

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Imunologie



Bc. Daniel Vašek

Vliv chladové adaptace na imunitní systém
The effect of cold adaptation on the immune system

Diplomová práce

Školitelka: doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

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

V Praze, 12.08.2019

Bc. Daniel Vašek

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především mojí školitelce doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. za vedení práce, cenné rady, vstřícnost a hlavně trpělivost. Dále všem členům Laboratoře imunoregulací, hlavně RNDr. Michaele Hájkové, Ph.D.; Mgr. Biance Porubské a Mgr. Adéle Kmochové, za skvělý kolektiv, zábavu a neskutečnou podporu, stejně jako za pomoc s experimentální prací. Také bych chtěl poděkovat RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. a Mgr. Anetě Benešové z Laboratoře bioenergetiky a svalové fyziologie za rady a adaptaci zvířat. Velké díky patří však především moji rodině, přátelům a spolužákům za podporu a motivaci při studiu a psaní práce.

Abstrakt

Udržení energetické homeostázy za snížené teploty je nezbytné pro přežití organismu. V této diplomové práci jsme určili vliv chladového stresu a chladové adaptace na imunitní systém potkanů. Na procesu termoregulace se podílí řada různých faktorů, zásadní roli však hraje adrenergní signalizace. Vazba noradrenalinu na β -adrenergní receptory vede k tvorbě hnědé tukové tkáně, která je nezbytná pro netřesovou termogenezi, stejně jako i pro energetickou rovnováhu. Bioaktivní produkty adipocytů následně moduluji imunitní systém, i tento proces je významně ovlivněn signalizací nervových buněk. Abychom pochopili neuroimunitní interakce během chladové aklimatizace, sledovali jsme zastoupení imunitních populací a produkci rozpustných produktů u potkanů, kterým byly podány specifické inhibitory β -adrenergních receptorů. Propojení imunitního a nervového systému se zdá být v mnoha biologických procesech velmi důležité. Pochopení základních mechanismů vlivu chladové adaptace na buňky imunitního systému může vysvětlit další klinicky relevantní témata, jako je léčba obezity.

Klíčová slova: imunitní systém, chladová adaptace, noradrenalin, adrenergní receptory, cytokiny, hnědá tuková tkáň, netřesová termogeneze

Abstract

Maintaining energy homeostasis at reduced temperatures is essential for the survival of the organisms. In this diploma thesis, we determined the impact of cold stress and cold adaptation on the rat immune system. A number of different factors participate at the process of thermoregulation, but the adrenergic signalling plays a crucial role. The binding of norepinephrine to β -adrenergic receptors leads to the formation of brown adipose tissue, which is necessary for non-shivering thermogenesis, as well as for energy balance. Bioactive products of adipocytes subsequently modulate the immune system, this process is significantly influenced by signalling of nerve cells. In order to understand neuro-immune interaction during the cold adaptation, we monitored changes in immune cell populations and the production of soluble products in rats treated with specific inhibitors of β -adrenergic receptors. Relationship between the immune and nervous system seems to be very important in many biological processes. Deciphering basic mechanisms of the influence of cold adaptation on immune cells can therefore explain other clinically relevant topics, such as treatment of obesity.

Key words: immune system, cold adaptation, norepinephrine, adrenergic receptor, cytokines, brown adipose tissue, non-shivering thermogenesis

Obsah

1	Úvod	1
2	Literární přehled	2
2.1	Termoregulace	2
2.1.1	Třesová termogeneze	2
2.1.2	Netřesová termogeneze	2
2.2	Tuková tkáň	3
2.2.1	Běžové adipocyty	5
2.3	Chlad a stres	7
2.3.1	Regulační osy	7
2.4	Mechanismy ovlivňující běžování tukové tkáně	8
2.4.1	Mastné kyseliny	8
2.4.2	Vliv mikrobiomu	9
2.4.3	Vliv potravy	9
2.4.4	Vliv fyzické aktivity	10
2.5	Imunitní systém	11
2.5.1	Vliv chladové adaptace na imunitní systém	11
2.5.2	Buňky vrozeného imunitního systému	12
2.5.2.1	Eozinofily	12
2.5.2.2	Makrofágy	13
2.5.2.3	Přirozené lymfoidní buňky	14
2.5.3	Buňky adaptivního imunitního systému	14
2.5.3.1	T regulační lymfocyty	14
2.5.3.2	Invariantní NKT buňky	15
2.6	Cytokiny	16
2.6.1	Interleukin 4 a interleukin 13	16
2.6.2	Interleukin 33	17
2.6.3	Methionin-enkefalinový peptid a Meteorin-like hormon	17
2.6.4	Interleukin 6	17
2.6.5	Fibroblastový růstový faktor 21	18
2.7	Studie vliv chladové adaptace na imunitní systém	20
3	Cíle práce	22

4	Metody a materiál	23
4.1	Zvířata	23
4.2	Médium	24
4.3	Roztoky	24
4.4	Použitý software	25
4.5	Technické vybavení	25
4.6	Izolace buněk a tkání	26
4.6.1	Slezinné buňky	26
4.6.2	Intraperitoneální makrofágy	26
4.6.3	Hnědá tuková tkáň	26
4.6.4	Izolace séra	26
4.7	ELISA	27
4.7.1	DuoSet ELISA Development System R&D	27
4.7.2	Měření NE	28
4.8	Proliferační test	28
4.9	Měření oxidu dusnatého	28
4.10	Průtoková cytometrie	29
4.11	Real-time PCR	31
4.11.1	Izolace RNA	31
4.11.2	Reverzní transkripce	31
4.11.3	Měření RT-PCR	32
4.12	Statistická analýza	32
5	Výsledky	33
5.1	Část 1. - Výsledky kinetiky chladové adaptace	33
5.1.1	Vrozená imunita	33
5.1.2	Adaptivní imunita	35
5.1.3	ELISA	37
5.1.4	RT-PCR	39
5.1.5	Hmotnost BAT	40

5.2	Část 2. - Výsledky experimentů s použitím inhibitorů	41
5.2.1	Vliv inhibitorů na BAT	41
5.2.2	Vrozená imunita	43
5.2.3	Adaptivní imunita	45
5.2.4	Vlastnosti slezinných buněk	46
6	Diskuze	48
7	Závěr	55
8	Přehled použité literatury	56

Seznam zkratek

ADP	adenosin difosfát (adenosine diphosphate)
AR	adrenergí receptor
ATP	adenosin trifosfát (adenosine triphosphate)
BAT	hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue)
CNS	centrální nervový systém
ConA	konkanavalin A (concanavaline A)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FA	mastné kyseliny (fatty acid)
FACS	fluorescent activated cell sorting
FBS	fetální telecí sérum (fetal bovine serum)
FFA	volné mastné kyseliny (free fatty acid)
FGF21	fibroblastový růstový faktor 21 (fibroblast growth factor 21)
GDP	guanosin difosfát (guanosine diphosphate)
GIT	gastrointesticiální trakt
HPA	hypothalamo-hypofyzární systém (hypothalamic-pituitary-adrenal)
HPT	hypothalamus-hypofýza-štítná žláza (hypothalamic-pituitary-thyroid)
IFN	interferon
IL	interleukin
ILC	přirozené lymfoidní buňky (innate lymphoid cell)
IL-R	interleukin receptor
iNKT	invariantní T přirozený zabíječ (invariant natural killer T cell)
LPS	lipopolysacharid
MAOA	monoamin oxidáza A

Met-enk	Methionin-enkefalinový peptid
NE	noradrenalin (norepinephrine)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NKT	T přirozený zabíječ (natural killer T cell)
PBMC	periferní krevní mononukleární buňky (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	fosfátový pufr (Phosphate saline buffer)
PPAR	receptor aktivovaný peroxizomovým proliferátorem (peroxisome proliferator-activated receptor)
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time polymerase chain reaction)
SAM	makrofágy asociované se sympatickým neuronem (sympathetic neuron-associated macrophages)
T4	tyroxin
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TH	tyrozin hydroxyláza
Th	pomocný T lymfocyt (T helper cell)
TLR	toll-like receptor
TNF	faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)
TRP	tranzientní receptorové potenciálové kanály (transient receptor potential channel)
UCP1	termogenin (uncoupling protein 1)
WAT	bílá tuková tkáň (white adipose tissue)

1 Úvod

Vliv chladové adaptace na imunitní systém je mezi širokou veřejností dosti diskutované téma. O otužování kolují různé pravdy, avšak vědeckých důkazů je málo. Velmi dobře je popsán proces termoregulace a termogeneze, i když zde se také nachází spousta nevyřešených otázek. Hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue - BAT), běžování bílé tukové tkáně (white adipose tissue - WAT) a objevení „brite“ adipocytů vnáší nové otázky do těchto procesů. Bioaktivní produkty adipocytů, které během termogeneze podléhají změnám, modulují imunitní systém, což také ovlivňuje signalizaci nervových buněk. Propojení imunitního a nervového systému se zdá být v mnoha biologických procesech velmi důležité. Popsání základních mechanismů vlivu chladové adaptace na imunitní buňky proto může přinést vysvětlení pro jiná klinicky relevantní témata, jako je léčba obezity nebo kardiovaskulárních chorob.

2 Literární přehled

Následující literární přehled poskytuje zjednodušený náhled do procesu chladové adaptace. Zabývá se především popisem termoregulace, změnám v tukové tkáni a její regulace. Dotýká se imunitních buněk a popisuje známé i diskutabilní regulace. Představuje část velmi komplexního a složitého systému, jehož funkčnost je však nesmírně důležitá.

2.1 Termoregulace

Udržení teploty organismu je zcela zásadní pro přežití teplokrevných živočichů včetně člověka. Termoregulace je děj, který udržení teploty zajišťuje. Musí být zabezpečena správná teplota pro funkci metabolismu a průběhu enzymatických reakcí. Na změnu vnější teploty reagují termoreceptory, což jsou nervové buňky, které se nachází na celé periférii těla, ale i v centrálním nervovém systému (CNS). Jejich podrážděním dochází k aktivaci a přenosu informace do hypothalamu, který funguje jako termoregulační centrum. Za zvýšené teploty dochází k aktivaci přední části hypothalamu (Aronsohn-Sachsova centra), což vede k inhibici sympatických center v zadním hypothalamu. Následkem je vasodilatace, evaporace a omezení produkce tepla. Za snížené teploty probíhá reakce opačně, je tedy stimulován zadní hypothalamus (Isenschmidt-Krohlovo centrum). Dochází k vasokonstrikci a zvýšení metabolismu. Pokud tyto mechanismy nestačí ke zvýšení tělesné teploty, dochází k termogenezi. Termogenezi můžeme rozdělit na třesovou a netřesovou podle toho, jakým způsobem a kde teplo vzniká.

2.1.1 Třesová termogeneze

Třesová termogeneze se využívá k okamžitému zvýšení tělesné teploty. Dochází ke spontánnímu třesu příčně pruhované svaloviny o frekvenci 10-20 stahů za sekundu, který je poháněn přeměnou adenosintrifosfátu (adenosine triphosphate - ATP) na kinetickou energii bez provedené práce. Tato energie je převedena na teplo. Kontrakce svalů jsou způsobeny nervovými vlákny, která stimulují svalová vřeténka (Haman and Blondin, 2017). V dospělém věku ji využívají především větší savci včetně člověka.

2.1.2 Netřesová termogeneze

Netřesová termogeneze, někdy též označována jako chemická termogeneze, využívá odlišné mechanismy pro výrobu tepla. Zcela zásadní je zde BAT. Aby mohla být BAT

producentem tepla, musí dojít k její aktivaci. Při podráždění chladových receptorů v kůži dojde k vyplavení adrenalinu a noradrenalinu (norepinephrine - NE) ze sympatických nervů do krevního řečiště, což má za následek zvýšení metabolismu. Tyto neurotransmitery se váží na adrenergní receptory (AR) a spouští signální kaskády. Dochází k odbourávání tuků a glykogenu, zvyšuje se koncentrace glukózy v krvi a zvyšuje se tepová frekvence (Nedergaard et al., 2007). V procesu termogeneze je nejzásadnější vazba NE na β 3-AR, který je exprimován v BAT. Vazba na tento receptor spouští signální kaskádu, na jejímž konci je aktivace proteinu termogeninu (uncoupling protein 1 - UCP1), který je pro netřesovou termogenezi nezbytný. UCP1 se nachází na vnitřní mitochondriální membráně a umožňuje odprážení gradientu protonů vznikajícího při respiraci. Nedochozí tak k syntéze ATP a návratu protonů přes ATP-syntázu, ale protony přecházejí přímo po chemickém gradientu zpět do matrix mitochondrií. Následkem je rozptýlení protonmotivní hnací síly, která je převedena na teplo (Azzu and Brand, 2010). Inhibici UCP1 zprostředkovávají cytosolické purinové nukleotidy guanosin difosfát (guanosine diphosphate - GDP) a adenosin difosfát (adenosine diphosphate - ADP) (Li et al., 2017). Po delším působení chladu se zdá být důležitý vliv tyroidních hormonů. Například hormon tyroxin (T4) urychluje rozklad tuků a zvyšuje činnost mitochondrií (Bianco and McAninch, 2013). Netřesovou termogenezi využívají u člověka především novorozenci. Nalezneme ji také u malých savců, neosrstěných mláďat a například u hibernantů.

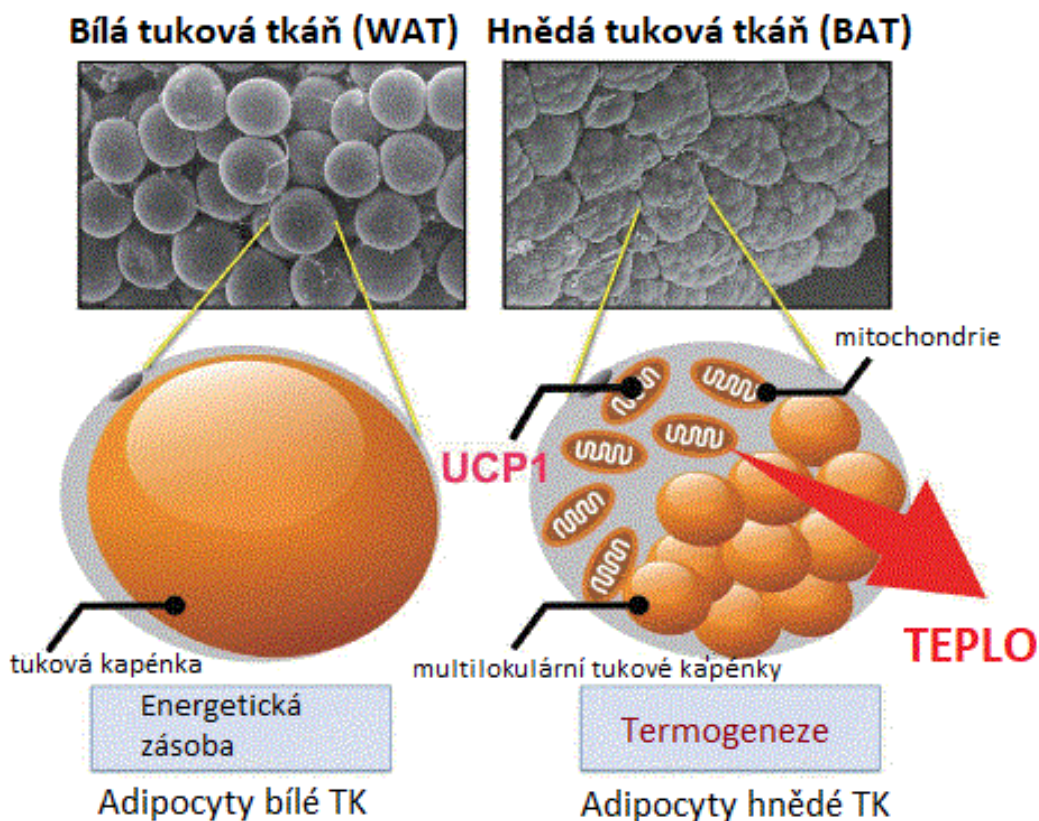
2.2 Tuková tkáň

Tuková tkáň je volná pojivová tkáň složená převážně z adipocytů. Kromě adipocytů se v ní vyskytují preadipocyty, fibroblasty, vaskulární endotelové buňky a buňky imunitního systému. Existují dva typy tukové tkáně - WAT a BAT. WAT je určený ke skladování energie, zatímco BAT se podílí na energetické homeostazi organismu produkcí tepla. Během věku se jeho objem zmenšuje, avšak nikdy nevymizí zcela úplně a hraje velmi důležitou úlohu v organismu (Nedergaard et al., 2007; Virtanen et al., 2009).

Adipocyty WAT obsahují zpravidla jednu tukovou kapénku, ve které jsou uloženy triglyceridy a estery cholesterolů, které figurují jako zásoba energie. Kapénka může zabírat až 90% objemu buňky, buněčné jádro je zatlačeno do periferie a spolu s ním i buněčné organely. Mitochondrie ve WAT jsou tenké a prodloužené (Saely et al., 2011). Mimo skladování energie slouží bílý tuk také jako teplený izolant a ochrana vnitřních orgánů.

Nalezneme ho pod kůží (podkožní tuk), kolem vnitřních orgánů (viscerální tuk), v kostní dřeni (žlutá kostní dřeň) a ve svalech (intramuskulární tuk).

Adipocyty v BAT nemají pouze jednu, ale mnohem více menších kapének. Tento jev se nazývá multilokularita. Nejdominantnější složkou hnědého adipocytu jsou mitochondrie, které jsou větší, ve vyšším počtu a často obsahují více krist (Obrázek 1). Větší počet mitochondrií je zásadní pro výrobu tepla při netřesové termogenezi. Hnědá barva tukové tkáně je způsobena vyšší koncentrací cytochromu z mitochondrií a podpořena silnější vaskularizací než u WAT (Cinti, 2009; Giralt and Villarroya, 2013). BAT u člověka nalezneme hlavně u novorozenců v oblasti hrudní páteře a mezi lopatkami, kde může tvořit až 5% jejich tělesné hmotnosti. Do relativně nedávné doby se předpokládalo, že u dospělého člověka se BAT vůbec nevyskytuje. Až s použitím pozitronové emisní tomografie k detekci rakovinových metastáz se přítomnost malých ložisek BAT potvrdila i u dospělého člověka (Yeung et al., 2003). Ta nalezneme v oblasti hrudi a krku, avšak během života se rychle zmenšují (van Marken Lichtenbelt et al., 2009). U malých savců zůstává BAT po celý život a je zcela zásadní. Oba typy tukové tkáně jsou metabolicky, endokrinně a parakrinně aktivní. Produkují hormony, enzymy, cytokiny či různé růstové faktory. Podílí se na energetickém metabolismu v organismu a jsou schopny komunikace s jinými buněčnými typy a tkáněmi (Saely et al., 2011).

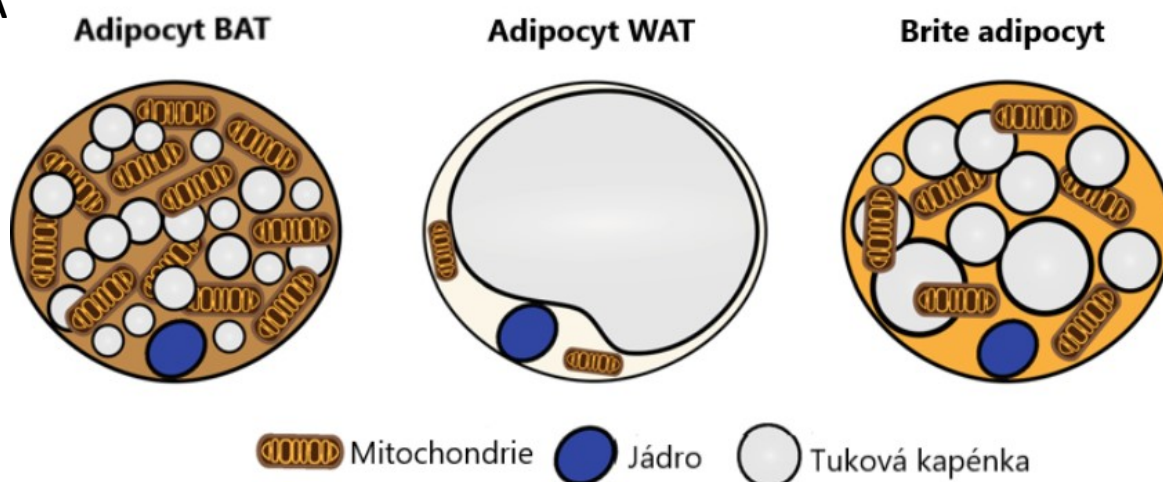


Obrázek 1: Adipocyty BAT a WAT. Schéma WAT a BAT a jejich adipocytů se znázorněnou strukturou buněk a jejich funkcí v modrém rámečku. (Goto et al., 2016)

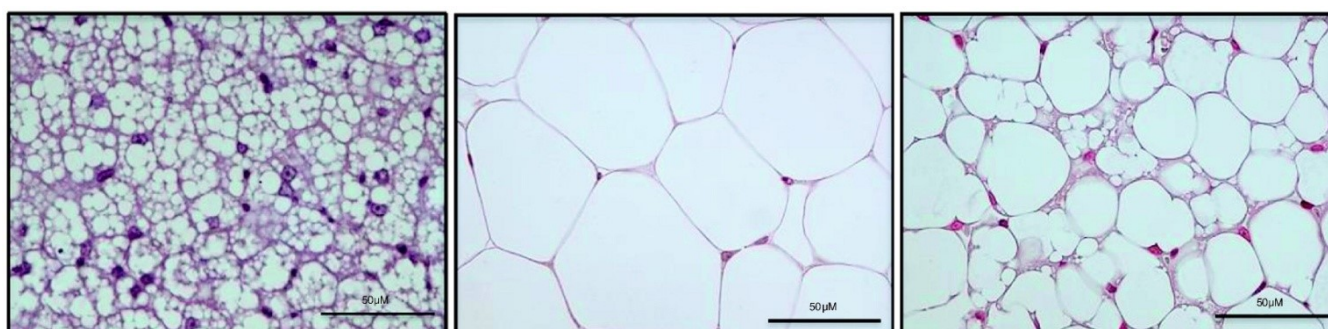
2.2.1 Běžové adipocyty

Kromě typicky bílé a hnědé tukové tkáně můžeme nalézt také adipocyty běžové nebo adipocyty "hnědé v bílém" (brown in white - brite). Tyto adipocyty nevznikají z prekurzorů pro BAT, ale z prekurzorů pro adipocyty bílé tukové tkáně, a nebo přímo rediferenciací z bílých adipocytů. Nejdůležitějším podnětem pro jejich vznik je chlad. Jedná se o adipocyty, které se svojí morfologií a fyziologií velmi podobají klasickým hnědým adipocytům. Je u nich aktivní exprese UCP1 proteinu, dochází k tvorbě multilokulárních tukových kapének a ke zmnožení mitochondrií (Obrázek 2; Tabulka 1) (Harms and Seale, 2013; Keipert and Jastroch, 2014). Proces, kdy vznikají běžové adipocyty rediferenciací z bílých se nazývá běžovění tukové tkáně. Právě tyto běžové a brite adipocyty se uplatňují u dospělého člověka, kde nedochází k vývoji nové pravé BAT. U malých hlodavců dochází jak k tvorbě nových pravých adipocytů hnědé tukové tkáně, tak také k běžovění tuku bílého (Giralt and Villarroya, 2013). Proces běžovění je však reverzibilní, nicméně pokud živočich zůstává v chronickém chladu po delší dobu, běžové adipocyty mohou přijmout svůj nový fenotyp a plnit funkci BAT (Rosenwald et al., 2013).

2A



2B



Obrázek 2: Morfologie adipocytů. Na obrázku jsou naznačeny adipocyty BAT, WAT a brite adipocyty (2A). Hnědě jsou znázorněny mitochondrie, modře jádra a bíle tukové kapénky. Řezy hnědou, béžovou a bílou tukovou tkání jsou barveny hematoxylin eosinem (2B). Měřítka je 50 μm. (Jung et al., 2018; Keipert and Jastroch, 2014)

Tabulka 1: Vlastnosti adipocytů. V tabulce jsou shrnuty nejdůležitější vlastnosti adipocytů BAT, adipocytů WAT a brite/běžových adipocytů. (Keipert and Jastroch, 2014)

	Adipocyt BAT	Adipocyt WAT	Brite adipocyt
Koncentrace mitochondrií	Vysoká	Nízká	Střední
Morfologie tukových kapének	Multilokulární	Unilokulární	Multilokulární
Expese UCP1	Pozitivní	Negativní	Pozitivní
Primární funkce	Termogeneze Endokrinní produkce	Zásoba energie Endokrinní produkce	Termogeneze Endokrinní produkce

2.3 Chlad a stres

Snížení teploty se dá označit za stresový podnět. Ten potom můžeme podle délky trvání rozdělit na krátkodobý - akutní chlad nebo dlouhodobý - chronický chlad až po stav teplotní aklimatizace. Rozdílné účinky mezi akutním a chronickým stresem jsou dobře známy. Akutní stres není pro zdravé jedince škodlivý, chronický stres však může znamenat zdravotní rizika. Při dlouhodobém stresu je prokázáno déletrvající hojení ran a vyšší riziko onemocnění. Změny vykazuje i imunitní systém. Během akutní stresové fáze se uplatňují především mechanismy přirozené imunity, protože dochází k zvýšení počtu granulocytů a NK (natural killer) buněk. Celkově můžeme pozorovat nárůst buněčné cytotoxicity. Chronický stres naopak vyvolává posun ke specifické T pomocné (T helper - Th) 2 imunitní reakci a na ní závislou humorální imunitu založenou na protilátkách (Bianco and McAninch, 2013).

2.3.1 Regulační osy

Hypothalamo-hypofyzární systém (Hypothalamic-pituitary-adrenal - HPA), který je součástí neuroendokrinního systému, někdy též označován jako HPA osa, řídí reakce na stres. Zároveň ale i spouští dalších tělesných procesů, včetně trávení, skladování energie, emocí, nálady. Jeho další funkcí je i ovlivňování imunitního systému. Jak již název napovídá, skládá se ze dvou hlavních částí: hypothalamu a hypofýzy. Následně hraje vliv adrenalin vyplavovaný z dřeně nadledvin a steroidní hormony produkované v kůře nadledvin. Chladové termoreceptory v kůži stimulují sympatikus a stresová odpověď aktivuje sympatoadrenální dráhu. Neurotransmiterem v tomto procesu je NE. V mozku se aktivuje HPA osa a dochází k přenosu signálu po celém těle. NE je vyplavován do těla, kde se váže na AR, které jsou spřažené s G-proteiny a po navázání katecholaminů spouští příslušné signální dráhy. Dělí se na receptory alfa (α) a beta (β) podle funkce a afinitě ke konkrétnímu substrátu. Odlišnou mají také lokalizaci v tkáních. V případě stresu a chladové adaptace nás zajímají především β AR, které se dělí do 3 typů. β 1AR nalezneme především v srdci; β 2AR v plicích, svalech, trávicím traktu a jsou dominantně exprimovány na buňkách imunitního systému. β 3AR jsou exprimovány v BAT, v žlučníku a v močovém měchýři (Pardon et al., 2003). Některé buňky imunitního systému však také exprimují tento receptor (Laukova et al., 2012). Rozdělení exprese není striktní, ve tkáních se může vyskytovat i více typů receptorů (Pardon et al., 2003).

HPA osa zajišťuje také hormonální změny, jako je produkce kortizolu a kortikosteroidů. Hormonální změny zajišťuje také osa hypotalamus-hypofýza-štítná žláza (hypothalamic-pituitary-thyroid - HPT). V HPT ose hraje nejdůležitější roli enzym jodothyronin deiodináza, který reguluje aktivitu hormonů štítné žlázy, T4 nebo trijodtyroniny. Tyto hormony ovlivňují úroveň bazálního metabolismu, ale dokážou také zvyšovat účinky jiných látek, jako například katecholaminů nebo kortizolu. V neposlední řadě působí jako diferenciační faktory a proto může T4 podpořit tvorbu BAT (Bianco and McAninch, 2013).

2.4 Mechanismy ovlivňující běžování tukové tkáně

Mezi faktory ovlivňující fenotyp tukové tkáně nepatří zřejmě jenom vnější teplota. Je popsáno mnoho mechanismů vnitřních, jako již zmíněný stres, potřeby energetického metabolismu nebo mastné kyseliny. Běžování tukové tkáně však mohou ovlivnit také vlivy vnější, jako například přijímaná potrava nebo fyzická aktivita. Překvapujícím faktorem může být také vliv mikrobiomu.

2.4.1 Mastné kyseliny

Navázáním NE na AR β 3 v BAT dochází k aktivaci lipáz a zvýšení lipolýzy. Hlavními enzymy jsou hormon senzitivní lipáza a adipocytární triglyceridová lipáza. Uvolněné mastné kyseliny (free fatty acid - FFA) slouží jako substrát pro mitochondriální β -oxidaci a zvyšují koncentraci FFA v oběhu (Schweiger et al., 2006). Zásadní funkcí při reakci na chlad je však aktivace UCP1. Díky FFA dokáže UCP1 překonat inhibiční efekt cytosolických ADP a GDP, a stává se aktivním (Li et al., 2017). Mitochondrie z BAT jsou mnohem citlivější na přítomnost FFA než mitochondrie v jiných tkáních, což souvisí právě s proteinem UCP1 a jeho rolí při termogenezi. Vzhledem k omezené možnosti ukládání tuků v hnědých adipocytech je koncentrace mastných kyselin (fatty acid - FA) doplňována z krevního oběhu (Hoeke et al., 2016). Mechanismus aktivace UCP1 pomocí FFA není zcela dobře popsán. Nejpravděpodobnější se zdá být, že UCP1 slouží jako symporter aniontů mastných kyselin a protonů (Fedorenko et al., 2012). V každém případě lipolýza v adipocytech BAT indukuje termogenezi a naopak, termogeneze v BAT nelze spustit bez vyvolání lipolýzy. Celý proces je závislý na β -adrenergní signalizaci (Li et al., 2017).

V tomto procesu nejde opomenout jaderné receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor - PPAR), které slouží jako transkripční faktory. PPAR α je hlavním regulátorem metabolismu lipidů a je důležitým

faktorem pro expresi UCP1 (Komatsu et al., 2010). PPAR γ reguluje ukládání FA a metabolismus glukózy. Geny aktivované PPAR γ stimulují příjem lipidů a adipogenezi. PPAR γ je vysoce exprimován v BAT, kde má zásadní význam pro diferenciaci hnědých adipocytů potřebných pro vývoj, funkci a přežití tkáně (Petrovic et al., 2008). PPAR γ i PPAR α mohou být aktivovány adrenergní signalizací, což má za následek tvorbu BAT. Zdá se však, že PPAR γ může být stimulován i nezávisle na adrenergní aktivaci a stále indukovat termogenní morfologii tukové tkáně (Festuccia et al., 2010; Hondares et al., 2011).

2.4.2 Vliv mikrobiomu

Mikrobiom je soubor mikroskopických organismů, zahrnující bakterie, archea, houby a protista. Lidským či zvířecím mikrobiomem chápeme všechnu mikroflóru, která se nachází na nebo v jakékoliv tkáni či tělní tekutině. U člověka je odhadovaný počet buněk mikroflóry až desetkrát větší než je počet vlastních buněk. U některých mikroorganismů známe velmi dobře jejich úlohu a jsou pro hostitele užitečné, u většiny bohužel není jejich role přesně popsána. Symbiotický vztah mezi metabolismem a mikrobiomem střeva je asi nejvíce prostudovaná kapitola. Dobře zdokumentovaný je stav střevní mikroflóry a jejich závislosti při některých onemocněních (Althani et al., 2016). Gastrointesticiální trakt (GIT) hraje úlohu v energetickém metabolismu. Vzhledem k přítomnosti mikrobiomu je jasné, že dokáže zásadně ovlivnit energetickou homeostázu. Předpokládá se, že díky této vlastnosti může produkovat molekuly, které mají vliv na metabolismus BAT a běžování WAT. Během chladové expozice je potvrzena dramatická remodelace střevního mikrobiomu. Tato chladová mikrobiota zvyšuje citlivost na inzulín, umožňuje toleranci chladu a podporuje běžování tukové tkáně, což vede ke zvýšení energetického výdeje a ztrátě tuku. (Chevalier et al., 2015; Wankhade et al., 2016). Naproti tomu bylo pozorováno, že běžování tukové tkáně je podporováno i prostou deplecí střevního mikrobiomu. Autoři si vysvětlují zvýšenou citlivost na inzulín a změny v tukové tkáni infiltrací eozinofilů. Pozorována byla zvýšená cytokinová signalizace typu 2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13) a polarizace makrofágů směrem M2 (Suárez-Zamorano et al., 2015).

2.4.3 Vliv potravy

Jako potrava jsou označovány látky, které jsou spotřebovány k zajištění nutriční podpory organismu. Obsahuje základní živiny, jako jsou sacharidy, bílkoviny, tuky, vitamíny

a minerály. Typ stravy a složení potravy může mít vliv na metabolismus organismu a na jeho celkový zdravotní stav.

Látky přijímané v potravě mohou ovlivňovat termogenezi, stejně jako metabolismus tukové tkáně. Zvýšený příjem lipidů má za následek vyšší uvolňování FFA a zvýšení termogeneze. Tuto reakci také podporují hormony produkované GIT (Kaufman et al., 1986). Různé FA v potravě mají vliv na koncentraci katecholaminů v moči, na expresi UCP1 a vývoj BAT. Důvodem je aktivace sympatického nervového systému přes tranzientní receptorové potenciálové kanály (transient receptor potential channel - TRP) (Goto et al., 2016). Receptory TRP lze rozdělit na více skupin, podtyp TRPV jsou kanály pro vaniloid a uplatňují se při detekci teploty a bolesti způsobené teplotou (tzv. nocicepce). Tyto kanály vykazují vyšší aktivitu po příjmu rybího oleje v potravě a následné zvýšení aktivity UCP1 v BAT i běžových adipocytech ve WAT (Kim et al., 2015). Kapsaiciny obsažené v pepři, způsobující pocit pálivého, také aktivují TRPV kanály, které poté stimulují BAT a zvyšují výdej energie (Yoneshiro et al., 2011). Mnoho dalších součástí potravy zvyšuje aktivitu BAT stimulací sekrece NE a adrenalinu prostřednictvím HPA dráhy (Goto et al., 2016). Posledním příkladem může být oleuropein z olivového oleje, po jehož konzumaci vzroste exprese UCP1 a dochází ke zvýšení funkce BAT (Oi-Kano et al., 2008). Zajímavé je, že aktivitu TRP kanálů může ovlivnit i mikrobiom. Například kyselina linonová vznikající jako metabolit střevních bakterií zvyšuje energetický metabolismus aktivací TRPV1 (Kim et al., 2017).

Nezáleží však pouze na energetické složce potravy, ale také na její chuti a vůni. Bylo prokázáno, že chuť i vůně stimulují senzory nervy, v jejichž závislosti dochází ke spuštění signálních kaskád, k vyplavení katecholaminů a adrenergní signalizaci, v jejímž důsledku dochází ke zvýšení metabolismu v BAT (Goto et al., 2016).

2.4.4 Vliv fyzické aktivity

Cvičení napomáhá fyzické kondici a zdravému životnímu stylu. Fyzická aktivita má za následek masivní aktivaci sympatického nervstva, které hraje hlavní roli při zprostředkování kardiovaskulárních a metabolických reakcí, jako je přísun kyslíku a energie do svalu. Nicméně vzhledem ke vznikajícímu teplu ve svalech během fyzické aktivity se dlouhou dobu nepředpokládala vliv na netřesovou termogenezi. Pochybnosti vneslo až zjištění, že běžecký trénink zvyšuje koncentraci tyrozin hydroxylázy (tyrosine hydroxylase - TH), což je enzym odpovědný za syntézu katecholaminů. Následná zvýšená koncentrace NE vede k navýšení počtu hnědých a bíle adipocytů a slabé aktivaci UCP1.

Chladová expozice je však stále mnohem silnější aktivátor netřesové termogeneze (De Matteis et al., 2013). Dnes je již běžovnění tukové tkáně během cvičení odbornou veřejností přijímáno. Objeven byl vliv myokinů, které se uvolňují během fyzické aktivity a podporují tvorbu brite adipocytů. Například myokin irsin dokáže indukovat expresi UCP1 v tukových buňkách a to pomocí zvýšení exprese PPAR α (Boström et al., 2012). Tento myokin je indukován pomocí transkripčního koaktivátoru PGC-1, který chrání svaly před zánětem a oxidačním stresem, a ovlivňuje také citlivost na inzulín a inzulínovou signalizaci. Jeho další významnou úlohou je regulace v mitochondriální biogenesi (Wenz et al., 2009). Bylo prokázáno, že bez myokinu irsinu nedochází v tukové tkáni k běžovnění během fyzické aktivity a zdá se tak být důležitým regulátorem (Boström et al., 2012).

2.5 Imunitní systém

Imunitní systém má za cíl ochránit tělo před cizím a škodlivým. Jeho hlavním úkolem je zachovat celistvost a homeostázu organismu. Rozlišujeme dva typy imunitního systému: vrozený a adaptivní imunitní systém. Některé buněčné typy imunitního systému mají přísnou lokalizaci, jiné kolují krevním řečištěm a jsou atrahovány do potřebného místa. Některé imunitní buňky jsou lokalizovány i v tukové tkáni, kde se mohou podílet na regulaci energetického metabolismu, stejně jako na reakci na teplotní změny. Tyto regulace však mohou působit i obráceně. To znamená, že energetický metabolismus nebo změna teploty může mít vliv na buňky imunitních populací.

2.5.1 Vliv chladové adaptace na imunitní systém

Imunitní systém může být za snížené teploty ovlivněn více způsoby. Změny v tukové tkáni jsou spojeny se změněnou produkcí bioaktivních látek adipocyty. Tím také dochází k ovlivňování buněk imunitního systému, které infiltrují tukovou tkáň (Vargovic et al., 2016). V tukové tkáni se nachází mnoho buněčných typů imunitních buněk, mimo jiné například přirozené lymfoidní buňky (innate lymphoid cell - ILC) a eosinofily, které mohou ovlivňovat imunitní systém produkcí cytokinů a zároveň se podílejí na běžovnění tukové tkáně (Fabbiano et al., 2016). Dalším způsobem je přímá sympatická inervace tkáni imunitního systému, která ovlivňuje imunitní buňky pomocí adrenergní signalizace. Zcela jistě se zde uplatňují regulační osy a nelze opomenout ani vliv hormonů (Perez et al., 2018).

Na rozdíl od termogeneze, vliv chladu na imunitní systém není prozatím dobře popsán, ačkoliv byl studován na různých modelech. U hmyzu se podařilo potvrdit, že samotný chlad

stačí k aktivaci imunitního systému (Salehipour-shirazi et al., 2017). U obratlovců je situace složitější. Studován byl především vliv působení chladu na buňky přirozené imunity - nejčastěji makrofágy, avšak tyto výsledky jsou velmi kontroverzní (Fischer et al., 2017; Nguyen et al., 2011). Změny v zastoupení jednotlivých imunitních populací buněk byly studovány pouze okrajově (Huang et al., 2015; Kim et al., 2014). V pracích zabývajících se imunitním systémem za snížené teploty, byly zpravidla experimenty prováděny pouze po krátkou dobu. Práce tak nemohou zaznamenat útlum stresového stavu a přesmyk z prozánětlivého na protizánětlivé prostředí (Gagnon et al., 2014).

Obecně lze říci, že po krátkém vystavení chladu organismus reaguje na stres a dochází k prozánětlivé polarizaci imunitního systému (Belay et al., 2017). Po delší adaptaci dochází v organismech k proti-zánětlivé odpovědi (Vargovic et al., 2016), která je spojena s tvorbou BAT a běžováním adipocytů (Fabbiano et al., 2016). Eozinofily přítomné v tukové tkáni produkují interleukin (IL) 4, který polarizuje imunitní odpověď a mění fenotyp dalších imunitních buněk. Signalizace přes IL-4 receptor (IL-4R) reguluje změny v tukové tkáni směrem k specializovaným adipocytům, jejichž aktivita redukuje metabolická onemocnění včetně obezity (Qiu et al., 2014). Ačkoliv je částečně popsána polarizace imunitního systému během chladové aklimatizace, není mnoho známo o efektech na konkrétní populace buněk imunitního systému.

2.5.2 Buňky vrozeného imunitního systému

2.5.2.1 Eozinofily

Eozinofily jsou leukocyty, které se uplatňují v boji proti mnohobuněčným parazitům a určitým infekcím u obratlovců. Nalezneme je také při kontrole alergické reakce. Jsou schopné aktivní degranulace, která uvolňuje toxické bazické proteiny. Produktem eozinofilů jsou růstové faktory a cytokiny Th2 odpovědi. Nejtypičtějším cytokinem pro eozinofily je IL-5. Dalšími jsou velmi důležité IL-4 a IL-13. Během chladové adaptace a běžování tukové tkáně je působením IL-4 a IL-13 indukován alternativně aktivovaný fenotyp makrofágů. Zdá se, že eozinofily jsou významným producentem IL-4 v odpovědi na chlad (Qiu et al., 2014). Obecně eozinofily v tuku hrají významnou roli při regulaci metabolické homeostázy a udržování fenotypu makrofágů. Prekurzory adipocytů mohou na IL-4 reagovat pomocí exprimovaného IL-4R (Lee et al., 2015). Při obezitě je produkce IL-4 eozinofily snížena, což ovlivní celou tukovou tkáň a včetně regulace buněk v tuku přítomných (Wu et al., 2011).

2.5.2.2 Makrofágy

Makrofágy jsou nejpočetnějším imunitním buněčným typem nacházejícím se v tukové tkáni. Nejedná se ale o jednotnou populaci. Jednotlivé typy mohou být rozlišeny na základě exprimovaných markerů a lokalizace. Podle funkce existují tři typy polarizace makrofágů. Klasicky aktivované makrofágy (M1) jsou popsány jako prozánětlivé díky produkci prozánětlivých cytokinů interferonu- γ (IFN- γ), IL-1, IL-6 a faktoru nádorové nekrózy (tumor necrosis factor -TNF). Jsou schopné zabíjet patogeny pomocí kyslíkových a dusíkatých radikálů a uplatňují se během akutní fáze imunitní reakce (Hume, 2015).

Alternativně aktivované makrofágy (M2) je větší skupina makrofágů, která je spojována především s Th2 buněčnou odpovědí. Jsou aktivovány IL-4, IL-10 a IL-13, což jsou cytokiny, které vedou k inhibici prozánětlivých Th1 signálů. M2 makrofágy se uplatňují při remodelaci tkání a hojení ran svojí produkcí extracelulární matrix, IL-10 a transformujícího růstového faktoru beta (transforming growth factor - TGF- β). Regulační makrofágy, dříve řazené mezi M2, slouží k utlumení imunitní odpovědi. Vyznačují se vysokou produkcí IL-10, která inhibuje syntézu IL-12. Na rozdíl od M2 však nejsou schopny produkce extracelulární matrix (Hume, 2015).

Nejmladší popsanou skupinou makrofágů jsou makrofágy asociované se sympatickým nervstvem (sympathetic neuron-associated macrophages - SAM). Jak se z nejnovějších studií zdá, jsou vhodnými kandidáty pro studium neuroimunitních mechanismů. Jsou lokalizovány jako rezidentní makrofágy sympatického nervstva a vykazují zvláštní schopnost importovat a degradovat NE (Pirzgalska et al., 2017).

Během chladové expozice eosinofily produkují IL-4, který by měl vést ke změně makrofágů na alternativně aktivované. Původně bylo předpokládáno, že tyto M2 produkují NE a ovlivňují termogenezi (Nguyen et al., 2011). Přítomnost M2 během chladové adaptace byla potvrzena, ale produkce NE v makrofázích nikoliv (Fischer et al., 2017). Nyní s objevem SAM se zdá být situace ještě komplikovanější. SAMs nejsou schopny syntézy NE, ale zcela jistě dokážou regulovat jeho hladinu, vychytávat ho z okolí nervů pomocí specifického transportéru a degradovat ho pomocí monoamin oxidázy A (MAOA). Tím brání nadměrné adrenergní signalizaci, která by mohla být pro organismus škodlivá. Překvapivě však SAMs vykazují prozánětlivý fenotyp (Pirzgalska et al., 2017). Vzhledem k důležitosti NE při netřesové termogenezi a přítomnosti makrofágů v tukové tkáni se zdá být jejich vliv na katabolismus katecholaminů velmi důležitý (Camell et al., 2017). Makrofágy (M2) se tedy

podílejí na polarizaci tkáně produkcí cytokinů a zároveň mohou ovlivnit běžování tkáně na základě adrenergní signalizace.

2.5.2.3 Přirozené lymfoidní buňky

ILC patří mezi imunitní buňky lymfoidní linie, které jsou ale definovány nepřítomností specifického B nebo T receptoru. Můžeme je rozdělit do tří skupin: ILC1, ILC2 a ILC3. ILC1 jsou buňky cytotoxické a vyvolávají Th1 imunitní odpověď. Mezi ILC1 se řadí i NK buňky. ILC2 mohou produkovat cytokiny druhého typu a jsou významné v regulaci tukové tkáně a termoregulaci. Skupina ILC3 je vrozeným protějškem pro Th17 buňky.

ILC2 reagují na cytokin IL-33. Během chladové adaptace se podílí na běžování tukové tkáně dvěma mechanismy. Prvním je produkce methionin-enkefalinového peptidu (Met-enk), který působí přímo na adipocyty, závislá na IL-33 (Brestoff et al., 2015). Druhým mechanismem je podpora proliferace adipocytů a diferenciaci na brite adipocyty pomocí IL-4 a IL-13 (Lee et al., 2015). ILC2 mohou také hrát důležitou roli při aktivaci eozinofilů, podporovat M2 fenotyp makrofágů, ale zároveň se účastnit běžování tukové tkáně a termogeneze. Mechanismy vedoucí k sekreci IL-33 bohužel nejsou jasně objasněny (Bénézech and Jackson-Jones, 2019; Ding et al., 2016; Molofsky et al., 2013).

2.5.3 Buňky adaptivního imunitního systému

Mezi buňky adaptivního systému patří T a B lymfocyty. Ty se mezi sebou rozlišují expresí T nebo B buněčného receptoru. Změny v zastoupení a aktivaci populací lymfocytů se mění v závislosti na lokalizaci a na stavu prostředí. V případě obezity dochází k zvýšení počtu T i B lymfocytů v tukové tkáni, kde se podílejí na potlačování zánětu. Přirozená buněčná populace (NKT) se v případě obezity v tuku naopak snižuje (Winer et al., 2011).

Roli v chladové adaptaci zřejmě také hrají regulační T buňky (Treg), neboť jsou početně v tukové tkáni zastoupeny. Dalším buněčným typem, který je při termogenezi důležitý, se zdají být invariantní NKT buňky (invariant natural killer T cells - iNKT) (Obrázek 3).

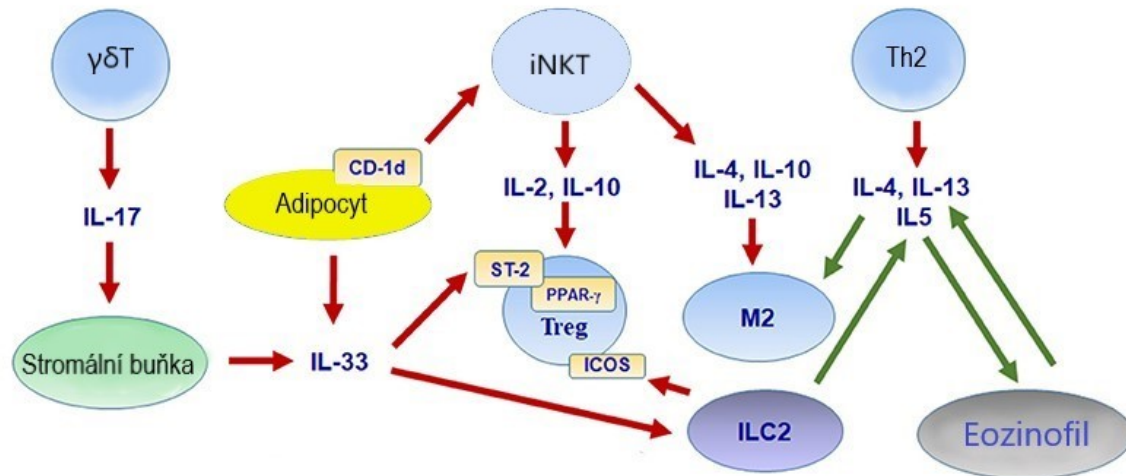
2.5.3.1 T regulační lymfocyty

Treg jsou lymfocyty ze skupiny CD4⁺ buněk, které udržují toleranci vůči vlastním tkáním organismu. Inhibují autoreaktivní klony a nastolují periferní toleranci (Kohlgruber et al., 2018). V BAT a běžovějící tukové tkáni je jejich výskyt vysoký v porovnání s jinými

populacemi T buněk, které se podílejí na iniciaci protizánětlivého prostředí. Zdá se, že mají tkáňově specifické účinky a vliv na inzulínovou toleranci, rozvoj obezity a diabetu. Mechanismus, kterým jsou Treg zachytávány v tukové tkáni není zcela popsán, ale je předpokládán vliv PPAR- γ (Cipolletta et al., 2012). To souvisí s dohledem Treg při přijímání lipidů adipocyty. Druhým vlivem se zdá být dráha IL-33, protože exprese IL-33R na Treg je vysoká. Tento cytokin potom může přispívat k proliferaci Treg a aktivaci ILC2. Dalším mechanismem je vazba membránové molekuly ICOS s ICOS ligandem exprimovaným na ILC2 (Wang and Wu, 2018).

2.5.3.2 Invariantní NKT buňky

iNKT buňky exprimují receptory, které jsou schopné rozeznávat lipidy a glykolipidy prezentované na CD1d molekule. CD1d je exprimována na adipocytech a má podobnou úlohu jako hlavní histokompatibilní komplex na antigen prezentujících buňkách. Díky této vlastnosti je tato malá populace buněk ideální pro rozpoznávání změn v tukové tkáni (Sato et al., 2016). Za normálních fyziologických podmínek produkují iNKT v tukové tkáni regulační cytokiny druhého typu (IL-4, IL-10, IL-13) a udržují protizánětlivé prostředí v tkáni. Inhibují infiltraci M1 makrofágů a podporují M2 fenotyp, stejně jako podporují funkci Treg. Bez jejich přítomnosti převažuje zánětlivý fenotyp a dochází k rozvoji obezity a citlivosti na inzulín. Produkují také cytokin IL-2, kterým regulují proliferaci a supresorovou funkci Treg (Lynch et al., 2015). iNKT mají vliv také na běžování tukové tkáně. Tomu přispívají pomocí fibroblastového růstového faktoru 21 (fibroblast growth factor 21- FGF21) (Lynch et al., 2016).



Obrázek 3: Buňky adaptivního imunitního systému v tukové tkáni. Obrázek demonstruje vztah adipocytů a buněk imunitního systému. Naznačuje, jaké buňky produkují jaké cytokiny a které buňky na ně reagují. Ve žlutých rámečcích jsou naznačeny další molekuly důležité v mezibuněčné komunikaci. (Wang and Wu, 2018)

2.6 Cytokiny

Následující kapitola se věnuje cytokinům, které jsou produkovány během termogeneze a mohou ovlivňovat samotný proces chladové adaptace, změny v tukové tkáni, ale i změny v imunitním systému (Obrázek 4).

2.6.1 Interleukin 4 a interleukin 13

IL-4 má mnoho důležitých funkcí. Inhibuje zánětlivou odpověď prvního typu a spouští odpověď typu druhého. Iniciuje diferenciaci Th2 buněk a B lymfocytů, u kterých podporuje izotopový přesmyk protilátek z IgM na IgG1 a IgE. IL-4 je důležitý ve vývoji M2 makrofágů a žírných buněk. IL-13 je strukturně i funkčně velmi podobný, avšak nalezneme drobné odlišnosti (Qiu et al., 2014).

IL-4 i IL-13 jsou při termogenezi vyvolané chladem zcela zásadní v regulaci odpovědi a stavu prostředí. IL-4 produkují převážně aktivované eozinofily a ILC2. Dalším zdrojem jsou makrofágy infiltrované v tukové tkáni, ve kterých převažuje M2 stav. Zdrojem IL-13 jsou z většiny ILC2. Zmíněné buněčné typy zajišťují v tuku převážně cytokinovou odpověď druhého typu. Oba cytokiny podporují bėžovění tukové tkáně, expresi UCP1 a enzymů odpovědných za regulaci NE aktivity (García et al., 2018). Prekurzory adipocytů exprimují

receptor pro IL-4 a ten tak může ovlivňovat přímo jejich diferenciaci, stejně tak jako pomocí PPAR γ ovlivňuje expresi genů pro oxidaci mastných kyselin a mitochondriální genezi (Kang et al., 2008).

2.6.2 Interleukin 33

IL-33 je silný iniciátor produkce Th2 cytokinů. Může být produkován mnoha buněčnými typy a mnoho dalších buněk ovlivnit. Jak již bylo zmíněno, přesný mechanismus ani původ IL-33 v tukové tkáni však není známý. Nejpravděpodobnější se zdá být produkce samotnými adipocyty a stromálními buňkami. U stromálních buněk byl nedávno popsán unikátní mechanismus - $\gamma\delta$ T lymfocyty produkují IL-17, který vyvolá produkci IL-33 v tukové tkáni a indukuje expresi UCP1 (Kohlgruber et al., 2018).

IL-33 podporuje vývoj a diferenciaci Treg v tukové tkáni a umožňuje jim tak plnit regulační roli. Krom toho také aktivuje produkci IL-13 a IL-5 populací ILC2. IL-13 poté zajišťuje funkci Th2 cytokinů a IL-5 aktivuje eozinofily. Důležitou molekulou se také zdají být Met-enk, které ovlivňují BAT a termogenezi (García et al., 2018).

2.6.3 Methionin-enkefalinový peptid a Meteorin-like hormon

Met-enk, někdy též označovaný jako opioidní růstový faktor, je krátký peptid, který reguluje nocicepci navázáním na opioidní receptory. Tento peptid, vylučovaný ILC2 podporuje diferenciaci adipocytů a napomáhá jejich běžování (Brestoff et al., 2015).

Meteorin-like hormon (metrnl) je homolog met-enk. Pro své nově objevené funkce se u něj někde používá nový název IL-39. Je silně exprimován v tukové tkáni a ve svalech. Jedná se o další molekulu, která stimuluje běžování tukové tkáně stejným mechanismem při vykonávání fyzické aktivity jako při chladové expozici. Aktivuje eozinofily a cytokinovou signalizaci druhého typu. Ke svojí aktivitě využívá stejný transkripční koaktivátor PGC-1, jako zmiňovaný myokin irsin (Rao et al., 2014).

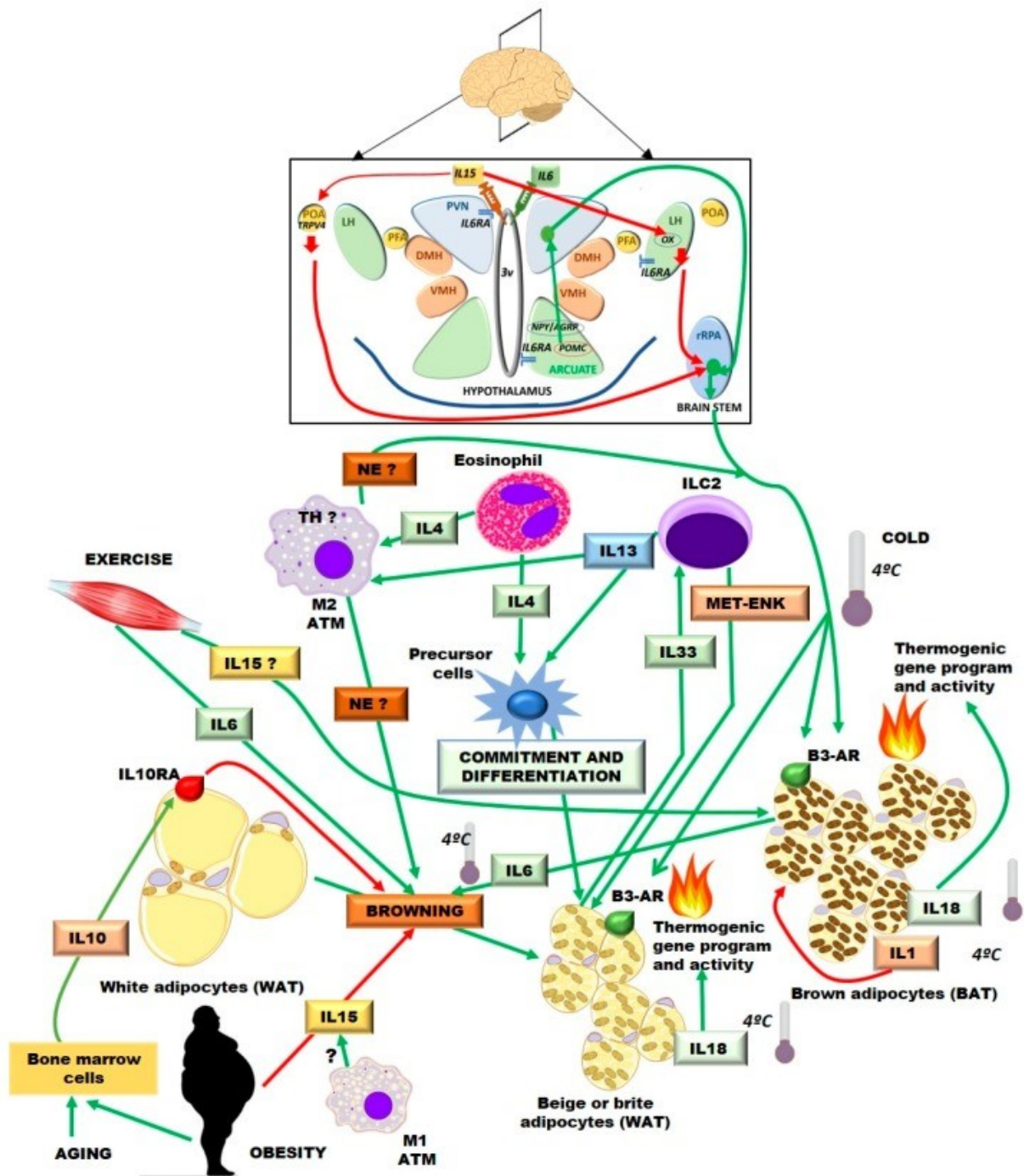
2.6.4 Interleukin 6

IL-6 je znám především jako prozánětlivý cytokin. Působí v akutní fázi a je mediátorem horečky. Mimo to však také působí jako myokin při fyzické aktivitě a iniciuje Th2 imunitní odpověď. Dokáže i spolupracovat s TGF- β a indukovat Treg. Prostřednictvím inhibice TNF- α a IL-1 potom spouští aktivitu IL-10 (Jin et al., 2013). Při fyzické aktivitě

podporuje citlivost na inzulín a tak hraje roli v energetickém metabolismu. Mimo jiné funguje jako tělesný regulátor hmotnosti ovlivňováním příjmu a složení potravy (Villarroya et al., 2017). V tukové tkáni potom podporuje M2 makrofágy a zvyšuje jejich citlivost na IL-4. Tento efekt naznačuje úlohu při udržení tkáňové homeostáze a omezení zánětlivého prostředí (Mauer et al., 2012).

2.6.5 Fibroblastový růstový faktor 21

FGF21 je hormon vylučovaný převážně v játrech, který reguluje příjem jednoduchých cukrů a preferenci sladkých jídel. Podporuje spalování glukózy v tukových tkáních a zlepšuje glykémii a lipidemii. Při chladové expozici, kdy se aktivuje BAT, dochází k produkci FGF21 v hnědých adipocytech. Tím je ovlivněna systémová hladina FGF21, dochází k utlumení produkce tohoto růstového faktoru v játrech a roli producenta přejímá BAT. Exprese je regulována noradrenergí signalizací, stejně jako samotná termogenní genová exprese (Villarroya et al., 2017). Nové studie ukazují, že produkci FGF21 v tukové tkáni mohou řídit iNKT. Výše zmíněnými mechanismy může být ovlivněna i celková hmotnost. FGF21 tedy zcela jistě přispívá k termogenezi a oxidaci metabolitů (Lynch et al., 2016).



Obrázek 4: Přehled hlavních cytokinů. Obrázek znázorňuje cytokiny podílející se na modulaci BAT a energetickém metabolismu a termogenezi běžové tukové tkáně prostřednictvím nervového systému nebo přímým působením na aktivaci hnědých adipocytů a hnědnutí WAT. Zelené šipky značí stimulační, červené šipky inhibiční účinky (García et al., 2018).

2.7 Studie vlivu chladové adaptace na imunitní systém

Během chladové adaptace dochází ke změnám v imunitním systému. Tyto změny nejsou zcela dobře objasněny. U hmyzího modelu bylo popsáno, že chlad aktivuje imunitní systém do té míry, aby bylo kompenzováno poškození způsobené chladem a hmyz se mohl účinně bránit (Salehipour-shirazi et al., 2017). Chlad ovlivňuje u hmyzu samotný vývoj a následné přežívání a rozmnožovací schopnosti jedinců (Košťál et al., 2019). Imunita u ektotermních živočichů je závislá na okolní teplotě stejně jako jejich teplota těla. Dokážou aktivovat nebo potlačit imunitní systém nezávisle na parazitech právě díky okolní teplotě (Ferguson et al., 2018). Například u tilápie bylo pospáno, že akutní stres vyvolaný chladem potlačuje fagocytární aktivitu leukocytů a vede k imunosupresivnímu stavu (Chen et al., 2002). U čtverzubců docházelo k rozvoji oxidačního stresu a apoptózy. Chlad u nich způsoboval poškození DNA (Cheng et al., 2017). Chlazené žáby byly náchylnější k houbové infekci oproti nahříváným, i když cílová teplota byla stejná (Greenspan et al., 2017). Ektotermní živočichové nepochybně využívají okolní teplotu k nastavení příznivé teploty pro imunitní systém, který je pro ně v danou chvíli nejvýhodnější. Nelze ale opomenout, že obdobné vlastnosti se vyvinuli i u parazitů (Ferguson et al., 2018).

U savců je popisován rozdílný efekt krátkodobého akutního chladu a dlouhodobého chronického chladu. Důležité je si uvědomit, že homeostatický vývoj imunity není ovlivněn okolní teplotou a změny mohou být indukovány po dokončení vývoje (Kokolus et al., 2013). Makrofágy během chladové adaptace přijímají protizánětlivý fenotyp, který je zprostředkováván produkcí IL-4 eozinofily a ILC2 (Qiu et al., 2014). Jejich supresorová funkce na buňky sleziny je známa již dlouho dobu (Kizaki et al., 1996). Chronický chladový stres vyvolává snížení počtu neutrofilů a vede k snížení fagocytární aktivity. Některé články hovoří o regulačním fenotypu makrofágů během chladové expozice a schopnosti stimulovat T buňky k produkci regulačních cytokinů (Sesti-Costa et al., 2012). Některé studie poukazují na odlišné výsledky mezi nízkým a vysokým rozdílem mezi teplotami. Pokud je teplota nižší pouze o několik stupňů, dochází k zvýšení imunitní odpovědi, pokud je teplota nižší o více stupňů, dochází naopak k inhibici imunitního systému (Kozyreva and Eliseeva, 2000).

Je známo, že chladový stres zvyšuje náchylnost k infekcím (Belay et al., 2017). Během chladové expozice dochází k potlačení produkce Th1 cytokinů INF- γ a IL-12. To má za následek podporu Th2 prostředí a regulační reakce T buněk (Hu et al., 2016). Zvýšená je naopak produkce regulačního cytokinu IL-10. Tím je potlačena akutní imunitní

odpověď během chladové stresu (Messmer et al., 2014). O vlivu chladové adaptace na imunitu je toho známo velmi málo. Studie naznačují, že počty T a B lymfocytů mají po dlouhodobé adaptaci zvyšující se trend (Janský et al., 1996). Jiné studie hovoří o zvýšení počtu CD4⁺ pomocných T lymfocytů a rozvoji regulačního fenotypu (Shu et al., 1993). Po imunizaci zřejmě dochází ke snížení koncentrace obecných sérových protilátek, avšak ve slezině se zvyšuje počet buněk, které tvoří protilátky (Kozyreva and Eliseeva, 2004).

U lidí byly studie vypracovávány především na sportovcích. Často byla korelována fyzická aktivita s chladovou adaptací (Gagnon et al., 2014; Kim et al., 2014). Výsledky naznačují pozitivní vliv pro lidské tělo a jeho imunitní systém, ale extrémní aktivita a náročné podmínky mohou být škodlivé (Žáková et al., 2017).

Interakce imunitních buněk v procesu termoregulace hraje důležitou úlohu v organismu. Rovněž pochopení základních mechanismů chladové adaptace na imunitní systém se zdá být důležité v mnoha biologických procesech. Doufejme, že více pochopení vnesou Th17, $\gamma\delta$ T a iNKT buňky, které hrají překvapivou roli v termogenezi a zdají se být zajímavými kandidáty při modulování imunitní odpovědi během chladové adaptace. Toto propojení imunitního a nervového systému může vysvětlit klinicky relevantní témata, jako je léčba obezity, diabetu nebo kardiovaskulárních onemocnění.

3 Cíle práce

Cílem práce je popsat vliv chladové adaptace na imunitní systém. V literatuře nejsou téměř žádné práce zabývající se vztahem mezi dlouhodobým chladem a buňkami imunitních populací. Naším úkolem bylo tedy popsat kinetiku chladové adaptace, změny v zastoupení jednotlivých populací a mechanismy, kterými jsou při snížené teplotě ovlivněny.

Ačkoliv práce o imunitním systému chybí, velmi detailně je popsán proces termoregulace. Vzhledem ke známému vztahu BAT a katecholaminů v procesu termogeneze, byl stanoven další cíl. Pomocí inhibitorů β AR popsat vliv adrenergní signalizace na imunitní populace během chladové adaptace.

4 Metody a materiál

Pokusy byly rozdělené na dvě části: pokusy kinetiky chladové adaptace a následující pokusy s inhibitory β AR.

4.1 Zvířata

V první části experimentů byli použiti potkaní samci kmene Wistar (Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Praha, ČR) s hmotností $250 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$. Potkani byli v experimentu chladové adaptace rozděleni do šesti skupin následovně: kontrolní, adaptovaná 10 hodin, adaptovaná 3 dny, adaptovaná 10 dní, adaptovaná 5 týdnů a regresní skupina. Kontrolní skupina byla chována v místnosti s pokojovou teplotou $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Adaptované a regresní skupiny byly chovány v oddělené místnosti od kontrolní skupiny, kde byla nastavena teplota na $10 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Regresní skupina byla po pěti týdnech přemístěná z chladové místnosti do místnosti s pokojovou teplotou, kde byla chována další 2 týdny. Výsledky byly získány ze dvou nezávislých pokusů. V každé skupině bylo 6-12 zvířat.

V druhé části experimentů byli použiti potkaní samci stejného kmene Wistar (Velaz, s.r.o.; Praha, ČR). Potkani byli rozděleni na 6 skupiny: kontrolní skupina bez inhibitoru, kontrolní skupina s inhibitorem β 2AR nebo β 3AR, chladová skupina bez inhibitoru a chladová skupina s inhibitorem β 2AR nebo β 3AR. Kontrolní skupiny byly chovány v místnosti s pokojovou teplotou $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Chladové skupiny byly chovány 10 dní v chladové komoře při teplotě $10 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. 3 dny byli potkani všech skupin ponecháni v klidu a poté jim byl denně po dobu 6 dnů aplikován inhibitor nebo kontrolní roztok. Jako inhibitor β 2AR byl použit ICI-118,551 hydrochlorid (Sigma), který byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku. Aplikován byl v koncentraci 1 mg/kg . Pro inhibici β 3AR byl použit inhibitor SR 59230A hydrochlorid (Sigma) rozpuštěný v dimethyl sulfoxidu (dimethyle sulfoxide - DMSO). Použitá koncentrace byla 2 mg/kg . Inhibitory i kontrolní roztoky byly aplikované peritoneálně. Výsledky byly získané z jednoho pokusu. V každé skupině bylo 5-9 zvířat.

Všechna zvířata byla krmena standardní dietou ST1 a chována ve světelném režimu 12/12 s neomezeným přístupem ke stravě i vodě. Adaptace byla prováděna ve spolupráci se skupinou bioenergetiky a svalové fyziologie z PřF UK.

4.2 Médium

Buňky byly kultivovány v RPMI 1640 mediu (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), které bylo doplněné 2,5 %, 5 % nebo 10 % tepelně inaktivovaného fetálního telecího séra (fetal bovine serum - FBS) (Sigma), penicilinem (100 µg/ml, Sigma), streptomycinem (100 µg/ml, Sigma) 2-merkaptotanolem (5×10^{-5} M, Sigma) a HEPES pufrem (10 mM, Sigma). Toto médium je dále označované jako RPMI.

4.3 Roztoky

- Fosfátový pufr (Phosphate saline buffer - PBS): pH 7,2 - 7,4
 - 37 mM NaCl
 - 10 mM Fosfát
 - 2,7 mM KCl
- Promývací roztok ELISA PBS/T: 0,05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich) v PBS
- Reagent diluent ELISA: 1 % BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma) v PBS
- Scintilační roztok: toluen (Lachema, Neratovice, ČR)
 - 4 g/l 2,5-difenyloxazol (PPO) - $C_{15}H_{11}NO$
 - 100 mg/ml 1,4-bis(5-phenyloxazol-2-yl) benzen (POPOP) - $C_{24}H_{16}N_2O_2$ (Sigma)
- Roztoky pro Griessovu reakci:
 - Roztok A: 0,5 g sulfonamid (Sigma-Aldrich)
 - 1,5 ml H_3PO_4
 - 48,5 ml H_2O
 - Roztok B: 0,15 g N-1-naphtylendiamin dihydrochlorid (Sigma-Aldrich)
 - 1,5 ml H_3PO_4
 - 48,5 ml H_2O

4.4 Použitý software

- Ovládací software pro průtokový cytometr FACSDiva Software (BD, Franklin Lakes, NJ)
- Vyhodnocovací software pro data získané průtokovou cytometrií GateLogic 400.2A (Invai, Mnetone, Australia)
- Ovládací software pro spektrofotometr Revelation Qucklink (Dynex Technologies, Chantilly, VA)
- Ovládací software pro nanadrop ND-1000 3.3 (Coleman Technologies)
- Ovládací a vyhodnocovací software pro LigthCycler 480 (Roche, Rotkreuz, Switzerland)
- Ovládací software pro Nanodrop ND-1000 (Coleman Technologies, Orlando, FL)
- Ovládací software pro kapalinový scintilační spektrometr QuantaSmart (PerkinElmer, Waltham, MA)
- Statistické zpracování výsledků program GraphPad Prism8 (GraphPad Software, La Jolla, CA)

4.5 Technické vybavení

- Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, UK)
- Centrifuga 5810R (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Minicentrifuga MiniSpin plus (Eppendorf)
- Inkubátor (Sanyo, Osaka, Japan; Panasonic, Osaka, Japan)
- Laminární box SafeFAST premium (DASITgroup, Cornaredo, Italy)
- Sběrač buněk Automash 2000 (Dynatech, Burlington, MA)
- Kapalinový scintilační spektrometr Tri-Carb 2910TR (PerkinElmer)
- Průtokový cytometr LSR II (BD)
- Elektroforetická aparatura PowerPac 300 (Bio-Rad, Hercules, CA)
- MyCyclerTM Thermal cycler (Bio-Rad)
- LigthCycler 480 II (Roche)
- Spektrofotometr ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
- Spektrofotometr microplate reader ELx800 (Biotek, Winooski, VT)

4.6 Izolace buněk a tkání

4.6.1 Slezinné buňky

Homogenizovaná slezina byla filtrována přes nylonovou gázu a centrifugovaná (8 min, 8°C, 170x g). Následně byly buňky resuspendované v 10% RPMI médiu. Splenocyty byly využity buď přímo na analýzu pomocí průtokového cytometru nebo byly dále kultivovány a použity na proliferační test nebo ELISA test (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA).

4.6.2 Intraperitoneální makrofágy

Usmrceným potkanům byla peritoneální dutina opakovaně vypláchnuta cca 20 ml 2,5% RPMI. Získaná suspenze byla centrifugována (8 min, 8°C, 170x g) a byla resuspendována v 1x ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) lyzačním pufru pro odstranění červených krvinek po dobu 2 minut. Poté byl pufr inaktivován přidáním 5% RPMI média a suspenze centrifugována (8 min, 8°C, 170x g). Poté byly makrofágy resuspendovány v 10% RPMI médiu a pomocí Bürkerovy komůrky stanovena jejich koncentrace. Makrofágy byly využity pro určení produkce oxidu dusnatého a produkce cytokinů.

4.6.3 Hnědá tuková tkáň

BAT izolovaný z potkanů byl odebrán po jejich usmrcení z mezilopatkového prostoru. Tuková tkáň byla zvážena a rozdělena na stejně velké části a ty byly kultivovány v 24jamkových destičkách (Nunc) v RPMI médiu. Z kultury byl odebírán supernatant pro stanovení cytokinů pomocí ELISA testu.

4.6.4 Izolace séra

Krev odebraná potkanům byla ponechána 2 hodiny při teplotě 4 °C. Poté byla centrifugována (2 hodiny, 1000x g) a odebrán čirý supernatant - sérum. Sérum bylo uchováváno zamražené v -80 °C a použito ke stanovení koncentrace NE.

4.7 ELISA

Metodou ELISA byla měřena produkce cytokinů z izolovaných splenocytů, makrofágů a BAT. Zjišťována byla koncentrace IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 a IFN- γ . Metoda ELISA byla také využita ke zjištění koncentrace NE ze séra.

Kultivace splenocytů probíhaly v 24jamkových kultivačních destičkách (Nunc) v RPMI médiu o objemu 1600 μ l $1,2 \times 10^6$ buněk. Kultivace makrofágů v 24jamkových kultivačních destičkách v RPMI médiu o objemu 1000 μ l $1,0 \times 10^6$ buněk. BAT a kultury byly studovány neovlivněné a ovlivněné bakteriálním lipopolysacharidem (LPS) (Difco Laboratories, Deitrot, MI) (5 μ g/ml) nebo konkanavalinem A (Concanavaleine A - ConA) (Sigma) (3 μ g/ml) při teplotě 37 °C a v 5% CO₂ atmosféře v inkubátorech. Z kultur byl postupně odebírán supernatant na stanovení cytokinů - 24 hodin (IL-2, IL-6), 48 hodin (IFN- γ) a 72 hodin (IL-4, IL-10).

4.7.1 DuoSet ELISA Development System R&D

Pomocí tohoto kitu byly měřeny zmíněné cytokiny. Test byl prováděn v 96jamkové destičce Immunoplate (SPL Life Sciences). Postupováno bylo dle doporučeného postupu od výrobce (R&D systems, Wiesbaden, Germany):

- Nanesení 100 μ l primární protilátky (naředěné v PBS na požadovanou koncentraci od výrobce) a inkubace přes noc v pokojové teplotě
- 3x promytí pomocí PBS/T
- Blokace 200 μ l Reagent diluentu 1 hodinu, 3x promytí pomocí PBS/T
- Přidání 100 μ l vzorků, blanku a standardů - inkubace 2 hodiny, 3x promytí pomocí PBS/T
- Přidání 100 μ l sekundární protilátky (naředěné v Reagent diluentu na požadovanou koncentraci od výrobce), 3x promytí pomocí PBS/T
- Přidání 100 μ l Streptavidin HRP, inkubace 20 minut ve tmě, 3x promytí pomocí PBS/T
- Přidání 100 μ l Substrátu (reagent A : reagent B 1:1), inkubace 20 minut ve tmě
- Zastavení reakce přidáním 50 μ l 2N kyseliny sírové H₂SO₄

- Měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 570 nm.

4.7.2 Měření NE

Měření koncentrace NE bylo prováděno ze séra zvířat. Pro měření byl využit Noradrenaline ELISA Kit LS-F5550 (LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA). Postupováno bylo podle příloženého doporučeného návodu od výrobce:

- Naneseno bylo 50 μ l neředěného séra, standardů a blanku na destičku
- Ihned přidáno 50 μ l detekčního reagentu A a inkubováno 1 hodinu při 37°C
- 3x promytí promývacím roztokem a přidání 100 μ l detekčního reagentu B, inkubace 30 minut při 37°C
- 5x promytí promývacím roztokem a přidání 90 μ l TMB substrátu , inkubováno 15 minut při 37°C
- Zastavení reakce přidáním 50 μ l Stop roztoku
- Měření optické density při vlnové délce 450 nm.

4.8 Proliferační test

Tato metoda byla použita k zjištění proliferace izolovaných splenocytů. Proliferace byla kvantifikována mírou inkorporace radioaktivně značeného tymidinu. Kultivováno bylo 250 000 čerstvě izolovaných buněk sleziny v celkovém objemu 200 μ l 10% RPMI v 96jamkové destičce. Buňky byly kultivovány neovlivněné a stimulované ConA (3 μ g/ml) nebo LPS (5 μ g/ml). Na posledních 6 hodin 72hodinové inkubace bylo přidáno 0,5 μ Ci ³H-tymidinu (Ústav pro výzkum radioizotopů, řež, ČR). Buňky byly poté sklizeny pomocí sběrače buněk Automash 2000 na filtry z mikrovláken GF/A (Whatman, Buckinghamshire, UK). Inkorporovaná aktivita byla měřena pomocí scintilačního roztoku (4 ml) na spektrofotometru Tri-Carb 2910TR.

4.9 Měření oxidu dusnatého (NO)

Produkce NO byla měřena z izolovaných kultur makrofágů. Makrofágy byly kultivované v 48jamkové kultivační destičce neovlivněné a ovlivněné LPS (5 μ g/ml). Nasazováno bylo 600 000 buněk ve finálním objemu 0,6 ml. Po 48 hodinách bylo odebráno 100 μ l supernatantu do 96jamkové destičky (Nunc), ve které byl obsah NO stanoven pomocí

Griessovy reakce. Jako standard jsme využili roztok dusitanu sodného (NaNO_3 , Sigma-Alrich) a jako blank kultivační médium RPMI. Ke vzorkům a standardům bylo přidáno 50 μl roztoku A a 50 μl roztoku B. Po cca 5 minutové kultivaci byly vzorky měřeny pomocí spektrofotometrie při vlnové délce 570 nm na spektrofotometru ELx800.

4.10 Průtoková cytometrie

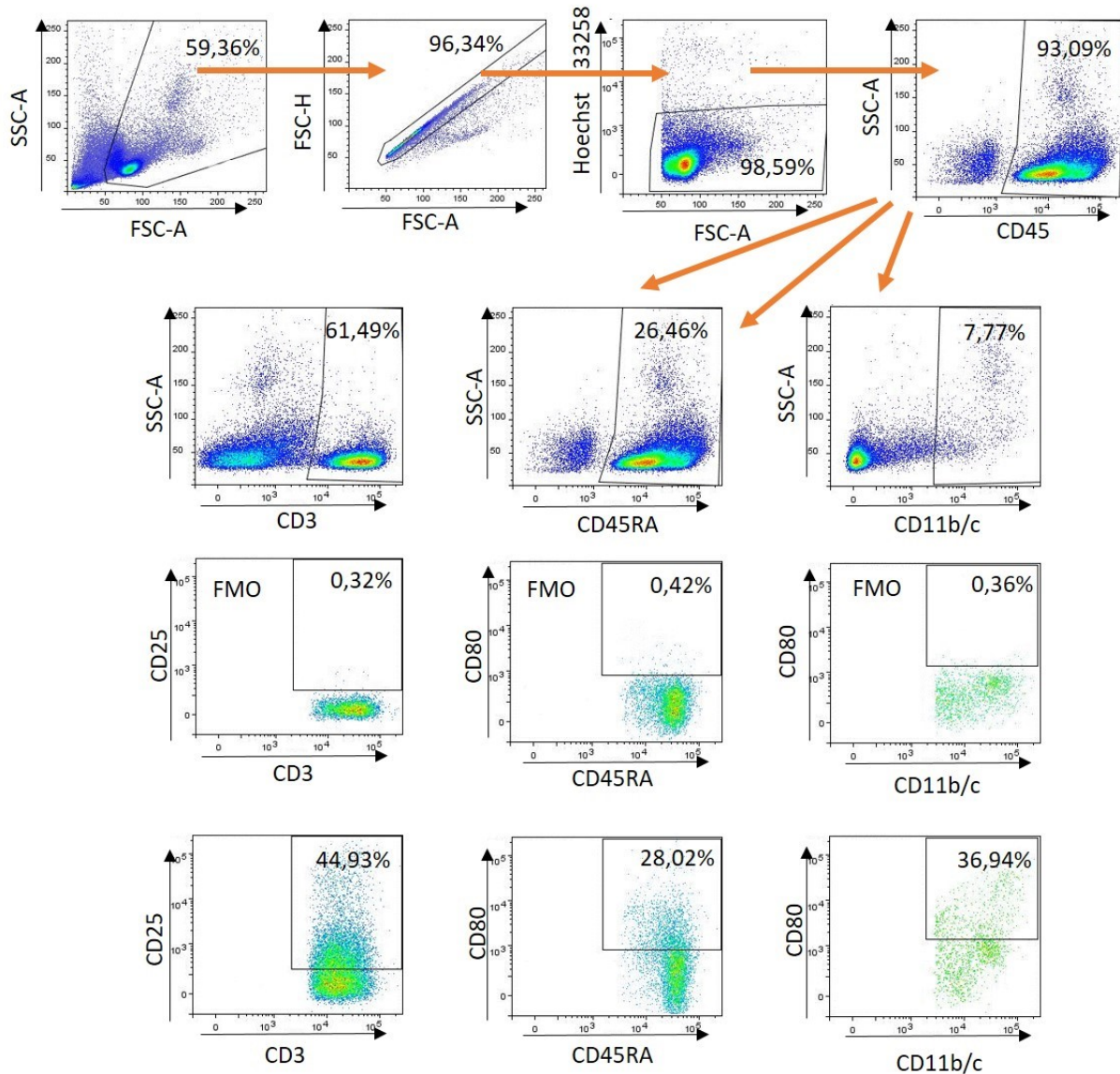
Průtoková cytometrie (Fluorescent Activated Cell Sorting - FACS) byla použita k fenotypizaci buněk získaných ze sleziny. Pro detekci povrchových znaků byl použit následující postup:

- Zkumavky se suspenzí sleziny v RPMI médiu byly centrifugovány (8 min, 8°C, 170x g) a poté umístěny na led
- Buňky byly resuspendovány v ACK lyzačním pufru pro odstranění červených krvinek a poté centrifugovány (8 min, 8°C, 170x g)
- Buňky byly resuspendovány v PBS a rozpipetovány do 96jamkové destičky s kulatým dnem (Nunc, Roskilde, Denmark) po 200 μl na jamku
- Centrifugace destičky (3 min, 4°C, 170x g)
- Rozvolnění pelety buněk, přidání 10 μl naředěné protilátky proti povrchovému znaku a inkubace (30 min, 4°C)
- 2x promytí 200 μl PBS, centrifugace (3 min, 4°C, 170x g)
- Naředění do 200 μl PBS, přidání 25 μl barviva Hoechst 33258 10 minut před měřením
- Detekce na průtokovém cytometru LSR II - Gateovací strategie je znázorněna na Obrázku 5

K měření byly použité monoklonální protilátky konjugované s fluorochromy fykoerytrín (Phycoerythrin - PE), fluorescein isothiokyanát (FITC) nebo alofykocyanin (Allophycocyanine - APC) (viz tabulka č. 2). Protilátky použité pro detekci povrchových znaků byly naředěné v PBS. Pro značení mrtvých buněk byl použitý Hoechst 33258 (Sigma) ředěný 1:40 000 v PBS.

Tabulka 2: Protilátky použité při průtokové cytometrii.

Znak	Fluorochrom	Specifita	Klon	Koncentrace (mg/ml)	Ředění v PBS	Výrobce
CD45	FITC	Anti-rat	OX-1	0,5	1:130	BioLegend
CD3	APC	Anti-rat	1F4	0,2	1:120	BioLegend
CD45RA	APC	Anti-rat	OX-33	0,2	1:120	BioLegend
CD11b/c	APC	Anti-rat	OX-42	0,2	1:120	BioLegend
CD25	PE	Anti-rat	OX-39	0,2	1:130	BioLegend
CD80	PE	Anti-rat	3H5	0,2	1:100	BD Biosciences



Obrázek 5: Gateovací strategie. Ukázka gateovací strategie na slezinných buňkách.

4.11 Real-time PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time polymerase chain reaction - RT-PCR) byla využita ke stanovení exprese proteinů ve slezině.

4.11.1 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena pomocí izolačního kitu E.Z.NA. Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA) z kusu sleziny o hmotnosti 20 - 30 mg. Postupováno bylo dle doporučeného návodu od výrobce:

- K homogenizované slezině bylo přidáno 700 μ l TRK lysis buffer a 20 μ l 2-merkptoethanolu, směs promíchána a centrifugována (14100x g, 5 minut)
- K čistému supernatantu přidáno objemově stejné množství 70% ethanolu
- Směs přenesena na HiBind RNA Mini kolonku a centrifugována (10000x g, 1 min)
- Přidáno 250 μ l RNA Wash buffer I a centrifugováno (10000x g, 1 min)
- Přidáno 75 μ l DNa I digestion (20Kunitz/ μ l) (DNázu RNase-Free DNase I Set (Omega Bio-tek)) a inkubováno 15 minut
- Přidáno 250 μ l RNA Wash buffer I a inkubováno 2 minuty, poté centrifugováno (10000x g, 1 min)
- Přidáno 500 μ l RNA Wash buffer I a centrifugováno (10000x g, 30 sekund)
- Přidáno 500 μ l RNA Wash buffer II rozpuštěného v 100% ethanolu a centrifugováno (10000x g, 1 min) - provedeno 2x
- Centrifugována prázdná HiBind RNA Mini kolonka (14100x g, 2 min)
- Přidáno 40 μ l DEPC vody a centrifugováno (14100x g, 2 min)

Získaná RNA byla uchovávána v -80°C . Koncentrace a čistota RNA ve vzorku byla zjišťována pomocí spektrofotometru Nanodrop. Čistota vzorku byla zkontrolována i vizuálně pomocí gelové elektroforézy na 2% agarózovém gelu s využitím ethidiumbromidu. RNA byla použita pro reverzní transkripci a RT-PCR.

4.11.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce z RNA izolované ze sleziny byla provedena kitem SuperScript III RT (Invitrogen, Praha, ČR) dle pokynů výrobce. K 1 μ g RNA byl přidán 1 μ l náhodných

hexamerů primerů, 1 μ l deoxynukleotidů a doplněno na objem 13 μ l autoklávovanou TK vodou. Směs byla zahřáta v thermocycleru na 65°C po dobu 5 minut a přemístěna na led. Do reakce bylo dále přidáno: 4 μ l 5X First-Strand buffer, 1 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l RNasa inhibitoru a 1 μ l SuperScript III RT. Směs byla vložena do thermocycleru na program (5 min 25°C, 60 min 50°C, 15 min 75°C) a poté byla ochlazená na 4 °C. Vzniklá cDNA byla použita pro RT-PCR.

4.11.3 Měření RT-PCR

Kvantitativní RT-PCR bylo měřeno na LigthCycler 480 II v 384jamkové destičce. Relativní exprese genů byla stanovena vzhledem ke genu B2m. Pro všechna měření byl použit 5x HOT FIFEPol EvaGreen (Solid Biodyne, Tartu, Estonia). Pro reakci byl užit následující postup:

- každá reakce byla smíchána z 1 μ l cDNA, 4 μ l SYBR, 1 μ l primerů L+R 4 μ l vody
- preinkubace 10 minut 95 °C
- 50 cyklů s profilem: 95 °C 10 sekund; 60 °C 30 sekund; 72 °C 1 sekunda
- zchlazení na 40 °C

4.12 Statistická analýza

Získaná data byla statisticky vyhodnocena programem GraphPad Prism8. Byla použita jednosměrná analýza rozptylu (analysis of variance - ANOVA). Hodnoty statistické odchylky $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***) a $P \leq 0,0001$ (****) byly považovány za statisticky signifikantní.

5 Výsledky

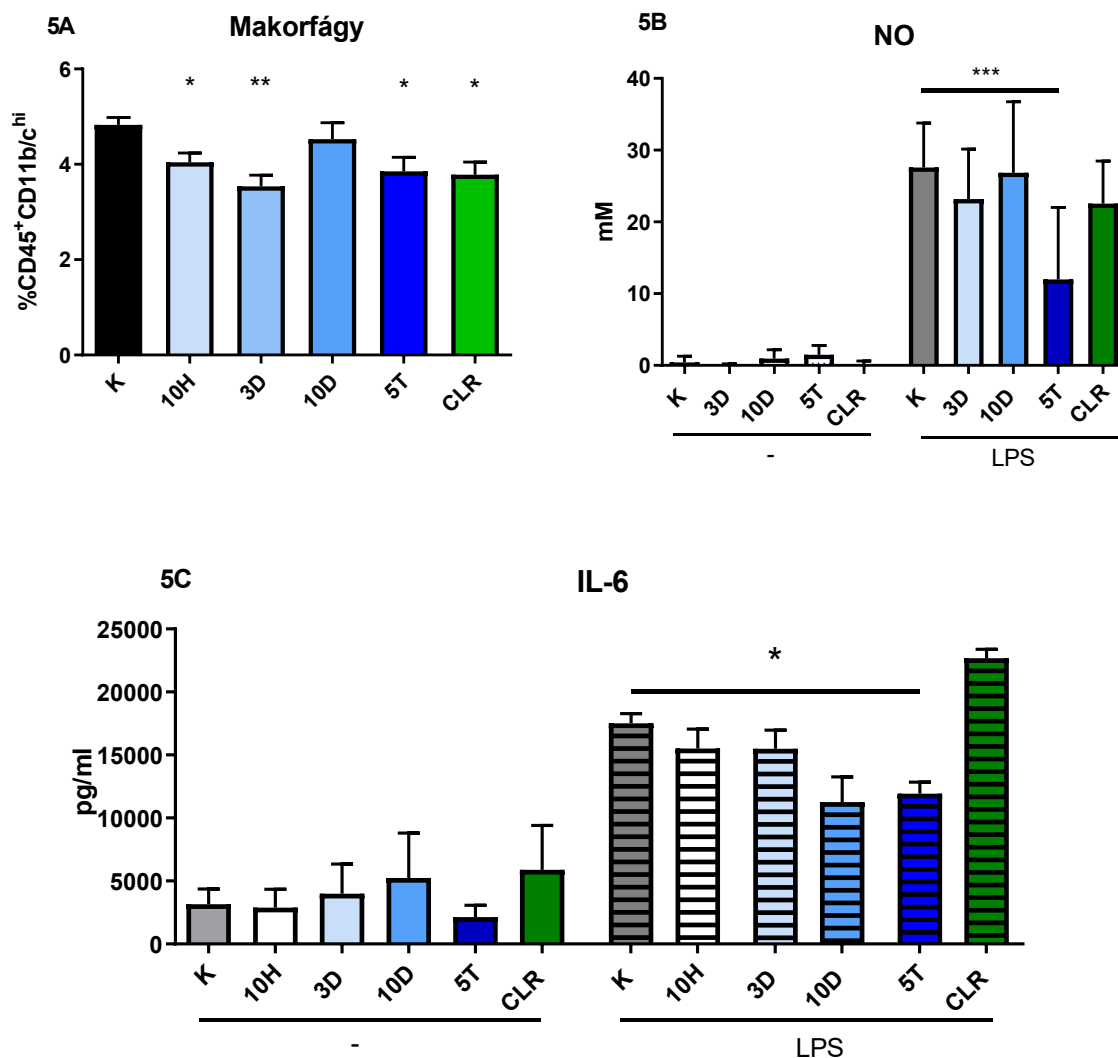
Pokusy byly rozděleny do dvou nezávislých experimentů. První se zabýval kinetikou chladové adaptace a druhý vlivem adrenergní signalizace během chladové adaptace.

5.1 Část 1. - Výsledky kinetiky chladové adaptace

Pokusy chladové adaptace porovnávaly efekty různě dlouhé adaptační doby s neadaptovanou kontrolní skupinou na různé populace buněk imunitního systému. Některá cytometrická data a data z produkce NO makrofágy byly naměřena před mým zapojením do projektu v řešitelské laboratoři. Potkani byli vystaveni chladové expozici 10 hodin (10H), 3 dny (3D), 10 dní (10D) nebo 5 týdnů (5T). Regresní skupina (CLR) byla vystavena chladu pět týdnů a poté byla dva týdny v pokojové teplotě. Kontrolní skupina (K) byla po celou dobu chována v pokojové teplotě.

5.1.1 Vrozená imunita

Nejprve byl sledován vliv na buňky vrozené imunity. Během chladové adaptace se ve slezině snížilo relativní zastoupení makrofágů během chladové adaptace v téměř všech časových intervalech oproti kontrolní skupině (Obrázek 5A). Výsledky získané z leukocytů periferní krve (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) odpovídaly výsledkům ze sleziny, proto byly v opakovaných pokusech vynechány a nejsou ukázány. Produkce NO byla studována na makrofázích izolovaných z peritoneální dutiny po stimulaci LPS. Po 48 hodinové kultivaci byl zaznamenán pokles produkovaného NO u 5T skupiny (Obrázek 5B). Také produkce cytokinu IL-6 byla po vystavení chronickému chladu (5T) a LPS potlačena (Obrázek 5C).

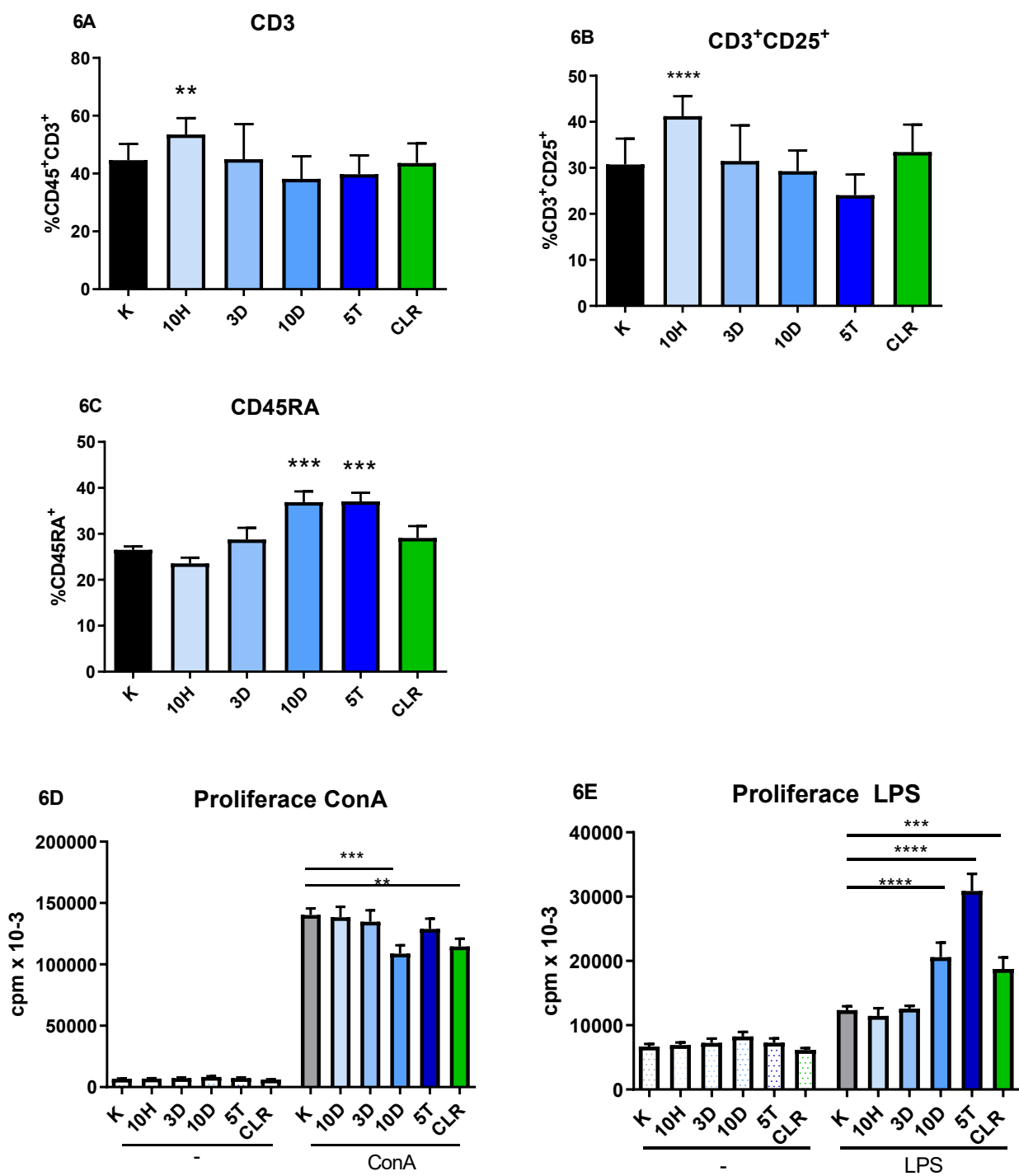


Obrázek 5: Vliv chladové adaptace na populaci makrofágů. Zastoupení makrofágů ve slezině (CD45⁺CD11b/c^{hi}) bylo určeno průtokovou cytometrií (A). Makrofágy izolované z peritoneální dutiny byly kultivovány nestimulované (-) nebo stimulované LPS (5 ug/ml). Produkce NO byla stanovena Griessovou reakcí (B). Produkce IL-6 byla měřena metodou ELISA (C). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 představuje statisticky významnou odchylku v porovnání s kontrolním vzorkem.

5.1.2 Adaptivní imunita

Vliv chladové adaptace na buňky adaptivní imunity byl sledován na buňkách sleziny. Ze suspenze slezinných buněk bylo zjištěno dočasné zvýšení T lymfocytů (Obrázek 6A), zvýšený byl také procentuální počet aktivovaných T lymfocytů po krátkodobém vystavení chladu (10H) oproti kontrole (Obrázek 6B). Zcela zásadním zjištěním je však významný nárůst relativního počtu B lymfocytů po chronické adaptaci (Obrázek 6C).

Pozorovali jsme také změny v proliferaci buněk ze sleziny po stimulaci mitogenem ConA, který stimuluje T buňky, a LPS, který stimuluje buňky exprimující Toll-like receptor 4 (Toll-like receptor - TLR4) - v našem měření B lymfocyty, vzhledem k tomu, že proliferace makrofágů je velmi nízká. Došlo k jejímu snížení u skupin 10D a CLR po stimulaci ConA (Obrázek 6D). Naopak signifikantní zvýšení proliferace bylo pozorováno po stimulaci LPS u skupin 10D, 5T a CLR (Obrázek 6E). Tato data odpovídají výsledkům získaným pomocí průtokové cytometrie.

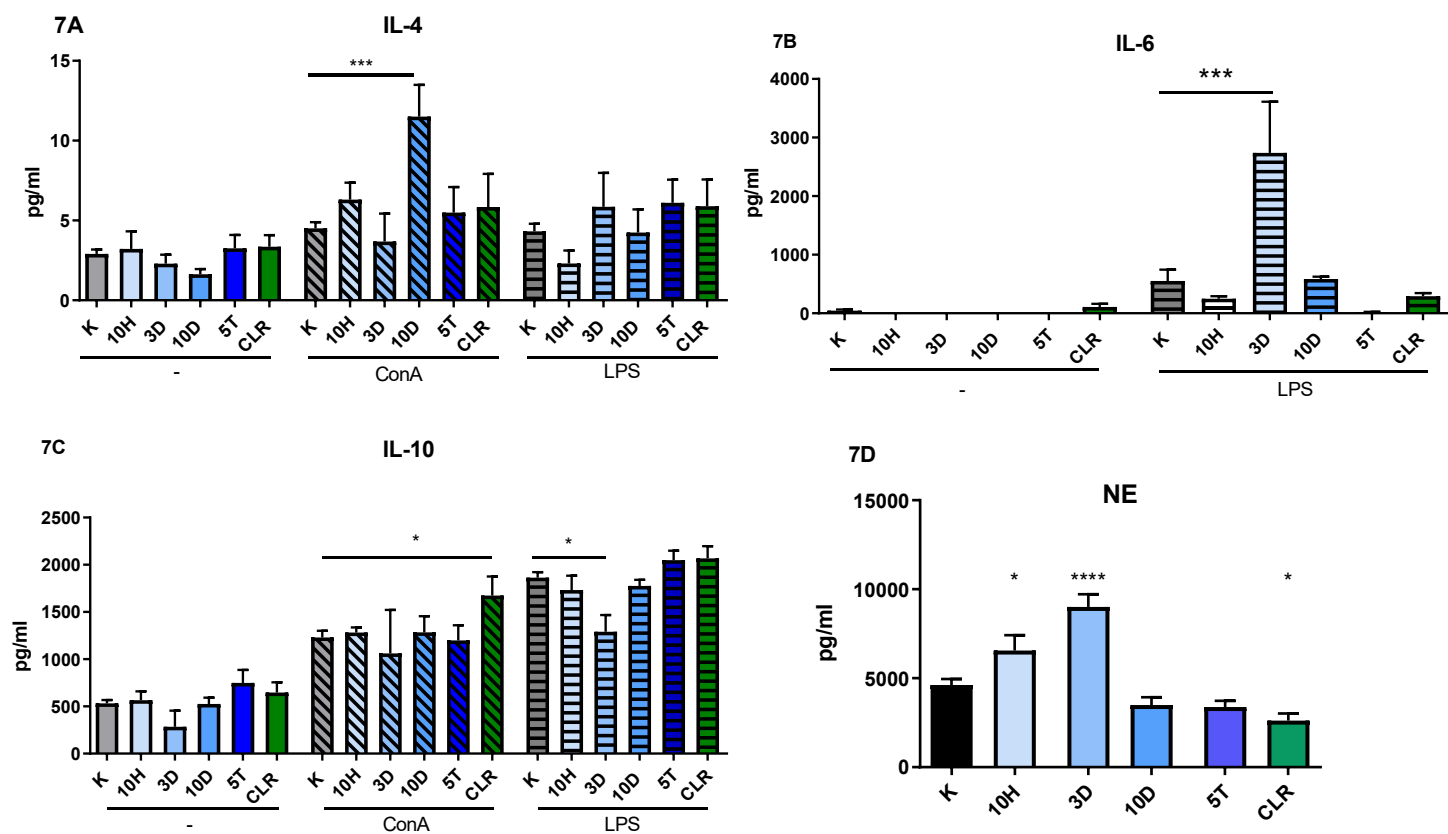


Obrázek 6: Vliv chladové adaptace na adaptivní imunitu. Zastoupení T lymfocytů ($CD45^+CD3^+$) (A), aktivovaných T lymfocytů ($CD3^+CD25^+$) (B) a B lymfocytů ($CD45^+CD45RA^+$) (C) ve slezině bylo zjištěno pomocí cytometrie. Proliferace slezinných buněk byla kvantifikována pomocí inkorporace radioaktivně značeného thymidinu. Buňky byly kultivované nestimulované (-) a stimulované ConA (3 $\mu\text{g/ml}$) (D) nebo LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) (E). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ představuje statisticky významnou odchylku v porovnání s kontrolním vzorkem.

5.1.3 ELISA

Produkce cytokinů z kultivovaných splenocytů byla studována pomocí ELISA testu. Množství IL-4 se signifikantně zvýšilo u skupiny 10D po stimulaci ConA (Obrázek 7A). Stimulace LPS neměla na tvorbu IL-4 signifikantní vliv, zato měla za následek signifikantní zvýšení produkce IL-6 u skupiny 3D oproti odpovídající kontrole (Obrázek 7B). Koncentrace IL-10 v supernatantu z kultur splenocytů vykazovala signifikantní zvýšení u skupiny CLR po stimulaci ConA a signifikantní pokles u skupiny 3D po stimulaci LPS oproti odpovídající kontrole (Obrázek 7C).

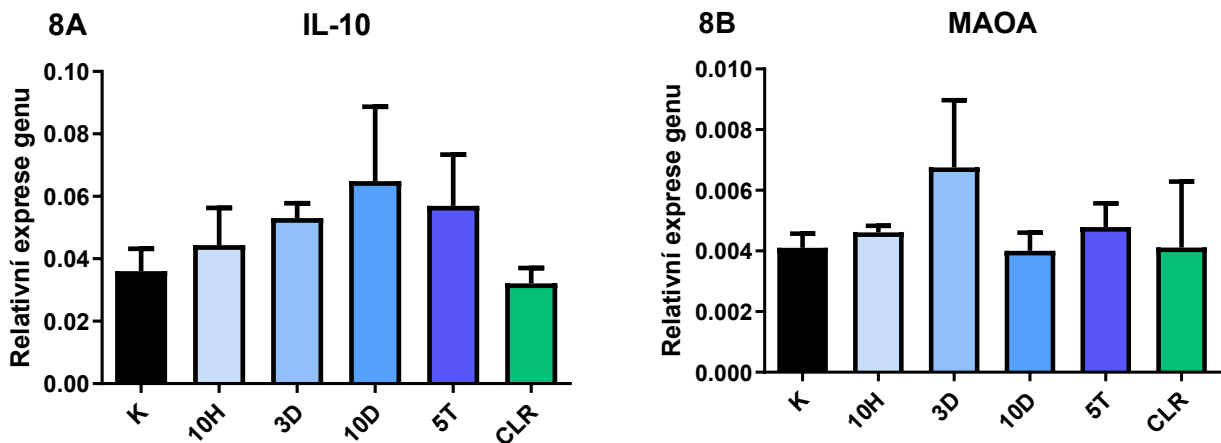
Pomocí ELISA testu byla sledována také koncentrace NE v séru adaptovaných potkanů. Množství NE se signifikantně zvýšilo u skupiny 10H a 3D. V dalších časech docházelo ke snížení, které bylo u skupiny CLR signifikantní (Obrázek 7D).



Obrázek 7. Koncentrace cytokinů a NE. Splenocyty z chladově adaptovaných potkanů byly kultivovány nestimulované (-) a ovlivněné ConA (3 $\mu\text{g/ml}$) nebo LPS (5 $\mu\text{g/ml}$). Koncentrace IL-4 (A), IL-6 (B) a IL-10 (C) ze supernatantů byla stanovena pomocí ELISA testu. Koncentrace NE byla stanovena ze séra (D). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ představuje statisticky významnou odchylku v porovnání s kontrolním vzorkem.

5.1.4 RT-PCR

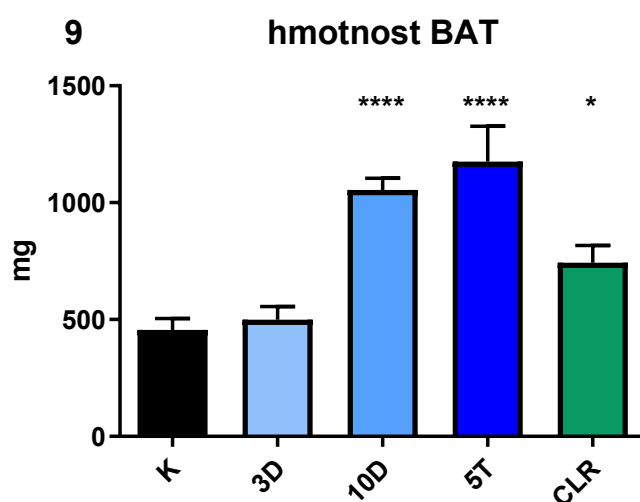
Expresí genů ve slezině byla stanovena pomocí RT-PCR. Výsledky naznačují zvýšení exprese genu pro IL-10 po dlouhodobé adaptaci (Obrázek 8A). U genu pro enzym MAOA, který degraduje NE došlo ke výraznému zvýšení exprese u skupiny 3D (Obrázek 8B).



Obrázek 8. Expresí genu pro IL-10 a monoamin oxidázu A. Pomocí RT-PCR byla zjištěna úroveň exprese genů ve slezině adaptovaných zvířat. Sledována byla exprese genu pro IL-10 (A) a MAOA (B). Jako kontrola byla použita exprese genu pro B2M.

5.1.5 Hmotnost BAT

Izolovaná hnědá tuková tkáň byla zvážena a hmotnosti porovnány. Došlo k výraznému nárůstu BAT mezi třetím a desátým dnem (Obrázek 9A). Nárůst je potvrzen zvýšenou hmotností pátý týden adaptace (Obrázek 9B). Jedná se o výsledky získané a zpracované Skupinou bioenergetiky a svalové fyziologie.



Obrázek 9. Hmotnost BAT. Hmotnost izolované BAT z mezilopatkové oblasti. Potkani byli adaptováni 3 dny (3D), 10 dní (10D), 5 týdnů (5T) v 10 °C. Regresní skupina (CLR) byla po pěti týdenní adaptaci chována další dva týdny v pokojové teplotě. Kontrolní skupina (K) byla celou dobu chována v pokojové teplotě 25 °C. * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$ představuje statisticky významnou odchylku v porovnání s kontrolním vzorkem.

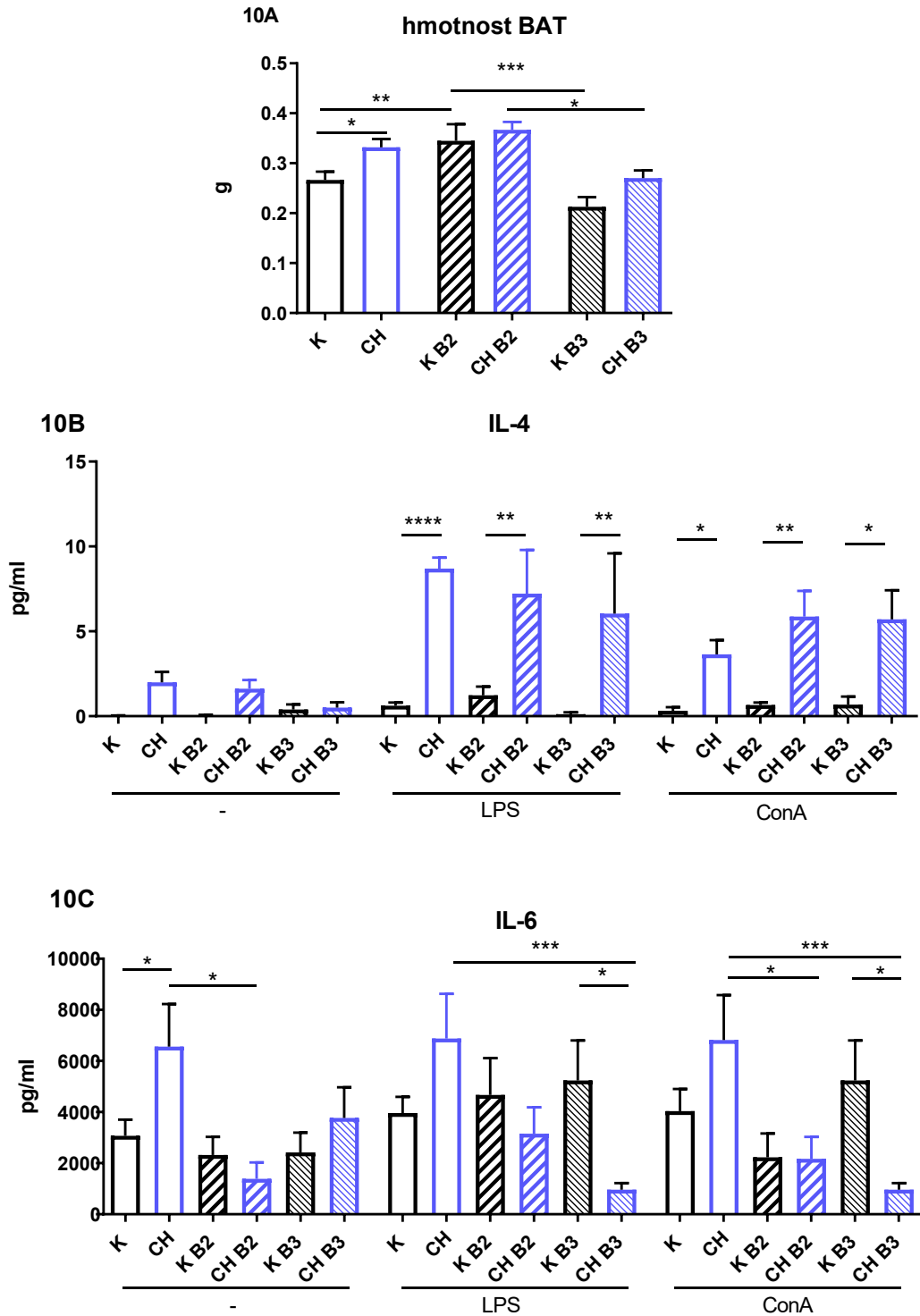
5.2 Část 2. - Výsledky experimentů s použitím inhibitorů

Vzhledem k tomu, že k nejvýznamnějším změnám v pozorovaných parametrech docházelo mezi třetím a desátým dnem adaptace a tyto změny korelovaly s hmotností BAT získanou Skupinou bioenergetiky a svalové fyziologie, rozhodli jsme se zjistit vliv adrenergní signalizace na tyto změny. Toho jsme docílili využitím inhibitorů β -AR. Použity byly inhibitory β 2 (B2) a β 3 (B3) AR, které byly aplikovány potkanům mezi 3 a 9 dnem adaptace. Desátý den byla zvířata usmrcena a izolovány potřebné tkáně. Byly porovnávány výsledky z potkanů, kteří byli adaptovaní na chlad (CH) a neadaptovaní (K) jako kontrola.

5.2.1 Vliv inhibitorů na BAT

Funkčnost aplikovaných inhibitorů během chladové adaptace byla potvrzena změnou hmotnosti BAT. Bylo potvrzeno zvýšení hmotnosti BAT u chladově adaptovaných zvířat. Po podání inhibitoru β 2AR došlo k signifikantnímu nárůstu hmotnosti BAT u kontrolní skupiny. Inhibitor β 3AR podle očekávání snižoval hmotnost BAT u kontrolních i chladově adaptovaných potkanů (Obrázek 10A).

BAT získaná z potkanů vystavených chladové adaptaci produkovala vyšší množství IL-4 a to jak u neovlivněných skupin, tak u skupin, kterým byly aplikovány inhibitory. Po stimulaci ConA nebo LPS byla tato zvýšená produkce signifikantní (Obrázek 10B). Také v produkci IL-6 došlo k navýšení u chladově adaptovaných potkanů. V tomto případě inhibice β 2AR docházelo ke snížení produkce IL-6, které bylo u signifikantní. Inhibice β 3AR vedla u chladových potkanů po stimulaci ConA nebo LPS k signifikantnímu snížení produkce IL-6 oproti neadaptovaným potkanům ovlivněným stejným inhibitorem, stejně jako vůči neinhibovaným adaptovaným zvířatům (Obrázek 10C).

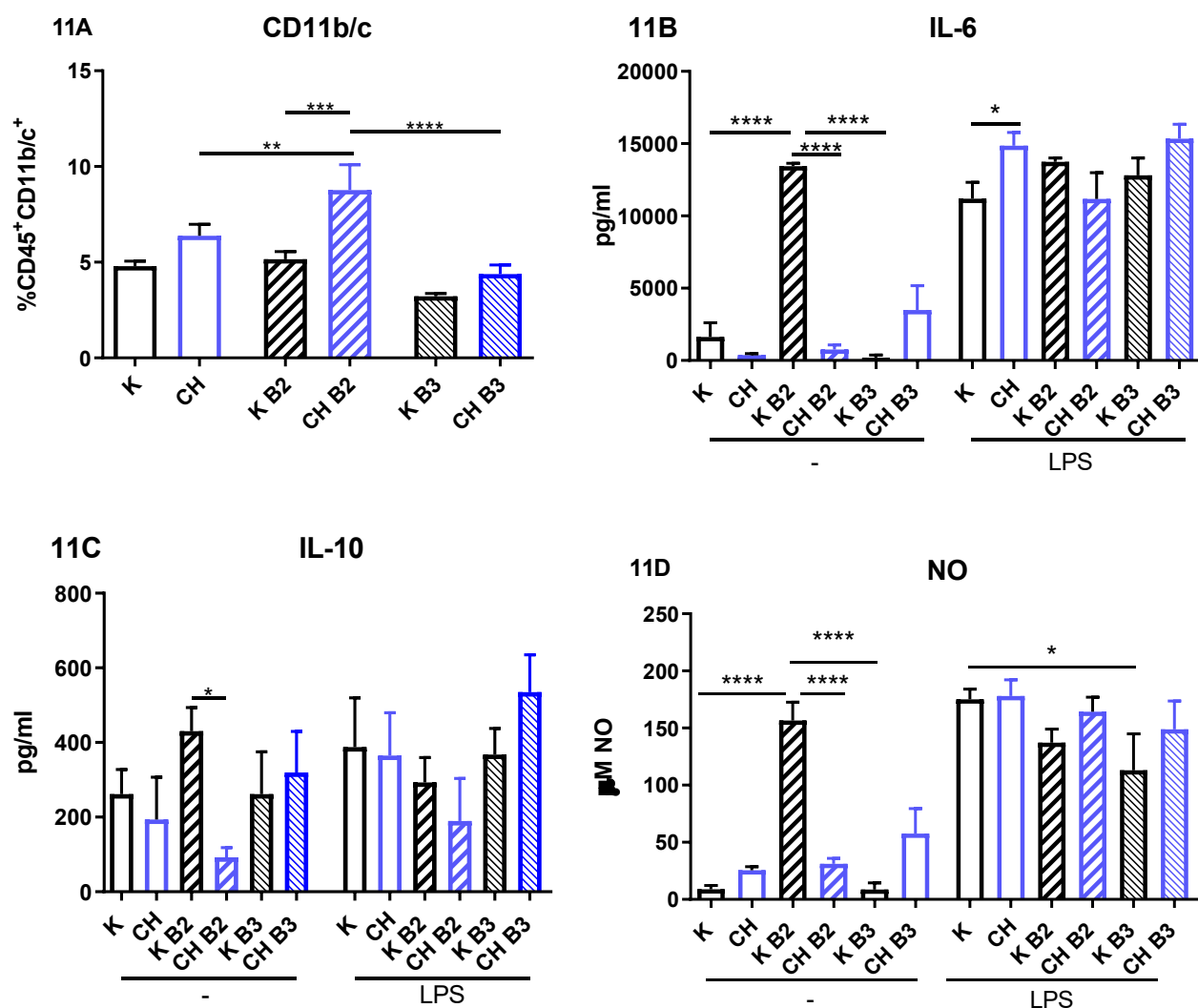


Obrázek 10. BAT. Změny v hmotnosti izolované BAT (A). Části BAT byly kultivované nestimulované (-) a stimulované ConA (3 ug/ml) nebo LPS (5 ug/ml). Produkce cytokinu IL-4 (B) a IL-6 (C) byla stanovena pomocí metody ELISA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ představuje statisticky významnou odchylku v porovnání s příslušným kontrolním vzorkem.

5.2.2 Vrozená imunita

Po chladové adaptaci docházelo ke zvýšení myeloidní populace (CD11b/c) buněk v slezině. Po inhibici β 2AR došlo k signifikantnímu zvýšení počtu buněk myeloidní populace u chladově adaptovaných potkanů ve slezině vůči neinhibované chladové skupině a kontrolní inhibované skupině. Inhibice β 3AR vedla ke snížení počtu myeloidních buněk vůči skupinám B2 (Obrázek 11A). Pro určení počtu buněk ze sleziny byla použita průtoková cytometrie.

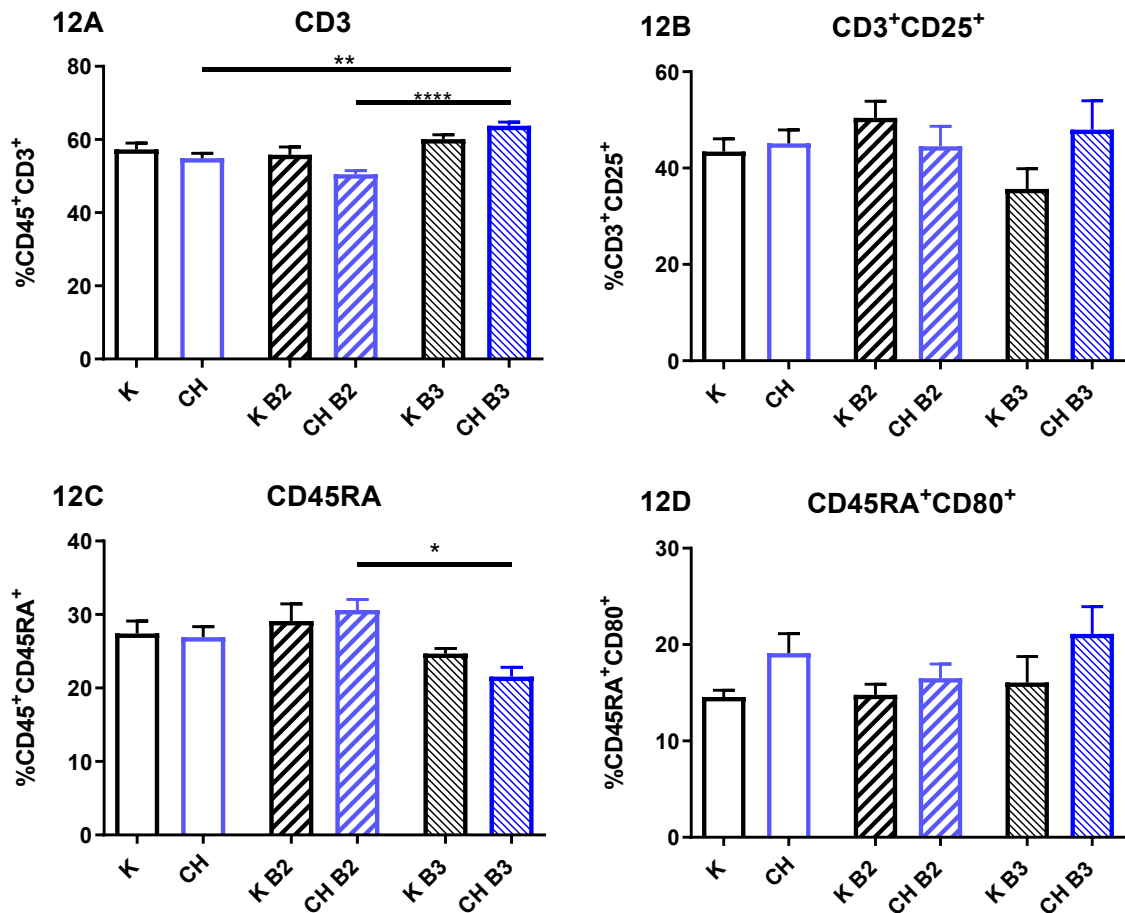
Ke stanovení produkce cytokinů peritoneálními makrofágy byla využita metoda ELISA a ke stanovení NO Griessova reakce. Velmi zajímavé bylo zjištění, že zablokování β 2AR vyvolává zvýšení produkce IL-6 u neadaptovaných potkanů vůči kontrole, ale k tomuto zvýšení nedocházelo u adaptované skupiny. U neinhibované skupiny a skupiny, kde byl použit inhibitor β 3AR docházelo k navýšení produkce IL-6 u chladově adaptovaných potkanů oproti neadaptovaným kontrolám po stimulaci LPS (Obrázek 11B). Produkce IL-10 byla po inhibici β 2AR markantně snížena u potkanů po chladové adaptaci vůči neadaptované skupině (Obrázek 11C). Produkce NO makrofágy vykazovala obdobný trend u nestimulovaných vzorků jako produkce IL-6. Došlo k signifikantně vyšší produkci NO u skupiny KB2 oproti kontrole. Adaptované skupiny CH a CHB3 vykazovaly vyšší hodnoty produkce NO než jejich kontroly. Po stimulaci LPS došlo k signifikantnímu snížení produkce NO u KB3 skupiny oproti neinhibované kontrole (Obrázek 11D).



Obrázek 11. Vrozená imunita. Zastoupení myeloidní populace CD11b/c⁺ ze sleziny byla měřena pomocí FACS (A). Makrofágy izolované z peritoneální dutiny byly kultivovány nestimulované (-) nebo stimulované LPS (5 ug/ml). Produkce cytokinů IL-6 (B) a IL-10 (C) byla měřena metodou ELISA. Produkce NO byla stanovena Griessovou reakcí (D). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001 představuje statisticky významnou odchylku v porovnání s kontrolním vzorkem.

5.2.3 Adaptivní imunita

Pomocí FACS bylo zjištěno relativní množství lymfocytů ve slezině. Po podání inhibitoru β 3AR došlo k zvýšení počtu T buněk ($CD45^+CD3^+$) u neadaptované i adaptované skupiny vůči příslušné kontrole, kde u chladově adaptovaných potkanů bylo toto zvýšení signifikantní. (Obrázek 12A). V počtu aktivovaných T lymfocytů ($CD3^+CD25^+$) došlo ke snížení u neadaptované skupiny s použitím inhibitoru β 3AR, i když toto snížení není signifikantní (Obrázek 12B). Počet B lymfocytů ($CD45^+CD45RA^+$) byl mírně navýšen po užití inhibitoru β 2AR proti kontrole a naopak došlo ke snížení u skupin, kde byl aplikován inhibitor β 3AR (Obrázek 12C). Chladově adaptovaní potkani vykazovali vyšší počet aktivovaných B lymfocytů ($CD45RA^+CD80^+$) oproti neadaptovaným skupinám (Obrázek 12D).



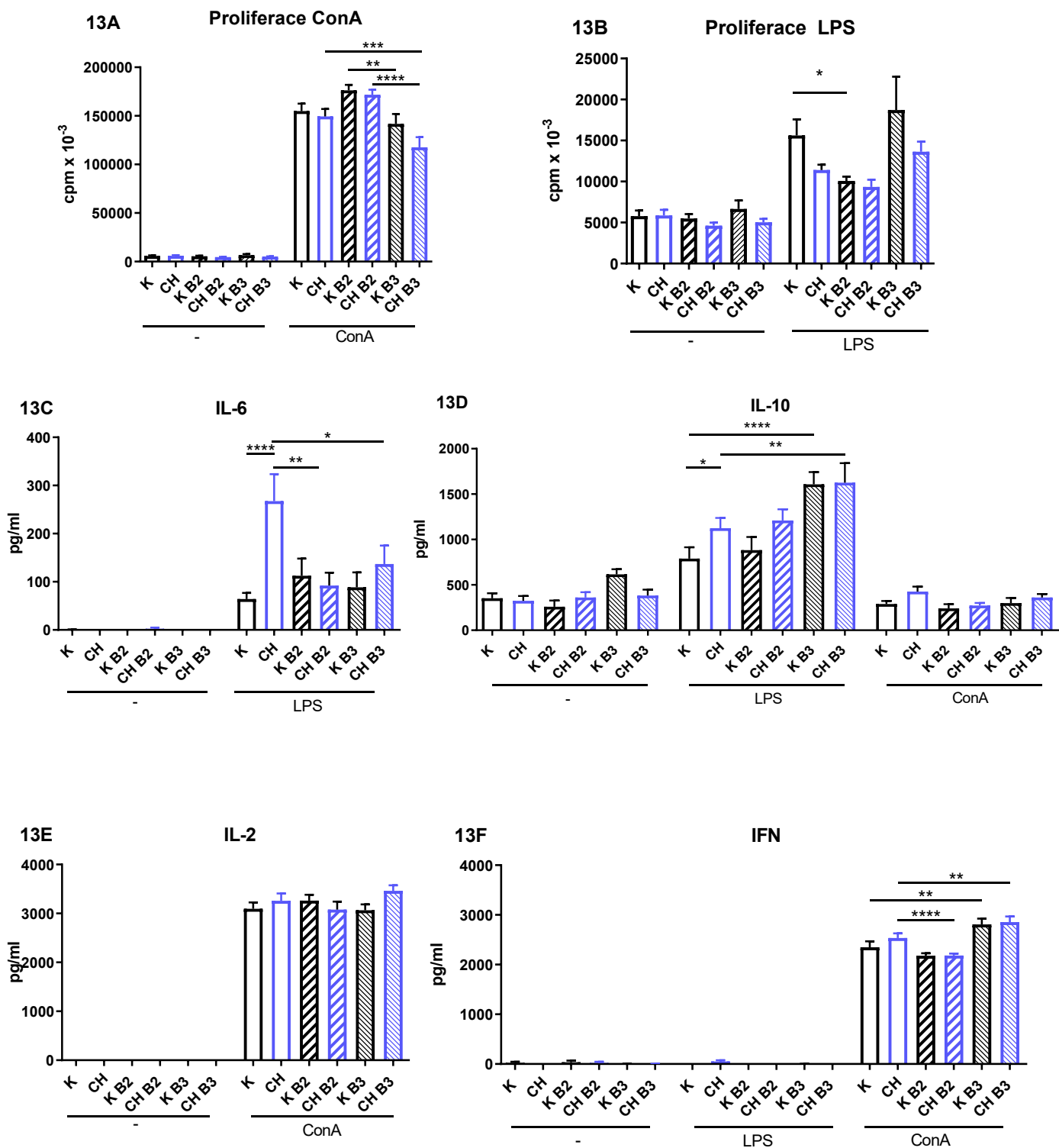
Obrázek 12. Adaptivní imunita FACS. Slezinné buňky byly rozlišeny pomocí průtokové cytometrie. Na základě typických markerů byly odlišeny T lymfocyty ($CD45^+CD3^+$) (A) a určen počet aktivovaných T buněk ($CD3^+CD25^+$) (B). Stanoven byl též počet B lymfocytů ($CD45^+CD45RA^+$) (C) a určen jejich aktivační stav ($CD45RA^+CD80^+$) (D). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$ představuje statisticky významnou odchylku v porovnání s kontrolním vzorkem.

5.2.4 Vlastnosti slezinných buněk

Proliferace splenocytů byla stanovena pomocí inkorporace ^3H -thymidinu. Buňky izolované ze slezin potkanů skupin KB2 a CHB2 po stimulaci ConA vykazovaly zvýšenou proliferační aktivitu po inhibici $\beta 2\text{AR}$, zato u skupiny CHB3 naopak došlo k signifikantnímu potlačení proliferace (obrázek 13A). Stimulace LPS vyvolala u skupin s inhibicí $\beta 2\text{AR}$ snížení proliferace. U neadaptované skupiny bylo toto snížení signifikantní (Obrázek 13B).

Produkce cytokinů byla stanovena pomocí ELISA testu. IL-6 produkovaly splenocyty skupiny CH po stimulaci LPS. Použitím inhibitorů došlo k signifikantnímu snížení produkce IL u obou adaptovaných skupin, kterým byly podávány inhibitory. U kontrolních skupin nedošlo ke změně (Obrázek 13C). Po stimulaci ConA nebyl IL-6 produkován (tato data nejsou uvedena). IL-10 byl signifikantně zvýšený u adaptovaných potkanů po stimulaci LPS a stejný trend byl zachován i u skupiny s inhibicí $\beta 2\text{AR}$. Užití inhibitoru $\beta 3\text{AR}$ mělo vliv na signifikantní zvýšení produkce IL-10 u neadaptované i adaptované skupiny. Stimulace ConA nevykazovala signifikantní změny na produkci IL-10 (Obrázek 13D). Po stimulaci ConA nedošlo k signifikantním změnám v produkci IL-2 (Obrázek 13E).

Cytokin IFN- γ byl výrazně produkován po stimulaci ConA. U skupiny CHB2 došlo ke snížení produkce vůči adaptované kontrole. Aplikace inhibitoru $\beta 3\text{AR}$ měla za následek signifikantní zvýšení produkce IFN- γ u adaptované i neadaptované skupiny zvířat (Obrázek 13F).



Obrázek 13. Proliferace a produkce cytokinů slezinných buněk. Proliferace slezinných buněk byla kvantifikována pomocí inkorporace radioaktivně značeného thymidinu. Buňky byly kultivované nestimulované (-) a stimulované ConA (3 $\mu\text{g/ml}$)(A) nebo LPS (5 $\mu\text{g/ml}$)(B). Splenocyty kultivované pro stanovení cytokinové produkce byly kultivovány stejně. Produkce cytokinů IL-6 (C), IL-10 (D), IL-2 (E) a IFN- γ (F) byla stanovena metodou ELISA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ představuje statisticky významnou odchylku v porovnání s kontrolním vzorkem.

6 Diskuze

V první části pokusů jsme studovali kinetiku chladové adaptace a její vliv na imunitní systém. Působení chladu vyvolává stres, který může být akutní nebo chronický, podle délky trvání. V našem případě byla akutní reakce zaznamenávána v časech 10 hodin a 3 dny. Chronickému chladu odpovídala desetidenní a pětítýdenní chladová adaptace. Během chladové adaptace jsme pozorovali efekt na jednotlivé imunitní populace. V začátcích chladové adaptace jsme očekávali prozánětlivé prostředí způsobené akutním stresem, po dlouhodobé adaptaci rozvoj protizánětlivého prostředí (Vargovic et al., 2016). Popisované je vychýlení Th1/Th2 rovnováhy směrem k Th2 odpovědi a indukce alternativně aktivovaného fenotypu makrofágů (Nguyen et al., 2011).

Abychom zjistili, u kterých imunitních populací dochází ke změnám, byla provedena FACS analýza sleziny a PBMC. První studovanou skupinou byla populace makrofágů. Během adaptace jsme u všech skupin zaznamenali relativní snížení počtu makrofágů, kromě skupiny vystavené chladu 10 dní. To může být spojeno s přechodem mezi akutním a chronickým stresem. Makrofágy izolované z peritonea potkanů adaptovaných 5 týdnů produkovaly po stimulaci LPS méně NO a také produkce IL-6 byla snížena. Tyto výsledky naznačují, že by mohli přijmout alternativně aktivovaný fenotyp. Tento předpoklad potvrzuje také zvýšená exprese genu pro IL-10 ve slezině. Pro potvrzení by bylo vhodné zjistit expresi dalších genů, například arginázy 1 (Vargovic et al., 2016). Tyto výsledky jsou v souladu s provedenými studiemi (Kizaki et al., 1996). Role makrofágů v procesu termogeneze však známá není. Dříve autoři navrhovali produkci NE přímo aktivovanými makrofágy (Nguyen et al., 2011), následně se však přímá produkce katecholaminů nepodařila potvrdit (Fischer et al., 2017). Vysvětlení by mohli přinést relativně nedávno popsání SAMs (Pirzalska et al., 2017).

Dalšími analyzovanými populacemi ve slezině byly lymfocyty. Pozorovali jsme dočasné zvýšení T buněk během akutní fáze adaptace, také procento aktivovaných T lymfocytů se významně zvýšilo. Nicméně po dlouhodobé adaptaci měl počet T buněk spíše opačný trend. Zcela opačně se jevila populace B lymfocytů, která se po dlouhodobé adaptaci významně navýšila. Výsledky z FACS byly potvrzeny proliferací slezinných buněk. Po stimulaci mitogenem ConA, který stimuluje T buňky, byla jejich proliferace nižší po dlouhodobé adaptaci. Naopak stimulace bakteriálním LPS, který stimuluje buňky přes TLR4, vedla k navýšení proliferace po dlouhodobé adaptaci.

Jedním z mechanismů, který ovlivňuje počty buněk v slezině během stresu a reakce na okolní teplotu je působení sympatiku. Uvolňovaný NE se ve slezině váže na β 2AR přítomné na imunitních buňkách. Je exprimován nezkušenými $CD4^+$ Th a Th1 buňkami. Th2 $CD4^+$ buňky tento receptor postrádají. β 2AR najdeme také na cytotoxických lymfocytech a B buňkách (Kohm and Sanders, 2001). Dočasné zvýšení T lymfocytů tak může být zapříčiněno aktivací Th1 buněk pomocí NE. Aktivita cytotoxických buněk je NE utlumována a proto neočekáváme jejich aktivitu během chladové adaptace závislé na adrenergní signalizaci (Estrada et al., 2016). Při chladové adaptaci je však popisován rozvoj Th2 odpovědi, který vzhledem k nepřítomnosti receptoru nemůže být zapříčiněn signalizací NE přes β 2AR, přesto je potvrzen vliv katecholaminů na posun rovnováhy Th1/Th2 (Huang et al., 2012; Salicrú et al., 2007). Nabízí se tedy další typy AR nebo cytokinová polarizace. Hlavním cytokinem pro Th2 odpověď je IL-4. Byla popsána jeho produkce během chladové adaptace eozinofily (Qiu et al., 2014), ale mohou ho produkovat různé buněčné typy včetně ILC2 a M2 makrofágů. V našich pokusech byla zaznamenána zvýšená produkce IL-4 splenocyty po stimulaci ConA v desátém dnu adaptace. IL-4 je významným růstovým faktorem pro B lymfocyty (Hodgkin et al., 1996). Tímto si vysvětlujeme nárůst počtu B buněk během dlouhodobé adaptace. V jejich zvýšení může hrát roli také samotná přítomnost NE, který má význam v produkci protilátek (Kohm and Sanders, 1999). Dalším mechanismem, který se nabízí, je nárůst prostřednictvím folikulárních pomocných T buněk (follicular helper T cells - Tfh). Tfh jsou $CD4^+$ lymfocyty, které v sekundárních lymfoidních orgánech pomáhají v diferenciaci B buňkám. I ony produkují IL-4, což může být jedním z vysvětlení zvýšené produkce tohoto cytokinu po stimulaci ConA. Pro vývoj Tfh jsou důležité cytokiny IL-21 a IL-6. IL-6 je však i důležitým Th2 cytokinem, který se uplatňuje i v B buněčné odpovědi (Eto et al., 2011). Námi naměřená produkce IL-6 ze slezinných buněk izolovaných ze skupiny 3D vykazovala signifikantní zvýšení po stimulaci LPS. Někteří autoři popisují zvýšení IL-6 během opakovaného stresu a spojují ho se sníženou expresí AR (Laukova et al., 2010). Po třídní adaptaci jsme zaznamenali sníženou produkci IL-10. Tento cytokin inhibuje produkci IL-6 T buňkami (Hempel et al., 1995), dokáže však také indukovat tvorbu Treg a tím podpořit další tvorbu IL-10 (Jin et al., 2013). IL-10 je regulační cytokin, který dominuje protizánětlivému prostředí. Jeho hladina se závěrečné fázi adaptace zvyšovala, což naznačuje, že i po ukončení chladové expozice se udržuje protizánětlivé prostředí.

V průběhu chladové adaptace docházelo ke změnám v tukové tkáni. Hmotnost BAT se v chronické části adaptace dvojnásobně zvýšila. Jednalo se o očekávanou změnu, která

dokazuje vliv chladové adaptace a je popisována v souvislosti s termoregulačními procesy. K nárůstu BAT nedošlo okamžitě, protože nejprve musí dojít k aktivaci preadipocytů a jejich následné diferenciaci. BAT hraje zcela zásadní roli při netřesové termogenezi, díky expresi UCP1, který umožňuje produkci tepla. Vzhledem k metabolické schopnosti tukové tkáně produkovat velké množství aktivních látek, předpokládáme, že se podílí na ovlivňování mnoha buněčných typů, včetně imunitních buněk (Villarroya et al., 2017).

Zvýšenou hmotnost BAT jsme korelovali se změnou v adrenergní signalizaci. Stresové podněty, včetně chladu, vyvolají reakci HPA osy, která má za následek fyziologické změny pod vedením vyplavovaných katecholaminů (Pardon et al., 2003). Měření koncentrace NE v séru jasně demonstruje očekávané zvýšení NE během akutní stresové fáze. NE je zásadní pro tvorbu BAT a její aktivaci přes β 3AR. Nepochybně může být adrenergní signalizace místně specifická a stimulovat/inhibovat konkrétní tkáň, ale v našem případě došlo ke zvýšení systémovému. Vyšší koncentraci NE v séru potvrzují další studie (Shimizu and Yokotani, 2009). Reakce na vyšší koncentraci NE jsme zaznamenali u slezinných buněk. Pomocí RT-PCR jsme určili vyšší expresi enzymu MAOA, který degraduje NE. Již dříve bylo potvrzeno, že exprese MAOA je regulována stresem nebo zánětem (Gupta et al., 2015). Domníváme se, že NE ve slezinně reguluje buňky imunitních populací přes β 2AR, což umožňuje reakci na změnu okolní teploty.

Díky získaným výsledkům, změnám v imunitním systému, zvýšení hmotnosti BAT a změně koncentrace NE jsme se rozhodli dále sledovat vliv adrenergní signalizace v procesu chladové termoregulace na imunitní systém. K tomuto studiu jsme se rozhodli využít specifických inhibitorů β AR. Použili jsme inhibitor β 2AR, protože je dominantním AR na imunitních buňkách (Kohm and Sanders, 1999), a inhibitor β 3AR, které jsou exprimované v tukové tkáni (Villarroya et al., 2017). Beta blokátorů nebo antagonistů β AR se běžně využívá v klinické praxi. Inhibitory byly podávány mezi třetím a devátým dnem adaptace, desátý den byla zvířata utracena a izolovány analyzované tkáně. Časové rozpětí pro podávání inhibitorů bylo určeno na základě předchozí kinetiky chladové adaptace. Mezi těmito časy docházelo k nejvýraznějším změnám, které byly přisuzované aklimatizaci potkanů.

Nicméně zde musíme odlišit první a druhou část experimentů. Jednalo se o dva nezávislé pokusy, kde pro každý z nich byli využiti potkani od jiného dodavatele. Tato skutečnost mohla způsobit některé rozdílné trendy mezi pokusy, které tak nechceme srovnávat. Další možností vysvětlení těchto trendů je jiná roční doba a sezónní fyziologie

zvířat. Základní předpoklady chladové adaptace, vlivu BAT a adrenergní signalizace však změněny nebyly.

Účinnost inhibitorů byla potvrzena změnou hmotnosti BAT. Po aplikaci β 3AR došlo k jejímu snížení, což je v souladu se všemi předpoklady (Ootsuka et al., 2011; Tonello et al., 1998). Blokace β 2AR signifikantně zvýšila tvorbu hnědého tuku u kontrolní neadaptované skupiny. To odpovídá zvýšené β 3 adrenergní signalizaci, ke které dochází při použití blokátorů β 2AR (Wijers et al., 2011). Očekávali jsme zvýšenou produkci IL-4 buňkami BAT během chladové adaptace. Adaptované skupiny vykazovali vyšší produkci IL-4, která byla po stimulaci LPS nebo ConA markantně navýšena. Inhibitory AR neměli na tvorbu IL-4 zásadní vliv. IL-4 může být produkován imunitními buňkami, které jsou infiltrovány v tukové tkáni a ovlivňují proces termogeneze (Qiu et al., 2014). Produkce IL-6 byla též v BAT výrazně vyšší u adaptovaných potkanů než u kontrolní skupiny. Po užití inhibitorů bylo toto zvýšení utlumeno. To odpovídá poznatkům, že stres zvyšuje koncentraci sérového IL-6 a jeho sekrece může být stimulována prostřednictvím β AR (Doo et al., 2001; Vicennati et al., 2002). Zdrojem IL-6 mohou být například endotelové buňky, které produkují IL-6 ve stresových situacích (Gornikiewicz et al., 2000). V tukové tkáni však IL-6 produkují zřejmě převážně samotné adipocyty v závislosti na NE (Tchivileva et al., 2009). Zajímavé je signifikantní snížení produkce IL-6 u adaptovaných zvířat po zablokování β 3AR po stimulaci, ke kterému u nestimulované BAT nedocházelo. Nutno podotknout, že stimulační neměly téměř žádný vliv na zvířata, kterým nebyl podáván inhibitor. Vysvětlení tohoto faktu navrhuje následující. Po inhibici β 3AR není IL-6 produkován adipocyty, ale jinými buněčnými typy (imunitní buňky, buňky endotelu). Během chladové adaptace dochází k navýšení lokální koncentrace NE v BAT, který je však inhibiční pro tvorbu IL-6 stimulovanými hematopoetickými buňkami (van der Poll et al., 1994). Imunitní buňky v BAT tak v nepřítomnosti NE neprodukují IL-6 a nemohou zastoupit adipocyty. Důležité je zmínit, že v těchto pokusech byla BAT rozdělena na stejně velké části pouze odhadem. Nicméně další experimenty naší laboratoře, ve kterých byla již produkce cytokinů vztažena na přesnou hmotnost BAT, nevykazují významné rozdíly s výsledky získanými v diplomové práci. Nezbytné je opakování pokusů v této části diplomové práce, abychom získané výsledky potvrdili. Zajímavé také bude sledovat WAT a porovnat efekt běžování tukové tkáně s produkcí cytokinů.

U makrofágů jsme očekávali navození alternativně aktivovaného fenotypu. Na základě převažující exprese β 2AR jsme předpokládali, že po jeho inhibici bude funkce této buněčné

populace snížena. Procento buněk myeloidní populace v slezině, mezi kterou se řadí i makrofágy, bylo u adaptovaných zvířat zvýšené. Vyšší adrenergní signalizace je jedním z možných mechanismů. Zajímavé zjištění bylo signifikantní zvýšení produkce všech sledovaných rozpustných faktorů u kontrolní skupiny po užití inhibitoru β 2AR až na úroveň srovnatelnou s makrofágy stimulovanými LPS. Vysvětlením může být vyšší proliferace makrofágů způsobená vazbou katecholaminů přes β 3AR, který makrofágy překvapivě také exprimují (Hadi et al., 2017). Lechtenberg s kolegy prokázali, že snížená β 2AR signalizace má za následek silnou cytokinovou produkci, jak cytokinů zánětlivých, tak protizánětlivých (Lechtenberg et al., 2019). Tím můžeme vysvětlit zvýšenou produkci IL-6 a IL-10 u peritoneálních makrofágů neadaptovaných zvířat po aplikaci inhibitoru β 2AR. Pro zvýšenou produkci NO je důležitý také samotný efekt inhibitoru β 2AR, který stimuluje produkci NO a spouští vasodilataci (Wenzel et al., 2009). Po chladové adaptaci nebyla zvýšená produkce NO u potkanů, kterým byl aplikován inhibitor β 2AR, zřejmě díky zvýšené produkci katecholaminů, která vznikla při stresové reakci na chlad. U této skupiny nebyla pozorována ani zvýšená produkce IL-6 a IL-10, zřejmě díky stejnému mechanismu. Navíc chladová adaptace vyžaduje vazokonstrikci, která je v rozporu s produkcí NO. β 3AR mohou v srdci vyrovnávat aktivitu β 1 a β 2AR, a tím brání nadměrné β AR signalizaci (Moniotte et al., 2001). Je možné, že podobný efekt zastoupení β AR by mohl nastat i při chladové adaptaci. Navíc stres indukuje u T lymfocytů vyšší expresi β 3AR a nikdo doposud nestudoval, zda tomu tak není i u populace makrofágů (Laukova et al., 2012).

Kultivace peritoneálních makrofágů s LPS vede k navození M1 fenotypu. Pokud jsou však tyto makrofágy kultivovány společně s LPS a katecholaminy, dochází k přesmyku na M2 fenotyp a následně k indukci Th2 odpovědi (Grailer et al., 2014). Tento mechanismus závislý na NE vysvětluje zvýšenou produkci IL-6 po stimulaci LPS u obou skupin bez inhibitoru, zároveň osvětluje snížení IL-6 a IL-10 po užití inhibitoru β 2AR, a zvýšení jejich produkce u zvířat s inhibitorem β 3AR. Vliv adrenergní signalizace na produkci IL-6 makrofágy byl již dříve prokázán (Straub et al., 2000).

V naší studii jsme sledovali vliv adrenergní signalizace na změny navozené adaptací na chlad. Očekávali jsme změny v zastoupení populací lymfocytů po aplikaci specifických antagonistů AR. Vzhledem k expresi β 2AR na téměř imunitních buňkách (mimo Th2 buňky) jsme předpokládali, že dojde ke snížení aktivovaných buněk imunitního systému. β 3AR jsou také přítomny na lymfocytárních populacích, kde se jejich exprese mění v závislosti na podmínkách. Během akutního stresu je u T lymfocytů prokázáno, že zvyšují expresi β 3AR

(Laukova et al., 2012). Nicméně vazba NE má vyšší afinitu k β 2AR než k β 3AR. U populace T lymfocytů jsme pozorovali vyšší procentuální zastoupení ve slezině zvířat, kterým byl aplikován inhibitor β 3AR. To může být způsobeno vyšší aktivitou β 2AR díky zvýšené koncentraci NE. Stejný předpoklad platí i pro aktivované T lymfocyty.

Nevýznamnější rozdíl mezi první a druhou částí diplomové práce byly změny v zastoupení B lymfocytů. Výrazné signifikantní zvýšení této populace, pozorované při sledování kinetiky chladové adaptace, nebylo v druhé části experimentů zopakováno. Populace $CD45^+CD45RA^+$ buněk zůstala po 10 dnech chladové adaptace srovnatelná s kontrolní skupinou. Tento fakt byl zřejmě zapříčiněn změnou dodavatele zvířat.

Mimo to, změny pozorované v zastoupení T a B lymfocytů nejsou vyjádřeny absolutními počty, ale jsou vyjádřeny pouze jako relativní procento zastoupení. Z těchto dat bohužel nevyplývá, u které populace došlo ke zvýšení a která pouze dorovnává procentuální zastoupení. V dalším opakování pokusů je nutné vzít tento fakt do úvahy.

Navíc je snížení relativního počtu B lymfocytů, které jsme pozorovali ve slezině, diskutabilní. Výsledky proliferace splenocytů jasně naznačují, že po stimulaci LPS nedochází ke snížené proliferaci při blokaci β 3AR. Naopak snížená proliferace při použití antagonisty β 2AR potvrzuje větší vliv signalizace přes tento receptor na B lymfocyty. Důvodem je jeho vyšší exprese a vyšší afinita vazby oproti β 3AR. Opačný trend jsme pozorovali při proliferaci po nespecifické stimulaci T lymfocytů. Snížení proliferace u adaptované skupiny, kde byl použit blokátor β 3AR má své opodstatnění, díky zvýšené expresi β 3AR na T lymfocytech během stresu (Laukova et al., 2012). Nicméně vzhledem k tomu, že produkce důležitého růstového faktoru pro T lymfocyty IL-2 se mezi jednotlivými skupinami významně neměnila, můžeme usuzovat, že po desetidenní chladové adaptaci nedošlo k zásadní změně v zastoupení T buněk, které tento cytokin produkují. Detekovali jsme také zvýšenou produkci IFN- γ po simulaci ConA, což opět potvrzuje odlišné zastoupení AR na jednotlivých populacích T lymfocytů (Laukova et al., 2012).

Vzhledem k očekávanému protizánětlivému prostředí jsme sledovali hladinu IL-10 po kultivaci splenocytů. Po chladové adaptaci došlo k signifikantnímu navýšení jeho produkce. Významný vliv na tento cytokin mělo zablokování β 3AR. Zde pravděpodobně došlo ke zvýšené stimulaci β 2AR signalizace, které bylo indukováno přítomností NE. Po chladové adaptaci došlo také k navýšení produkce IL-6 v kulturách splenocytů po stimulaci LPS. U skupin, kde byly použity blokátory, došlo ke snížení produkce na úroveň neinhibované

kontroly. Zvýšená produkce IL-6 během stresu ve slezině je v souladu s literaturou (Laukova et al., 2010), stejně tak jako vliv adrenergní signalizace (Straub et al., 2000).

Na základě těchto výsledků, budeme modelovat další pokusy, které nám pomohou více objasnit některé mechanismy. Zcela zásadní bude zjištění exprese jednotlivých AR na různých imunitních populacích v našem modelu. Další pokusy bychom chtěli rozšířit o studium tyroidních hormonů, jejichž vliv na chladovou adaptaci je také popisován.

7 Závěr

- Podařilo se nám stanovit kinetiku chladové adaptace u potkanů, kde jsme stanovili přechod z akutního stresového prostředí na fázi adaptace mezi třetím a desátým dnem
- Pozorovali jsme změny v zastoupení jednotlivých buněčných populací ve slezině, detekovali jsme dočasné zvýšení T lymfocytů a nárůst populace B lymfocytů, který jsme korelovali se zvýšenou produkcí IL-4. Peritoneální makrofágy během chladové adaptace vykazovaly alternativně aktivovaný fenotyp M2
- V procesu chladové adaptace, jakož i v procesu tvorby BAT, se podílí adrenergní signalizace, což naznačuje zjištěná koncentrace NE v séru a exprese MAOA
- V druhé části diplomové práce jsme potvrdili účast β 3AR na procesu chladové adaptace ve změně hmotnosti BAT, u které jsme pozorovali rozdílnou cytokinovou produkci
- Efekt antagonistů β 2 a β 3AR jsme pozorovali na populaci peritoneálních makrofágů, kde inhibitor β 2AR spouštěl silnou cytokinovou produkci a produkci NO u kontrolních zvířat
- Efekt chladové adaptace na zvýšení populace B lymfocytů se nepodařilo znovu potvrdit, zřejmě kvůli změně dodavatele zvířat. Podařilo se však potvrdit vliv adrenergní signalizace během chladové adaptace na lymfocytární populace.

8 Přehled použité literatury

- Althani, A.A., Marei, H.E., Hamdi, W.S., Nasrallah, G.K., El Zowalaty, M.E., Al Khodor, S., Al-Asmakh, M., Abdel-Aziz, H., and Cenciarelli, C. (2016). Human Microbiome and its Association With Health and Diseases. *J. Cell. Physiol.* *231*, 1688–1694.
- Azzu, V., and Brand, M.D. (2010). The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 298–307.
- Belay, T., Woart, A., and Graffeo, V. (2017). Effect of cold water-induced stress on immune response, pathology and fertility in mice during *Chlamydia muridarum* genital infection. *Pathog. Dis.* *75*, 1–13.
- Bénézech, C., and Jackson-Jones, L.H. (2019). ILC2 orchestration of local immune function in adipose tissue. *Front. Immunol.* *10*, 1–6.
- Bianco, A.C., and McAninch, E.A. (2013). The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homeostasis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *1*, 250–258.
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K. a, Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., et al. (2012). A PGC1a dependent myokine that derives browning of white fat and thermogenesis. *Nature* *481*, 463–468.
- Brestoff, J.R., Kim, B.S., Saenz, S.A., Stine, R.R., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Thome, J.J., Farber, D.L., Lutfy, K., Seale, P., et al. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* *519*, 242–246.
- Camell, C.D., Sander, J., Spadaro, O., Lee, A., Nguyen, K.Y., Wing, A., Goldberg, E.L., Youm, Y.H., Brown, C.W., Elsworth, J., et al. (2017). Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature* *550*, 119–123.
- Chen, W.H., Sun, L.T., Tsai, C.L., Song, Y.L., and Chang, C.F. (2002). Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* *126*, 90–100.
- Cheng, C.H., Ye, C.X., Guo, Z.X., and Wang, A.L. (2017). Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. *Fish Shellfish Immunol.* *64*, 137–145.
- Chevalier, C., Stojanović, O., Colin, D.J., Suarez-Zamorano, N., Tarallo, V., Veyrat-Durebex, C., Rigo, D., Fabbiano, S., Stevanović, A., Hagemann, S., et al. (2015). Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell* *163*, 1360–1374.
- Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am. J. Physiol. Metab.* *297*, E977–E986.
- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S.E., Benoist, C., and Mathis, D. (2012). PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* *486*, 549–553.
- Ding, X., Luo, Y., Zhang, X., Zheng, H., Yang, X., Yang, X., and Liu, M. (2016). IL-33-driven ILC2/eosinophil axis in fat is induced by sympathetic tone and suppressed by obesity. *J. Endocrinol.* *231*, 35–48.
- Doo, Y.C., Kim, D.M., Oh, D.J., Ryu, K.H., Rhim, C.Y., and Lee, Y. (2001). Effect of beta blockers on expression of interleukin-6 and C-reactive protein in patients with unstable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* *88*, 422–424.
- Estrada, L.D., Açaç, D., and Farrar, J.D. (2016). Sympathetic neural signaling via the β 2-adrenergic receptor suppresses T-cell receptor-mediated human and mouse CD8 + T-cell effector function. *Eur. J. Immunol.* *46*, 1948–1958.
- Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T.C., Kageyama, R., Yusuf, I., and Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One* *6*.

- Fabbiano, S., Suárez-Zamorano, N., Rigo, D., Veyrat-Durebex, C., Stevanovic Dokic, A., Colin, D.J., and Trajkovski, M. (2016). Caloric Restriction Leads to Browning of White Adipose Tissue through Type 2 Immune Signaling. *Cell Metab.* *24*, 434–446.
- Fedorenko, A., Lishko, P. V., and Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* *151*, 400–413.
- Ferguson, L. V., Kortet, R., and Sinclair, B.J. (2018). Eco-immunology in the cold: the role of immunity in shaping the overwintering survival of ectotherms. *J. Exp. Biol.* *221*, jeb163873.
- Festuccia, W.T., Blanchard, P.-G., Richard, D., and Deshaies, Y. (2010). Basal adrenergic tone is required for maximal stimulation of rat brown adipose tissue UCP1 expression by chronic PPAR- γ activation. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* *299*, R159–R167.
- Fischer, K., Ruiz, H.H., Jhun, K., Finan, B., Oberlin, D.J., Van Der Heide, V., Kalinovich, A. V., Petrovic, N., Wolf, Y., Clemmensen, C., et al. (2017). Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat. Med.* *23*, 623–630.
- Gagnon, D.D., Gagnon, S.S., Rintamäki, H., Törmäkangas, T., Puukka, K., Herzig, K.H., and Kyröläinen, H. (2014). The effects of cold exposure on leukocytes, hormones and cytokines during acute exercise in humans. *PLoS One* *9*.
- García, M. del C., Pazos, P., Lima, L., and Diéguez, C. (2018). Regulation of energy expenditure and brown/beige thermogenic activity by interleukins: New roles for old actors. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Giralt, M., and Villarroya, F. (2013). White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? *Endocrinology* *154*, 2992–3000.
- Gornikiewicz, A., Sautner, T., Brostjan, C., Schmierer, B., Függer, R., Roth, E., Mühlbacher, F., and Bergmann, M. (2000). Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *FASEB J.* *14*, 1093–1100.
- Goto, T., Kim, M., Takahashi, H., Takahashi, N., and Kawada, T. (2016). Food Intake and Thermogenesis in Adipose Tissue. *Korean J. Obes.* *25*, 109–114.
- Grailer, J.J., Haggadone, M.D., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., and Ward, P.A. (2014). Induction of M2 regulatory macrophages through the β 2- Adrenergic receptor with protection during endotoxemia and acute lung injury. *J. Innate Immun.* *6*, 607–618.
- Greenspan, S.E., Bower, D.S., Webb, R.J., Berger, L., Rudd, D., Schwarzkopf, L., and Alford, R.A. (2017). White blood cell profiles in amphibians help to explain disease susceptibility following temperature shifts. *Dev. Comp. Immunol.* *77*, 280–286.
- Gupta, V., Khan, A.A., Sasi, B.K., and Mahapatra, N.R. (2015). Molecular mechanism of monoamine oxidase A gene regulation under inflammation and ischemia-like conditions: Key roles of the transcription factors GATA2, Sp1 and TBP. *J. Neurochem.* *134*, 21–38.
- Hadi, T., Douhard, R., Dias, A.M.M., Wendremaire, M., Pezzè, M., Bardou, M., Sagot, P., Garrido, C., and Lirussi, F. (2017). Beta3 adrenergic receptor stimulation in human macrophages inhibits NADPHoxidase activity and induces catalase expression via PPAR γ activation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1864*, 1769–1784.
- Haman, F., and Blondin, D.P. (2017). Shivering thermogenesis in humans: Origin, contribution and metabolic requirement. *Temperature* *4*, 217–226.
- Harms, M., and Seale, P. (2013). Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* *19*, 1252–1263.
- Hempel, L., Körholz, D., Bönig, H., Schneider, M., Klein-Vehne, A., Packeisen, J., Mauz-Körholz, C., and Burdach, S. (1995). Interleukin-10 directly inhibits the interleukin-6 production in T-cells. *Scand. J. Immunol.* *41*, 462–466.
- Hodgkin, P.D., Lee, J.H., and Lyons, A.B. (1996). B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J. Exp. Med.* *184*, 277–281.

- Hoeke, G., Kooijman, S., Boon, M.R., Rensen, P.C.N., and Berbeé, J.F.P. (2016). Role of Brown Fat in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Circ. Res.* *118*, 173–182.
- Hondares, E., Rosell, M., Díaz-Delfín, J., Olmos, Y., Monsalve, M., Iglesias, R., Villarroya, F., and Giralt, M. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: Involvement of PRDM16. *J. Biol. Chem.* *286*, 43112–43122.
- Hu, G.-Z., Yang, S.-J., Hu, W.-X., Wen, Z., He, D., Zeng, L.-F., Xiang, Q., Wu, X.-M., Zhou, W.-Y., and Zhu, Q.-X. (2016). Effect of cold stress on immunity in rats. *Exp. Ther. Med.* *11*, 33–42.
- Huang, H.-W., Fang, X.-X., Wang, X.-Q., Peng, Y.-P., and Qiu, Y.-H. (2015). Regulation of differentiation and function of helper T cells by lymphocyte-derived catecholamines via α_1 - and β_2 -adrenoceptors. *Neuroimmunomodulation* *22*, 138–151.
- Huang, H.W., Tang, J.L., Han, X.H., Peng, Y.P., and Qiu, Y.H. (2012). Lymphocyte-derived catecholamines induce a shift of Th1/Th2 balance toward Th2 polarization. *Neuroimmunomodulation* *20*, 1–8.
- Hume, D.A. (2015). The many alternative faces of macrophage activation. *Front. Immunol.* *6*, 1–10.
- Janský, L., Pospíšilová, D., Honzová, S., Ulicný, B., Srámek, P., Zeman, V., and Kamínková, J. (1996). Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* *72*, 445–450.
- Jin, J.-O., Han, X., and Yu, Q. (2013). Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *J. Autoimmun.* *40*, 28–44.
- Jung, S.M., Sanchez-Gurmaches, J., and Guertin, D.A. (2018). Brown Adipose Tissue Development and Metabolism. In *Journal of Animal Science*, pp. 3–36.
- Kang, K., Reilly, S.M., Karabacak, V., Gangl, M.R., Fitzgerald, K., Hatano, B., and Lee, C.H. (2008). Adipocyte-Derived Th2 Cytokines and Myeloid PPAR δ Regulate Macrophage Polarization and Insulin Sensitivity. *Cell Metab.* *7*, 485–495.
- Kaufman, L.N., Young, J.B., and Landsberg, L. (1986). Effect of protein on sympathetic nervous system activity in the rat. Evidence for nutrient-specific responses. *J. Clin. Invest.* *77*, 551–558.
- Keipert, S., and Jastroch, M. (2014). Brite/beige fat and UCP1 - Is it thermogenesis? *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1837*, 1075–1082.
- Kim, K., Suzuki, K., Peake, J., Ahn, N., Ogawa, K., Hong, C., Kim, S., Lee, I., and Park, J. (2014). Physiological and leukocyte subset responses to exercise and cold exposure in cold-acclimatized skaters. *Biol. Sport* *31*, 39–48.
- Kim, M., Goto, T., Yu, R., Uchida, K., Tominaga, M., Kano, Y., Takahashi, N., and Kawada, T. (2015). Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci. Rep.* *5*, 1–12.
- Kim, M., Furuzono, T., Yamakuni, K., Li, Y., Kim, Y. Il, Takahashi, H., Ohue-Kitano, R., Jheng, H.F., Takahashi, N., Kano, Y., et al. (2017). 10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, enhances energy metabolism by activation of TRPV1. *FASEB J.* *31*, 5036–5048.
- Kizaki, T., Oh-ishi, S., and Ohno, H. (1996). Acute cold stress induces suppressor macrophages in mice. *J. Appl. Physiol.* *81*, 393–399.
- Kohlgruber, A.C., Gal-Oz, S.T., LaMarche, N.M., Shimazaki, M., Duquette, D., Koay, H.-F., Nguyen, H.N., Mina, A.I., Paras, T., Tavakkoli, A., et al. (2018). $\gamma\delta$ T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. *Nat. Immunol.* *19*, 464–474.
- Kohm, A.P., and Sanders, V.M. (1999). Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo. *J. Immunol.* *162*, 5299–5308.
- Kohm, A.P., and Sanders, V.M. (2001). Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol. Rev.* *53*, 487–525.

- Kokolus, K.M., Capitano, M.L., Lee, C.-T., Eng, J.W.-L., Waight, J.D., Hylander, B.L., Sexton, S., Hong, C.-C., Gordon, C.J., Abrams, S.I., et al. (2013). Baseline tumor growth and immune control in laboratory mice are significantly influenced by subthermoneutral housing temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 20176–20181.
- Komatsu, M., Tong, Y., Li, Y., Nakajima, T., Li, G., Hu, R., Sugiyama, E., Kamijo, Y., Tanaka, N., Hara, A., et al. (2010). Multiple roles of PPAR α in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. *Genes to Cells* *15*, 91–100.
- Košťál, V., Grgac, R., and Korbelová, J. (2019). Delayed mortality and sublethal effects of cold stress in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* *113*, 24–32.
- Kozyreva, T. V., and Eliseeva, L.S. (2000). Immune response in cold exposures of different types. *J. Therm. Biol.* *25*, 401–404.
- Kozyreva, T. V., and Eliseeva, L.S. (2004). The immune system response to antigen in cold- and warm-adapted rats. *J. Therm. Biol.* *29*, 865–869.
- Laukova, M., Vargovic, P., Krizanova, O., and Kvetnansky, R. (2010). Repeated stress down-regulates β 2- and α 2C-adrenergic receptors and up-regulates gene expression of IL-6 in the rat spleen. *Cell. Mol. Neurobiol.* *30*, 1077–1087.
- Laukova, M., Vargovic, P., Csaderova, L., Chovanova, L., Vlcek, M., Imrich, R., Krizanova, O., and Kvetnansky, R. (2012). Acute stress differently modulates beta 1, beta 2 and beta 3 adrenoceptors in T cells, but not in B cells, from the rat spleen. *Neuroimmunomodulation* *19*, 69–78.
- Lechtenberg, K.J., Meyer, S.T., Doyle, J.B., Peterson, T.C., and Buckwalter, M.S. (2019). Augmented β 2-adrenergic signaling dampens the neuroinflammatory response following ischemic stroke and increases stroke size. *J. Neuroinflammation* *16*, 1–18.
- Lee, M.W., Odegaard, J.I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Yun, K., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* *160*, 74–87.
- Li, Y., Fromme, T., and Klingenspor, M. (2017). Meaningful respirometric measurements of UCP1-mediated thermogenesis. *Biochimie* *134*, 56–61.
- Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P.J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E.E., Tighe, M., Koay, H.-F., et al. (2015). Regulatory iNKT cells lack PLZF expression and control T(reg) cell and macrophage homeostasis in adipose tissue. *Nat. Immunol.* *16*, 85–95.
- Lynch, L., Hogan, A.E., Duquette, D., Lester, C., Banks, A., LeClair, K., Cohen, D.E., Ghosh, A., Lu, B., Corrigan, M., et al. (2016). iNKT Cells Induce FGF21 for Thermogenesis and Are Required for Maximal Weight Loss in GLP1 Therapy. *Cell Metab.* *24*, 510–519.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1500–1508.
- De Matteis, R., Lucertini, F., Guescini, M., Polidori, E., Zeppa, S., Stocchi, V., Cinti, S., and Cuppini, R. (2013). Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* *23*, 582–590.
- Mauer, J., Chaurasia, B., Goldau, J., Vogt, M.C., Ruud, J., Nguyen, K.D., Theurich, S., Hausen, A.C., Schmitz, J., Bronneke, H.S., et al. (2012). Interleukin-6 signaling promotes alternative macrophage activation to limit obesity-associated insulin resistance and endotoxemia. *Nat. Immunol.* *29*, 997–1003.
- Messmer, M.N., Kokolus, K.M., Eng, J.W.-L., Abrams, S.I., and Repasky, E.A. (2014). Mild cold-stress depresses immune responses: Implications for cancer models involving laboratory mice. *Bioessays* *36*, 884–891.
- Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Liang, H., Van Dyken, S.J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Chawla,

- A., and Locksley, R.M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J. Exp. Med.* *210*, 535–549.
- Moniotte, S., Kobzik, L., Feron, O., Trochu, J., Gauthier, C., and Balligand, J. (2001). Response to Inotropic Amines in Human Failing Myocardium. *Drugs*.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Metab.* *293*, E444–E452.
- Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P.S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* *480*, 104–108.
- Oi-Kano, Y., Iwai, K., Kawada, T., Watanabe, T., Koyama, F., Watanabe, K., and Senbongi, R. (2008). Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. *54*, 363–370.
- Ootsuka, Y., Kulasekara, K., de Menezes, R.C., and Blessing, W.W. (2011). SR59230A, a beta-3 adrenoceptor antagonist, inhibits ultradian brown adipose tissue thermogenesis and interrupts associated episodic brain and body heating. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* *301*, R987–R994.
- Pardon, M.-C., Ma, S., and Morilak, D.A. (2003). Chronic cold stress sensitizes brain noradrenergic reactivity and noradrenergic facilitation of the HPA stress response in Wistar Kyoto rats. *Brain Res.* *971*, 55–65.
- Perez, S.D., Molinaro, C.A., Tan, L., ThyagaRajan, S., Lorton, D., and Bellinger, D.L. (2018). Sympathetic neurotransmission in spleens from aging Brown-Norway rats subjected to reduced sympathetic tone. *J. Neuroimmunol.* *324*, 1–15.
- Petrovic, N., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2008). Thermogenically competent nonadrenergic recruitment in brown preadipocytes by a PPAR γ agonist. *Am. J. Physiol. Metab.* *295*, E287–E296.
- Pirzgalska, R.M., Seixas, E., Seidman, J.S., Link, V.M., Sánchez, N.M., Mahú, I., Mendes, R., Gres, V., Kubasova, N., Morris, I., et al. (2017). Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine. *Nat. Med.* *23*, 1309–1318.
- van der Poll, T., Jansen, J., Endert, E., Sauerwein, H.P., and van Deventer, S.J. (1994). Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect. Immun.* *62*, 2046–2050.
- Qiu, Y., Nguyen, K.D., Odegaard, J.I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R.M., Palmiter, R.D., and Chawla, A. (2014). Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* *157*, 1292–1308.
- Rao, R.R., Long, J.Z., White, J.P., Svensson, K.J., Lou, J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M.P., Ruas, J.L., Wrann, C.D., Lo, J.C., et al. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* *157*, 1279–1291.
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T., and Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* *15*, 659–667.
- Saely, C.H., Geiger, K., and Drexel, H. (2011). Brown versus white adipose tissue: A mini-review. *Gerontology* *58*, 15–23.
- Salehipour-shirazi, G., Ferguson, L. V., and Sinclair, B.J. (2017). Does cold activate the *Drosophila melanogaster* immune system? *J. Insect Physiol.* *96*, 29–34.
- Salicrú, A.N., Sams, C.F., and Marshall, G.D. (2007). Cooperative effects of corticosteroids and catecholamines upon immune deviation of the type-1/type-2 cytokine balance in favor of type-2 expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Brain. Behav. Immun.* *21*, 913–920.
- Satoh, M., Hoshino, M., Fujita, K., Iizuka, M., Fujii, S., Clingan, C.S., Van Kaer, L., and Iwabuchi, K.

- (2016). Adipocyte-specific CD11d-deficiency mitigates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Sci. Rep.* *6*, 1–12.
- Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J. Biol. Chem.* *281*, 40236–40241.
- Sesti-Costa, R., Ignacchiti, M.D.C., Chedraoui-Silva, S., Marchi, L.F., and Mantovani, B. (2012). Chronic cold stress in mice induces a regulatory phenotype in macrophages: Correlation with increased 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression. *Brain. Behav. Immun.* *26*, 50–60.
- Shimizu, T., and Yokotani, K. (2009). Acute cold exposure-induced down-regulation of CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A, in rat interscapular brown adipose tissue by sympathetically activated β 3-adrenoreceptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *387*, 294–299.
- Shu, J., Stevenson, J.R., and Zhou, X. (1993). Modulation of cellular immune responses by cold water swim stress in the rat. *Dev. Comp. Immunol.* *17*, 357–371.
- Straub, R., Schaller, T., Horsten von, S., Jessop, D., Scholmerich, J., and Falk, W. (2000). Neuropeptide Y cotransmission with norepinephrine in the dialogue between nerve and macrophage. *J. Neurochem.* *75*, 2464–2471.
- Suárez-Zamorano, N., Fabbiano, S., Chevalier, C., Stojanović, O., Colin, D.J., Stevanović, A., Veyrat-Durebex, C., Tarallo, V., Rigo, D., Germain, S., et al. (2015). Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat. Med.* *21*, 1497–1501.
- Tchivileva, I.E., Tan, K.S., Gambarian, M., Nackley, A.G., Medvedev, A. V., Romanov, S., Flood, P.M., Maixner, W., Makarov, S.S., and Diatchenko, L. (2009). Signaling pathways mediating β 3-adrenergic receptor-induced production of interleukin-6 in adipocytes. *Mol. Immunol.* *46*, 2256–2266.
- Tonello, C., Dioni, L., Briscini, L., Nisoli, E., and Carruba, M.O. (1998). SR59230A blocks β 3-adrenoceptor-linked modulation of uncoupling protein-1 and leptin in rat brown adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* *352*, 125–129.
- Vargovic, P., Manz, G., and Kvetnansky, R. (2016). Continuous cold exposure induces an anti-inflammatory response in mesenteric adipose tissue associated with catecholamine production and thermogenin expression in rats. *Endocr. Regul.* *50*, 137–144.
- Vicennati, V., Vottero, A., Friedman, C., and Papanicolaou, D. (2002). Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *Int. J. Obes.* *26*, 905–911.
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., and Giralto, M. (2017). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* *13*, 26–35.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1518–1525.
- Wang, Q., and Wu, H. (2018). T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. *Front. Immunol.* *9*, 2509.
- Wankhade, U.D., Shen, M., Yadav, H., and Thakali, K.M. (2016). Novel Browning Agents, Mechanisms, and Therapeutic Potentials of Brown Adipose Tissue. *Biomed Res. Int.* *2016*.
- Wenz, T., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., Spiegelman, B.M., and Moraes, C.T. (2009). Increased muscle PGC-1 expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 20405–20410.
- Wenzel, D., Knies, R., Matthey, M., Klein, A.M., Welschoff, J., Stolle, V., Sasse, P., Röhl, W., Breuer, J., and Fleischmann, B.K. (2009). β 2-adrenoceptor antagonist icl 118,551 decreases pulmonary vascular tone in mice via a G i/o protein/nitric oxide-coupled pathway. *Hypertension* *54*, 157–163.

- Wijers, S.L.J., Schrauwen, P., Van Baak, M.A., Saris, W.H.M., and Lichtenbelt, W.D.V.M. (2011). β -adrenergic receptor blockade does not inhibit cold-induced thermogenesis in humans: Possible involvement of brown adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, 598–605.
- Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P.P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M.G., Alonso, M.N., et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.* *17*, 610–617.
- Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2011). Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis. *Science* (80-.). *332*, 243–247.
- Yeung, H.W.D., Grewal, R.K., Gonen, M., Schoder, H., and Larson, S.M. (2003). Patterns of 18 F-FDG Uptake in Adipose Tissue and Muscle: A Potential Source of. *J. Nucl. Med.* *44*, 1789–1797.
- Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., and Saito, M. (2011). Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity* *19*, 13–16.
- Žáková, A., Knechtle, B., Chlíbková, D., Miličková, M., Rosemann, T., and Nikolaidis, P.T. (2017). The effect of a 100-km ultra-marathon under freezing conditions on selected immunological and hematological parameters. *Front. Physiol.* *8*, 1–9.