sensitivity in vivo. *J. Immunol*. 2005; 175: 6390-6401.
193. Souza-Fonseca-Guimaraes F, et al. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol Med*. 2012; 18 (1): 270-285.
194. Spruss A, et al. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009; 50: 1094-1104.
195. Elinav E, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 2011; 145: 745-757.
196. Henao-Mejia J, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012; 482(7384): 179-185.
197. Zeisel SH, et al. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr Rev*. 2009; 67(11): 615-623.
198. Velasquez M, et al. Trimethylamine N-Oxide: The Good, the Bad and the Unknown. *Toxins (Basel)*. 2016; 8: 326.
199. Chen Y-M et al. Associations of gut-flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with non-alcoholic fatty liver disease in adults. *Sci Rep*. 2016; 8(6): 19076.
200. Boutagy NE, et al. Probiotic supplementation and trimethylamine-N-oxide production following a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2015; 23(12): 2357-2363.
201. Arendt BM, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic and erythrocyte ratios of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2013; 38: 334-340.



- 
202. Hui DY. Intestinal phospholipid and lysophospholipid metabolism in cardiometabolic disease. *Curr Opin Lipidol*. 2016; 27: 507–512.
203. Hara H, et al. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *J. Nutr*. 1999; 129: 942–948.
204. Aranha MM, et al. Bile acid levels are increased in the liver of patients with steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 20(6): 519-525.
205. Ferslew BC, et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2015; 60(11): 3318-3328.
206. Parséus A, et al. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut*. 2017; 66(3): 429-437.
207. Li F, et al. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun*. 2013; 4: 2384.
208. Hacini-Rachinel F, et al. Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells. *PLoS One*. 2009; 4(3):e4903.
209. Chapat L, et al. *Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation. *Eur J Immunol*. 2004; 34: 2520–2528.
210. Fujiwara R, et al. 2,4-Dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity response in NC/Nga mice fed fructo-oligosaccharide. *J Nutr Sci Vitaminol*. (Tokyo).2010; 56: 260-265.
211. Plantamura E, et al. MAVS deficiency induces gut dysbiotic microbiota conferring a proallergic phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(41): 10404-10409.
212. Strzępa A, et al. Broad spectrum antibiotic enrofloxacin modulates contact sensitivity through gut microbiota in a murine model. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 140(1): 121-133.
213. Strzępa A, et al. Oral treatment with enrofloxacin creates anti-inflammatory environment that supports induction of tolerogenic dendritic cells. *Int Immunopharmacol*. 2019; 77: 105966.
214. Livak KJ, et al. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.
215. Yaqoob P, et al. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett*. 1994; 41(2-3): 241-247.
216. Smith AG, et al. Diet-Induced Obese Mice Have Increased Mortality and Altered Immune Responses When Infected with Influenza Virus. *J Nutr*. 2007; 137(5): 1236-1243.
217. Niavarani SR, et al. Lipid accumulation impairs natural killer cell cytotoxicity and tumor control in the postoperative period. *BMC Cancer*. 2019; 19(1): 823.
218. Winer S, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009; 15(8): 921-929.
219. Duffaut C, et al. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 384(4): 482-485.
220. Weitman ES, et al. Obesity impairs lymphatic fluid transport and dendritic cell migration to lymph nodes. *PLoS One*. 2013; 8(8): e70703.

- 
221. Liu X, et al. Lack of mature lymphocytes results in obese but metabolically healthy mice when fed a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)*. 2015; 39(10): 1548–1557.
222. O'Neill AM, et al. High-fat Western diet-induced obesity contributes to increased tumor growth in mouse models of human colon cancer. *Nutr Res*. 2016; 36(12): 1325-1334.
223. Johansen MJ, et al. The effect of overweight and obesity on liver biochemical markers in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019. doi: 10.1210/clinem/dgz010. [Epub ahead of print]
224. Lee MJ, et al. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med*. 2013; 34(1): 1–11.
225. Tran TT, et al. Transplantation of subcutaneous fat to the visceral cavity induced protective metabolic effects: Evidence for intrinsic properties of subcutaneous fat. *Diabetes*. 2007; 56: A5–A6.
226. Hocking SL, et al. Subcutaneous fat transplantation alleviates diet-induced glucose intolerance and inflammation in mice. *Diabetologia*. 2015; 58(7): 1587-600.
227. Fontana L, et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007; 56(4):1010-1013.
228. Divella R, et al. Obesity, Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Adipocytokines Network in Promotion of Cancer. *Int J Biol Sci*. 2019; 15(3): 610–616.
229. Eder K, et al. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm. Res*. 2009; 58: 727.
230. Liu X. Adiponectin administration prevents weight gain and glycemic profile changes in diet-induced obese immune deficient Rag1<sup>-/-</sup> mice lacking mature lymphocytes. *Metabolism*. 2016; 65(12): 1720-1730.
231. Harmon C, et al. Liver-Derived TGF- $\beta$  Maintains the EomeshiTbetlo Phenotype of Liver Resident Natural Killer Cells. *Front Immunol*. 2019; 10: 1502.
232. Kobayashi M, et al. Identification and purification of natural-killer cell stimulatory factor (Nksf), a cytokine with multiple biologic effects on human-lymphocytes. *J Exp Med*. 1989; 170(3): 827–845.
233. Lehmann D, et al. IL-12 directs further maturation of ex vivo differentiated NK cells with improved therapeutic potential. *PLoS One*. 2014; 9(1): e87131.
234. Abel AM, et al. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 2018; 9: 1869.
235. Chiossone L, et al. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood*. 2009; 113: 5488–5496
236. Hayakawa Y, et al. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol*. 2006; 176: 1517–1524.
237. Fu B, et al. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology* 2011; 133: 350–359.
238. Yu J, et al. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*. 2013; 34(12): 573–582.
239. Sun JC, et al. NK cells and immune “memory”. *J Immunol*. 2011; 186: 1891-1897.

- 
240. Clinthorne JF, et al. NK cell maturation and function in C57BL/6 mice are altered by caloric restriction. *J Immunol.* 2013; 190: 712–722.
241. White MJ, et al. Calorie Restriction Attenuates Terminal Differentiation of Immune Cells. *Front Immunol.* 2017; 7: 667.
242. Long EO. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. *Immunity.* 2007; 26(4): 385–387.
243. Wu Y, et al. Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. *Front Immunol.* 2017; 8: 930.
244. Lassen MG, et al. Intrahepatic IL-10 maintains NKG2A(+)Ly49(-) liver NK cells in a functionally hyporesponsive state. *J Immunol.* 2010; 184(5): 2693–2701.
245. Shinoda Y, et al. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J. Cell. Biochem.* 2006; 99: 196–208.
246. Piñeiro, R, et al. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5163–5169.
247. Rodriguez-Pacheco F, et al. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology.* 2007; 148: 401–410.
248. Delaigle AM, et al. Induction of Adiponectin in Skeletal Muscle by Inflammatory Cytokines: in Vivo and in Vitro Studies. *Endocrinology.* 2004; 145(12): 5589–5597.
249. Kaser S, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2005; 54(1): 117–121.
250. Taylor VH, et al. The Role of Adipokines in Understanding the Associations between Obesity and Depression. *J Obes.* 2010; 2010: 748048.
251. Vuppalanchi R, et al. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol.* 2005; 39(3): 237–242.
252. Neumeier M, et al. Adiponectin and its receptors in rodent models of fatty liver disease and liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(34): 5490–5494.
253. Wolf AM, et al. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J Hepatol.* 2006; 44(3): 537–543.
254. Silva TE, et al. Adiponectin: A multitasking player in the field of liver diseases. *Diabetes Metab.* 2014; 40(2): 95–107.
255. Wilk S, et al. Adiponectin modulates NK-cell function. *Eur J Immunol.* 2013 Apr; 43(4): 1024–1033
256. Leong JW, et al. Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20(4): 463–473.
257. Lautenbach A, et al. Altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean animals. *Obesity (Silver Spring).* 2009; 17(10): 1848–1855.
258. Shoaie S, et al. Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. *Sci Rep.* 2013; 3: 2532.

- 
259. den Besten G, et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 2013; 54: 2325–2340.
260. Van den Abbeele P, et al. Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J.* 2013; 7: 949–961.
261. Nishizawa K. Low-grade endotoxemia, diet, and gut microbiota – an emphasis on the early events leading to dysfunction of the intestinal epithelial barrier. *Biomed Res Clin Prac*, 2016; 1(2): 46-57.
262. Cool JC, et al Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Growth Horm IGF Res.* 2005; 15(1): 72-82.
263. Bao S, et al. Gp91 phox contributes to the development of experimental inflammatory bowel disease. *Immunol Cell Biol.* 2011; 89(8): 853-860.
264. de La Serre, CB, et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 299, G440–G448.
265. Madsen KL, et al. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis.* 1999; 5: 262–270.
266. Madsen KL, et al. Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterology.* 1997; 113: 151–159.
267. Hamilton MK, et al. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015; 308(10): G840–G851.
268. Li H, et al. Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism.* 2008; 57: 1704–1710.
269. Eftychi C, et al. Temporally Distinct Functions of the Cytokines IL-12 and IL-23 Drive Chronic Colon Inflammation in Response to Intestinal Barrier Impairment. *Immunity.* 2019; 51(2): 367-380.
270. Luck H, et al. Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell Metab.* 2015; 21: 527–542.