

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie (navazující magisterské studium)

Studijní obor: Imunologie



Bc. Anna Kratochvílová

**Vliv chladového stresu na imunitní systém za působení infekčních agens**

**The effect of cold stress on the immune system in the presence of infection**

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2021

## **Poděkování**

Především bych chtěla poděkovat své školitelce doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D za cenné rady, vstřícný přístup a trpělivost během psaní diplomové práce. Ráda bych také poděkovala všem členům Laboratoře Imunoregulací, zejména RNDr. Michaele Hájkové, Ph.D., Mgr. Danielu Vaškovi a Mgr. Biance Porubské, za přátelské prostředí, podporu a pomoc s experimentální prací. Dále doc. RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D. z Laboratoře bioenergetiky a svalové fyziologie za pomoc s adaptací zvířat a RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D. ze skupiny membránových receptorů a buněčné signalizace za pomoc s metodou Western blot. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu v průběhu celého studia.

## **Prohlášení**

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

V Praze dne 26.4.2021

Bc. Anna Kratochvílová

## Abstrakt

Přestože je problematika vztahu působení chladu a infekcí zkoumána již od nepaměti, stále nebyla objevena řada mechanismů, které k tomuto jevu přispívají. Zatímco krátkodobé působení chladu spouští stresovou odpověď a tvorbu prozánětlivých cytokinů, dlouhodobé působení chladu navozuje chladovou adaptaci a protizánětlivý přesmyk. Nevyřešenou otázkou zůstává role chladové adaptace v rozvoji a průběhu odpovědi organismu na infekci. V této diplomové práci jsme se zaměřili na učení vlivu chladového stresu, nebo chladové adaptace na imunitní systém potkanů za současné stimulace ligandy Toll-like receptorů (TLR). Z námi získaných výsledků vyplývá především důležitost  $\gamma\delta$ T lymfocytů a cytokinů, které produkují v procesu chladové adaptace. Abychom zjistili, jak chladová adaptace ovlivní odpověď na infekční agens, studovali jsme změny zastoupení různých populací imunitních buněk u potkanů, kterým byl aplikován ligand TLR2/6, Pam2CSK4. Pozorovali jsme významné změny v aktivaci myeloidních buněk a B lymfocytů, ale také v populaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů. Některé z výsledků poukazují na význam  $\gamma\delta$ T lymfocytů a protektivní vliv chladové adaptace.

**Klíčová slova:** imunitní systém, chladový stres, chladová adaptace, infekce, Toll-like receptory, ligandy Toll-like receptorů

## Abstract

Although the relationship between the effects of cold and infection has been studied for a long time, the mechanisms contributing to this phenomenon have not yet been discovered. While short-term exposure to cold triggers a stress response and the production of proinflammatory cytokines, long-term cold exposure induces adaptation and anti-inflammatory shift. The role of cold adaptation in the development and the process of the organism's response to infection remains an unresolved issue. In this diploma thesis, we focused on determining the effect of cold stress or cold adaptation on the immune system of rats which was stimulated by ligands of Toll-like receptors (TLRs). The obtained results showed the importance of  $\gamma\delta$ T lymphocytes and their cytokine production in the process of cold adaptation. To determine how cold adaptation affects the response to infectious agents, we studied changes in the proportion of different immune cell populations in rats treated with the TLR2/6 ligand Pam2CSK4. We determined significant changes in the activation of myeloid cells and B lymphocytes, but also in the population of  $\gamma\delta$ T lymphocytes. Our obtained results suggested the importance of  $\gamma\delta$ T lymphocytes and the protective effect of cold adaptation.

**Key words:** immune system, cold stress, cold adaptation, infection, Toll-like receptors, Toll-like receptor ligands

## Seznam zkratek

ATP	adenosin trifosfát (adenosine triphosphate)
AR	adrenergní receptor (adrenergic receptor)
BAT	hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue)
CD	diferenciační skupina (cluster of differentiation)
DAMP	alarmin (damage / danger-associated molecular pattern)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescent activated cell sorting
FGF21	fibroblastový růstový faktor 21 (fibroblast growth factor 21)
HPA	hypotalamo-hypofyzární osa (hypothalamic-pituitary-adrenal)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IKK	kináza inhibitoru jaderného faktoru $\kappa$ (I $\kappa$ B kinase)
IL	interleukin
ILC2	přirozené lymfoidní buňky typu 2 (type 2 innate lymphoid cells)
IL-R	receptor pro interleukin
IRAK	interleukin-1 receptor associated kinase
IRF	interferon regulující faktor (interferon regulatory factor)
LPS	lipopolysacharid
LRR	na leucin bohatá repetice (leucine-rich repeat)
MAP	mitogenem aktivovaná kináza (mitogen-activated protein kinase)
MyD88	myeloid differentiation primary response 88
NE	norepinefrin (norepinephrine)
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NO	oxid dusnatý (nitric oxide)

NK	přirozený zabíječ (natural killer cell)
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
PAMP	molekulární vzory spojené s patogeny (pathogen-associated molecular patterns)
PPAR	receptor aktivovaný peroxizómovým proliferátorem (peroxisome proliferator-activated receptor)
RIP1	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
TAK1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
TBK1	TANK-binding kinase 1
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor beta (transforming growth factor $\beta$ )
Th	pomocný T lymfocyt (T helper cell)
TIR	toll-Interleukin-1 receptor
TIRAP	toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein
TLR	toll-like receptor
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
TRP	tranzientní receptorové potenciálové kanály (transient receptor potential channel)
UCP1	termogenin (uncoupling protein 1)
WAT	bílá tuková tkáň (white adipose tissue)

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Termoregulace</b>	<b>2</b>
2.1.1	Třesová termogeneze	2
2.1.2	Netřesová termogeneze	2
<b>2.2</b>	<b>Chladový stres</b>	<b>3</b>
2.2.1	Vliv chladového stresu na organismus	4
2.2.2	Odpověď na chladový stres	5
<b>2.3</b>	<b>Chladová adaptace</b>	<b>5</b>
2.3.1	Mechanismy vedoucí k běžování adipocytů	6
<b>2.4</b>	<b>Imunitní systém</b>	<b>7</b>
2.4.1	Imunitní systém a chlad	7
2.4.2	Odpověď imunitního systému na chladový stres	8
<b>2.5</b>	<b>Vliv imunitního systému na běžování adipocytů</b>	<b>9</b>
2.5.1	Buňky vrozené imunity	9
2.5.1.1	Eozinofily	9
2.5.1.2	ILC2	10
2.5.1.3	Makrofágy	10
2.5.2	Buňky adaptivní imunity	11
2.5.2.1	Regulační T lymfocyty	11
2.5.2.2	$\gamma\delta$ T lymfocyty	12
2.5.3	Cytokiny	13
<b>2.6</b>	<b>Infekce</b>	<b>14</b>
2.6.1	Vztah infekce a chladu	14
<b>2.7</b>	<b>Toll-like receptory</b>	<b>15</b>
2.7.1	TLR signalizace	16
2.7.2	Přehled jednotlivých TLR a jejich ligandů	18
2.7.2.1	TLR2	18
2.7.2.2	TLR3	19



2.7.2.3	TLR4	19
2.7.3	Aktivace TLR v tukové tkáni	19
<b>3</b>	<b>Cíle práce</b>	21
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b>	22
4.1	Zvířata	22
4.2	Médium	23
4.3	Roztoky	23
4.4	Ligandy TLR použité pro kultivaci s buňkami	25
4.5	Použitý software	25
4.6	Použité technické vybavení	25
4.7	Izolace buněk a tkání	25
2.7.1	Slezina	25
2.7.2	Izolace buněk sleziny	26
2.7.3	Izolace peritoneálních buněk	26
4.8	Průtoková cytometrie	27
4.9	ELISA	32
4.9.1	DuoSet ELISA Development System R&D	31
4.10	Western blot	33
4.10.1	Stanovení koncentrace proteinů	32
4.10.2	SDS-PAGE elektroforéza	34
4.10.3	Western blot	35
4.11	Statistická analýza	36
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	37
5.1	Hmotnost BAT	38
5.2	Působení ligandů TLR	39
5.2.1	Působení ligandů TLR in vitro	39
5.2.1.1	Průtoková cytometrie	39
5.2.1.2	ELISA	45
5.2.1.3	Western blot	47
5.2.2	Aplikace TLR2/6 ligandu Pam2CSK4 in vivo	49

	5.2.2.1 Průtoková cytometrie v den odběru	50
	5.2.2.2 Průtoková cytometrie po kultivaci splenocytů	55
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>Další použité zdroje</b>	<b>80</b>

# 1. Úvod

Vztah vzájemného působení chladu a pravděpodobnosti infekce je zkoumán již od nepaměti. Přesto zatím nebyla řada mechanismů, kterými k nachlazení během vystavení chladu dochází objasněna. Málo je také známo o vlivech krátkodobého a dlouhodobého působení chladu na imunitní systém. Krátkodobá expozice chladu působí na organismus jako stresový faktor, na imunitní systém působí pro-zánětlivě a může zvyšovat náchylnost k infekcím. Naopak dlouhodobé působení chladu vede k chladové adaptaci a tvorbě hnědé tukové tkáně. Zdá se, že chladová adaptace moduluje imunitní systém a navozuje proti-zánětlivý přesmyk. Otázkou zůstává, jakou roli hraje chladová adaptace během infekce. Některé nedávné studie naznačují, že aktivace Toll-like receptorů (TLR) působí na chladovou adaptaci negativně a vede ke snížení tvorby hnědé tukové tkáně. Objasnění vlivu vzájemného působení chladu a aktivace TLR na imunitní systém může přispět k vyřešení některých otázek týkajících se vztahu chladu a infekcí.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Termoregulace

Endotermní živočichové, včetně člověka, jsou závislí na udržení konstantní tělesné teploty. Správná tělesná teplota je klíčová pro zachování homeostázy, metabolismu i enzymatických procesů. Termoregulace je vitální funkcí, která udržení této teploty zajišťuje nezávisle na proměnlivé teplotě prostředí (Haman and Blondin, 2017; Tansey and Johnson, 2015). Změny v teplotě prostředí jsou registrovány termoreceptory, kterými jsou neurony umístěné po celém těle, včetně centrální nervové soustavy. Tyto neurony prostřednictvím tranzientních receptorových potenciálových kanálů (transient receptor potential, TRP) rozeznávají fyziologické i patofyziologické tepelné podněty. Centrem termoregulace jsou preoptická jádra hypotalamu (Tan and Knight, 2018). Neurony aktivované zvýšenou teplotou se nachází v dorzální části laterálního parabrachiálního jádra a jejich působením dochází například k vazodilataci a inhibici termogeneze. Naopak chladem aktivované neurony se vyskytují v laterální části laterálního parabrachiálního jádra a po aktivaci navozují vazokonstrikci a termogenezi (Madden and Morrison, 2019). Termogenezi lze pak rozdělit na třesovou a netřesovou (adaptivní) v závislosti na tkáni a mechanismu vzniku tepla.

#### 2.1.1 Třesová termogeneze

Třesová termogeneze je mechanismus tvorby tepla využívající především kosterní (příčně pruhovanou) svalovinu. Po podráždění chladových receptorů v kůži dochází k aktivaci alfa a gama motoneuronů, které kosterní svalstvo inervují (Madden and Morrison, 2019). Nervovou stimulací dochází k rychlým a opakovaným kontrakcím svalů se zapojením vláken I. a II. typu za spotřeby adenosintrifosfátu (adenosine triphosphate, ATP). Vytvořená energie je pak uvolňována ve formě tepla. U velkých savců, včetně člověka, je třesová termogeneze hlavním mechanismem vzniku tepla po expozici chladu (Haman and Blondin, 2017).

#### 2.1.2 Netřesová termogeneze

Naopak netřesová termogeneze je děj odehrávající se především v hnědé tukové tkáni (brown adipose tissue, BAT). BAT je silně inervovaná, vaskularizovaná a obsahuje vysoké

množství mitochondrií. Po vystavení chladu a podráždění chladových receptorů dochází k aktivaci BAT prostřednictvím norepinefrinu (norepinephrine, NE), který je uvolňován sympatickým nervovým systémem. Tímto se aktivuje metabolická dráha, která přeměňuje intracelulární triacylglyceroly na volné mastné kyseliny.  $\beta$ -oxidací těchto mastných kyselin vzniká acetyl koenzym A, který vstupuje do citrátového cyklu. Dochází k redukcí nikotinamidadenindinukleotidu a flavinadenindinukleotidu – molekul zásadních pro tvorbu protonového gradientu. V BAT se vlivem stimulace NE exprimuje protein termogenin (uncoupling protein 1, UCP1). Ten odpřahuje protonový gradient na vnější mitochondriální membráně. Netvoří se tak ATP a protonmotivní hnací síla je přeměněna na teplo. Kromě mastných kyselin je metabolizována i glukóza (Yau and Yen, 2020). Je možné, že BAT pro tvorbu tepla využívá i zásoby mastných kyselin uložených v bílé tukové tkáni (white adipose tissue, WAT) (Zeng et al., 2015). K expresi UCP1 a dalších genů asociovaných s BAT dochází po vystavení chladu i ve WAT. Tento proces se označuje za takzvané „běžování“ WAT a vzniklé „běžové“ adipocyty poté spolupracují na netřesové termogenezi. Pro udržení netřesové termogeneze jsou důležité hormony štítné žlázy trijodthyronin a tyroxin (Yau and Yen, 2020). Produkci tepla prostřednictvím netřesové termogeneze využívají například malí savci a hibernanti (MacCannell et al., 2019). U člověka je BAT aktivní především u novorozenců a postupem věku dochází k její regresi, přestože i u dospělých jedinců zůstává aktivní (Yau and Yen, 2020).

## 2.2 Chladový stres

Chlad lze obecně považovat za stresový faktor. Chladový stres je stav způsobený náhlým, nebo trvalým poklesem teploty prostředí pod termoneutrální zónu jedince (Imamura et al., 2013). V závislosti na době působení můžeme rozdělit chladový stres na akutní (krátkodobý), nebo chronický (dlouhodobý), který později může přecházet v chladovou adaptaci (Wang et al., 2015). Během chladového stresu dochází k poklesu tělesné teploty a zvýšení tepové frekvence či krevního tlaku (Imamura et al., 2013). Mezi další odpovědi na chladový stres patří vazokonstrikce a piloerекce (napřímení srsti). Organismus se s chladovým stresem vypořádává nástupem třesové a později i netřesové termogeneze (Messmer et al., 2014).

S chladovým stresem také úzce souvisí hypotermie. Za hypotermii se považuje stav, kdy teplota těla jedince klesne pod úroveň potřebnou pro normální chod metabolismu. Pro člověka je to teplota menší než 35°C. S nástupem hypotermie se postupně zastavují svalový třes a termogeneze. Tím dochází k poklesu metabolismu. Snižuje se funkce ledvin a klesá enzymatická funkce jater. Naopak stoupá hematokrit a viskozita krve. V pozdějších stádiích může dojít až k fibrilaci srdečních komor a smrti jedince (Cheshire, 2016).

### 2.2.1 Vliv chladového stresu na organismus

Chladový stres může na organismus působit značně škodlivě. Následkem poklesu teploty prostředí dochází ke zvýšení krevního tlaku, změnám v hemodynamice a výkonnosti myokardu (Cong et al., 2018). Po vystavení chladu se v srdci hromadí více reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS), které mohou poškozovat kardiomyocyty a jejich mitochondrie. Dochází tak k apoptóze a následně ke strukturním změnám myokardu. Tyto změny mohou vést k arytmiím, nebo infarktu myokardu. Řada epidemiologických studií zaznamenala nárůst počtu případů úmrtí na kardiovaskulární onemocnění v zimních měsících (Kong et al., 2020; Yang et al., 2015).

Akutní vystavení chladu také snižuje funkci osteoblastů a působí negativně na remodelaci a denzitu kostí. Překvapivě však bylo zjištěno, že exprese UCP1 spojená s chladovou adaptací působí na kosti protektivně (Nguyen et al., 2018). Na potkaním modelu bylo pozorováno, že chladový stres negativně ovlivňuje i vylučovací soustavu. Chlad způsobuje zvýšenou aktivitu hladké svaloviny stěny močového měchýře a tím zvýšenou potřebu močení a nokturii. Podobný vliv lze sledovat i u člověka (Imamura et al., 2013).

Nepříznivé působení chladového stresu během gravidity na potkaním modelu pozorovali Lian et al. U gravidních samic chladový stres ovlivňoval nejen neuroendokrinní systém a metabolismus, ale i imunitní systém. Tyto faktory ústily v prozánětlivou odpověď v placentě. Vlivem prenatálního působení chladového stresu pak došlo k hypertenzi, depresivnímu a úzkostnému chování u potomstva (Lian et al., 2020).

Odpovědí na chladový stres však může být i chladová adaptace, na jejímž počátku stojí uvolnění NE sympatickými nervy a aktivace hypothalamo-hypofyzární osy (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA).

## 2.2.2 Odpověď na chladový stres

HPA osa je důležitou součástí neuroendokrinního systému. Je tvořena složitým komplexem přímých vlivů a zpětných vazeb mezi jejími třemi komponentami: hypotalamem, hypofýzou a nadledvinami. Dohromady tyto komponenty řídí nejen reakci na stres, ale také řadu dalších funkcí jako jsou trávení, metabolismus, emoce nebo poznání. V neposlední řadě také významně moduluje imunitní systém (Appleton, 2018; Bellavance and Rivest, 2014). Termosenzitivní neurony jsou schopny vnímat chlad prostřednictvím iontových kanálů TRPM8 (Dhaka et al., 2007). V reakci na jakýkoli akutní stresový podnět pak dochází v mozku k aktivaci noradrenergického systému. Z dřeně nadledvin se uvolňuje NE, který společně s dalšími neurotransmitery přispívá k aktivaci HPA osy (Morilak et al., 2005). Výsledkem je uvolnění hormonů kortikoliberinu a argininu-vazopresinu do portálního oběhu pření hypofýzy. Následně dochází k sekreci adrenokortikotropního hormonu do krevního řečiště. Vlivem jeho působení dochází k produkci glukokortikoidů v nadledvinách. Glukokortikoidy patří mezi steroidní hormony a vyznačují se obecně protizánětlivými a imunomodulačními účinky (Bellavance and Rivest, 2014).

NE je dále vyplavován do těla, kde se v cílových tkáních váže na adrenergické receptory (adrenergic receptors, AR), které se dělí na alfa ( $\alpha$ )-AR a beta ( $\beta$ )-AR. V souvislosti s chladovým stresem a adaptací jsou důležité zejména  $\beta$ -AR, které můžeme rozdělit na  $\beta$ 1-AR,  $\beta$ 2-AR a  $\beta$ 3-AR. Zatímco  $\beta$ 1-AR jsou exprimovány především v srdeční tkáni a ledvinách,  $\beta$ 2-AR se v hojně míře vyskytují na buňkách imunitního systému, ale také na srdci, v plicích, cévách nebo ve svalech (Araujo et al., 2019; Mutlu and Factor, 2008).  $\beta$ 3-AR jsou exprimovány na BAT, ale také WAT. Jejich stimulací dochází v buňkách k metabolickým změnám vedoucím k netřesové termogenezi a chladové adaptaci (Cypess et al., 2015).

## 2.3 Chladová adaptace

Chladová adaptace, nebo též aklimatizace, je proces, který v konečném důsledku umožňuje organismu přizpůsobit se chladnému prostředí. Zahrnuje řadu behaviorálních, morfologických a fyziologických změn. Aby byl organismus schopný se s nízkými teplotami vyrovnat, je třeba zvýšit metabolismus. S chladovou adaptací proto úzce souvisí aktivace BAT, ale také přeměna a běžování WAT.

### 2.3.1 Mechanismy vedoucí k běžovění adipocytů

Mechanismů, jak organismus běžovění WAT docílí je několik a často vzájemně spolupracují. Jedním ze zásadních kroků je aktivace adipocytů stimulací  $\beta$ 3-AR na jejich povrchu. Tímto dochází ke spuštění dráhy, která vede k zvýšení exprese UCP1 a k lipolýze triacylglycerolů. Vznikající mastné kyseliny jsou důležité pro netřesovou termogenezi.

Běžové adipocyty se v mnoha ohledech podobají hnědým adipocytům – exprimují UCP1, podílí se na termogenezi a obsahují více, než jednu tukovou kapénku. Od hnědých adipocytů se však liší svým původem. Zatímco hnědé adipocyty se vyvíjí prenatálně z dermomyotomu, běžové adipocyty vznikají postnatálně z prekurzorů pro bílé adipocyty. Podobně jako hnědé adipocyty, i běžové adipocyty se vyznačují množstvím mitochondrií. Jejich autofágií lze běžové adipocyty převést zpět v bílé (Altshuler-Keylin et al., 2016).

Vzhledem k důležitosti masných kyselin pro termogenezi není náhodou, že některé z nich přispívají i k běžovění adipocytů. Jedná se konkrétně o omega-3 mastné kyseliny, které jsou obsaženy například v rybím oleji. Myši, kterým byl podáván rybí olej vykazovaly vyšší energetický výdej a zároveň u nich došlo ke zvýšení exprese UCP1 a  $\beta$ 3-AR. Toto mělo vliv i na hmotnost zvířat, která se snížila (Kim et al., 2016). Významnou molekulou v tomto procesu je také inzulin. Ukazuje se, že právě inzulinová signalizace ovlivňuje příjem lipidů a glukózy adipocyty (Heine et al., 2018). Zajímavý efekt na běžovění má i kalorická restrikce. Krátkodobé snížení příjmu potravy může mít řadu pozitivních účinků na metabolismus. U myší vystavených kalorické restrikci se zvýšila exprese UCP1 a navýšila se respirační kapacita tukové tkáně (Fabbiano et al., 2016).

Příznivé účinky na tvorbu běžových adipocytů byly zaznamenány také u sportovců. Cvičení podporuje protizánětlivé prostředí tukové tkáně, stimuluje její vaskularizaci, tvorbu mitochondrií a zajišťuje lepší přísun kyslíku a živin. Díky tomu dochází ke zvýšení metabolické kapacity tkáně. Navíc, během fyzické aktivity dochází v kosterním svalstvu k produkci faktorů, které tvorbu běžových adipocytů podporují. Mezi tyto faktory patří například receptor aktivovaný peroxizómovým proliferátorem  $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPAR- $\alpha$ ). Důležitým je ale také cytokin interleukin (IL-) 6 nebo kyselina  $\beta$ -aminoisomáselná, či laktát (Aldiss et al., 2018).



Překvapivým mechanismem je působení střevního mikrobiomu. Ten významně přispívá k udržení hostitelské metabolické homeostázy. Poslední studie naznačují, že následkem vystavení chladu se mění zastoupení mikrobiomu. Tato změna je spojena se zvýšením metabolické aktivity, běžováním WAT a lepší tolerancí chladu. Bylo zjištěno, že u bezmikrobních myši a myši, kterým byl střevní mikrobiom odstraněn antibiotiky, došlo ke snížení termogenní kapacity BAT a k poklesu exprese UCP1 (Li et al., 2019).

V neposlední řadě se na chladové adaptaci a běžování WAT podílí také imunitní systém. Mechanismy, kterými k tomu dochází, budou probrány v následujících kapitolách.

## 2.4 Imunitní systém

Organismus se v prostředí setkává s řadou neškodných i nebezpečných mikroorganismů a cizích, ale i vlastních potenciálně škodlivých částic. Imunitní systém je sítí buněk a molekul, které nás před nebezpečným a škodlivým chrání. Hlavním úkolem imunitního systému je tedy odlišit vlastní od cizího a bezpečné o nebezpečného. Tomu nebezpečnému potom musí čelit, ovšem za zachování tělní integrity a homeostázy. Imunitní systém se dělí na vrozený, který slouží jako linie první obrany a adaptivní, specificky odpovídající na druh hrozby.

### 2.4.1 Imunitní systém a chlad

Podobně jako ostatní orgány a systémy, i imunitní systém je působením chladu ovlivňován. Vliv akutního chladu na imunitní systém byl sledován na řadě živočišných druhů. Například u drozofily samotný akutní chlad stačí k aktivaci imunitního systému. Dochází však k poklesu fagocytární aktivity (Salehipour-shirazi et al., 2017). Teplota vody je významným faktorem ovlivňujícím zdraví a imunitní systém ryb. Příliš nízká teplota vody působí imunosupresivně a zhoršuje náchylnost k infekcím. U některých druhů ryb dochází dokonce k poklesu celkového počtu leukocytů. Toto bylo pozorováno například u kapra obecného nebo tlamouna mosambického. Izolované makrofágy z těchto ryb navíc vykazují snížený fagocytární index a dysregulaci produkce ROS (Abram et al., 2017). Chlad imunosupresivně působí i na imunitu obojživelníků, kteří jsou v důsledku poklesu teploty více náchylní například na infekci houbou *Batrachochytrium dendrobatidis*. Chytridiomykóza, způsobená tímto patogenem, aktuálně ohrožuje řadu obojživelných druhů. Funkční vlastnosti imunity jsou tedy u ektotermních živočichů do jisté míry závislé na okolní teplotě. Přestože chlad působí i na jejich

parazity, je pravděpodobné, že řada parazitů je schopna se přizpůsobit a aklimatizovat rychleji, než jejich hostitelé (Bradley et al., 2019).

Ačkoliv imunitní systém endotermů není přímo podřízen teplotě okolí, akutní vystavení chladu a stres může mít negativní dopad i na něj. Ptáci, kteří nemigrují, si musí v zimních měsících vybírat mezi investicí živin do termogeneze, nebo imunitního systému. Zdá se, že v případě vystavení infekce dochází k porušení metabolické rovnováhy a zpomalení odpovědi přirozené imunity (Nord et al., 2020). Chladový stres byl také sledován na potkaním modelu, kde došlo k supresi vrozené imunity, dysregulaci adaptivní imunity a k poklesu zastoupení CD4+ (diferenciační skupina 4, cluster of cluster of differentiation 4) regulačních T lymfocytů (regulatory T cell, Treg) (Hu et al., 2016). Přes všechny tyto poznatky stále zůstává neobjevena řada klíčových mechanismů, kterými k nerovnováze imunitního systému dochází. Chybí též detailnější pozorování změn v zastoupení imunitních populací vlivem chladového stresu.

Efekt dlouhodobého působení chladu a chladové adaptace na imunitní systém tak dobře prostudovány nejsou. Obecně lze říci, že vlivem dlouhodobého působení chladu se imunitní systém polarizuje na T pomocnou odpověď 2. typu (Th2), která napomáhá běžování WAT (Huang et al., 2017). Částečný vhled do problematiky přináší studie, které se zabývaly otužováním, nebo chladovou aklimací u člověka. Ty poukazují na prospěšný vliv dlouhodobé chladové adaptace. Imunologické parametry se mezi aklimatizovanou a neaklimatizovou skupinou v některých ohledech lišily (Brazaitis et al., 2014; Kim et al., 2014).

## 2.4.2 Odpověď imunitního systému na chladový stres

Jak již studie laboratorních i volně žijících živočichů napovídají, chladový stres působí na imunitní systém nepříznivě. Krátkodobé vystavení chladu vede k prozánětlivé odpovědi. To se projevuje navýšením produkce oxidu dusnatého (nitric oxide, NO). Byla také zaznamenána zvýšená tvorba prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-1 $\beta$  a faktoru nádorové nekrózy  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) makrofágy (Belay et al., 2017). Zvýšenou produkci IL-6 lze detekovat i v některých tkáních (Yildirim and Yurekli, 2010). Role IL-6 je však v odpovědi na chlad složitější a bude více rozebrána v následujících kapitolách. Naopak hladiny IL-2, IL-4 a interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) se u zvířat podrobených akutnímu chladu snižují (Hu et al., 2016).

U některých zvířat bylo zjištěno, že akutní vystavení chladu může vést k imunosupresi. Zajímavou roli v tomto jevu hraje signalizace spojená s aktivací iontového kanálu TRPM8.

Vlivem jeho podráždění dochází ke spuštění drah, která vedou k zvýšení krevního tlaku a zvýšení hladiny plazmatických proteinů. Tímto v plazmě také dochází k navýšení obsahu imunoglobulinů (Ig). Právě zvýšení množství intravenózního Ig přitom někdy bývá spojeno s imunosupresí (Chan et al., 2018). Navíc se zdá, že aktivace TRPM8 negativně reguluje expresi prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$ . TRPM8 signalizace tedy v reakci na rozpoznání chladu pravděpodobně působí protizánětlivě (Wang et al., 2017).

Dlouhodobé působení chladu iniciuje chladovou adaptaci a přesmyk imunitní odpovědi z prozánětlivé na spíše protizánětlivou. Dochází k poklesu produkce některých prozánětlivých cytokinů, jako je například IL-1 $\beta$  nebo IL-17. Naopak se zvyšuje produkce Th2 cytokinu IL-4 a protizánětlivého cytokinu IL-10 (Vargovic et al., 2016).

## 2.5 Vliv imunitního systému na běžování adipocytů

Na indukci běžování adipocytů má vliv mnoho buněk převážně vrozené, ale i adaptivní imunity. V procesu se uplatňují především eozinofily, přirozené lymfoidní buňky typu 2 (type 2 innate lymphoid cells, ILC2), alternativně aktivované makrofágy (M2) a žírné buňky. Z adaptivní imunity se zdají být důležité například Treg. V nedávné době byla však pozornost zaměřena i na gama delta T buňky (gamma delta T cell,  $\gamma\delta$  T buňky). Důležité jsou zejména cytokiny typu 2, ale významnou roli hrají také IL-6, IL-17 a TNF- $\alpha$ .

### 2.5.1 Buňky vrozené imunity

#### 2.5.1.1 Eozinofily

Eozinofily (nebo také eosinofilní granulocyty) jsou buňky imunitního systému podílející se především na obraně proti helmintům. Na druhou stranu jsou významnou komponentou alergických reakcí. Po rozpoznání cíle vypouští do prostředí granula obsahující cytotoxické kationické proteiny, ale také cytokiny. Mezi nejvýznamnější cytokiny produkované eozinofily patří IL-5, IL-4 a IL-13. Eozinofily v krvi tvoří poměrně nízké hladiny a více se vyskytují ve tkáních (Weller and Spencer, 2017). Právě v tukové tkáni jsou důležité pro regulaci metabolické homeostázy. Po expozici chladu produkují IL-4 a IL-13, které pomáhají udržení M2 fenotypu makrofágů a protizánětlivého prostředí v tuku (Qiu et al., 2014). Eozinofily jsou v tuku klíčovými producenty IL-4. Ten se váže na příslušný receptor na adipocytech a přispívá k jejich

diferenciaci v běžové adipocyty. Zatímco u štíhlých jedinců je WAT infiltrována eozinofily, u obézních jedinců je jejich počet snížený (Lee et al., 2015; Weller and Spencer, 2017).

### 2.5.1.2 ILC2

ILC2 patří mezi přirozené lymfoidní buňky. Nalezneme je především ve tkáních, kde se podobně jako eozinofily účastní odpovědi vůči helmintům a mohou přispívat k alergickým reakcím. Významné jsou také pro svou bariérovou funkci (Lee et al., 2015). V tukové tkáni jsou ILC2 regulovány prostřednictvím Th2 polarizačního cytokinu IL-33, který je produktem stromálních buněk (Mahlaköiv et al., 2019). V reakci na stimulaci tímto cytokinem pak ILC2 produkují další cytokiny typu 2. Produkci IL-5 ILC2 zásadně ovlivňují migraci a udržení eozinofilů v tukové tkáni. Prostřednictvím IL-4 a IL-13 zase přispívají k M2 polarizaci makrofágů a homeostáze tukové tkáně (Lee et al., 2015). Během vystavení chladu ILC2 kromě důležitých cytokinů sekretují i peptid methion-enkefalin. Ten působí přímo na adipocyty, u kterých zvyšuje expresi UCP1 (Brestoff et al., 2015).

### 2.5.1.3 Makrofágy

Nejpočetnější imunitní populací v tukové tkáni jsou makrofágy. Jedná se o poměrně heterogenní skupinu buněk, jejíž fenotyp a polarizace jsou ovlivnitelné okolním mikroprostředím. Klasicky aktivované makrofágy (M1) jsou stimulovány mikrobiálními produkty a prozánětlivými mediátory. Vyznačují se produkcí prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 a tvorbou kyslíkových a dusíkových radikálů. Vykazují vysokou fagocytární aktivitu a jsou důležité pro iniciaci imunitní odpovědi.

Makrofágy spojené s běžováním adipocytů jsou M2 makrofágy. Pro jejich polarizaci jsou zásadní IL-4 a IL-13. Typická je pro ně produkce extracelulární matrix a exprese arginázy 1 a IL-10. Uplatňují se především v odpovědi vůči parazitům, hojení ran, remodelaci tkání a udržování tkáňové homeostázy (Villarroya et al., 2018; Wang et al., 2014b). Je však nutné poznamenat, že poznatky o polarizaci makrofágů byly často získány v pokusech *in vitro*. Situace *in vivo* je pravděpodobně mnohem komplexnější (Xue et al., 2014).

Zatímco ILC2 a eozinofily v tuku produkují IL-4 a IL-13, běžové a hnědé adipocyty sekretují chemokin CXCL14. Souhra těchto faktorů vytváří příznivé prostředí pro polarizaci a migraci dalších M2 makrofágů (Cereijo et al., 2018). Původním předpokládaným

mechanismem vlivu působení makrofágů na běžování adipocytů byla produkce NE. Toto však bylo vyvráceno. Pravděpodobně tedy existují jiné způsoby, kterými makrofágy k tvorbě běžových adipocytů přispívají (Fischer et al., 2017). Jedním z takových mechanismů může být produkce ligandů receptoru PPAR $\gamma$  (Lee et al., 2016), který je důležitý pro expresi UCP1 a diferenciaci hnědých i běžových adipocytů (Petrovic et al., 2010). Překvapivým objevem byla schopnost makrofágů ovlivňovat inervaci BAT prostřednictvím exprese receptoru PlexinuA4, který odpuzuje sympatické axony exprimující Semaforin A6. Tento mechanismus by mohl být důležitý zejména pro dlouhodobou chladovou adaptaci (Wolf et al., 2017). Nedávná studie však naznačuje, že zapojení makrofágů není pro samotné běžování adipocytů zásadní. Nicméně, vlivem dlouhodobého působení chladu dochází k navýšení protizánětlivé populace makrofágů v BAT, která přispívá k remodelaci tkáně a udržení její homeostázy (Boulet et al., 2021).

U štíhlých jedinců tuková tkáň obsahuje především rezidentní M2 polarizované makrofágy. U obézních jedinců naopak obsahuje více M1 polarizovaných infiltrujících makrofágů. Právě dysbalance mezi M1 a M2 makrofágy pravděpodobně vede k chronické zánětlivé odpovědi v tukové tkáni, ovlivňuje inzulinovou senzitivitu a má negativní dopad na expresi UCP1 a adaptivní termogenezi (Sakamoto et al., 2016; Villarroya et al., 2018).

## 2.5.2 Buňky adaptivní imunity

### 2.5.2.1 Regulační T lymfocyty

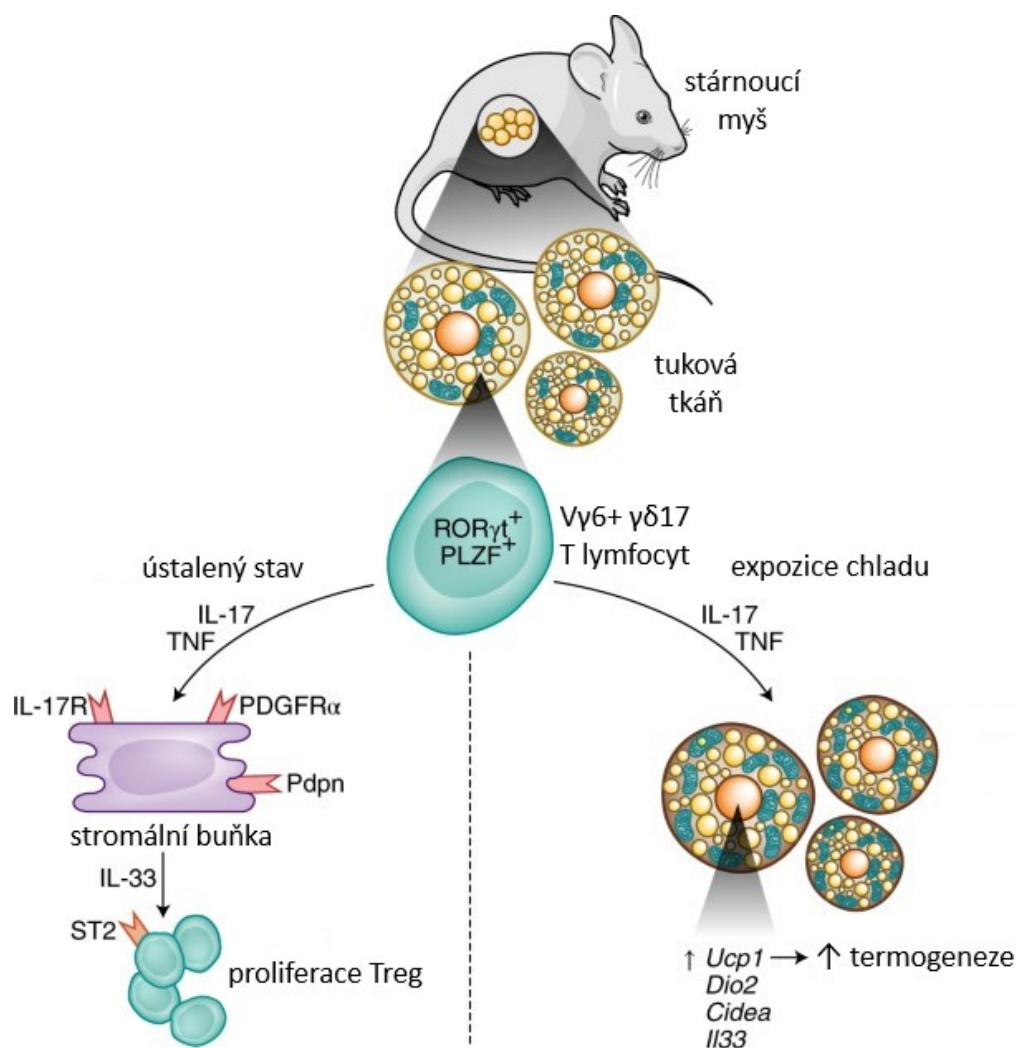
Nejhojněji zastoupenými T lymfocyty v tukové tkáni jsou Treg, které jsou známé především pro své imunomodulační a imunosupresivní účinky. K jejich akumulaci v tukové tkáni dochází postupem věku a u dospělé myši zde mohou tvořit až 80% CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. Jedním z mechanismů jejich expanze je signalizace prostřednictvím IL-33, jehož receptor ST2 je na Treg ve vysoké míře exprimován (Kohlgruber et al., 2018). Bylo zjištěno, že Treg v BAT představují unikátní populaci, která se po vystavení chladu liší od ostatních Treg expresí genů ovlivňujících metabolické dráhy. Hrají také významnou roli v udržení protizánětlivého prostředí v BAT, které je esenciální pro správné fungování adaptivní termogeneze (Medrikova et al., 2015).

### 2.5.2.2 $\gamma\delta$ T lymfocyty

Nejnovějším sledovaným hráčem v chladové adaptaci jsou  $\gamma\delta$ T lymfocyty. Jedná se o malou populaci invariantních T lymfocytů exprimujících  $\gamma\delta$  T buněčný receptor (T cell receptor, TCR), místo klasického  $\alpha\beta$  TCR. Na rozdíl od  $\alpha\beta$  T lymfocytů jsou  $\gamma\delta$  T lymfocyty schopny rychlé imunitní odpovědi, která se podobá spíše přirozené, než adaptivní. Ačkoliv v periferní krvi tvoří menšinu, hojně se vyskytují na sliznicích a také v některých tkáních (Gustafsson et al., 2020). Mezi tkáně s vysokým výskytem  $\gamma\delta$ T lymfocytů patří i WAT a BAT.

Postupem věku dochází v tukové tkáni k akumulaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů, které pak pozitivně ovlivňují akumulaci a homeostázu Treg. Bylo zjištěno, že produkce IL-17A a TNF- $\alpha$   $\gamma\delta$ T lymfocyty v tukové tkáni spouští produkci IL-33 stromálními buňkami. Jak již bylo zmíněno výše, tento cytokin je důležitý pro proliferaci Treg. IL-33 zároveň aktivuje ILC2 a zvyšuje expresi UCP1 (Kohlgruber et al., 2018). Navíc se zdá, že IL-17A a TNF- $\alpha$  mohou působit i přímo na adipocyty, což opět vede ke zvýšení exprese UCP1 a termogenezi (viz obr.1) (Papotto and Silva-Santos, 2018). Jiná práce ovšem poukazuje spíše na vliv produkce IL-17F  $\gamma\delta$ T lymfocyty. Ten se váže na receptor pro interleukin 17 (IL-17R) C přítomný na adipocytech, které následně produkují transformující růstový faktor beta (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  v některých případech funguje i jako neurotrofní faktor. Bylo dokázáno, že tato dráha přispívá k inervaci nejen tukové tkáně, ale i některých dalších tkání (Hu et al., 2020).

Působení  $\gamma\delta$  T lymfocytů v tukové tkáni však může být i negativní. Během obezity produkcí některých cytokinů přispívají k přeměně v prozánětlivé prostředí a inzulinové rezistenci (Mehta et al., 2015).



**Obrázek 1 – Vliv  $\gamma\delta$  T lymfocytů na termogenezi a homeostázu tukové tkáně**

*Postupem času dochází k akumulaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů produkujících IL-17 a TNF v tukové tkáni. IL-17 stimuluje stromální buňky k produkci IL-33, který je důležitým faktorem pro proliferaci Treg. Během vystavení chladu IL-17 a TNF působí přímo na adipocyty a indukuje u nich expresi genů spojených s termogenezí. Převzato a upraveno: (Papotto and Silva-Santos, 2018)*

### 2.5.3 Cytokiny

Jak již vyplývá z předchozích kapitol, vliv imunitního systému na bėžovění adipocytů je většinou zprostředkován prostřednictvím cytokinů. Jedná se především o Th2 polarizační cytokin IL-33 (Lee et al., 2015) a cytokiny typu 2, mezi které patří například IL-4, IL-5 a IL-13 (Qiu et al., 2014). Důležitými se zdají být i IL-17 a TNF- $\alpha$  produkované  $\gamma\delta$  T lymfocyty (Hu et

al., 2020; Kohlgruber et al., 2018). Významnou roli v běžování hraje také hepatokin fibroblastový růstový faktor 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21). Jedná se o stresový hormon, který může být produkován například v reakci na chladový stres. Bylo zjištěno, že produkce FGF21 adipocyty zvyšuje expresi chemokinového ligandu CCL11. Ten patří mezi důležité chemoatraktanty eozinofilů a zajišťuje jejich atrakci do tkáně (Huang et al., 2017). Dalším kandidátem by mohl být i meteorin-like homon, produkováný tukovou tkání po vystavení chladu (Rao et al., 2014), který se též označuje jako IL-39. Otázkou ovšem zůstává, zda se tento cytokin vyskytuje i u člověka (Ecoeur et al., 2020).

V neposlední řadě se na běžování adipocytů podílí také IL-6. Přestože je IL-6 považován hlavně za prozánětlivý cytokin a významný mediátor horečky, ve tkáních může působit i protizánětlivě. Vlivem fyzické aktivity dochází ve svalech k produkci IL-6, který zde působí jako myokin. Navíc po cvičení v tukové tkáni ovlivňuje produkci IL-10 a polarizaci makrofágů z M1 na M2, což přispívá k její homeostáze (Macpherson et al., 2015). IL-6 je důležitým regulátorem tělesné hmotnosti, kompozice a metabolismu (García et al., 2018). Jeho vliv na běžování WAT byl pozorován například u kachexie (Han et al., 2018). Po vystavení chladu dochází ke zvýšení produkce IL-6 v řadě tkání (Yildirim and Yurekli, 2010). Zdá se, že IL-6 by na termogenezi a tvorbu běžových adipocytů mohl působit prostřednictvím signalizace v centrální nervové soustavě (Egecioglu et al., 2018).

## 2.6 Infekce

Jedním z nejdůležitějších úkolů imunitního systému je chránit organismus před infekcí. Tu lze definovat jako průnik původce nákazy do organismu, jeho množení a působení na tkáně hostitele. Infekce může být vyvolána řadou patogenních agens, mezi které patří například bakterie, viry, plísňe, kvasinky, protozoa nebo mnohobuněční parazité. Infekci můžeme dělit na bezpříznakovou a příznakovou, vedoucí k poškození hostitele. Odpovědí na infekci je nejprve aktivace vrozeného imunitního systému, která může být doprovázena zánětem. V pozdějších fázích dochází i k zapojení adaptivní imunity.

### 2.6.1 Vztah infekce a chladu

Vztah poklesu teploty okolního prostředí a pravděpodobnosti nákazy některými infekčními agens je zkoumán již od nepaměti. Tento vztah se zdá být významný především pro



sezónní virové infekce. Bylo zjištěno, že kombinace ochlazení prostředí společně s poklesem relativní vlhkosti vzduchu pozitivně ovlivňuje infekčnost rhinovirů a virů chřipky (Ikäheimo et al., 2016; Lowen et al., 2007). Dalším virem vykazujícím sezónní chování se signifikantně zvýšenou incidencí v zimě je respirační syncytiální virus (Chadha et al., 2020). Ovšem, existují i viry, které jsou více infekční v letních měsících. Jedná se především o enteroviry (Brinkman et al., 2017). Akutní chladový stres může zvyšovat také náchylnost k bakteriálním infekcím (Belay et al., 2017).

Přestože byly objeveny některé mechanismy vysvětlující vyšší vnímavost hostitele k patogenům v chladném prostředí, ucelený obraz zatím neexistuje. Například vlivem působení nízkých teplot dochází k ochlazení nosní sliznice, které vytváří příznivé prostředí pro infekci rhinoviry. Byl pozorován teplotně závislý pokles produkce interferonů typu I. a III. epitelálními buňkami nosní sliznice a následné ovlivnění odpovědi přirozené imunity hostitele (Foxman et al., 2015). Vdechování chladného suchého vzduchu navíc zhoršuje mukociliární transport, zvyšuje produkci muku a poškozuje epitel samotný. Zdá se, že negativní roli na protektivní funkci imunitního systému má také snížená hladina vitamínu D v zimních měsících. Významným faktorem, který nelze opomíjet zejména u člověka, je také častější pobyt v uzavřených prostorách během zimních měsíců. Relativní vlhkost vzduchu uvnitř místnosti bývá obvykle nízká, zatímco koncentrace osob je vyšší. Tím dochází k vytvoření ideálních podmínek pro šíření některých patogenů. (Audi et al., 2020).

## 2.7 Toll-like receptory

Aby imunitní systém včas rozpoznal nebezpečí a ubránil se potenciální infekci, potřebuje sadu receptorů, které rozeznávají unikátní molekulární vzory spojené s patogeny (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Jedněmi z takových receptorů jsou Toll-like receptory (Toll-like receptors, TLRs). Ty, kromě schopnosti rozeznávat PAMPs, také dovedou rozeznávat molekuly produkované infikovanými, poškozenými a umírajícími buňkami v důsledku zánětu. Tyto molekuly jsou známé jako alarminy, nebo s poškozením/nebezpečím asociované molekuly (Damage/Danger-associated molecular patterns, DAMPs) (Moresco et al., 2011). TLR byly poprvé objeveny jako lidské homology Toll receptorů vrozené imunity drozofily. Podobně jako drozofilární Toll, i lidské TLR obsahovaly extracelulární doménu bohatou na leucinové repetice (leucine-rich repeat, LRR) (Medzhitov

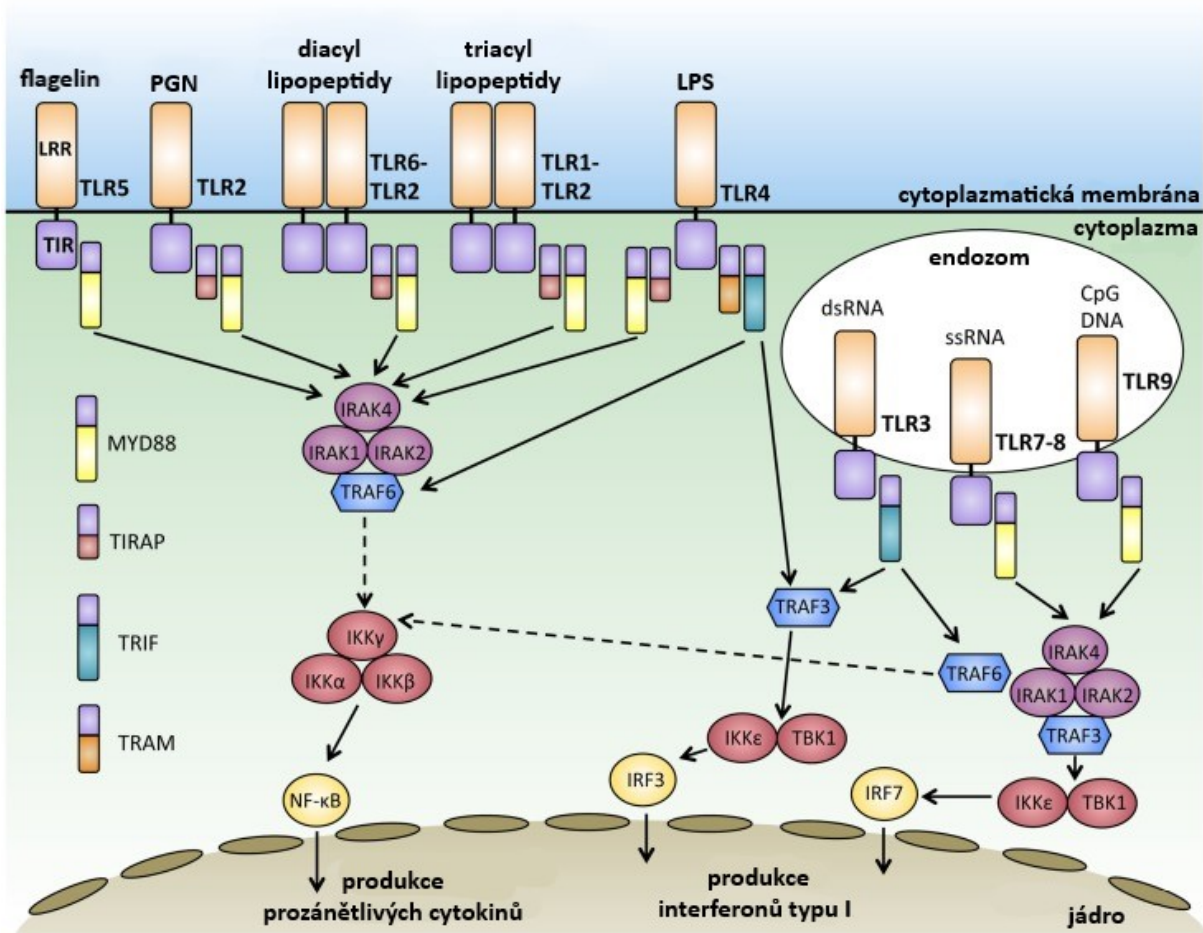
et al., 1997). Od té doby bylo identifikováno celkem 10 lidských a 12 myších TLR. Jedná se o transmembránové receptory, které se vyskytují buď na buněčné membráně, nebo v intracelulárních váčcích a zde tvoří homo- nebo heterodimery. TLR jsou exprimovány zejména buňkami vrozené, ale i adaptivní imunity. Některé však nalezneme i na buňkách mimo imunitní systém – například na epitelech, endotelu, fibroblastech nebo astrocytech (Johnson et al., 2018; Moresco et al., 2011). Aktivací TLR se spouští signální dráhy vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů, antimikrobiálních peptidů, vyšší proliferaci a přežívání, nebo naopak k apoptóze buněk (Ullah et al., 2016).

### 2.7.1 TLR signalizace

Jednotlivé PAMPs a DAMPs jsou rozeznávány prostřednictvím LRR na příslušných TLR. Po rozeznání ligandu dochází k dimerizaci receptorů, která je klíčová pro nábor adaptorových proteinů obsahujících TIR (toll-Interleukin-1 receptor) doménu. Mezi tyto adaptory patří například TIRAP (toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein), TRAM (TRIF-related adaptor molecule), MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) a TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ). Existují 2 typy signalizace: MyD88-závislá, nebo TRIF-závislá dráha (viz. obr. 2) (Kawasaki and Kawai, 2014; Wang et al., 2014a).

MyD88-závislou dráhu využívají všechny TLR, s výjimkou TLR3. Nejprve adaptorový protein TIRAP rekrutuje protein MyD88 na buněčnou membránu. MyD88 vytvoří komplex s kinázami rodiny IRAK (interleukin-1 receptor associated kinase). Kináza IRAK4 aktivačně fosforyluje kinázu IRAK1, která se dále sama autofosforyluje a uvolňuje se z komplexu. IRAK1 poté asociuje s TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) E3 ubiquitin ligázou a ta aktivačně polyubiquitínuje TAK1 kinázu (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7), která patří do rodiny mitogenem aktivovaných proteinkináz (mitogen-activated protein kinases, MAP). Aktivovaná TAK1 spouští dvě signální dráhy: MAP kinázovou dráhu a dráhu kinázy inhibitoru jaderného faktoru  $\kappa$  (I $\kappa$ B kinase, IKK). IKK komplex je tvořen podjednotkami IKK $\alpha$  a IKK $\beta$ , které jsou katalytické a podjednotkou IKK $\gamma$  (známou též jako NEMO), která je regulační. Prostřednictvím ubiquitinových řetězců se TAK1 váže na IKK komplex, fosforyluje IKK $\beta$  a tím ji aktivuje. IKK komplex poté fosforyluje inhibiční protein I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibitor of nuclear factor kappa B), který je degradován v proteozomu. To umožní vyvázání transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B

(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) a jeho translokaci do jádra, kde indukuje transkripci řady prozánětlivých cytokinů (Kawasaki and Kawai, 2014).



**Obrázek 2 – Přehled jednotlivých TLR a jejich signálních drah**

TLR rozeznávají odlišné PAMPs a DAMPs. Jsou umístěny buď v cytoplasmatické membráně (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 a TLR6), nebo v membránách endozomů (TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9). Jejich aktivací dochází ke spuštění MyD88-závislé, nebo TRIF-závislé dráhy, které vedou k produkci prozánětlivých cytokinů a interferonů typu I. PGN = peptidoglykan, LPS = lipopolysacharid, dsRNA = dvouvláknová RNA, ssRNA = jednovláknová RNA, CpG DNA = nemetylované cytosin-fosfát-guaninové úseky DNA. Převzato a upraveno: (Wang et al., 2014a)

Naopak TRIF-závislá dráha je využívána především TLR3, ale také TLR4. Zatímco TLR3 interaguje s TRIF přímo, TLR4 interaguje s TRIF prostřednictvím adaptoru TRAM. TRIF poté asociuje s proteiny TRAF3 a TRAF6. Zde se signalizace rozdělí do dvou větví. TRAF3 tvoří komplex s kinázami TBK1 (TANK-binding kinase 1) a IKKi, který fosforyluje transkripční faktor interferon regulující faktor 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3). Zároveň tvoří další komplex

s kinázami IRAK1 a IKKi, který fosforyluje transkripční faktor IRF7. Fosforylované transkripční faktory IRF3 a IRF7 se poté translokují do jádra, kde spouští transkripci interferonů typu I. TRAF6 rekrutuje kinázu RIP1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1), která aktivuje TAK1 kinázu. Tato dráha vede k uvolnění transkripčního faktoru NF-κB a transkripci prozánětlivých cytokinů.

TLR7/8 a TLR9 signalizace také spouští produkci interferonů typu I., ovšem prostřednictvím jiné dráhy (Ullah et al., 2016).

## 2.7.2 Přehled jednotlivých TLR a jejich ligandů

Následující tabulka (1) zobrazuje nejdůležitější TLR a jejich přirozené ligandy:

Receptor	Ligandy a jejich původ
<b>TLR1</b>	Triacyl lipopeptidy (bakterie, mykobakterie)
<b>TLR2</b>	Peptidoglykan (bakterie), zymosan (kvasinky), atypický lipopolysacharid ( <i>Leptospira</i> , <i>Porphyromonas</i> ), glykolipidy (bakterie, mykobakterie), poriny ( <i>Neisseria</i> ), glykoinositolfosfolipidy ( <i>Trypanozoma</i> , <i>Toxoplasma</i> ), hemaglutinin (virus spalniček), HSP70 (hostitel), HMGB1 (hostitel)
<b>TLR3</b>	dvouvláknová RNA (viry)
<b>TLR4</b>	Lipopolysacharid (gramnegativní bakterie), manan (kvasinky), fúzní protein (lidský respirační syncytiální virus), taxol (rostliny), HSP60 (hostitel), HSP70 (hostitel), HMGB1 (hostitel), fibrinogen (hostitel), heparansulfát (hostitel), fragmenty kyseliny hyaluronové (hostitel)
<b>TLR5</b>	Flagelin (bakterie)
<b>TLR6</b>	Diacyl lipopeptidy (mykoplazmata), kyselina teichoová (grampozitivní bakterie)
<b>TLR7</b>	jednovláknová RNA (viry)
<b>TLR8</b>	jednovláknová RNA (viry)
<b>TLR9</b>	nemetylované cytosin-fosfát-guaninové úseky DNA (bakterie, mykobakterie, viry, protozoa)

Převzato a upraveno: (Sandig and Bulfone-Paus, 2012; Savva and Roger, 2013)

### 2.7.2.1 TLR2

TLR2 byl poprvé identifikován a popsán v roce 1998 společně s TLR1, TLR3, TLR4 a TLR5 (Rock et al., 1998). Tento receptor je umístěn v cytoplazmatické membráně, kde se účastní rozpoznání řady bakteriálních, mykobakteriálních, kvasinkových, protozoárních, ale i virových PAMPs. Kromě toho je aktivován i některými DAMPs. TLR2 většinou tvoří heterodimery buď s TLR1, nebo s TLR6. Zdá se však, že může působit i ve formě homodimeru s dalším TLR2.

Zatímco TLR1/2 heterodimer rozeznává triacyl lipopeptidy, mezi ligandy TLR6/2 heterodimeru patří diacyl lipopeptidy a kyselina teichoová (Savva and Roger, 2013). TLR2 je hojně exprimován na myeloidních dendritických buňkách, monocytech, granulocytech, NK buňkách (přirozený zabíječ, natural killer cell) a B lymfocytech. Vyskytuje se také na T lymfocytech (Yeh et al., 2016). Aktivace TLR2, ale také TLR4 a TLR7 je u B lymfocytů marginální zóny sleziny důležitá pro protilátkovou odpověď nezávislou na T lymfocytech (Rubtsov et al., 2008).

### 2.7.2.2 TLR3

TLR3 se nachází uvnitř cytoplazmy v membránách endozomů a jako jediný z TLR nevyužívá MyD88-závislou dráhu. Jeho přirozeným ligandem je dvouvláknová RNA virů. TLR3 je exprimován převážně myeloidními dendritickými buňkami. Ovšem, lze jej nalézt i na B lymfocytech, NK buňkách (Mancini et al., 2020; Yeh et al., 2016), CD8+ T lymfocytech (Mansson et al., 2006), nebo  $\gamma\delta$ T lymfocytech (Wesch et al., 2006).

### 2.7.2.3 TLR4

TLR4 je pravděpodobně nejlépe popsáným TLR. Přestože se vyskytuje hlavně na cytoplazmatické membráně, může být internalizován a účastnit se signalizace vedoucí k produkci interferonů typu I. Nejznámějším přirozeným ligandem TLR4 je lipopolysacharid (Lipopolysaccharide, LPS). TLR4 s ním však přímo neinteraguje. LPS je nejprve rozeznán proteinem LBP, který jej dále přenáší na protein CD14. Z proteinu CD14 LPS putuje na protein MD-2, asociovaný s extracelulární doménou TLR4. Vazbou LPS dochází k dimerizaci MD-2 a TLR4. Komplex může signalizovat buď z buněčné membrány, nebo z endozomu (Marongiu et al., 2019). Mezi další významné ligandy TLR4 patří DAMPs. Vysokou expresí TLR4 se vyznačují především myeloidní dendritické buňky, monocyty, granulocyty, B lymfocyty a v menší míře i T lymfocyty (Mancini et al., 2020; Yeh et al., 2016). Kromě toho byl TLR4 objeven i v řadě tkání, například ve svalech, mozku, játrech, nebo plicích (Park et al., 2020).

## 2.7.3 Aktivace TLR v tukové tkáni

Řada studií dokázala, že aktivace některých TLR v tukové tkáni vede k nastavení prozánětlivého prostředí a často je spojená s obezitou (Artemniak-Wojtowicz et al., 2020). Během obezity dochází v tukové tkáni ke zvýšení exprese TLR a zároveň jsou potlačeny negativní regulátory TLR signalizace, což vede k jejímu zesílení. Zdá se, že k vyšší aktivaci TLR

v tuku přispívá také změna střevního mikrobiomu během obezity, která je spojená s vyšší produkcí LPS a dalších ligandů TLR (Miura et al., 2017). Kromě toho se na prozánětlivém fenotypu podílí i makrofágy, které se vlivem TLR aktivace repolarizují z protizánětlivých M2 na prozánětlivé M1 (Sindhu et al., 2019). Aktivace TLR4 u eozinofilů v tuku negativně ovlivňuje jejich schopnost produkovat cytokiny typu 2 a podporovat M2 fenotyp makrofágů (Yoon et al., 2019).

TLR jsou následkem infekce aktivovány i v BAT a WAT neobézních jedinců. To bylo pozorováno například během napadení parazitem *Trypanosoma cruzi* (Nagajyothi et al., 2012). V souvislosti s vlivem infekce na chladovou adaptaci bylo zjištěno, že aktivace zejména TLR4, ale také TLR2 a komponenty inflamazomu NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) vede v BAT ke snížení exprese UCP1 a atenuaci netřesové termogeneze (Bae et al., 2014; Okla et al., 2015). Ve WAT aktivace TLR4 a NLRP3 inhibuje běžování adipocytů (Okla et al., 2018). Na myším modelu se ukázalo, že inhibice signalizace TLR4 naopak běžování adipocytů podporuje. Zdá se tedy, že infekce na chladovou adaptaci působí negativně (Cao et al., 2018).

Přestože existuje několik prací zabývajících se tímto fenoménem, vliv současného působení chladu a infekce na imunitní systém nebyl doposud prakticky prozkoumán.

### 3. Cíle práce

Tato práce je součástí širšího projektu, jehož cílem je popsat vliv působení chladového stresu, nebo chladové adaptace na imunitní systém a následné změny v metabolismu imunitních buněk. Cílem této práce je především popsat jak kombinace působení chladu a stimulace TLR ovlivní imunitní systém. Dalším cílem je identifikovat rozdíly v imunitní odpovědi mezi jedinci vystavenými chladu krátkodobě a dlouhodobě.

Práce je členěna do dvou úseků:

- **I:** popsat vlivy působení ligandů TLR na imunitní buňky po krátkodobém vystavení chladu, nebo chladové adaptaci.
- **II:** sledovat vliv vybraného TLR ligandu na modelu chladového stresu, nebo chladové adaptace potkanů.

## 4. Materiál a metody

Pokusy se zvířaty byly rozděleny na dvě části. V části I byl sledován vliv chladu na imunitní systém. Pro stanovení změn v reaktivitě buněk imunitního systému po krátkodobém chladu (předpokládaný vznik chladového stresu) a adaptaci byly splenocyty adaptovaných zvířat stimulovány ligandy TLR. V části II byl sledován vliv ovlivnění zvířat ligandem TLR2/6 v průběhu chladové adaptace na některé parametry imunitního systému.

### 4.1 Zvířata

Pro oba experimenty byli použiti potkaní samci kmene Wistar (Velaz, s.r.o., Praha, ČR), jejichž průměrná hmotnost na začátku experimentu byla 250 g. V části I byla zvířata rozdělena do tří skupin: kontrolní, adaptovaná 1 den (~chladový stres) a adaptovaná 14 dní (~chladová adaptace). Kontrolní skupina potkanů (K) byla chována v místnosti při pokojové teplotě  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Skupiny adaptované 1 den (1D), nebo 14 dní (14D) byly chovány odděleně od kontrolní skupiny, v chladové komoře s teplotou nastavenou na  $10\pm 1^\circ\text{C}$ . Výsledky byly získány z pěti na sobě nezávislých experimentů, každá skupina tvořila 22 zvířat.

V části II byla zvířata rozdělena do 6 skupin (viz. tabulka 2). Kontrolní skupiny byly chovány v místnosti při pokojové teplotě  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Skupiny 1D, nebo 14D byly chovány odděleně od kontrolních skupin, v chladové komoře při teplotě  $10\pm 1^\circ\text{C}$ . 24h před ukončením pokusu byl potkanům v závislosti na skupině intraperitoneálně aplikován buď TLR2/6 ligand, nebo kontrolní roztok, kterým byl fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline, PBS) (viz časová osa). Jako TLR2/6 ligand byl vybrán syntetický diacyl lipopeptid Pam2CSK4 (InvivoGen, San Diego, California, USA), který byl rozpuštěn v PBS. Použitá koncentrace byla  $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ . Skupiny bez TLR2/6 ligandu tvořilo 4-6 zvířat a skupiny s TLR2/6 ligandem tvořilo 6 zvířat. Výsledky byly získány z jednoho experimentu.

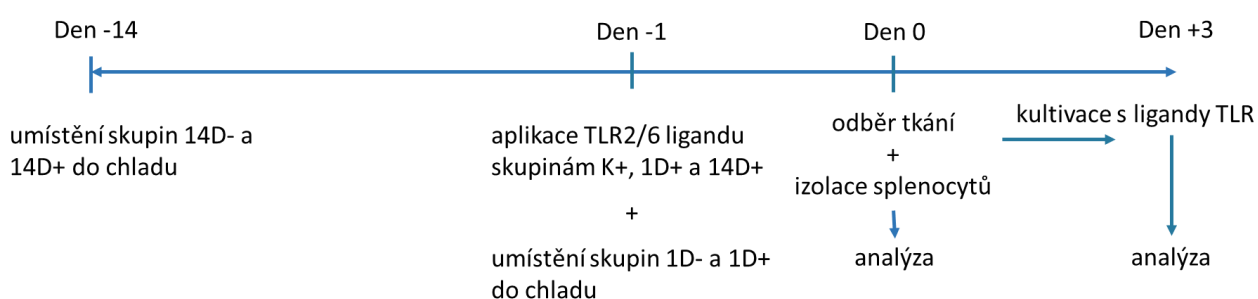
Potkani byli chováni ve světelném režimu 12/12, s neomezeným přístupem k vodě a krmivu. Potkani byli krmeni standardní dietou ST1. Adaptace zvířat byla provedena ve spolupráci se skupinou bioenergetiky a svalové fyziologie PŘF UK. Zvířata byla uvedena do hluboké anestezie podáním thiopentalu a následně utracena.



**Tabulka 2 – Rozdělení zvířat v části II:**

Pořadí	Skupina	Počet zvířat	Ovlivnění
1.	K-	4	-
2.	K+	6	TLR2/6
3.	1D-	4	-
4.	1D+	6	TLR2/6
5.	14D-	4	-
6.	14D+	6	TLR2/6

**Časová osa experimentu části II:**



## 4.2 Médium

Pro pokusy bylo využito kultivační médium RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), které bylo doplněno buď 5%, nebo 10% tepelně inaktivovaným fetálním telecím sérem (fetal bovine serum - FBS) (Sigma, Grand Island, NY), penicilinem (100 µg/ml, Sigma), streptomycinem (100 µg/ml, Sigma), 2-merkaptoetanolem ( $5 \times 10^{-5}$  M, Sigma) a HEPES pufrům (10 mM, Sigma). Médium je dále označené jako RPMI.

## 4.3 Roztoky

- PBS: pH 7,2 – 7,4, 37 mM NaCl, 10 mM fosfát, 2,7 mM KCl
- 10x ACK lyzační pufr: 1,5M NH<sub>4</sub>Cl, 100mM KHCO<sub>3</sub>, 10mM EDTA-2Na
- Promývací pufr ELISA: 0,05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich) v PBS
- Reagent diluent ELISA: 1 % BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma) v PBS
- TMES: pH 7,4, 20mM Tris, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), 250 mM sacharóza

- Bicinchoninic Acid (BCA) Protein assay:
  - Činidlo A: pH 11,25
    - 8 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
    - 1,6 g vinan sodný
    - doplněno destilovanou vodou ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) do 100 ml
  - Činidlo B:
    - 3 g bicinchoninová kyselina
    - doplněno  $\text{dH}_2\text{O}$  do 100 ml
  - Činidlo C:
    - 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
    - doplněno  $\text{dH}_2\text{O}$  do 10 ml
- Laemmliho vzorkový pufr (Laemmli Sample Buffer, SLB) 4x koncentrovaný: pH 6,8, 4 ml glycerol, 2,6 ml Tris, 0,8g dodecylsírán sodný (SDS), 0,8 g dithiothreitol (DTT), 1 mg bromfenolová modř, doplněno  $\text{dH}_2\text{O}$  do 10 ml
- Pufr 1 SDS-PAGE elektroforéza: pH 8,8, 18,17 g Tris, doplněno do 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$
- Pufr 2 SDS-PAGE elektroforéza: 6,05 g Tris, doplněno do 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$
- Elektroforetický pufr 10x koncentrovaný: 30,3 g Tris, 144 g glycin, 10g SDS, doplněno  $\text{dH}_2\text{O}$  do 1 l
- Blotovací pufr Western blot: 15,14 g Tris, 71,31 g glycin, 1 l 20% metanol, doplněno do 5 l  $\text{dH}_2\text{O}$
- TBS pufr (Tris-buffered saline, TBS) 10x koncentrovaný: pH 7,6, 87,66 g NaCl, 24,22 g Tris, doplněno do 1l  $\text{dH}_2\text{O}$
- Blokovací pufr Western blot: 5 g odtučněného mléka, 10 ml TBS, 100  $\mu\text{l}$  Tween-20, 90 ml  $\text{dH}_2\text{O}$
- Ředící pufr Western blot: 1 g odtučněného mléka, 10 ml TBS, 100  $\mu\text{l}$  Tween-20, 90 ml  $\text{dH}_2\text{O}$
- Promývací pufr Western blot: 100 ml TBS, 3 ml Tween-20, 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$

## 4.4 Ligandy TLR použité pro kultivaci s buňkami

**Tabulka 3** – koncentrace použitých ligandů TLR. Koncentrace byly vybrány na základě předběžných experimentů :

Název	Receptor	Koncentrace	Výrobce
Lipopolysacharid	TLR4	3 µg/ml	Sigma
Poly(I:C)	TLR3	10 µg/ml	Novus Biologicals (Centennial, CO)
Pam2CSK4	TLR2/6	300 ng/ml	InvivoGen

## 4.5 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 spektrofotometr Gen5 (BioTek Instruments, Winooski, VT)
- Software pro analýzu membrán a filmů Fiji
- Statistické zpracování výsledků: program GraphPad Prism8 (GraphPad Software, La Jolla, CA)

## 4.6 Použité technické vybavení

- Laminární box CleanAir (Schoeller Instruments s.r.o., Praha, Česká republika)
- Laminární box SafeFAST premium (DASITgroup, Cornaredo, Italy)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (Sanyo, Osaka, Japan ; Panasonic, Osaka, Japan)
- Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, England)
- Centrifuga 5810R (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Průtokový cytometr LSR II (BD)
- Spektrofotometr microplate reader ELx800 (Biotek, Winooski, VT)

- Spektrofotometr Synergy HT (Biotek, Winooski, VT)
- Ultrazvukový sonikátor Sonolupus (Bandelin, Berlin, Germany)
- Vytvářecího přístroj (Optimax)

## 4.7 Izolace buněk a tkání

Potkanům byla po usmrcení odebrána krev pro přípravu séra, srdce, peritoneální buňky, slezina, BAT a WAT pro další zpracování.

### 4.7.1 Slezina

Odebraná slezina byla rozdělena na dvě části. Jedna část byla zamražena v tekutém dusíku a uložena do -80°C pro další zpracování. Druhá část byla přenesena do 5 ml 5% RPMI.

#### 4.7.1.1 Izolace buněk sleziny

Odebraná část sleziny v 5% RPMI byla zhomogenizovaná a přefiltrovaná přes nylonovou gázu. Vzniklá suspenze byla centrifugována (8 min, 8°C, 170x g). Získané splenocyty byly resuspendovány v 10% RPMI a pomocí Bürkerovy komůrky byla stanovena jejich koncentrace. Část splenocytů byla využita pro analýzu na průtokovém cytometru. Zbytek splenocytů byl dále kultivován s ligandy TLR a využit na ELISA testy, Western blot, nebo analýzu na průtokovém cytometru.

#### 4.7.2 Izolace peritoneálních buněk

Peritoneální buňky byly získány výplachem peritoneální dutiny usmrcených zvířat. Získaná suspenze byla centrifugována (8 min, 8°C, 170x g) a poté resuspendována v 1x ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) lyzačním pufru. Tím bylo docíleno odstranění červených krvinek. Suspenze byly centrifugována (8 min, 8°C, 170x g). Získané buňky byly resuspendovány v 10% RPMI a byla stanovena jejich koncentrace prostřednictvím Bürkerovy komůrky. Peritoneální buňky byly kultivovány s ligandy TLR a poté využity na ELISA testy.

## 4.8 Průtoková cytometrie

Metodou průtokové cytometrie (Fluorescent Activated Cell Sorting, FACS) byly měřeny relativní změny v zastoupení imunitních populací sleziny v den pokusu a po kultivaci s ligandy TLR. Detekovány byly povrchové znaky a intracelulární cytokiny.

Pro kultivaci byly využity 24-jamkové kultivační destičky (NUNC). Splenocyty byly kultivovány v 10% RPMI médiu v koncentraci  $3 \times 10^6$  buněk, ve finálním objemu 1000  $\mu$ l. Buňky byly neovlivněné, nebo ovlivněné ligandy TLR: LPS, Poly(I:C) a Pam2CSK4. Kultivace probíhala po dobu 72 hodin, při teplotě 37°C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře v inkubátoru. Pro detekci intracelulárních cytokinů byly buňky poté ještě restimulovány 8 hodin.

Pro detekci povrchových znaků v den pokusu, nebo po 72h kultivace byly vzorky připraveny podle následujícího postupu:

- **V den pokusu:** Suspenze splenocytů v 10% RPMI byla přenesena do zkumavek a centrifugována (8 min, 8°C, 170x g). Zkumavky byly umístěny na led.
- **Po 72h kultivaci:** Buňky v kultivační 24-jamkové destičce byly nejprve přeneseny na led, seškrábány pomocí škrabky a přeneseny do zkumavky. Zkumavky byly doplněny PBS, centrifugovány (8 min, 8°C, 170x g) a umístěny na led.

Následující kroky jsou již společné pro oba dny:

- Splenocyty byly resuspendovány v 1x ACK lyzačním pufru pro odstranění červených krvinek po dobu 1 minuty a centrifugovány (8 min, 8°C, 170x g).
- Vzniklé pelety buněk byly resuspendovány v objemu 300  $\mu$ l PBS a rozpipetovány na 96-jamkovou destičku s kulatým dnem (NUNC) v objemu 200  $\mu$ l na jamku.
- Destička byla centrifugována (3 min, 4°C, 170x g).
- Vzniklé pelety buněk byly rozvolněny a barveny 10  $\mu$ l naředěné směsi protilátek proti povrchovým znakům. Destička byla inkubována ve tmě (30 min, 4°C).
- Jamky byly 3x promyty PBS a destička byla vždy centrifugována (3 min, 4°C, 170x g).

- K rozvolněným peletám bylo přidáno 200  $\mu$ l PBS a 10 minut před měřením bylo přidáno 20  $\mu$ l barviva Hoechst 33258 (Sigma) pro značení mrtvých buněk.
- Detekce pomocí průtokového cytometru LSR II. Gaetovací strategie viz obr. 3.

Pro současnou detekci povrchových znaků a intracelulárních cytokinů v den pokusu, nebo po 72h kultivace byly vzorky připraveny podle následujícího postupu:

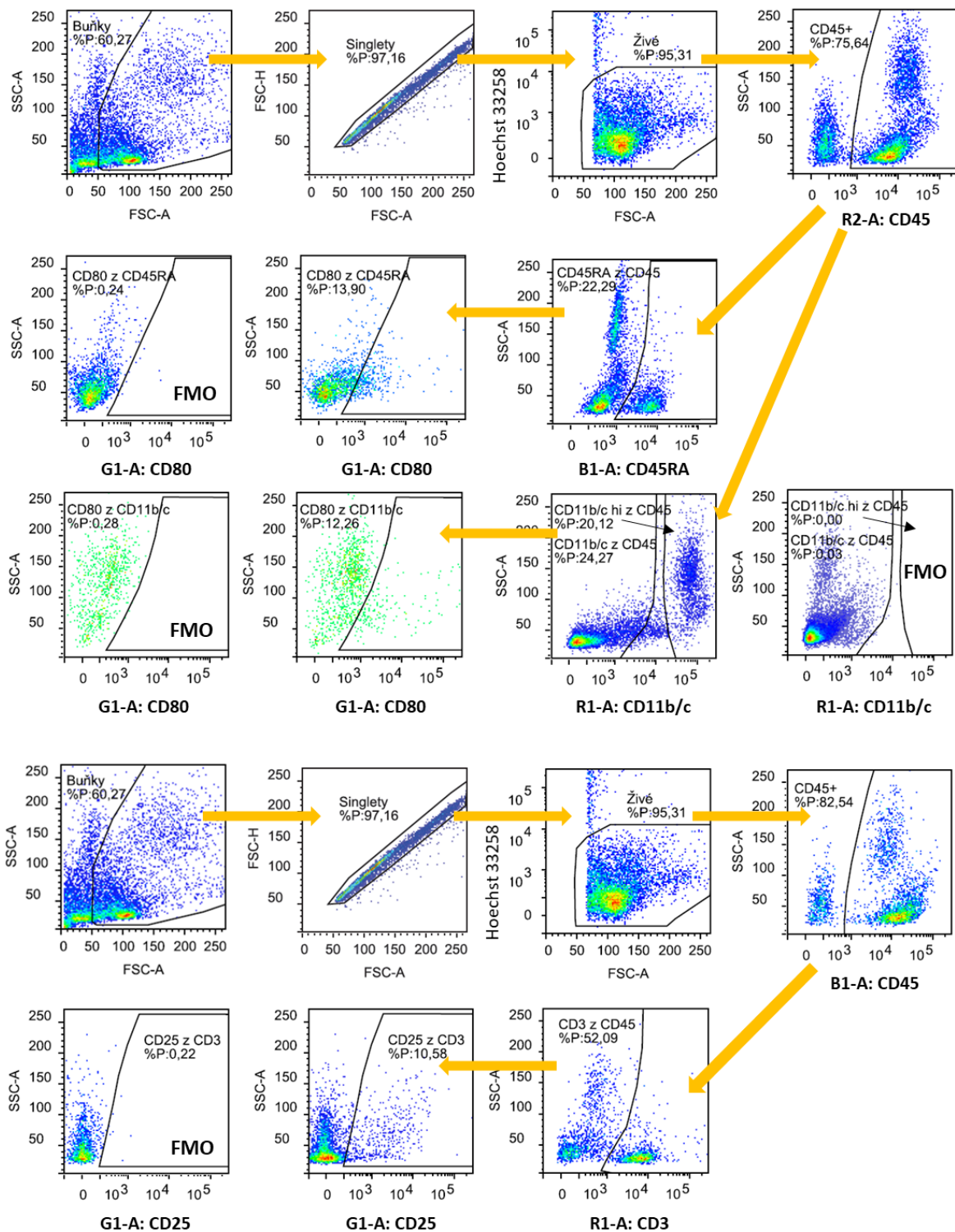
- Destička s 200  $\mu$ l splenocytů byla centrifugována (3 min, 4°C, 170x g).
- Vzniklé pelety buněk byly rozvolněny a nabarveny 10  $\mu$ l naředěné směsi protilátek proti povrchovým znakům. Zároveň bylo provedeno značení mrtvých buněk pomocí barviva Fixable Viability Die eFluor® 450 (eBioscience). Destička byla inkubována ve tmě (30 min, 4°C).
- Jamky byly 3x promyty PBS a destička byla vždy centrifugována (3 min, 4°C, 170x g).
- Pelety byly rozvolněny a bylo k nim přidáno 100  $\mu$ l fixačního pufru (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Destička byla nejprve inkubována ve tmě (10 min, 4°C) a poté při laboratorní teplotě ve tmě (20 min, 25°C).
- K buňkám bylo přidáno 100  $\mu$ l permeabilizačního pufru (Invitrogen) a destička byla centrifugována (4 min, 25°C, 300x g).
- Jamky byly promyty permeabilizačním pufrem a destička byla centrifugována (4 min, 25°C, 300x g).
- Vzniklé pelety byly rozvolněny a nabarveny 10  $\mu$ l naředěné směsi protilátek proti intracelulárním cytokinům. Destička byla inkubována ve tmě (30 min, 25°C).
- Jamky byly 3x promyty permeabilizačním pufrem a destička byla vždy centrifugována (4 min, 25°C, 300x g).
- Pelety byly rozvolněny a bylo k nim přidáno 200  $\mu$ l permeabilizačního pufru.
- Detekce pomocí průtokového cytometru LSR II.

K měřeným byly použity monoklonální protilátky konjugované s fluorochromy: Alexa Fluor 700 (Alexa 700), fluorescein isothiokyanát (FITC), alofykocyanin (Allophycocyanine, APC) a fykoerythrin (Phycoerythrin, PE) (viz. tabulka 4). Protilátky na detekci povrchových znaků byly ředěny v PBS a protilátky na detekci intracelulárních cytokinů v permeabilizačním pufrem

(permeabilizační/fixační kit, Ivtrogen). Ke značení mrtvých buněk byla využita barviva Hoechst 33258 (1: 40 000 v PBS) a Viability Die eFluor® 450 (1 : 1000 v PBS).

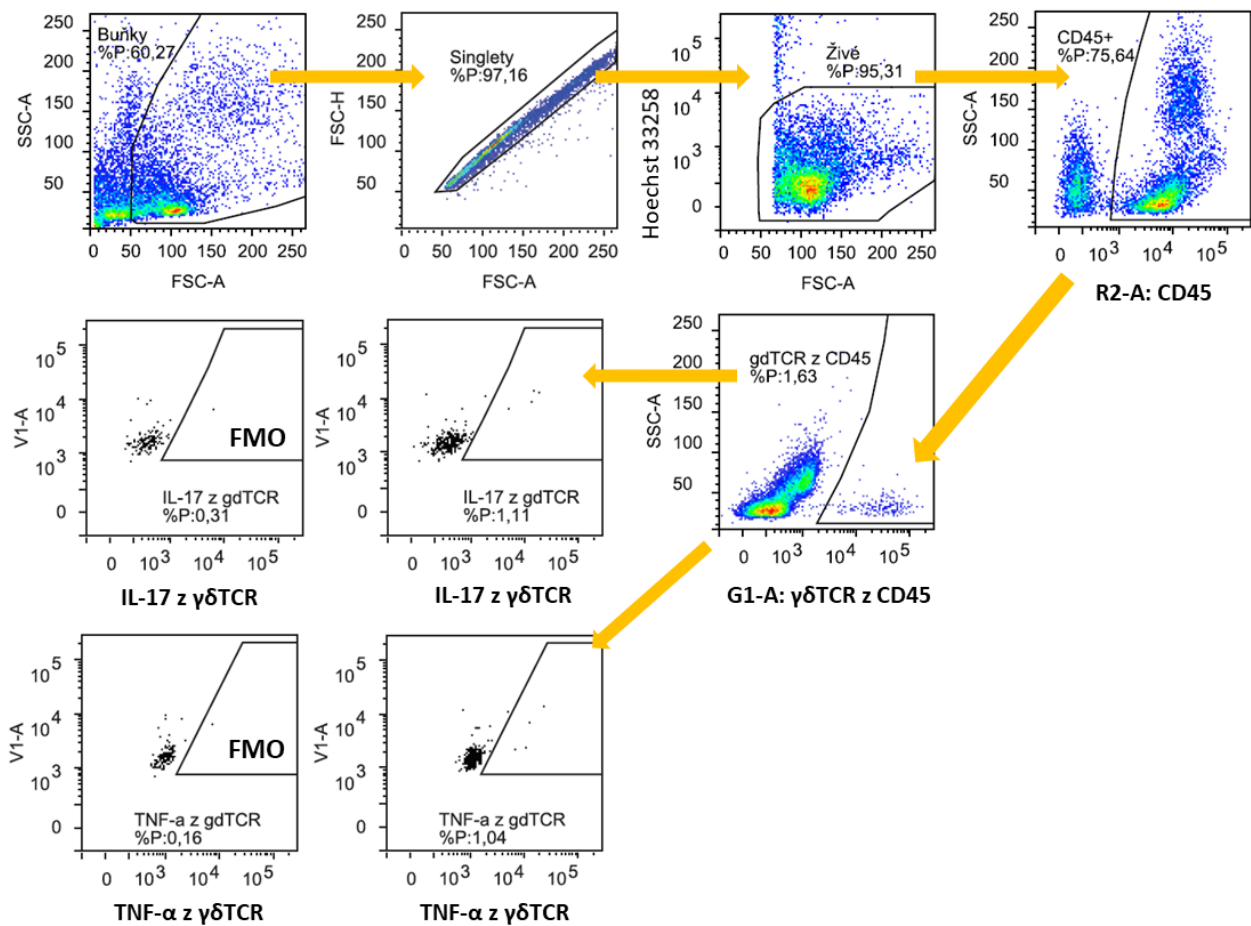
**Tabulka 4** - protilátky využité pro průtokovou cytometrii:

Znak	Fluorochrom	Specifita	Klon	Koncentrace (mg/ml)	Ředění	Výrobce
CD45	Alexa 700	anti-rat	OX-1	0,5	1 : 110	BioLegend
CD45	FITC	anti-rat	OX-1	0,5	1 : 120	SONY
CD45RA	FITC	anti-rat	OX-33	0,5	1 : 110	SONY
CD45RA	APC	anti-rat	OX-33	0,2	1 : 120	SONY
CD11b/c	APC	anti-rat	OX-42	0,2	1 : 120	BioLegend
CD3	APC	anti-rat	1F4	0,2	1 : 100	SONY
γδTCR	PE	anti-rat	V65	0,2	1 : 130	SONY
CD25	PE	anti-rat	OX-39	0,2	1 : 130	BioLegend
CD80	PE	anti-rat	3H5	0,2	1 : 100	BD Biosciences
IL-17	APC	anti-mouse	eBio17B7	0,2	1 : 70	eBioscience
TNF-α	FITC	anti-mouse	TN3-19.12	0,5	1 : 70	eBioscience



**Obrázek 3** – ukázka gatovací strategie B lymfocytů (CD45RA z CD45; CD80 z CD45RA), myeloidních buněk (CD11b/c z CD45; CD80 z CD11b/c) a T lymfocytů (CD3 z CD45; CD25 z CD3). Na základě parametrů forward scatter (FSC-A) a side scatter (SSC) byly určeny buňky, na základě parametru forward scatter (FSC-H a FSC-A) byly určeny singlety. Pomocí parametru forward scatter (FSC-A) a značení Hoechst 33258 byly určeny živé buňky, dále byly vybrány CD45<sup>+</sup> buňky a z nich jednotlivé diferenciační znaky. Z Populace CD11b/c byla dále vybrána populace pozitivní na CD80 a populace CD11b/c<sup>hi</sup>.





**Obrázek 4** – ukázka gatovací strategie intracelulárních cytokinů z  $\gamma\delta$ T lymfocytů. Buňky, singlety a živé buňky byly určeny podobně jako na předchozím obrázku. Dále byly vybrány CD45<sup>+</sup> buňky a z nich  $\gamma\delta$ T lymfocyty ( $\gamma\delta$ TCR z CD45). Osa x = side scatter (SSC). Dále byly určovány populace  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na IL-17 (IL-17 z  $\gamma\delta$ TCR) a TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  z  $\gamma\delta$ TCR). Osa x = V1-A.

## 4.9 ELISA

Metoda ELISA byla využita k měření produkce cytokinů z izolovaných splenocytů a peritoneálních buněk. U splenocytů byly stanovovány koncentrace cytokinů IL-6 a IL-10. U peritoneálních buněk byly změřeny koncentrace cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 a TNF- $\alpha$ .

Kultivace splenocytů a peritoneálních buněk probíhala v 10% RPMI médiu ve 24-jamkových destičkách (NUNC). Splenocyty byly kultivovány v koncentraci  $3 \times 10^6$  buněk, ve finálním objemu 1000  $\mu$ l. Peritoneální buňky byly nasazeny v koncentraci  $1 \times 10^6$  buněk, ve finálním objemu 1000  $\mu$ l. Buňky byly neovlivněné, nebo ovlivněné ligandy TLR: LPS, Poly(I:C) a Pam2CSK4. Kultivace probíhala po dobu 24 nebo 72 hodin při teplotě 37°C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře v inkubátoru. Z kultur byl odebírán supernatant pro stanovení cytokinů: po 24h (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), nebo po 72h (IL-10).

### 4.9.1 DuoSet ELISA Development System R&D

Koncentrace cytokinů byla stanovována podle kitu DuoSet ELISA Development System R&D (R&D systems). ELISA test byl prováděn v 96-jamkových destičkách Costar<sup>®</sup> (Corning Inc., NY, USA). Postupováno bylo podle návodu od výrobce:

- Bylo naneseno 100  $\mu$ l primární protilátky ředěné v PBS (podle výrobce) a destička byla přes noc inkubována při pokojové teplotě.
- Destička byla 3x promyta promývacím pufrem.
- Jamky byly blokovány 200  $\mu$ l Reagentu diluentu po dobu 1 hodiny a znovu 3x promyty promývacím pufrem.
- Bylo přidáno 100  $\mu$ l blanku, standartu a vzorků. Destička byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě a poté byla 3x promyta promývacím pufrem.
- Bylo naneseno 100  $\mu$ l sekundární protilátky ředěné v Reagentu diluentu (podle výrobce), destička byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě a poté 3x promyta promývacím pufrem.
- Bylo přidáno 100  $\mu$ l Streptavidinu-HRP (ředěno v Reagentu diluentu 1 : 40). Destička byla inkubována 20 minut ve tmě při pokojové teplotě a poté 3x promyta promývacím pufrem.

- Bylo přidáno 100  $\mu$ l substrátu (reagent A + reagent B, 1:1). Destička byla inkubována 20 minut ve tmě při pokojové teplotě.
- Reakce byla zastavena přidáním 50  $\mu$ l 2N kyseliny sírové ( $H_2SO_4$ ).
- Detekce pomocí spektrofotometru ELx800 při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 570 nm.

## 4.10 Western blot

Pomocí metody Western blot byly ve vzorcích ze zamražené sleziny a z kultivovaných splenocytů detekovány receptory TLR2 a TLR4.

Splenocyty byly kultivovány v 10% RPMI v kultivační láhvi (BioLite). Bylo kultivováno  $15 \times 10^6$  buněk ve finálním objemu 15 ml. Kultivace probíhala po dobu 24h při teplotě 37°C v 5%  $CO_2$  atmosféře v inkubátoru. Splenocyty byly neovlivněné, nebo ovlivněné ligandy TLR: LPS a Pam2CSK4. Poté byly buňky přeneseny do zkumavky a centrifugovány (8 min, 8°C, 170x g). Buněčný pelet byl přenesen do mikrozkušavky (Schoeller). Vzorky byly zamraženy v tekutém dusíku a uloženy do -80°C pro další zpracování.

### 4.10.1 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla určena pomocí BCA (Bicinchoninic Acid Assay) metody. Postupováno bylo v následujících krocích:

- Po rozmražení byly vzorky umístěny na led a bylo k nim předáno 50  $\mu$ l TMES. Následně byly vzorky homogenizovány za použití ultrazvukového sonikátoru (Bandelin). Výkon přístroje byl nastaven na 50%.
- Do 96-jamkové destičky byl nejprve napipetován blank ( $dH_2O$ ) a standart (různé koncentrace BSA v  $dH_2O$ , viz tabulka 5).
- Vzorky byly 100x zředěny  $dH_2O$  a napipetovány v triplicátech do 96-jamkové destičky. Do každé jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l vzorku.
- Do jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l reakční směsi (činitla A: B : C, 25 : 26 : 1) a destička byla inkubována (30 min, 60°C).
- Měření absorbance spektrofotometrem Synergy HT při vlnové délce 562 nm.

**Tabulka 5** - schéma kalibrační křivky BSA:

Standart	BL	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10	ST11	ST12
Obsah BSA [μg]	0	0,2	0,5	1,0	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0,1 μg/μl) [μl]	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 μg/μl) [μl]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
dH <sub>2</sub> O [μl]	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

BL = blank, ST = standart

#### 4.10.2 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky pro SDS-PAGE elektroforézu byly nejdříve naředěny pomocí dH<sub>2</sub>O a Laemmliho vzorkového pufru na požadovanou koncentraci 1 μg/μl. Laemmliho vzorkový pufr tvořil 1/4 objemu vzorku. Vzorky byly povařeny po dobu 2 minut na 100°C za účelem denaturace proteinů a uchovány v -20°C.

SDS-PAGE elektroforéza byla provedena následujícím způsobem:

- Byl připraven 10% dělicí gel pro separaci proteinů: 4 ml dH<sub>2</sub>O, 2,5 ml pufr 1, 3,35 ml 30% akrylamid-0,8% N,N'-metylen bisakrylamid, 100 μl 10% SDS, 4 μl tetrametyletylendiamin (TEMED), 45 μl 10% peroxidisíran amonný (APS). Gel byl nalit do sestavené elektroforetické aparatury a přelit roztokem butanolu a vody (3 : 1). Polymerace gelu probíhala 45 minut.
- Roztok butanolu byl odmyt dH<sub>2</sub>O. Dělicí gel byl převrstven 4% zaostřovacím gelem: 3 ml dH<sub>2</sub>O, 1,25 ml pufr 2, 0,65 ml 30% akrylamid-0,8% N,N'-metylen bisakrylamid, 50 μl 10% SDS, 4 μl TEMED, 45 μl 10% APS. Do zaostřovacího gelu byl vsunut hřebínek a jeho polymerace probíhala 15 minut.
- Aparatura byla umístěna do elektroforetického pufru a hřebínek byl vysunut. Do vzniklých jamek byly nanесeny 4 μl standartu molekulové hmotnosti a vzorky v objemu 10, nebo 20 μl.
- Elektroforetická separace proteinů probíhala 50 min (200 V, konstantní napětí).

### 4.10.3 Western blot

Metoda Western blot byla provedena v následujících krocích:

- Byla sestavena blotovací aparatura. Po ukončení elektroforetické separace byl nejprve odstraněn zaostřovací gel. Dělicí gel se vzorky byl vyjmut a položen na nitrocelulózovou membránu (Amerham).
- Blotovací aparatura s gelem a membránou byla zalita blotovacím pufrem.
- Přenos proteinů na membránu (60 min, 100 V, konstantní napětí).
- Pomocí barvení Ponceau S byla zkontrolována správnost nanášky proteinů.
- Membrány byly blokovány v blokovacím pufru po dobu 30 minut a poté byly přeneseny do ředícího pufru s primárními protilátkami (ředění viz. tabulka 6), kde byly ponechány přes noc při 4°C.
- Druhý den byla membrána opláchnuta dH<sub>2</sub>O a 3x promyta promývacím pufrem.
- Membrána byla přenesena do ředícího pufru se sekundárními protilátkami (ředění viz. tabulka 6), kde byla ponechána 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byla znovu opláchnuta dH<sub>2</sub>O a 3x promyta promývacím pufrem.
- Membrána byla inkubována se substrátem pro křenuvou peroxidázu SuperSignal West Dura (ThermoFisher Scientific), nebo SuperSignal West Femto (ThermoFisher Scientific).
- K membráně byl v temné komoře přiložen film (Agfa), který byl vyvolán pomocí vyvolávacího přístroje. Film byl digitalizován.

**Tabulka 6** - protilátky použité pro metodu Western blot:

Primární protilátka	Ředění	Výrobce	Sekundární protilátka	Ředění	Výrobce
TLR2	1 : 1000	Novus biologicals	anti-rabbit	1 : 20 000	Cytiva
TLR4	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology	anti-mouse	1 : 20 000	Cytiva
beta-aktin	1 : 5000	Santa Cruz Biotechnology	anti-goat	1 : 20 000	Santa Cruz Biotechnology

## 4.11 Statistická analýza

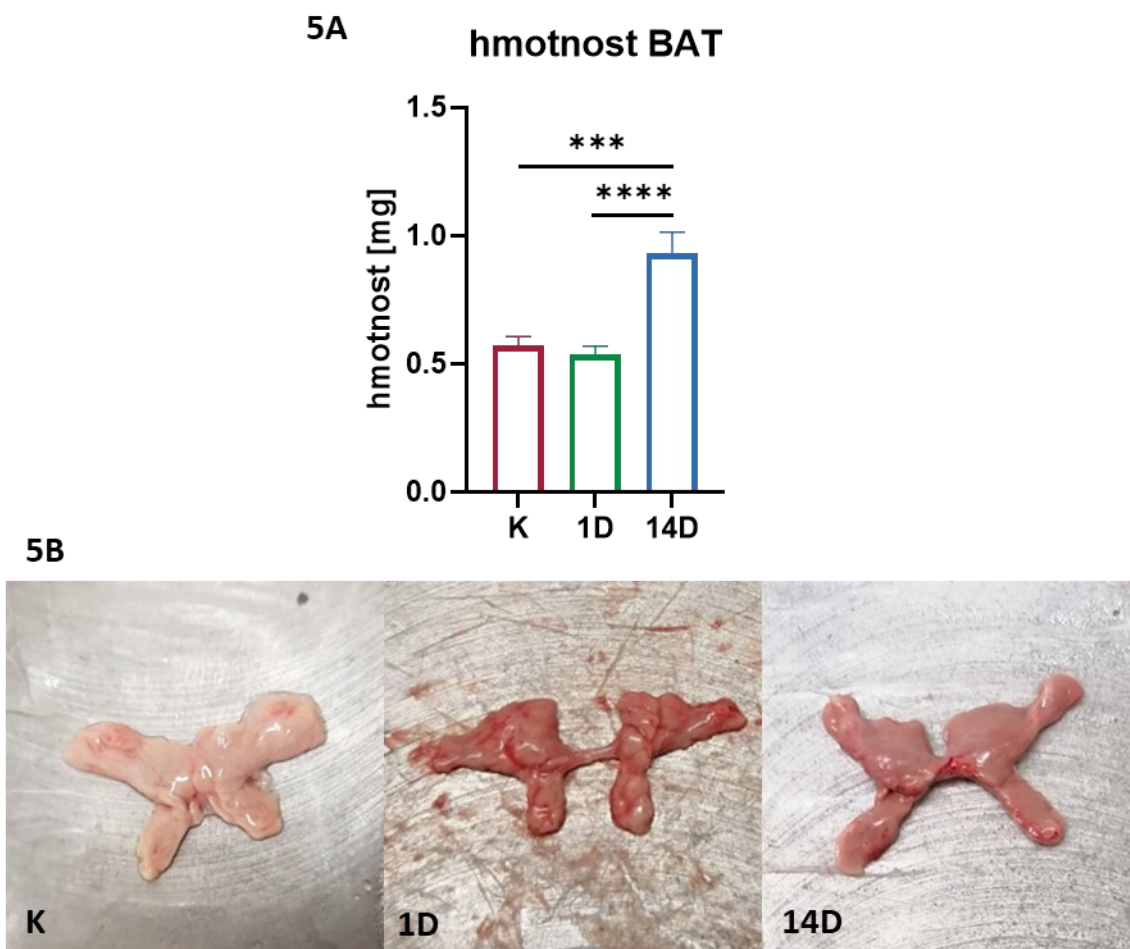
Změřená data byla statisticky vyhodnocena pomocí programu GraphPad Prism8. Jednotlivé sloupce grafů vyjadřují průměry získaných hodnot +/- SEM. Byla použita jednosměrná analýza rozptylu (analysis of variance - ANOVA). Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty statistické odchylky  $P \leq 0,05$ (\* , #),  $P \leq 0,01$ (\*\* , ##),  $P \leq 0,001$ (\*\*\* , ###) a  $P \leq 0,0001$ (\*\*\*\* , ####).

## 5. Výsledky

Tato práce navazuje na výsledky z Laboratoře bioenergetiky a svalové fyziologie RNDr. Jitky Žurmanové, Ph.D., kde byla optimalizována chladová adaptace a na výsledky z diplomové práce Mgr. Daniela Vaška, která se zabývala vlivem chladové adaptace na imunitní systém. Některé otázky, které vyvstaly při řešení této diplomové práce, byly podnětem pro navázání na toto téma a vytvoření modelu, pomocí kterého by bylo možné popsat, jak chladová adaptace ovlivní odpověď na infekční agens.

## 5.1 Hmotnost BAT

Pro zdokumentování chladové adaptace byla potkanům odebrána BAT z mezilopatkové oblasti, která byla zvážena a vyfotografována. Bylo zjištěno, že po 14 dnech chladové adaptace dochází k signifikantnímu zvýšení hmotnosti BAT (5A), které je také doprovázeno změnou prokrvení (5B). BAT izoloval Bc. František Galatík. Výsledky získal Mgr. Daniel Vašek.



**Obrázek 5 – porovnání hmotnosti a vzhledu hnědé tukové tkáně (BAT).** Porovnání hmotnosti (5A) a vzhledu (5B) BAT neadaptovaných a chladově adaptovaných zvířat. Osa y v grafu = hmotnost BAT na 1 kg potkana. K = kontrola, 1D = zvířata adaptovaná 1 den, 14D = zvířata adaptovaná 14 dní. Výsledky a fotografie opatřil Mgr. Daniel Vašek. \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  představuje statisticky významnou odchylku v porovnání s kontrolním vzorkem.



## 5.2 Působení ligandů TLR

Práce byla rozdělena na dvě části. První část se zabývala především vlivem ligandů TLR na buňky získané ze zvířat vystavených chladu. Druhá část byla zaměřena na současné působení chladu a TLR2/6 ligandu Pam2CSK4 (Pam2) *in vivo*.

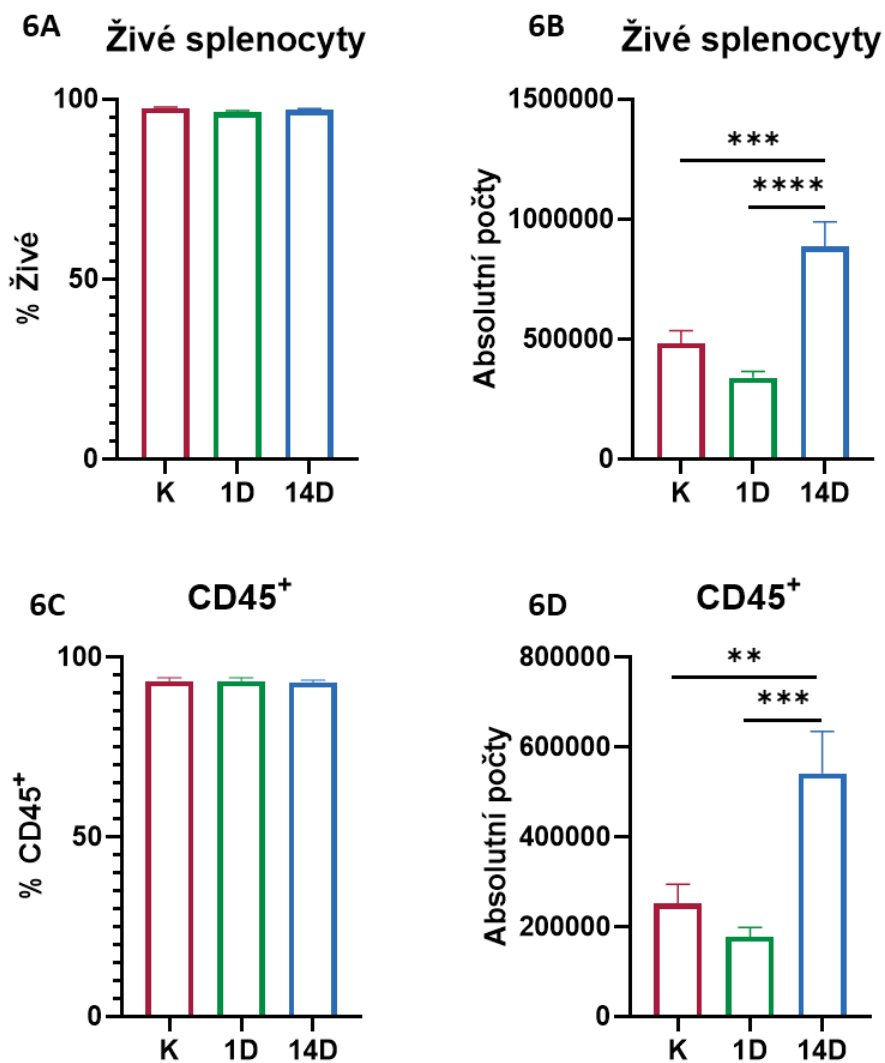
### 5.2.1 Působení ligandů TLR *in vitro*

V pokusech *in vitro* jsme sledovali vliv ligandů TLR na fenotyp splenocytů a peritoneálních buněk izolovaných z potkanů po vystavení chladu. Expozice chladu probíhala 1 den (1D), nebo 14 dní (14D), kontrolní skupina (K) byla chována při pokojové teplotě. Splenocyty a peritoneální buňky byly kultivovány bez stimulace (-), nebo s ligandy TLR: lipopolysacharidem (LPS), Poly(I:C) (I:C) a Pam2CSK4 (Pam2).

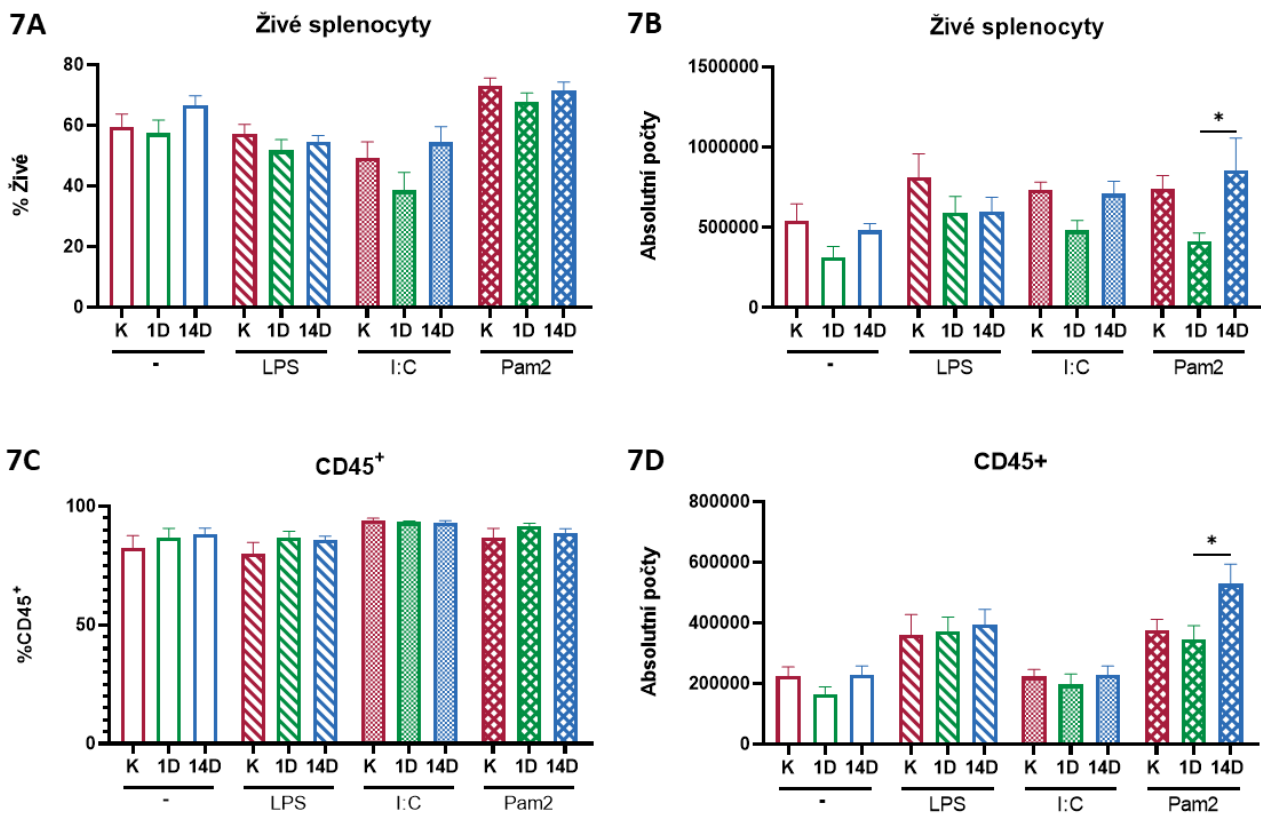
#### 5.2.1.1 Průtoková cytometrie

Pomocí průtokové cytometrie byly na vzorcích splenocytů sledovány změny v zastoupení imunitních populací. Protože vlivem chladové adaptace došlo k signifikantnímu zlepšení přežívání splenocytů (obr. 6), které se promítalo do absolutních počtů buněk (obr. 6B) a značně zkreslovalo změny v populacích (obr. 6D), rozhodli jsme se výsledky vyjádřit v procentech. Změna přežívání splenocytů se do výsledků v procentech nepromítala (obr. 6A a 6C). Tyto výsledky byly získány v den odběru. Po kultivaci byly rovněž zaznamenány změny v přežívání splenocytů (obr. 7), které se promítaly do absolutních počtů živých buněk (obr. 7B a 7D). Nebyly zaznamenány signifikantní změny v procentuálním zastoupení (obr. 7A a 7C).

Splenocyty byly kultivovány s ligandy TLR po dobu 72h. Byly změřeny relativní změny v zastoupení imunitních populací B lymfocytů (CD45RA z CD45), myeloidních buněk (CD11b/c z CD45), populace CD11b/c<sup>hi</sup> z CD45, aktivovaných B lymfocytů (CD80 z CD45RA) a aktivovaných myeloidních buněk (CD80 z CD11b/c) (obr. 8). Měřeny byly též relativní změny v zastoupení T lymfocytů (CD3 z CD45) a  $\gamma\delta$ T lymfocytů ( $\gamma\delta$ TCR z CD45;  $\gamma\delta$ TCR z CD3) (obr. 9).

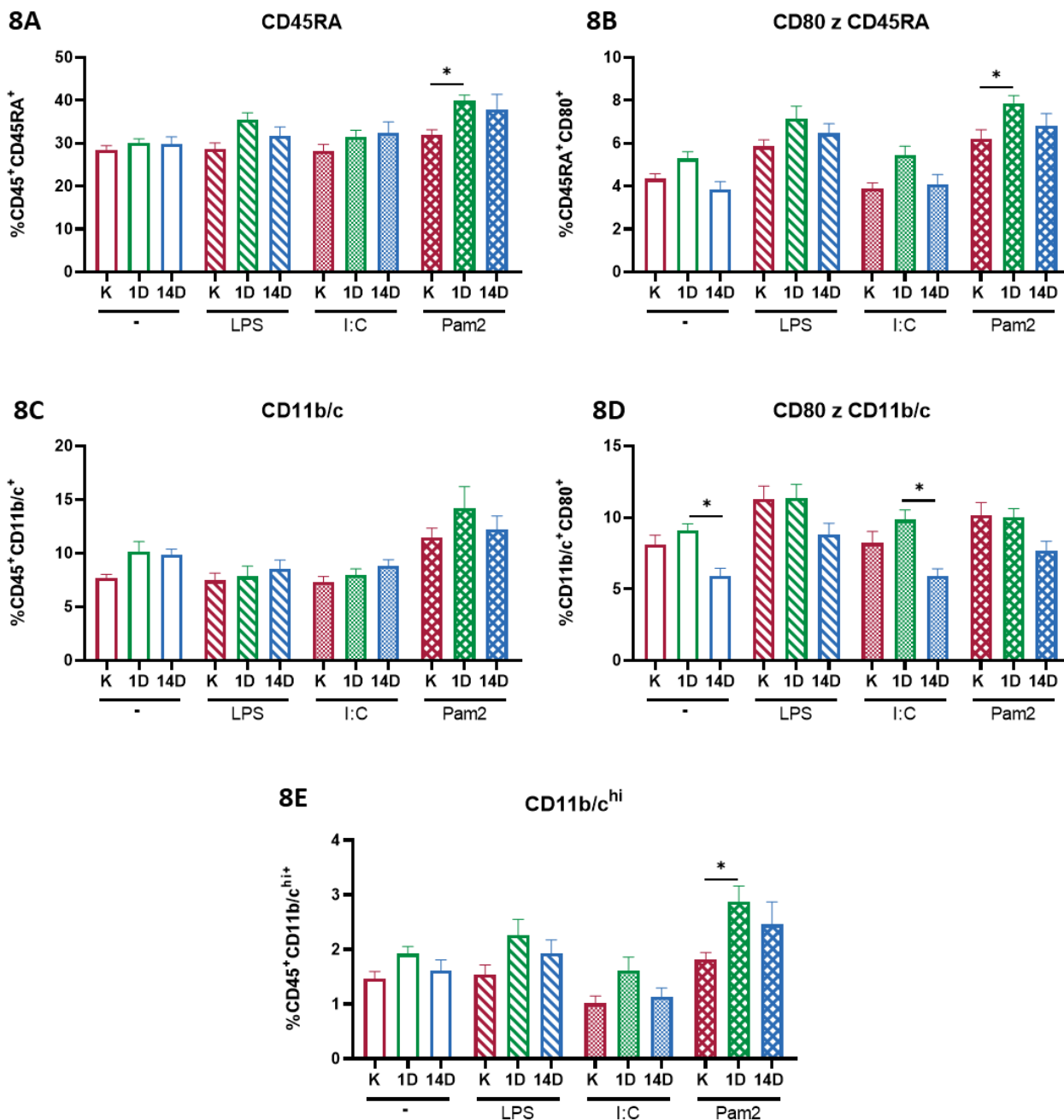


**Obrázek 6 – Porovnání relativního zastoupení a absolutního počtu živých splenocytů a CD45<sup>+</sup> buněk před kultivací.** Relativní zastoupení živých splenocytů (6A), absolutní počty živých splenocytů (6B), relativní zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk (6C) a absolutní zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk (6D). Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  představuje statisticky významnou odchylku.



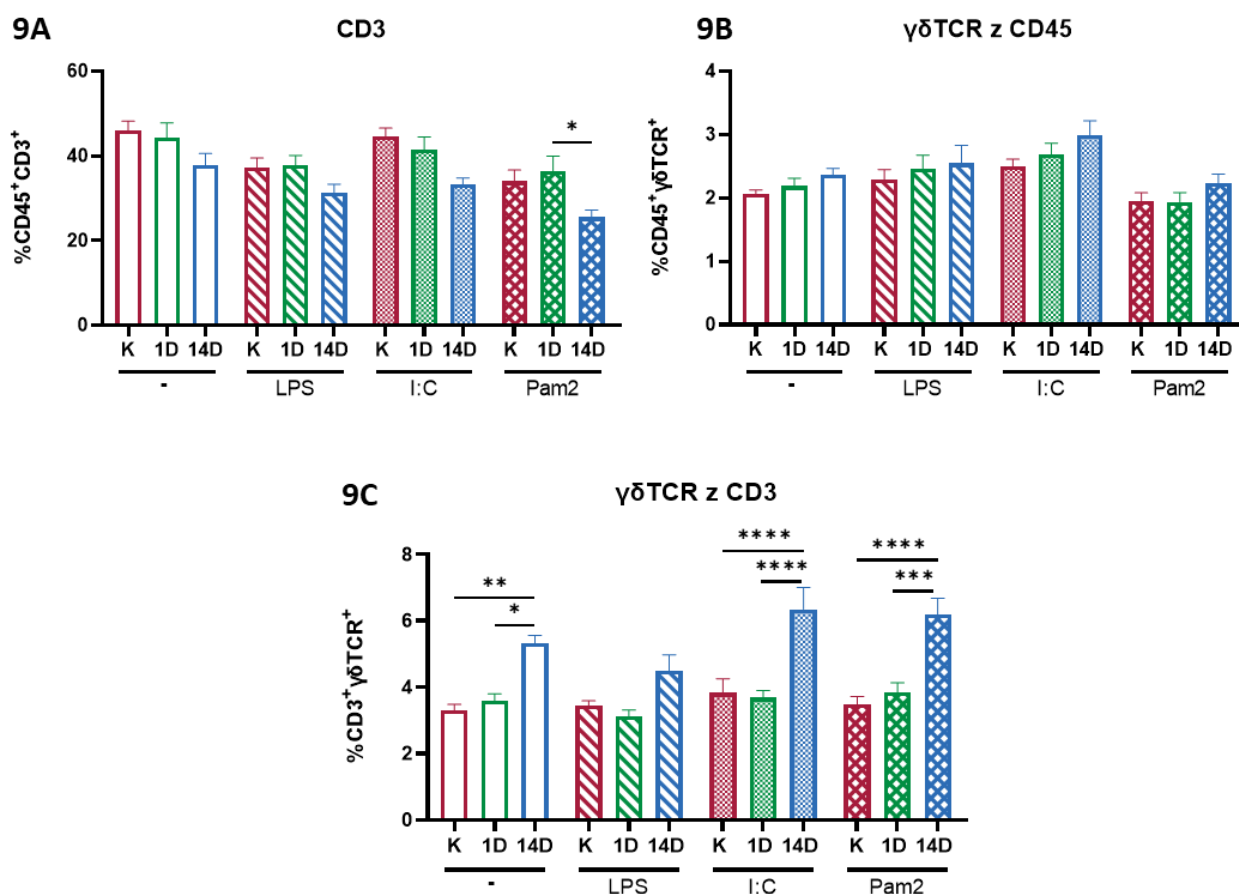
**Obrázek 7 - Porovnání relativního zastoupení a absolutního počtu živých splenocytů a CD45<sup>+</sup> buněk po kultivaci.** Relativní zastoupení živých splenocytů (7A), absolutní počty živých splenocytů (7B), relativní zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk (7C) a absolutní zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk (7D). Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \* $P < 0,05$  představuje statisticky významnou odchylku.

K signifikantnímu nárůstu zastoupení B lymfocytů došlo u skupiny 1D po stimulaci ligandem Pam2 (obr. 8A), které bylo pozorovatelné i na části myeloidní populace (CD11b/c<sup>hi</sup> z CD45) (obr. 8E). Toto zvýšení u skupiny 1D, ačkoliv nesignifikantní, lze u obou populací pozorovat i po stimulaci LPS. Po stimulaci ligandy TLR však nedošlo k signifikantním změnám v populaci myeloidních buněk (obr. 8C). V populaci aktivovaných B lymfocytů (obr. 8B) došlo k nárůstu zastoupení u skupiny 1D po stimulaci Pam2. Naopak u aktivovaných myeloidních buněk došlo k signifikantnímu poklesu zastoupení u skupiny 14D bez stimulace a po stimulaci poly(I:C) (obr. 8D).



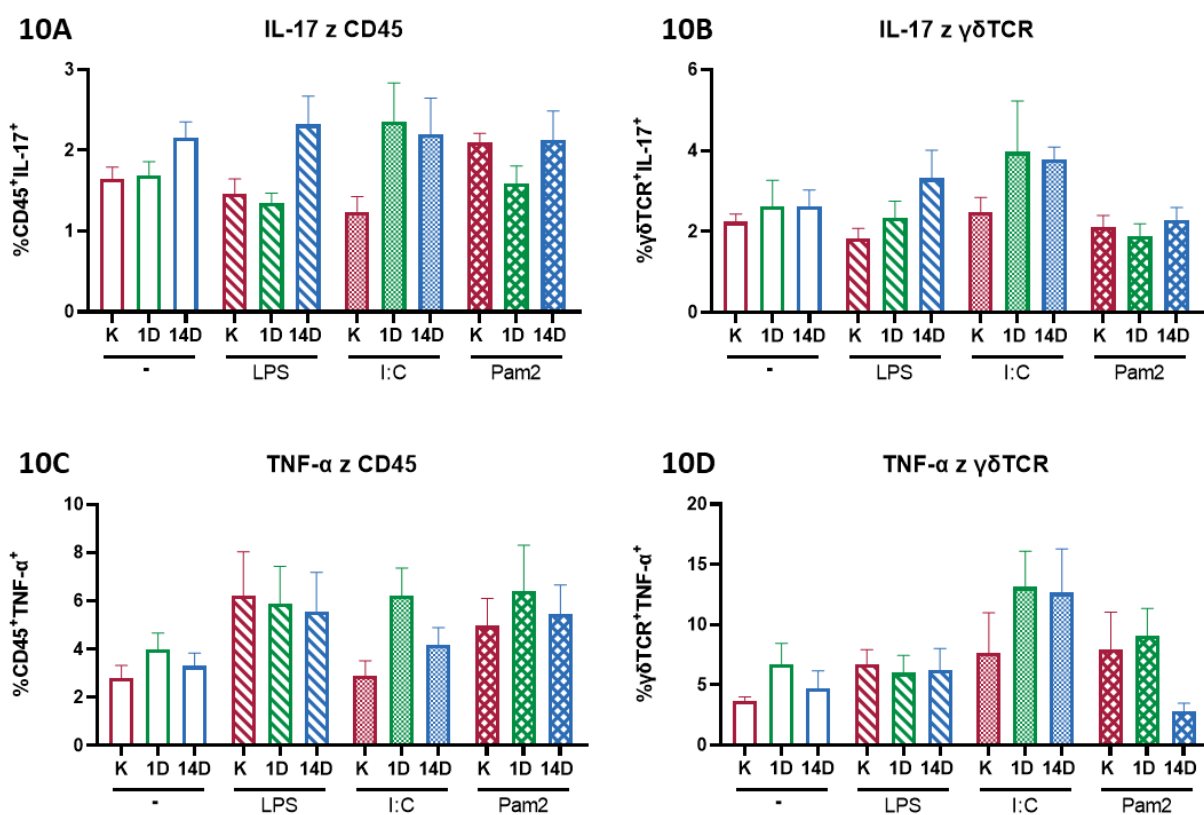
**Obrázek 8 – Vliv působení ligandů TLR na změny v populaci B lymfocytů a myeloidních buněk po expozici chladu. Relativní zastoupení B lymfocytů (CD45RA z CD45) (8A), aktivovaných B lymfocytů (CD80 z CD45RA) (8B), myeloidních buněk (CD11b/c z CD45) (8C), aktivovaných myeloidních buněk (CD80 z CD11b/c) (8D) a vybrané populace myeloidních buněk (CD11b/c<sup>hi</sup> z CD45) (8E). LPS = lipopolysacharid, I:C = Poly (I:C), Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \*P<0,05 představuje statisticky významnou odchylku.**

K signifikantnímu poklesu zastoupení T lymfocytů došlo u skupiny 14D po stimulaci Pam2CSK4 (9A). Nejvýznamnější změny byly zaznamenány na populaci  $\gamma\delta$ TCR z CD3 (9C), jejíž relativní zastoupení vzrostlo po stimulaci I:C a Pam2, ale v menší míře také bez stimulace. Naopak v populaci  $\gamma\delta$ TCR z CD45 k žádným signifikantním změnám nedošlo (9B).



**Obrázek 9 – Vliv působení ligandů TLR na změny v populaci T lymfocytů po expozici chladu.** Relativní zastoupení T lymfocytů (CD3 z CD45) (9A) a  $\gamma\delta$ T lymfocytů ( $\gamma\delta$ TCR z CD45;  $\gamma\delta$ TCR z CD3) (9B; 9C). LPS = lipopolysacharid, I:C = Poly (I:C), Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  představuje statisticky významnou odchylku.

Protože nejvýznamnější změny byly zaznamenány v populaci  $\gamma\delta T$  lymfocytů, byla změřena hladina cytokinů spojených s chladovou adaptací: IL-17 a TNF- $\alpha$  pomocí intracelulárního značení. Dále byly změřeny i CD45<sup>+</sup> buňky pozitivní na tyto cytokiny (obr. 10). U skupiny 14D došlo k nesignifikantnímu nárůstu produkce IL-17 CD45<sup>+</sup> buňkami (obr. 10A), který však nebyl pozorovatelný u  $\gamma\delta T$  buněk (obr. 10B). Nebyly detekovány změny v intracelulární hladině TNF- $\alpha$  u CD45<sup>+</sup> buněk (obr. 10C), ani  $\gamma\delta T$  lymfocytů (obr. 10D).

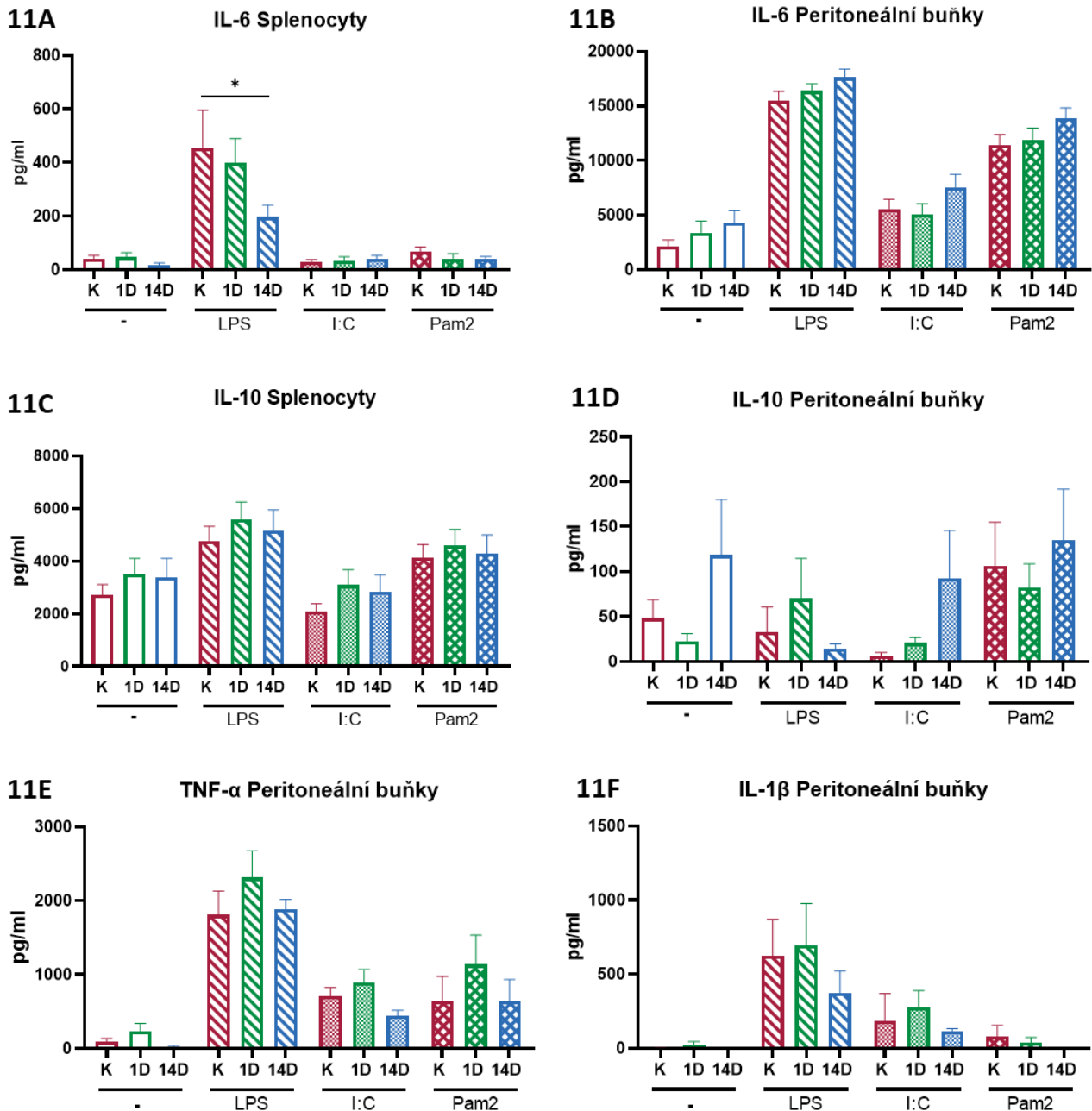


**Obrázek 10 – Vliv působení ligandů TLR na produkci cytokinů CD45<sup>+</sup> buňkami a  $\gamma\delta T$  lymfocyty po expozici chladu.** Relativní zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na IL-17 (10A),  $\gamma\delta T$  lymfocytů pozitivních na IL-17 (10B), CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na TNF- $\alpha$  (10C) a  $\gamma\delta T$  lymfocytů pozitivních na TNF- $\alpha$  (10D). LPS = lipopolysacharid, I:C = Poly (I:C), Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru.

### 5.2.1.2 ELISA

Pomocí ELISA testů byly v supernatantu z kultivovaných splenocytů a peritoneálních buněk stanoveny koncentrace cytokinů. U peritoneálních buněk byla stanovena produkce IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ , zatímco u splenocytů produkce IL-6 a IL-10 (obr. 11).

Zatímco po 14 denní chladové expozici došlo k poklesu produkce IL-6 splenocyty po stimulační LPS (obr. 11A), produkce IL-6 peritoneálními buňkami měla tendenci se zvyšovat (obr. 11B). Nebyly pozorovány signifikantní změny v produkci IL-10 splenocyty (obr. 11C), produkce IL-10 peritoneálními buňkami byla u skupiny 14D nesignifikantně zvýšená (obr. 11D). Došlo také k mírnému zvýšení produkce TNF- $\alpha$  (obr. 10E) a IL-1 $\beta$  (obr. 11F) peritoneálními buňkami u skupiny 1D po stimulaci LPS a I:C, které však nebylo signifikantní.



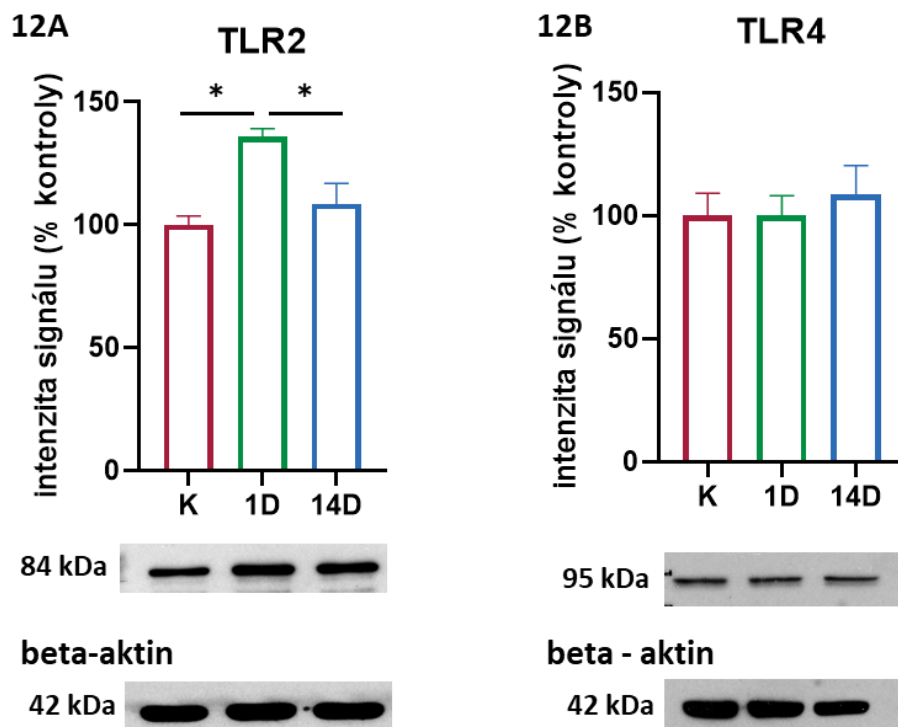
**Obrázek 11 – Koncentrace cytokinů v supernatantu z kultivovaných splenocytů a peritoneálních buněk.** Koncentrace IL-6 v supernatantu kultivovaných splenocytů (11A) a peritoneálních buněk (11B). Koncentrace IL-10 v supernatantu kultivovaných splenocytů (11C) a peritoneálních buněk (11D). Koncentrace TNF-α (11E) a IL-1β (11F) v supernatantu kultivovaných peritoneálních buněk. LPS = lipopolysacharid, I:C = Poly (I:C), Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny pomocí ELISA testu. \* $P < 0,05$  představuje statisticky významnou odchylku.



### 5.2.1.3 Western blot

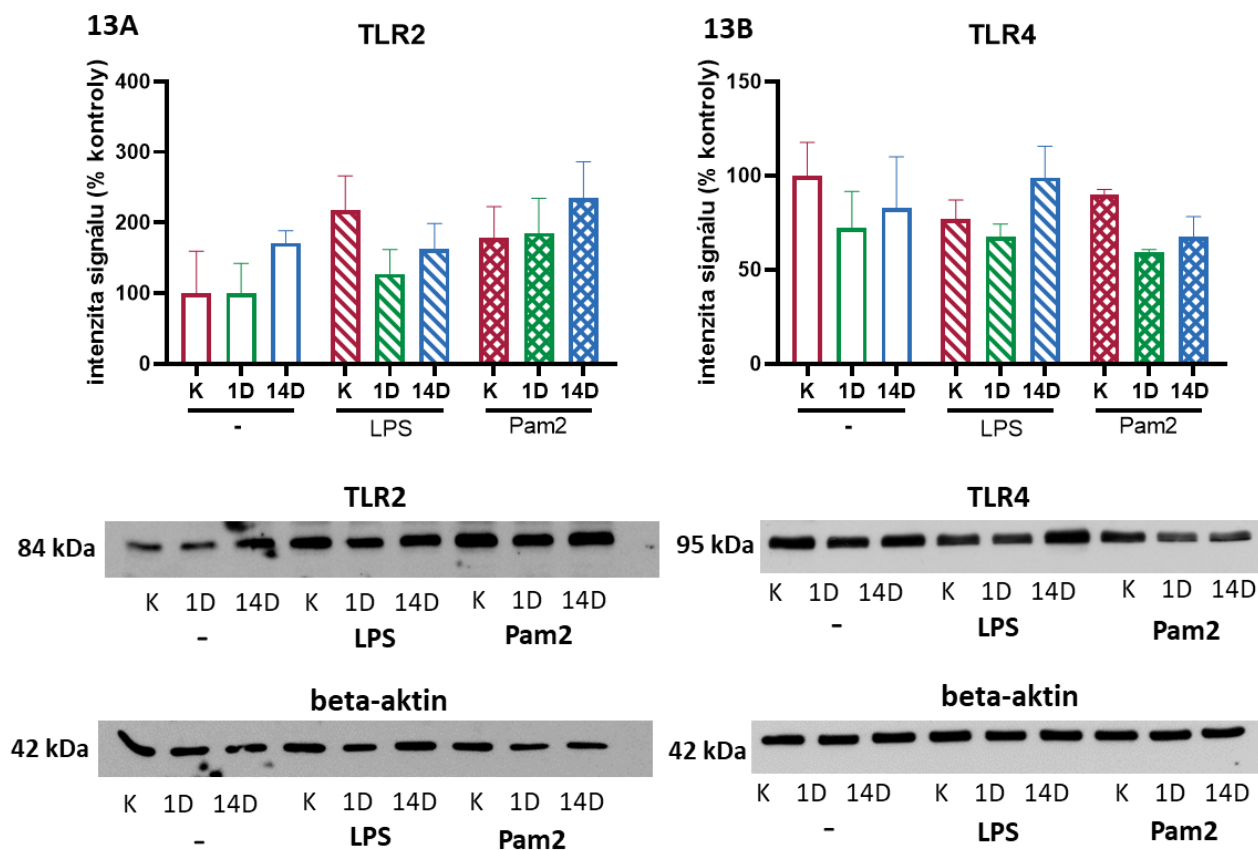
Pomocí metody Western blot byly ve vzorcích ze zamražené sleziny (obr. 12) a ze splenocytů kultivovaných s ligandy TLR po dobu 24 hodin (obr. 13) detekovány relativní změny v úrovni exprese receptorů TLR2 a TLR4. Byly provedeny 3 na sobě nezávislé pokusy a výsledky byly vztaženy na expresi beta-aktinu.

Ve vzorcích ze sleziny byla detekována zvýšená relativní exprese TLR2 u skupiny 1D (obr. 12A). Vlivem chladového stresu, ani chladové adaptace nedošlo ke změně relativní exprese TLR4 (obr. 12B).



**Obrázek 12 – detekce TLR2 a TLR4 ve slezině kontrolních potkanů (K), chladově adaptovaných 1 den (1D) a 14 dní (14D).** Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese TLR2 (12A) a TLR4 (12B) vůči kontrole. Jednotlivé sloupce jsou vyjádřeny jako průměr +/- SEM z denzitometrického stanovení ze skenů imunoblotů ze tří nezávislých opakování. Signál byl normalizován na expresi beta-aktinu. Pořadí reprezentativních vzorků imunoblotu odpovídá pořadí vzorků grafu. \* $P < 0,05$  představuje statisticky významnou odchylku.

Na vzorcích z splenocytů po stimulaci jednotlivými ligandy nebyly zjištěny signifikantní odchylky relativní exprese TLR2 a TLR4 mezi skupinami. Z výsledků jsou však patrné tendence ke zvyšování relativní exprese TLR2 po stimulaci Pam2 u skupiny 14D (obr. 13A). Vlivem stimulace LPS zase došlo k tendenci ke zvýšení relativní exprese TLR4 u skupiny 14D oproti kontrole. Zdá se, že relativní exprese TLR4 u skupiny 1D klesala oproti kontrole ve všech případech (obr. 13B). Je třeba dalších opakování pokusu, aby bylo možné výsledky potvrdit.



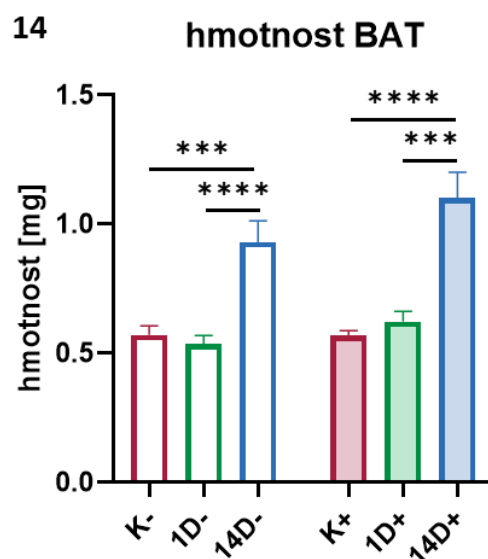
**Obrázek 13 – detekce TLR2 a TLR4 ve vzorcích z kultivovaných splenocytů kontrolních potkanů (K), chladově adaptovaných 1 den (1D) a 14 dní (14D).** Procenta na ose y udávají relativní úroveň exprese TLR2 (13A) a TLR4 (13B) vůči nestimulované kontrole. Jednotlivé sloupce jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM z denzitometrického stanovení ze skenů imunoblotů ze tří nezávislých opakování. Signál byl normalizován na expresi beta-aktinu. Pořadí reprezentativních vzorků imunoblotu odpovídá pořadí vzorků grafu. LPS = lipopolysacharid, Pam2 = Pam2CSK4.

## 5.2.2 Aplikace TLR2/6 ligandu Pam2CSK4 *in vivo*

V části II diplomové práce jsem sledovala vliv stimulace TLR2/6 na fenotyp splenocytů získaných z potkanů vystavených chladu 1 den (1D-), nebo 14 dní (14D-). Kontrolní skupina (K-) byla chována při pokojové teplotě. 24 hodin před ukončením pokusu byl vybraným kontrolním (K+), chladově adaptovaným 1 den (1D+) a 14 dní (14D+) zvířatům aplikován TLR2/6 ligand Pam2CSK4 (viz časová osa experimentu). Splenocyty byly poté využity na měření na průtokové cytometrii, nebo kultivovány po dobu 72h bez stimulace (-), nebo s ligandy TLR: lipopolysacharidem (LPS) a Pam2CSK4 (Pam2).

### 5.2.2.1 Hmotnost BAT

Chladově adaptovaným a kontrolním potkanům bez, nebo po aplikaci Pam2 byla odebrána BAT z mezilopatkové oblasti, která byla zvážena. Po 14 dnech chladové adaptace došlo k výraznému zvýšení hmotnosti BAT (14D-), které bylo viditelné i u zvířat, kterým byl aplikován Pam2 (14D+) (obr. 14).

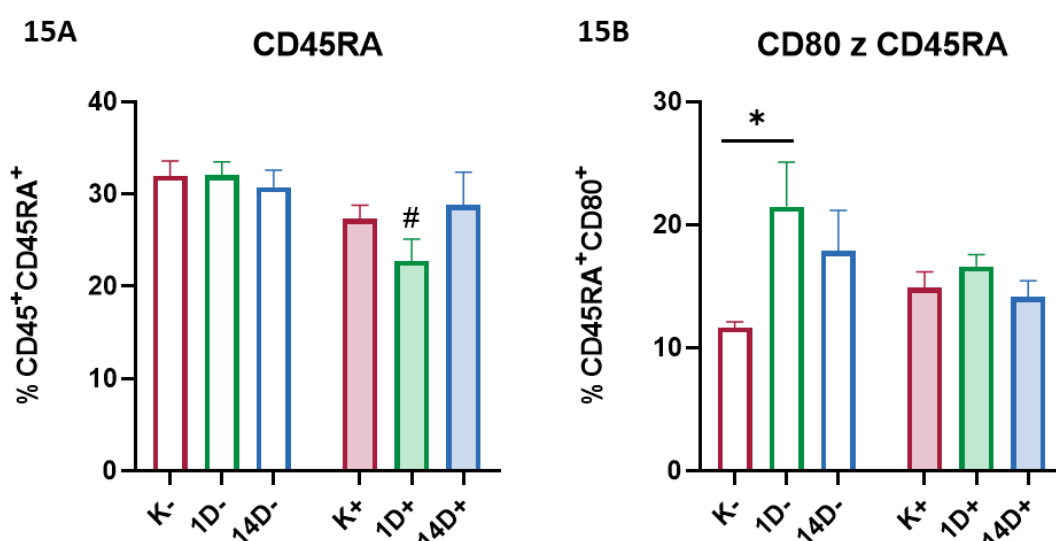


**Obrázek 14 – Porovnání hmotnosti BAT.** Porovnání váhy BAT kontrolních a chladově adaptovaných zvířat bez aplikace Pam2CSK4 (K-, 1D-, 14D-), nebo kontrolních a chladově adaptovaných zvířat po aplikaci Pam2CSK4 (K+, 1D+, 14D+). Osa y = hmotnost BAT na 1 kg potkana. Výsledky opatřil Mgr. Daniel Vašek. \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  představuje statisticky významnou odchylku vůči kontrolnímu vzorku.

### 5.2.2.2 Průtoková cytometrie v den odběru

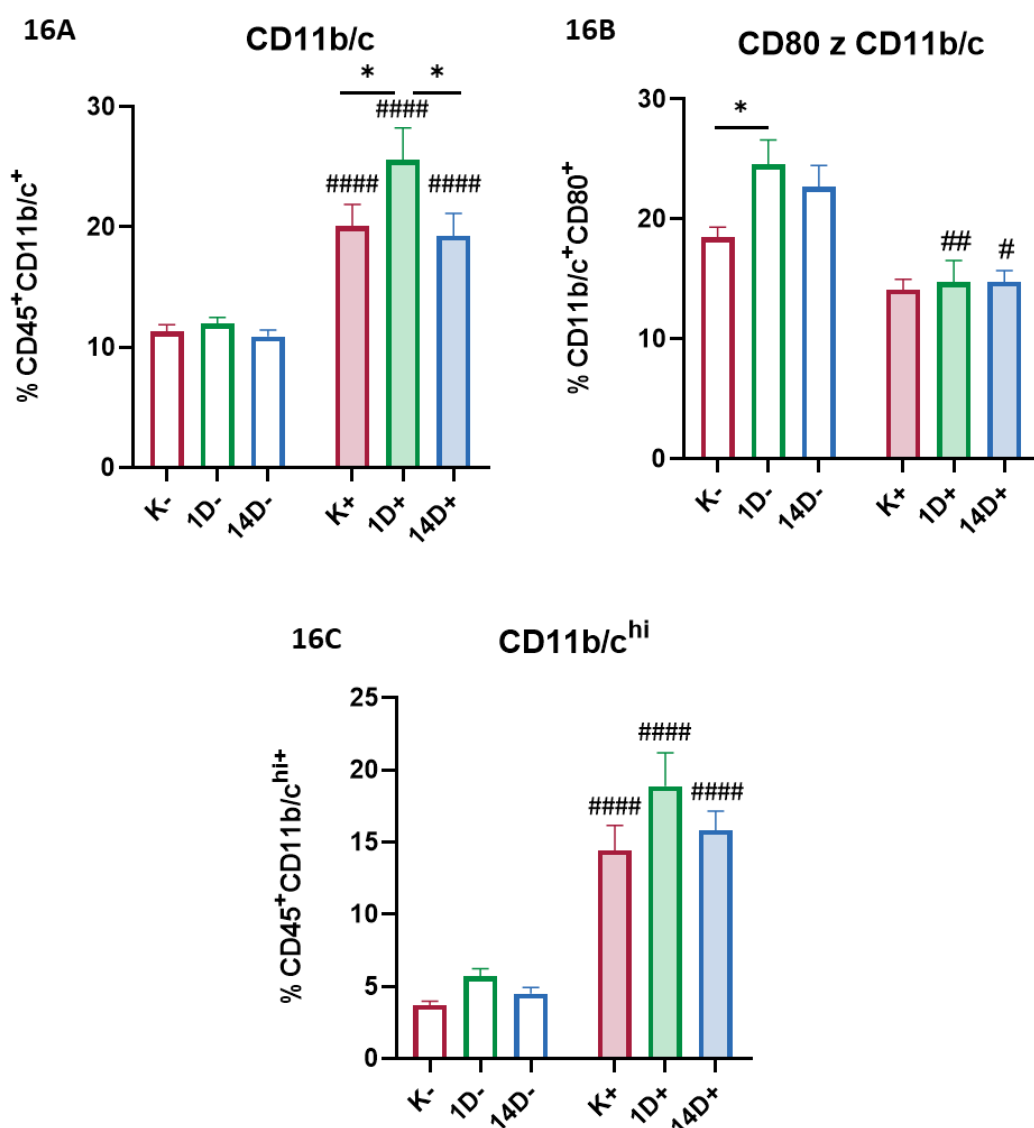
Pomocí průtokové cytometrie byly na vzorcích splenocytů v den odběru sledovány změny v zastoupení imunitních populací. Byly změřeny relativní změny v zastoupení populací B lymfocytů (CD45RA z CD45), aktivovaných B lymfocytů (CD80 z CD45RA) (obr. 15), myeloidních buněk (CD11b/c z CD45) a aktivovaných myeloidních buněk (CD80 z CD11b/c)(obr. 16). Dále byly sledovány změny v populacích T lymfocytů (CD3 z CD45),  $\gamma\delta$ T lymfocytů ( $\gamma\delta$ TCR z CD45) a aktivovaných T lymfocytů (CD25 z CD3) (obr. 17). V neposlední řadě byly měřeny CD45<sup>+</sup> buňky a  $\gamma\delta$ T lymfocyty pozitivní na cytokiny IL-17 (obr. 18) a TNF- $\alpha$  (obr. 19). Výsledky jsou vyjádřeny v procentech.

Bylo zjištěno, že vlivem stimulace TLR2/6 dochází k poklesu v relativním zastoupení B lymfocytů oproti lymfocytům získaným ze zvířat bez této stimulace, které je signifikantní u skupiny 1D+ (obr. 15A). Zatímco u nestimulovaných zvířat došlo k signifikantnímu nárůstu relativního zastoupení aktivovaných B lymfocytů u skupiny 1D-, u zvířat stimulovaných Pam2 k signifikantním změnám nedošlo (obr. 15B).



**Obrázek 15 – Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na změny v populaci B lymfocytů.** Relativní zastoupení B lymfocytů (CD45RA z CD45) (15A) a aktivovaných B lymfocytů (CD80 z CD45RA) (15B). Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. #P<0,05 představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K<sup>-</sup>, 1D<sup>-</sup>, 14D<sup>-</sup>) a s aplikací Pam2 (K<sup>+</sup>, 1D<sup>+</sup>, 14D<sup>+</sup>). \*P<0,05 představuje statisticky významnou odchylku v rámci skupin.

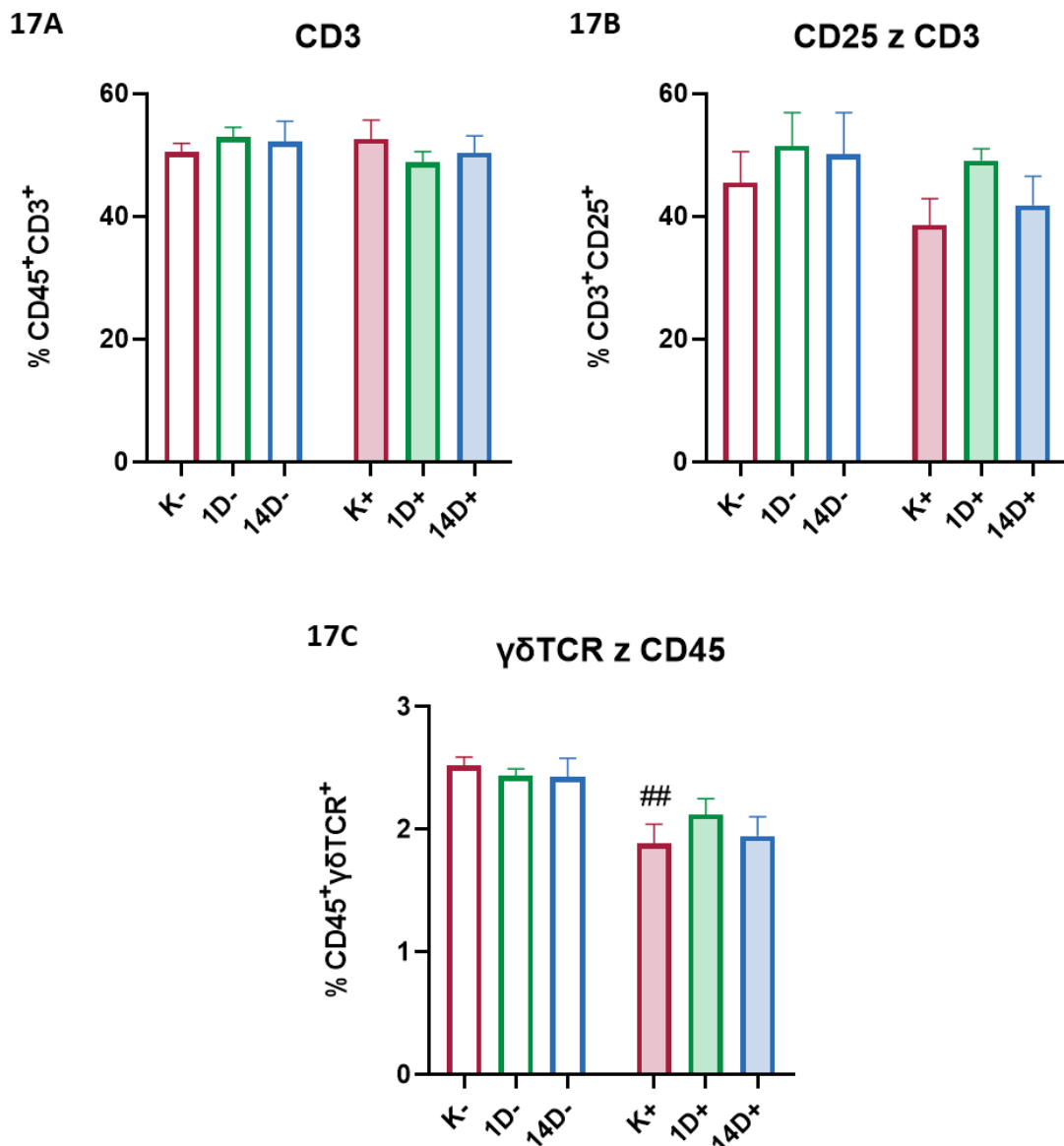
U leukocytů získaných ze zvířat, kterým byl aplikován Pam2 došlo k významnému nárůstu relativního zastoupení myeloidní populace oproti leukocytům získaných ze skupin bez podaného Pam2 (obr. 16A), které je ještě výraznější u populace CD11b/c<sup>hi</sup> z CD45 (obr. 16C). K nárůstu relativního zastoupení myeloidní populace také došlo u skupiny 1D+ oproti skupinám K+ a 14D+ (obr. 16A). U aktivovaných myeloidních buněk došlo k signifikantnímu zvýšení relativního zastoupení u skupiny 1D- vůči odpovídající kontrole (K-). U zvířat po aplikaci Pam2 došlo ke snížení relativního zastoupení buněk pozitivních na znak CD80 (obr. 16B).



**Obrázek 16 - Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na změny v populaci myeloidních buněk.** Relativní zastoupení myeloidních buněk (CD11b/c z CD45) (16A), aktivovaných myeloidních buněk (CD80 z CD11b/c) (16B) a vybrané populace myeloidních buněk (CD11b/c<sup>hi</sup> z CD45) (16C). Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \*P<0,05 představuje statisticky významnou odchylku v rámci skupin. #P<0,05; ##P<0,01; ####P<0,0001 představuje statisticky

významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K-, 1D-, 14D-) a s aplikací Pam2 (K+, 1D+, 14D+).

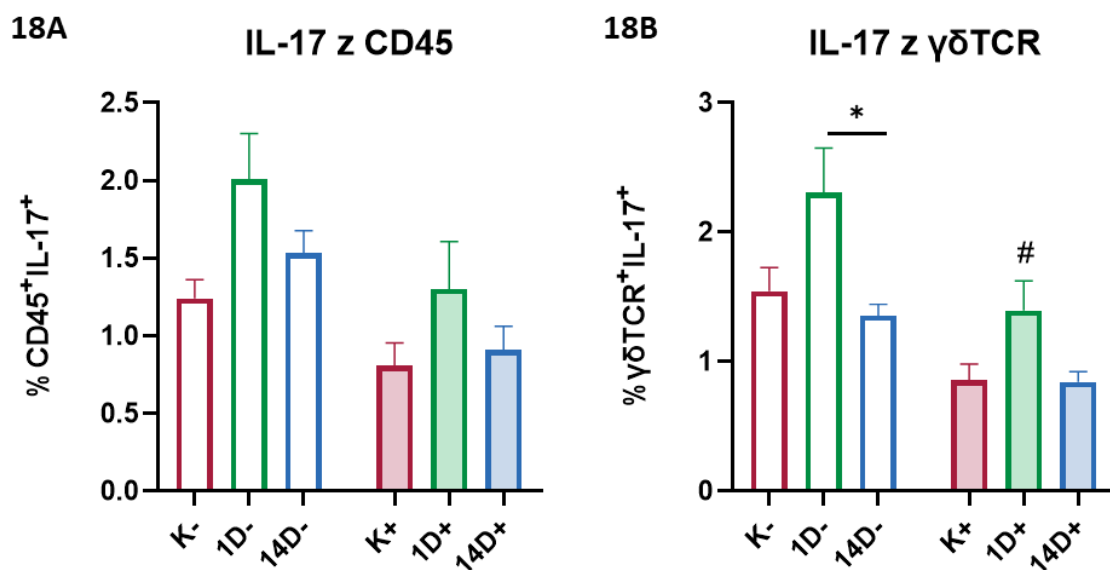
V žádné ze skupin nedošlo k signifikantním změnám v relativním zastoupení T lymfocytů (obr. 17A), ani aktivovaných T lymfocytů (obr. 17B). Vlivem stimulace TLR2/6 však došlo k signifikantnímu poklesu relativního zastoupení  $\gamma\delta$ T lymfocytů u skupiny K+ oproti skupině K- (obr. 17C).



**Obrázek 17 – Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na populaci T lymfocytů.** Relativní zastoupení T lymfocytů (CD3 z CD45) (17A), aktivovaných T lymfocytů (CD25 z CD3) (17B) a  $\gamma\delta$ T lymfocytů (17C). Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. <sup>##</sup>P<0,01

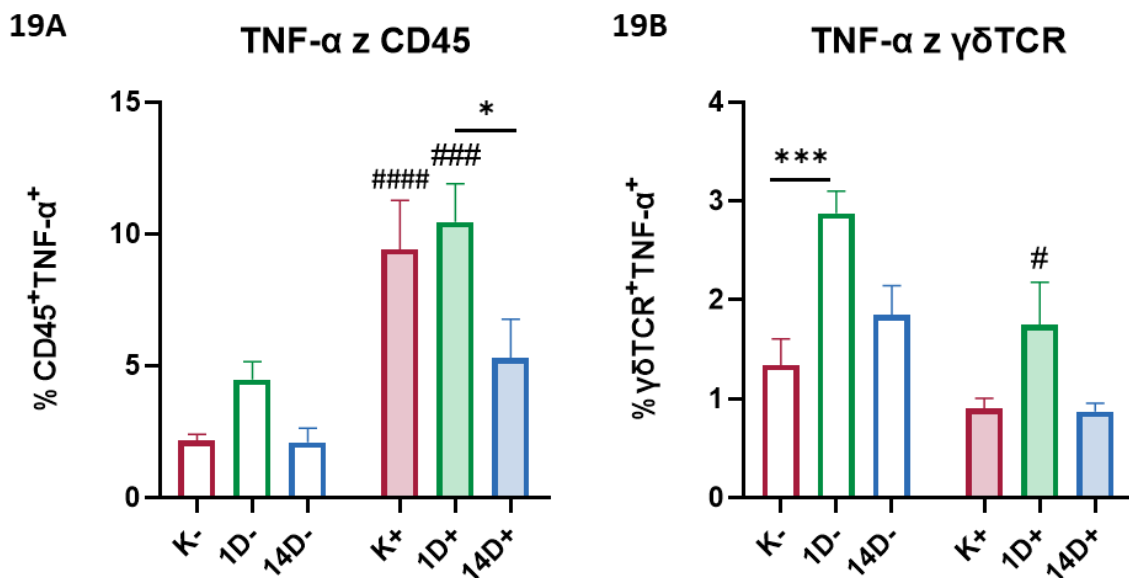
*představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K-, 1D-, 14D-) a s aplikací Pam2 (K+, 1D+, 14D+)*

Dále byla měřena hladina intracelulárního cytokinu IL-17. Došlo k nesignifikantnímu nárůstu relativního zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk produkujících IL-17 u skupin 1D- a 1D+ (obr. 18A). U  $\gamma\delta$ T lymfocytů byl tento nárůst signifikantní u skupiny 1D- vůči skupině 14D- (obr. 18B). Byla také pozorována tendence poklesu relativního zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na IL-17 získaných ze zvířat, kterým byl aplikován Pam2 (obr. 18A). Pokles u stejné skupiny byl signifikantní u  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na IL-17 (obr. 18B).



**Obrázek 18 – Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na populaci CD45<sup>+</sup> buněk a  $\gamma\delta$ T lymfocytů produkujících IL-17. Relativní zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na IL-17 (18A) a  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na IL-17 (18B). Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \* $P < 0,05$  představuje statisticky významnou odchylku v rámci skupin. # $P < 0,05$  představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K-, 1D-, 14D-) a s aplikací Pam2 (K+, 1D+, 14D+).**

Naopak došlo k výraznému zvýšení relativního zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na TNF- $\alpha$  izolovaných ze zvířat, kterým byl aplikován Pam2. Skupina 14D+ byla signifikantně méně pozitivní na tento cytokin oproti skupině 1D+ (obr. 19A). V populaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů byl trend u zvířat, kterým byl aplikován Pam2 opačný. Došlo ke snížení relativního zastoupení  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na TNF- $\alpha$  po aplikaci Pam2. Bylo také možné pozorovat významný nárůst relativního zastoupení TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T lymfocytů získaných ze zvířat vystavených 1 den chladu, kterým nebyl aplikován Pam2 (obr. 19B).



**Obrázek 19 - Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na populace CD45<sup>+</sup> buněk a  $\gamma\delta$ T lymfocytů produkujících TNF- $\alpha$ .** Relativní zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na TNF- $\alpha$  (19A) a  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na TNF- $\alpha$  (19B). Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$  představuje statisticky významnou odchylku v rámci skupin. # $P < 0,05$ ; ### $P < 0,001$ ; #### $P < 0,0001$  představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K<sup>-</sup>, 1D<sup>-</sup>, 14D<sup>-</sup>) a s aplikací Pam2 (K<sup>+</sup>, 1D<sup>+</sup>, 14D<sup>+</sup>).

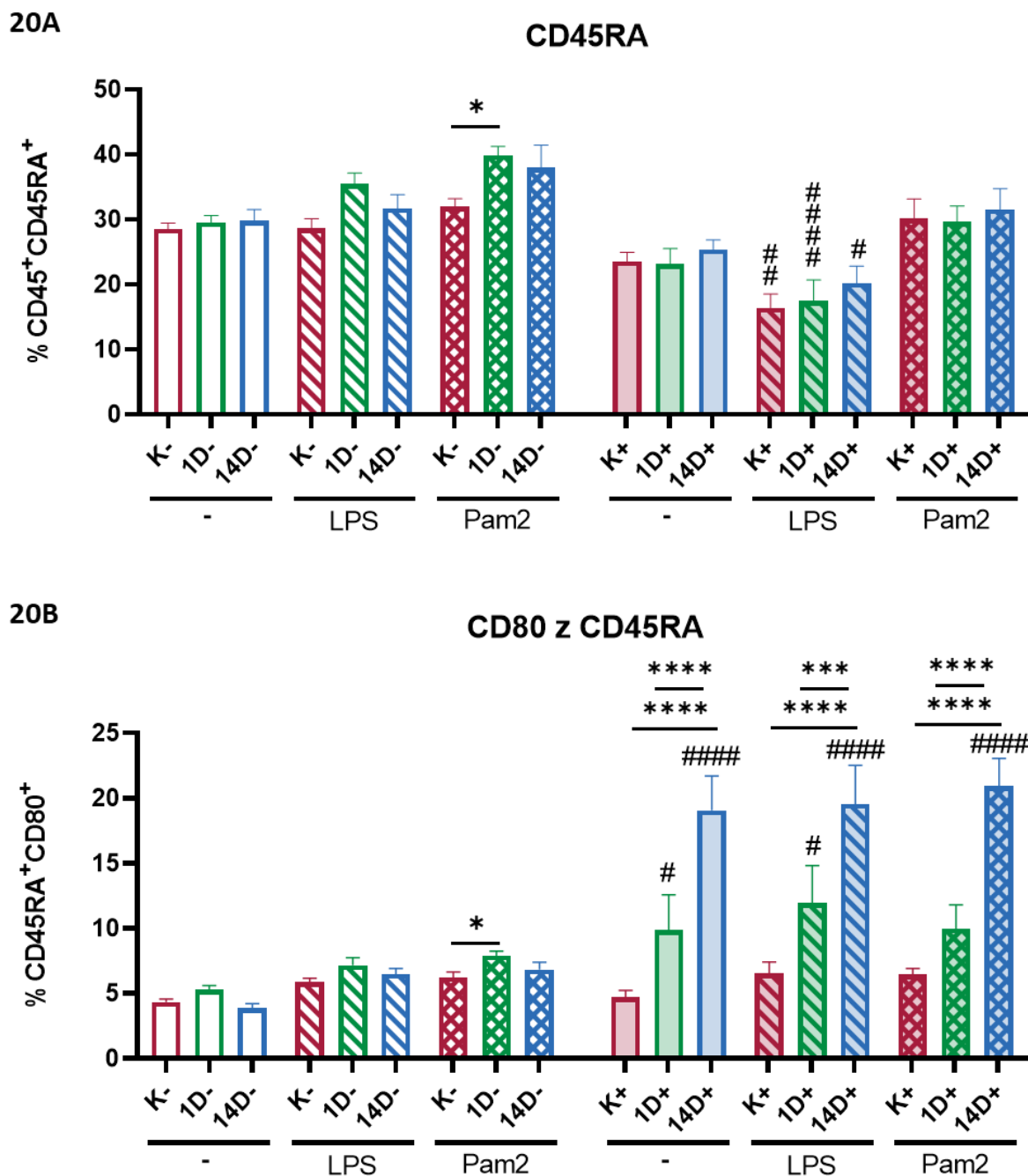


### 5.2.2.3 Průtoková cytometrie po kultivaci splenocytů

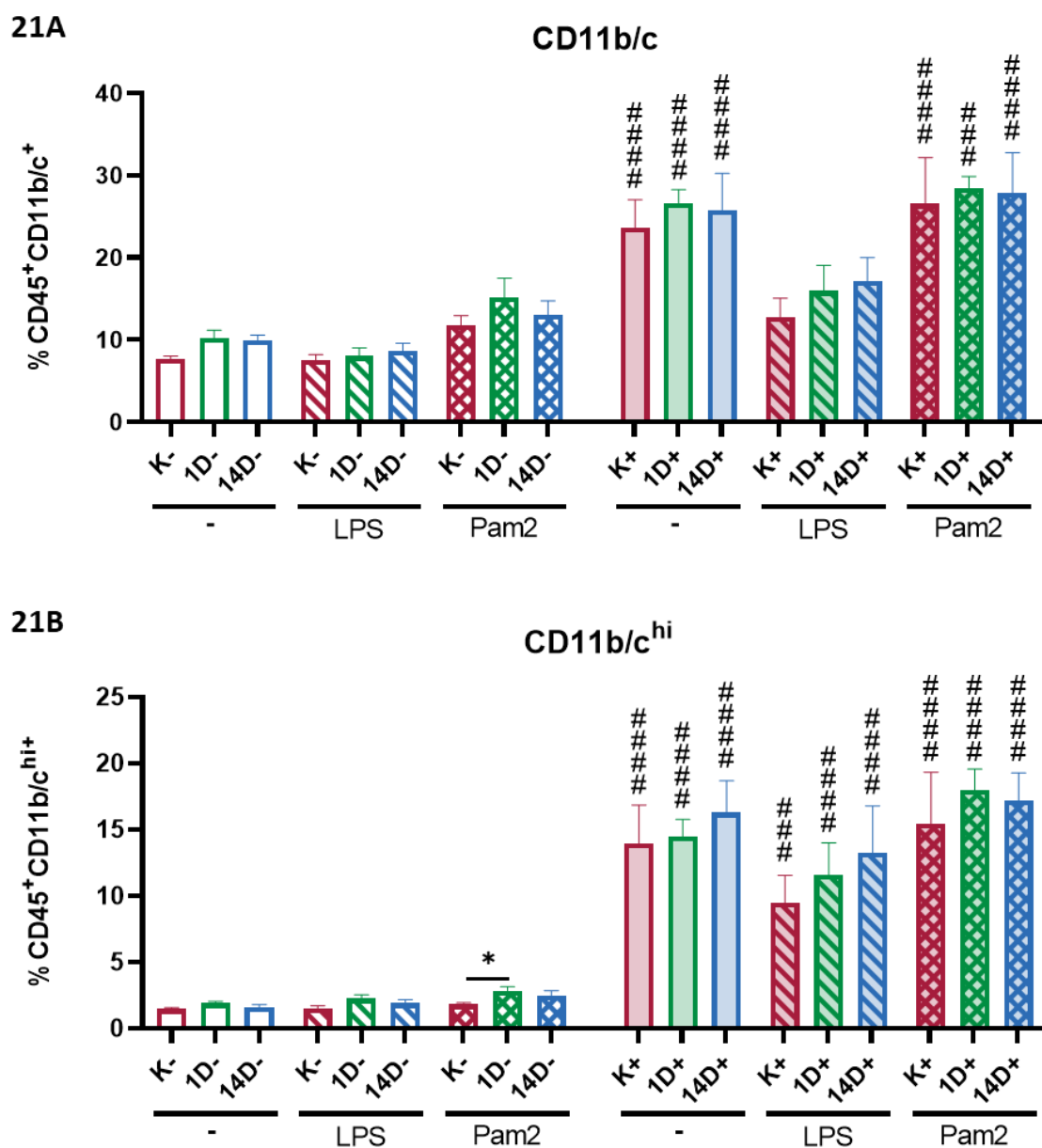
Pomocí průtokové cytometrie byly na vzorcích splenocytů kultivovaných po dobu 72 hodin bez stimulace (-), nebo s ligandy TLR: lipopolysacharidem (LPS) a Pam2CSK4 (Pam2) sledovány změny v zastoupení imunitních populací. Byly změřeny relativní změny v zastoupení populací B lymfocytů (CD45RA z CD45), aktivovaných B lymfocytů (CD80 z CD45RA) (obr. 10), myeloidních buněk (CD11b/c z CD45) (obr. 21) a aktivovaných myeloidních buněk (CD80 z CD11b/c)(obr. 22). Byly také sledovány změny v populacích T lymfocytů (CD3 z CD45) a aktivovaných T lymfocytů (obr. 23). Dále bylo zjištěno relativní zastoupení  $\gamma\delta$ T lymfocytů ( $\gamma\delta$ TCR z CD45) (obr. 24). Měřeny byly také intracelulární cytokiny IL-17 (obr. 25) a TNF- $\alpha$  (obr. 26).

Po kultivaci s LPS byl zaznamenán signifikantní pokles relativního zastoupení B lymfocytů izolovaných za zvířat, kterým byl aplikován Pam2 oproti skupinám kultivovaným s LPS bez aplikace Pam2. Tento pokles byl nejvýraznější u skupiny 1D+ (obr. 20A). Nejvýraznější změny byly pozorovány v populaci aktivovaných B lymfocytů. Došlo k významnému nárůstu jejich relativního zastoupení u skupiny 14D+ oproti skupině 14D-, ale také vůči skupinám K+ a 1D+ bez stimulace i po stimulaci LPS a Pam2. K nárůstu zastoupení také došlo u skupiny 1D+ oproti skupině 1D-. Relativní zastoupení skupin K+ a K- se nelišilo (obr. 20B).

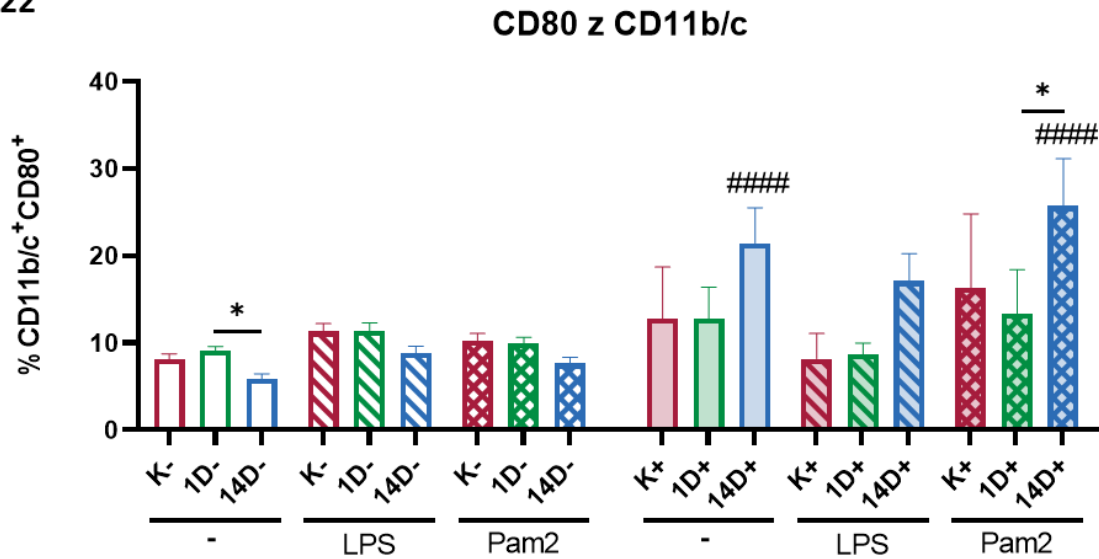
K dalším významným změnám došlo v populaci myeloidních buněk. Byl zaznamenán signifikantní nárůst jejich relativního zastoupení u všech skupin, kterým byl aplikován Pam (K+, 1D+ a 14D+) a byly kultivovány bez stimulace, nebo s ligandem Pam2. Tento nárůst byl viditelný i po kultivaci LPS, nebyl však signifikantní (obr. 21A). Podobný nárůst byl zaznamenán i u populace CD11b/c<sup>hi</sup> z CD45, kde byly rozdíly mezi skupinami bez a s aplikací Pam2 ještě výraznější (obr. 21B). V neposlední řadě byly výrazné změny pozorovány i v aktivaci myeloidních buněk. Podobně jako u aktivovaných B lymfocytů, k nejvyššímu nárůstu relativního zastoupení došlo u skupiny 14D+ oproti skupině 14D- (obr.22).



Obrázek 20 – Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na změny v populaci B lymfocytů kultivovaných s ligandy TLR. Relativní zastoupení B lymfocytů (CD45RA z CD45) (20A) a aktivovaných B lymfocytů (CD80 z CD45RA) (20B). LPS = lipopolysacharid, Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  představuje statisticky významnou odchylku v rámci skupin. # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$ ; #### $P < 0,0001$  představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K-, 1D-, 14D-) a s aplikací Pam2 (K+, 1D+, 14D+).

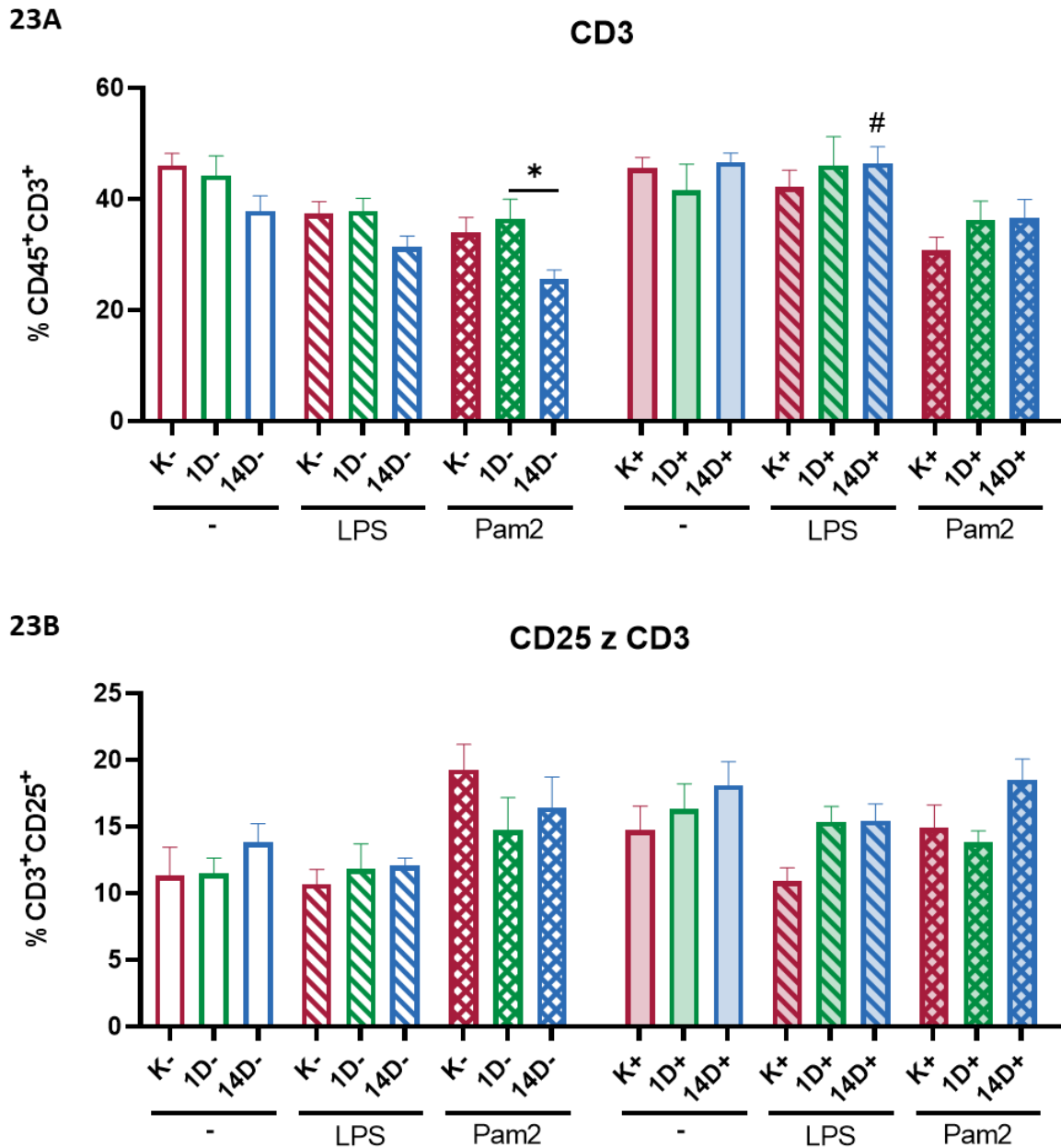


**Obrázek 21 - Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na změny v populaci myeloidních buněk kultivovaných s ligandy TLR. Relativní zastoupení myeloidních buněk (CD11b/c z CD45) (21A) a vybrané populace myeloidních buněk (CD11b/c<sup>hi</sup> z CD45) (21B). LPS = lipopolysacharid, Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \*P<0,05 představuje statisticky významnou odchylku v rámci skupin. ###P<0,001; ####P<0,0001 představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K<sup>-</sup>, 1D<sup>-</sup>, 14D<sup>-</sup>) a s aplikací Pam2 (K<sup>+</sup>, 1D<sup>+</sup>, 14D<sup>+</sup>).**



**Obrázek 22 - Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na změny v populaci aktivovaných myeloidních buněk kultivovaných s ligandy TLR. Relativní zastoupení aktivovaných myeloidních buněk (CD80 z CD11b/c). LPS = lipopolysacharid, Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \* $P < 0,05$  představuje statisticky významnou odchylku v rámci skupin. #### $P < 0,0001$  představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K<sup>-</sup>, 1D<sup>-</sup>, 14D<sup>-</sup>) a s aplikací Pam2 (K<sup>+</sup>, 1D<sup>+</sup>, 14D<sup>+</sup>).**

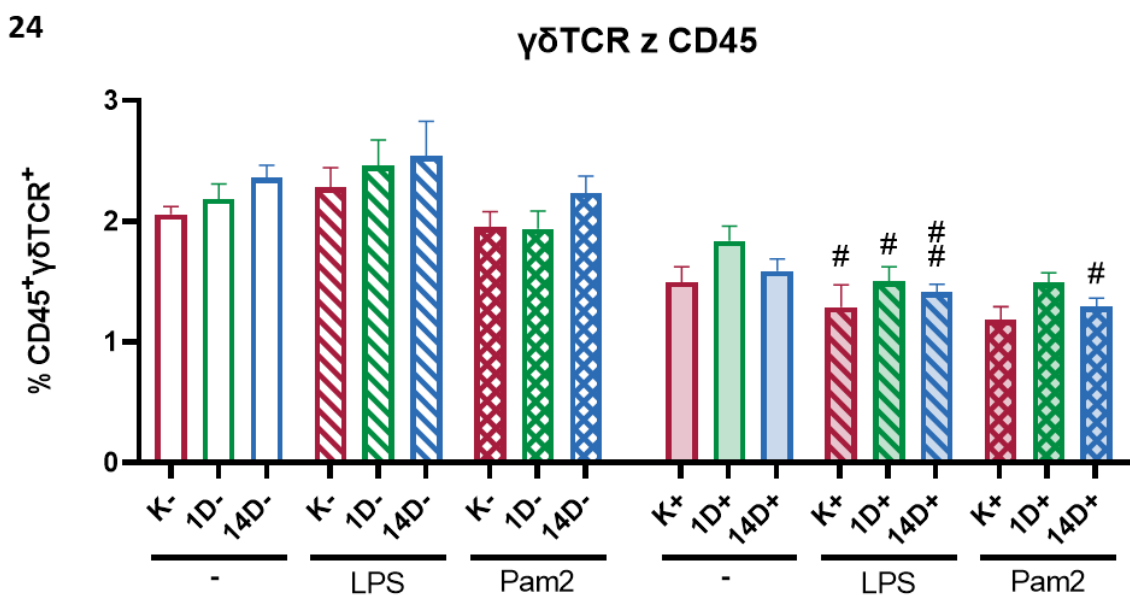
V populaci T lymfocytů došlo pouze k mírnému nárůstu relativního zastoupení po stimulaci LPS u skupiny 14D+ (obr. 23A). Po aplikaci Pam2 nedošlo k žádným změnám v populaci aktivovaných T lymfocytů (obr. 23B).



**Obrázek 23 - Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na změny v populaci T lymfocytů kultivovaných s ligandy TLR. Relativní zastoupení T lymfocytů (CD3 z CD45) (23A) a aktivovaných T lymfocytů (CD25 z CD3) (23B). LPS = lipopolysacharid, Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. \*P<0,05 představuje statisticky**

významnou odchylku v rámci skupin. # $P < 0,05$  představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K-, 1D-, 14D-) a s aplikací Pam2 (K+, 1D+, 14D+).

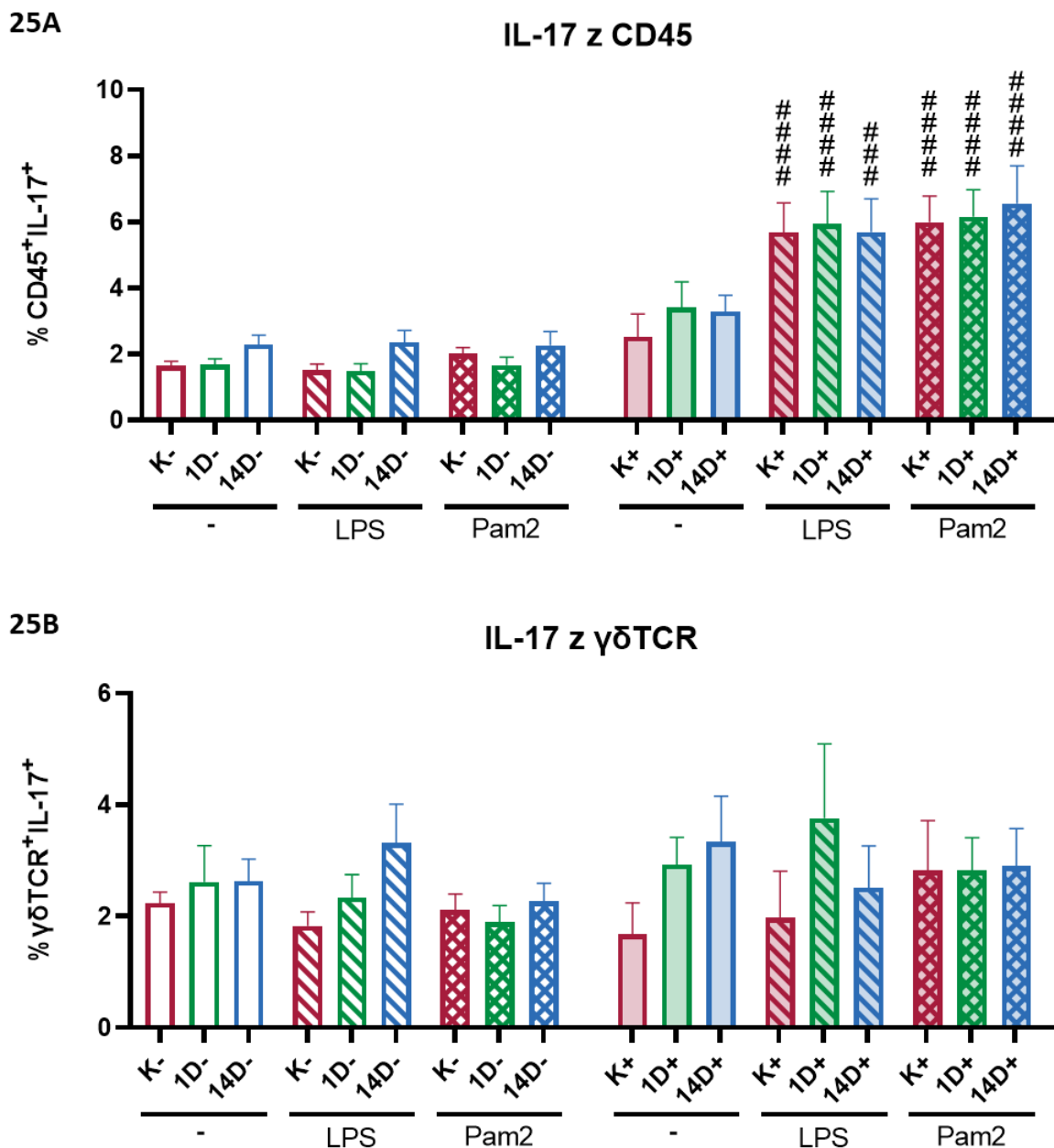
U leukocytů zvířat, kterým byl aplikován Pam2 došlo ke snížení relativního zastoupení  $\gamma\delta$ T lymfocytů oproti skupinám bez aplikace Pam2, které bylo signifikantní po kultivaci s LPS. U skupiny 14D+ také po kultivaci s Pam2 (obr. 24).



**Obrázek 24 - Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na změny v populaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů kultivovaných s ligandy TLR.** Relativní zastoupení  $\gamma\delta$ T lymfocytů ( $\gamma\delta$ TCR z CD45). LPS = lipopolysacharid, Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$  představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K-, 1D-, 14D-) a s aplikací Pam2 (K+, 1D+, 14D+).

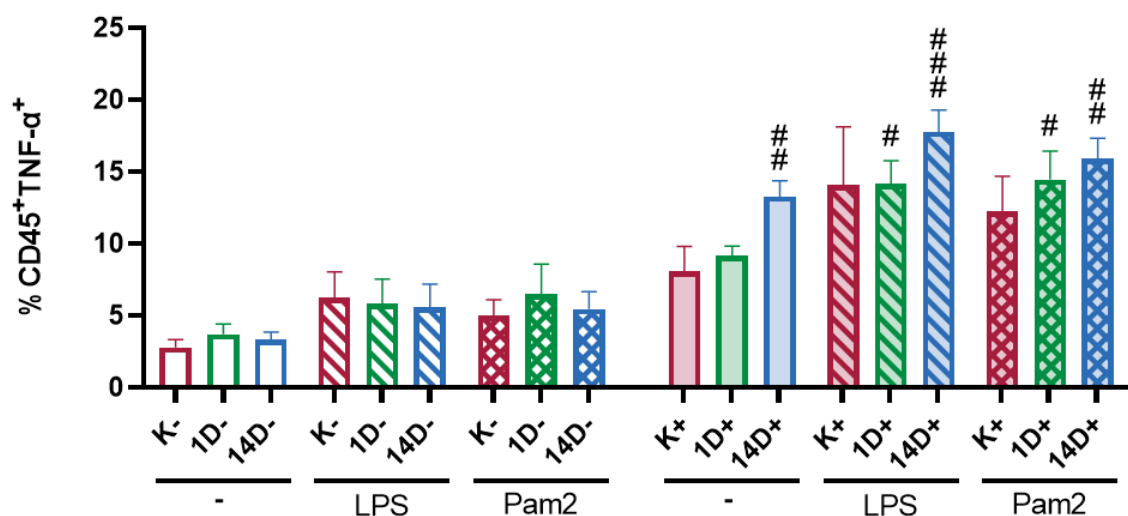
V neposlední řadě byly sledovány změny v populaci CD45+ buněk a  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na IL-17 a TNF- $\alpha$ . Došlo k výraznému zvýšení relativního zastoupení CD45+ buněk pozitivních na IL-17 získaných ze zvířat, kterým byl aplikován Pam2 po stimulaci LPS a Pam2 (obr. 25A). Tento trend jsme však nezaznamenali v populaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů (obr. 25B). Vzrostlo relativní zastoupení CD45+ buněk pozitivních na TNF- $\alpha$  získaných ze zvířat, kterým byl aplikován Pam2. Toto bylo patrné zejména u skupiny 14D+ (obr. 26A). Relativní

zastoupení  $\gamma\delta T$  lymfocytů pozitivních na TNF- $\alpha$  izolovaných ze zvířat, kterým byl aplikován Pam2 spíše klesalo. Tato tendence však byla nesignifikantní (obr. 26B).

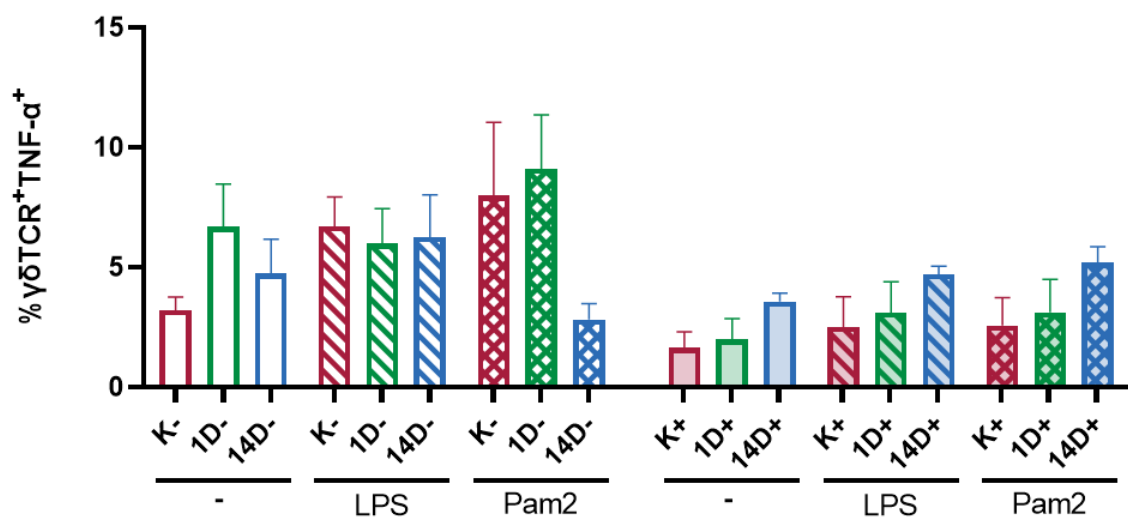


**Obrázek 25 - Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na změny v populacích buněk pozitivních na IL-17 kultivovaných s ligandy TLR. Relativní zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na IL-17 (25A), relativní zastoupení  $\gamma\delta T$  lymfocytů pozitivních na IL-17 (25B). LPS = lipopolysacharid, Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. ###P<0,001; ####P<0,0001 představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K-, 1D-, 14D-) a s aplikací Pam2 (K+, 1D+, 14D+).**

26A

TNF- $\alpha$  z CD45

26B

TNF- $\alpha$  z  $\gamma\delta$ TCR

Obrázek 26 - Vliv současného působení chladu a stimulace TLR2/6 na změny v populacích buněk pozitivních na TNF- $\alpha$  kultivovaných s ligandy TLR. Relativní zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na TNF- $\alpha$  (26A), relativní zastoupení  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na TNF- $\alpha$  (26B). LPS = lipopolysacharid, Pam2 = Pam2CSK4. Výsledky byly změřeny na průtokovém cytometru. # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$ ; ### $P < 0,001$  představuje statisticky významnou odchylku mezi odpovídajícími sloupci skupin bez (K-, 1D-, 14D-) a s aplikací Pam2 (K+, 1D+, 14D+).



## 6. Diskuze

Tato práce navazuje na diplomovou práci Mgr. Daniela Vaška, která popisovala vliv chladové adaptace na imunitní systém. Zároveň je součástí širšího projektu, který se snaží objasnit jak působení chladového stresu a chladové adaptace ovlivní imunitní systém a imunometabolismus. Cílem této práce bylo zjistit jaký je současný vliv působení chladu a infekčních agens.

Již na začátku pokusů jsme si všimli, že vlivem chladové adaptace dochází k významnému zlepšení přežívání splenocytů, které se promítalo do absolutních počtů živých buněk a jednotlivých populací. Toto bylo pozorováno u buněk po izolaci sleziny i jejich kultivaci 72 hodin. Je možné, že tento jev je spojený s metabolickými změnami, ke kterým během chladové adaptace dochází (Lettieri-Barbato and Aquilano, 2020). Účinnost chladové adaptace byla potvrzena signifikantním zvýšením hmotnosti BAT u skupiny 14D oproti kontrole a skupině 1D (výsledky Daniela Vaška).

V části I jsme chtěli zjistit, zda změny navozené chladovou adaptací ovlivní odpověď jednotlivých buněčných populací. Proto jsme sledovali vliv stimulace TLR na fenotyp splenocytů a peritoneálních buněk izolovaných z potkanů po vystavení chladu. Buňky v peritoneální dutině jsou v kontaktu s tukovou tkání, a proto jsou více ovlivněny metabolickými změnami (Willemsen et al., 2019). Pozorovali jsme vliv na jednotlivé populace, produkci cytokinů a expresi TLR. Předpokládali jsme, že jeden den v chladu navodí spíše pro-zánětlivý fenotyp spojený se stresem, který byl popisován v literatuře (Belay et al., 2017; Lian et al., 2017). Některé práce však popisují také imunosupresi (Hu et al., 2016). Naopak po chladové adaptaci (~14 dní v chladu) jsme očekávali rozvoj spíše proti-zánětlivého prostředí (Vargovic et al., 2016).

Pro detekci relativních změn v imunitních populacích splenocytů získaných ze zvířat vystavených chladu a stimulovaných ligandy TLR byla využita průtoková cytometrie. Nejprve byly sledovány změny v populaci B lymfocytů. U skupiny krátkodobě vystavené chladu došlo k signifikantnímu navýšení jejího relativního zastoupení oproti kontrole po stimulaci Pam2. Bylo dokázáno, že Pam2 stimuluje proliferaci B lymfocytů (Buwitt-Beckmann et al., 2005). Tento ligand se váže na TLR2/6. TLR2 je exprimovaný na B lymfocytech a může přispívat k jejich aktivaci, přežívání, diferenciaci a maturaci, zejména pak u B lymfocytů marginální zóny sleziny

(Genestier et al., 2007; Rubtsov et al., 2008). B lymfocyty oproti některým jiným imunitním populacím exprimují vyšší hladiny TLR6, který může společně s TLR2 přispívat k výše zmíněným efektům (Genestier et al., 2007; Hornung et al., 2002). Po stimulaci Pam2 byl u skupiny krátkodobě vystavené chladu zaznamenán signifikantní nárůst relativního zastoupení aktivovaných B lymfocytů. Je možné, že toto souvisí s vlivem stimulace TLR2 na aktivaci B lymfocytů (Rubtsov et al., 2008), protože po stimulaci TLR by mělo dojít ke zvýšení exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86 (Yamamoto et al., 2002). Trend nárůstu relativního zastoupení aktivovaných B lymfocytů se ale u skupiny krátkodobě vystavené chladu objevil i bez stimulace. Může tedy být zapříčiněn krátkodobým vystavením chladu.

Dále byly sledovány změny v populaci myeloidních buněk. Zatímco relativní zastoupení v celé populaci myeloidních buněk se signifikantně neměnilo, u populace CD11b/c<sup>hi</sup> z CD45 jsme zaznamenali podobný efekt po stimulaci Pam2, jako u B lymfocytů – nárůst relativního zastoupení u skupiny krátkodobě vystavené chladu. Tuto populaci jsme oddělili na základě vyšší exprese CD11b/c na FACS. Vzhledem k nedostupnosti některých potkaních protilátek jsme dále nezjišťovali, které buněčné typy zajišťuje. Podobně jako B lymfocyty, i myeloidní buňky exprimují TLR2. Zdaleka nejvíce jej pak exprimují makrofágy ([proteinatlas.org](http://proteinatlas.org), online). TLR6 je hojně exprimován granulocyty, monocyty i makrofágy ([proteinatlas.org](http://proteinatlas.org), online). V populaci aktivovaných myeloidních buněk došlo k signifikantnímu nárůstu jejich relativního zastoupení u skupiny krátkodobě vystavené chladu oproti skupině dlouhodobě vystavené chladu bez stimulace a po stimulaci I:C, jehož receptorem je TLR3. Zdá se tedy, že krátkodobé působení chladu ovlivnilo aktivaci B lymfocytů a myeloidních buněk.

Další sledovanou populací byly T lymfocyty. Po stimulaci Pam2 pokleslo jejich relativní zastoupení u skupiny dlouhodobě vystavené chladu oproti skupině krátkodobě vystavené chladu. Zatímco TLR2 je T lymfocyty exprimován, TLR6 na rozdíl od myeloidních buněk a B lymfocytů exprimují pouze v minimální míře ([proteinatlas.org](http://proteinatlas.org), online). K výrazným změnám došlo v populaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů (populace CD3<sup>+</sup> lymfocytů pozitivních na  $\gamma\delta$ T receptor), jejich relativní zastoupení významně vzrostlo u skupiny dlouhodobě vystavené chladu po stimulaci I:C a Pam2. Signifikantní byl ale také jejich nárůst u této skupiny bez stimulace. Toto pozorování je významné zejména pro jejich nedávno popsané vlivy na chladovou adaptaci (Hu et al., 2020; Kohlgruber et al., 2018).  $\gamma\delta$ T lymfocyty se vyznačují vysokou expresí TLR3 ([proteinatlas.org](http://proteinatlas.org), online), která je vyšší než u konvenčních  $\alpha\beta$ T lymfocytů. Bylo zjištěno, že

stimulace I:C přímo ovlivňuje aktivaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů (Wesch et al., 2006).  $\gamma\delta$ T lymfocyty mimo jiné exprimují také TLR2 a v menší míře i TLR6 a aktivace jejich ligandy může přispívat k jejich expanzi (Martin et al., 2009; Pietschmann et al., 2009).

S ohledem na významné změny, které jsme detekovali v populaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů, jsme se rozhodli změřit hladiny intracelulárních cytokinů, které jsou podle literatury spojené s chladovou adaptací: IL-17 a TNF- $\alpha$  (Kohlgruber et al., 2018). Tyto cytokiny jsme detekovali u  $\gamma\delta$ T lymfocytů a celé populace CD45<sup>+</sup> buněk. U skupiny dlouhodobě vystavené chladu došlo k nesignifikantnímu nárůstu kultivovaných CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na IL-17, které se ale příliš neprojevovalo u kultivovaných  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na IL-17. Ačkoliv nedošlo k signifikantním změnám, byl patrný nárůst procenta buněk exprimujících TNF- $\alpha$  u skupiny krátkodobě vystavené chladu, což je v souladu s literaturou (Belay et al., 2017; Wei et al., 2018). Správné cytokinové prostředí je důležité pro nárůst BAT (García et al., 2018). Zdá se, že nejen Th2 cytokiny, ale právě také TNF- $\alpha$ , nebo IL-17 jsou v tomto procesu podstatné (Kohlgruber et al., 2018).

Dále jsme pomocí ELISA testů změřili produkci cytokinů ze splenocytů a peritoneálních buněk, které byly izolované ze zvířat vystavených chladu a kultivovány s ligandy TLR. Produkce IL-6 splenocyty po stimulaci LPS byla u skupiny dlouhodobě vystavené chladu signifikantně snížena oproti kontrole. V literatuře bylo popsáno snížení produkce IL-6 vlivem dlouhodobého působení chladu například ve WAT (Vargovic et al., 2016) a játrech, plicích, nebo mozku naopak zvýšení produkce IL-6 (Yildirim and Yurekli, 2010). V našich experimentech jsme detekovali nesignifikantní zvýšení produkce IL-6 peritoneálními buňkami u skupin krátkodobě a dlouhodobě vystavených chladu oproti kontrole. Ačkoliv je IL-6 charakterizován převážně jako prozánětlivý cytokin a mediátor horečky, jeho role spočívá také v regulaci tělesné hmotnosti, kompozice, metabolismu (García et al., 2018) a chladové adaptace (Egecioglu et al., 2018). Bylo zjištěno, že IL-6 se může podílet na běžování WAT (Han et al., 2018). Tendence u splenocytů může být odlišná, protože je více spojená s imunitní odpovědí, naopak peritoneální buňky mohou více odpovídat na regulaci metabolismu (Willemsen et al., 2019).

Zatímco u splenocytů nedošlo ke změnám v produkci IL-10, u peritoneálních buněk došlo k nesignifikantnímu nárůstu produkce tohoto cytokinu u skupiny dlouhodobě vystavené chladu bez stimulace a po stimulaci I:C a Pam2. Zvýšená produkce IL-10 byla v literatuře zaznamenána po chladové adaptaci (Vargovic et al., 2016). Produkce prozánětlivých cytokinů

IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  byla u peritoneálních buněk získaných ze zvířat krátkodobě vystavených chladu nesignifikantně zvýšená, což odpovídá výsledkům získaných z myšího modelu chladového stresu (Belay et al., 2017). K nejvyšší produkci těchto cytokinů došlo po stimulaci LPS. Po delším vystavení chladu byl v literatuře zaznamenán pokles produkce IL-1 $\beta$  v placentě (Lian et al., 2017). Přestože naše výsledky nebyly signifikantní, tento trend jsme u peritoneálních buněk také zaznamenali.

Na začátku chladové adaptace dochází ke zvýšení prozánětlivých cytokinů, které přispívají k nastavení mechanismů spojených s chladovou adaptací. Postupně by mělo dojít k přesmyku na protizánětlivé prostředí (Lee et al., 2015; Messmer et al., 2014; Vargovic et al., 2016). Ačkoliv byl detekován zvýšený IL-10, jasný protizánětlivý fenotyp jsme detekcí cytokinů nezískali. Nicméně, výsledky Mgr. Daniela Vaška potvrzují zvýšenou expresi genů pro cytokiny spojené s Th2 typem imunitní odpovědi: IL-4 a IL-33 ve slezině po 14 dnech chladové adaptace. Zajímavé je cytokinové prostředí přímo v BAT, v našich pokusech jsme získali zvýšenou produkci řady proti- i pro-zánětlivých cytokinů po 1 dni (výsledky Mgr. Daniela Vaška), což potvrzuje výše uvedenou hypotézu krátkodobé aktivace na začátku působení chladu.

Abychom zjistili změny v relativní expresi proteinů TLR2 a TLR4 ve slezině a splenocytech kultivovaných s ligandy TLR izolovaných ze zvířat vystavených chladu, byla využita metoda Western blot. Oba receptory jsou ve slezině hojně exprimovány (Nishimura and Naito, 2005). Nejprve jsme pozorovali signifikantní zvýšení relativní exprese TLR2 ve slezině u zvířat krátkodobě vystavených chladu. Relativní exprese TLR4 ve slezině se vlivem krátkodobého, ani dlouhodobého chladu neměnila. Nebylo možné najít práce, které by se změnami exprese TLR ve slezině vlivem působení chladu zabíraly. Ve splenocytech kultivovaných s ligandy TLR byla pozorována tendence ke zvyšování relativní exprese TLR2 po stimulaci Pam2 u skupiny dlouhodobě vystavené chladu. Relativní exprese TLR4 u stejné skupiny měla tendenci růst po stimulaci LPS. Je možné, že změny v expresi TLR2 a TLR4 u skupiny dlouhodobě vystavené chladu souvisí s protektivním vlivem chladové adaptace. V literatuře bylo popsáno snížení exprese TLR4 ve splenocytech potkanů, kteří byly vystaveni krátkodobému působení chladu (Hu et al., 2016). Zaznamenali jsme obdobný trend, ale je třeba dalších opakování pokusu, aby jej bylo možné potvrdit.

Cílem části II bylo pozorovat vliv *in vivo* aplikace vybraného TLR ligandu na fenotyp splenocytů zvířat vystavených chladu. Vzhledem k výsledkům z části I, kde k největším

změnám v imunitních populacích docházelo po kultivaci s TLR2/6 ligandem Pam2, jsme se rozhodli tento ligand využít i pro aplikaci zvířatům. Výhodou tohoto ligandu bylo, že se jedná o syntetický diacyl lipopeptid. Diacyl lipopeptidy se přirozeně vyskytují na bakteriích jako jsou *Mycoplasma*, *Listeria* nebo *Staphylococcus aureus (s.aureus)* (Kurokawa et al., 2012). Model s aplikací Pam2 24 hodin před ukončením pokusu jsme vybrali proto, abychom mohli pozorovat rozdílné vlivy chladového stresu a chladové adaptace na odpověď vůči infekčním agens. Po aplikaci Pam2 nedošlo ke změnám v hmotnosti BAT.

Část získaných splenocytů byla využita k FACS analýze v den odběru. K výrazným změnám došlo v populaci myeloidních buněk. Po aplikaci Pam2 vzrostlo jejich relativní zastoupení vůči skupinám, kterým nebyl Pam2 aplikován. Bylo zjištěno, že stimulace ligandy TLR2/6 vede k proliferaci monocytů *in vivo* (Demir et al., 2007) a dalších typů myeloidních buněk *in vitro* (Chan et al., 2009). Navíc u zvířat, kterým byl aplikován Pam2 a byla krátkodobě vystavena chladu, došlo k signifikantnímu nárůstu relativního zastoupení myeloidních buněk oproti příslušné kontrole a skupině 14D+. Ovšem relativní zastoupení aktivovaných myeloidních buněk získaných ze zvířat po aplikaci Pam2 pokleslo vůči skupinám, kterým Pam2 nebyl aplikován. Je možné, že tento viditelný pokles relativního zastoupení aktivovaných myeloidních buněk nějak souvisí s faktem, že stimulace TLR2/6 diacyl lipopeptidy může v některých případech vést k imunosupresi (Parcina et al., 2013; Skabytska et al., 2014).

U kontrolní skupiny, které byl aplikován Pam2 došlo k poklesu relativního zastoupení  $\gamma\delta$ T lymfocytů oproti kontrole, které nebyl aplikován Pam2. Je možné, že buď došlo k aktivaci a migraci  $\gamma\delta$ T lymfocytů ze sleziny do místa aplikace (Costa et al., 2010), nebo toto pozorování souvisí s výše zmíněnou imunosupresí. V literatuře bylo popsáno snížení relativního zastoupení T lymfocytů po aplikaci Pam2, nebo infekci grampozitivní bakterií *s. aureus*. Stimulací TLR2/6 jsou totiž aktivovány myeloidní supresorové buňky, které potlačují aktivitu T lymfocytů (Skabytska et al., 2014).

V neposlední řadě byly změřeny relativní změny v populaci CD45<sup>+</sup> buněk a  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na IL-17 a TNF- $\alpha$ . Potvrdili jsme, že procento buněk pozitivních na tyto cytokiny je po krátkodobém vystavení chladu zvýšené, jak bylo diskutováno u části I. Ovšem zaznamenali jsme pokles  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na IL-17 i TNF- $\alpha$  ve slezině zvířat, kterým byl aplikován Pam2. Vzhledem k významu  $\gamma\delta$ T lymfocytů na adaptivní termogenezi (Hu et al., 2020; Kohlgruber et al., 2018) lze usuzovat, že stimulace TLR ovlivňuje  $\gamma\delta$ T lymfocyty a působí

na produkci cytokinů spojených s chladovou adaptací. Myši bez  $\gamma\delta T$  lymfocytů, nebo IL-17A nebyly schopny zahájení exprese řady genů souvisejících s termogenezí (Kohlgruber et al., 2018). Bylo popsáno, že pouze IL-17<sup>+</sup>  $\gamma\delta T$  lymfocyty exprimují TLR2 (Martin et al., 2009). Stimulace TLR2 může pak u těchto buněk vést k produkci IFN- $\gamma$  (Deetz et al., 2006). Dále v našem modelu došlo k výraznému nárůstu CD45<sup>+</sup> buněk pozitivních na TNF- $\alpha$  u kontroly a skupiny krátkodobě vystavené chladu po aplikaci Pam2 ve srovnání s odpovídajícími skupinami bez aplikace Pam2, což může být spojeno s aktivací TLR2/6 a odpovědí na zánět (Buwitt-Beckmann et al., 2005). Obdobné zvýšení však nebylo pozorováno u dlouhodobě adaptované skupiny, které byl aplikován Pam2. Tento jev lze přisuzovat změnám, které probíhají během chladové adaptace.

Další část splenocytů byla kultivována po dobu 72 hodin s ligandy TLR a poté analyzována průtokovou cytometrií. K významnému nárůstu relativního zastoupení aktivovaných B lymfocytů bylo detekováno u zvířat, která byla vystavena chladu a byl jim aplikován Pam2 oproti odpovídajícím skupinám bez Pam2. Mezi kontrolními skupinami nedošlo k žádným změnám. Proto nelze tento jev vysvětlit pouhým vlivem stimulace TLR2 na expresi kostimulačních molekul (Rubtsov et al., 2008; Sayi et al., 2011) a lze usuzovat na rozdílné vlivy krátkodobého a dlouhodobého působení chladu.

K výrazným změnám došlo také v populaci myeloidních buněk. Po aplikaci Pam2 došlo k nárůstu jejich relativního zastoupení ve všech skupinách kultivovaných bez stimulace a v přítomnosti Pam2. Na populaci aktivovaných myeloidních buněk jsme pozorovali podobný efekt jako u aktivovaných B lymfocytů – signifikantní zvýšení u zvířat dlouhodobě vystavených chladu, kterým byl aplikován Pam2 vůči zvířatům bez Pam2. Proto ani v případě myeloidních buněk nelze relativní nárůst CD80<sup>+</sup> populace přisuzovat pouze aktivaci TLR2/6 (Loof et al., 2008). Tyto výsledky naznačují, že současným vlivem chladové adaptace a stimulace TLR dochází ke změnám v aktivaci B lymfocytů a myeloidních buněk.

Sledovány byly také změny v relativním zastoupení  $\gamma\delta T$  lymfocytů. U buněk získaných ze zvířat, kterým byl aplikován Pam2 došlo k poklesu jejich relativního zastoupení po stimulaci LPS oproti příslušným skupinám izolovaných z kontrolních zvířat. Detekované změny odpovídají hypotéze, že vlivem aplikace Pam2 mohlo dojít k migraci  $\gamma\delta T$  lymfocytů ze sleziny do místa zánětu (Costa et al., 2010). Slezina je totiž spádovým lymfoidním orgánem pro

peritoneální dutinu (Etogo et al., 2008; Kawahara et al., 2003). Může se však také jednat o pouhé dorovnání procentuálního zastoupení.

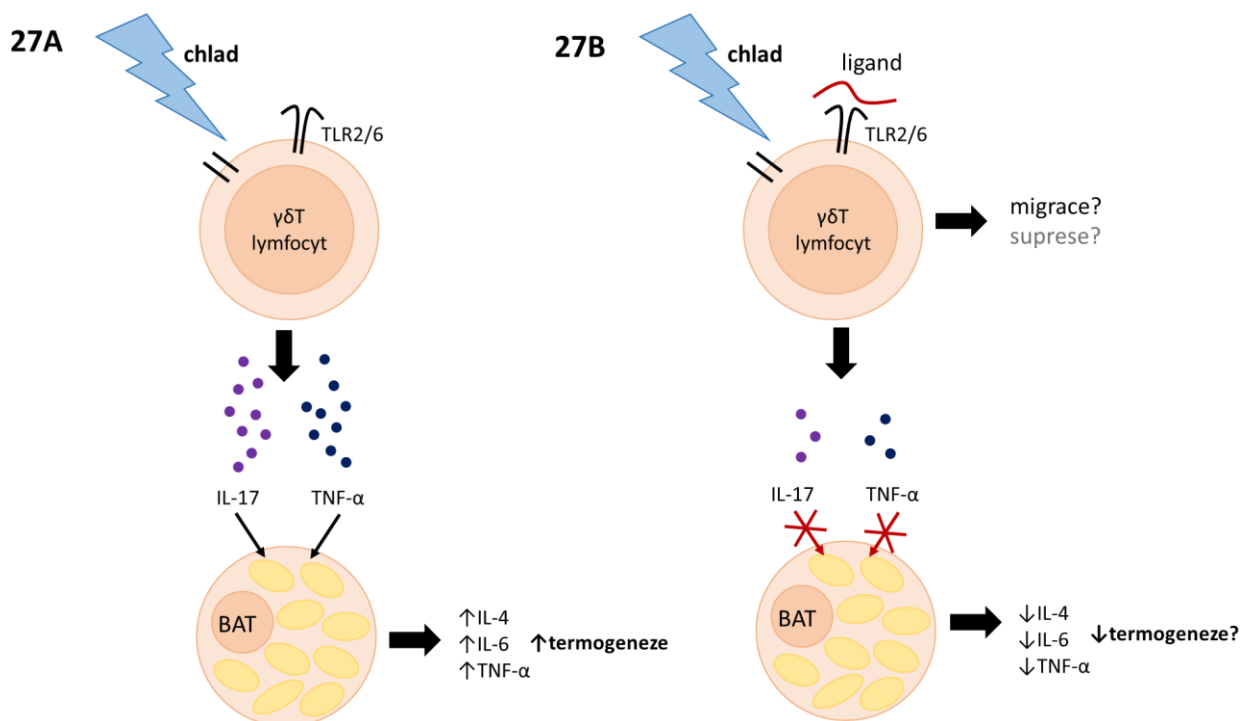
Došlo k významnému nárůstu relativního zastoupení CD45<sup>+</sup> buněk produkujících IL-17 získaných ze zvířat, kterým byl aplikován Pam2 a kultivovaných s LPS, nebo Pam2 v porovnání se zvířaty, kterým nebyl aplikován Pam2. Zvýšená produkce IL-17 může být v některých případech spojena i s aktivací TLR2 (Chan et al., 2014). Naopak nedošlo ke změnám v populaci IL-17<sup>+</sup>  $\gamma$ δT lymfocytů. CD45<sup>+</sup> buňky izolované ze zvířat po aplikaci Pam2 vykazovaly vyšší hladinu intracelulárního TNF- $\alpha$ , což může souviset s aktivací TLR2/6 (Buwitt-Beckmann et al., 2005; Palma et al., 2009). Narozdíl od CD45<sup>+</sup> buněk jsme překvapivě detekovali tendenci k poklesu populace TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma$ δT lymfocytů. Pokles v produkci některých cytokinů, může souviset se změnou celkového fenotypu zvířat po aplikaci Pam2. Je zajímavé, že po kultivaci *in vitro* došlo pouze ke změně v populaci TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma$ δT lymfocytů, nikoliv však IL-17<sup>+</sup>  $\gamma$ δT lymfocytů. Rozdíl v populacích  $\gamma$ δT lymfocytů produkujících IL-17 a TNF- $\alpha$  by bylo vhodné dále prozkoumat.

Vzhledem k epidemiologické situaci bohužel nebylo možné v části II stanovit produkci cytokinů pomocí ELISA testů, ani stanovit relativní expresi TLR2 a TLR4 pomocí metody Western blot. Tato měření by však mohla pomoci vysvětlit některé ze změn, které jsme po aplikaci Pam2 pozorovali. Proto budou tato měření provedena v budoucnu.

Výsledky části II byly získané z jednoho pokusu. I když byl počet zvířat dostatečný (6 potkanů), měl by být pokus zopakován. Použitý kmen Wistar je outbrední. Protože se jedná o geneticky variabilní jednice, navzájem se liší v řadě imunitních parametrů i imunitní odpovědi. Tato skutečnost tak do značné míry ovlivňuje získané výsledky a jejich statistickou signifikanci.

Změny v zastoupení imunitních populací, které jsme zaznamenali během krátkodobého působení chladu se týkaly především aktivace buněk. U zvířat vystavených 14 dní chlad, tedy po chladové adaptaci byl zaznamenán nárůst zastoupení  $\gamma$ δT lymfocytů. Zvýšenou hladinu jejich cytokinů IL-17 a TNF- $\alpha$ , které jsou spojovány s chladovou adaptací, jsme detekovali po jednom dni v chladu. Zdá se, že tyto cytokiny mohou být důležité pro nastartování tvorby BAT v našem modelu.  $\gamma$ δT lymfocyty jsou v BAT hojně zastoupeny (LaMarche et al., 2018). Z výsledků Daniela Vaška vyplývá, že v BAT během chladového stresu dochází k tvorbě řady cytokinů, jako je IL-4, IL-6, nebo TNF- $\alpha$ , které hrají roli v procesu

adaptivní termogeneze (García et al., 2018; Kohlgruber et al., 2018). Je pravděpodobné, že tyto změny jsou systémové. U zvířat, kterým byl aplikován Pam2 jsme pozorovali pokles zastoupení  $\gamma\delta$ T lymfocytů a také pokles zastoupení  $\gamma\delta$ T lymfocytů pozitivních na IL-17, nebo TNF- $\alpha$ . Zároveň bylo zaznamenáno snížení produkce IL-4, IL-6 a TNF- $\alpha$  v BAT (výsledky Daniela Vaška) (obr. 27). Otázkou zůstává, zda jsou  $\gamma\delta$ T lymfocyt ovlivněny první a poté modulují produkci cytokinů v BAT, nebo musí být nejprve stimulovány přítomností cytokinů v BAT. Některé získané výsledky naznačují, že během chladové adaptace dochází ke změnám, které mohou ovlivnit průběh infekce. Toto bylo pozorováno například na nárůstu aktivovaných B lymfocytů a myeloidních buněk po kultivaci, nebo tendenci ke změnám v expresi TLR2 s TLR4.



**Obrázek 27 – Námi předpokládaný mechanismus vlivu  $\gamma\delta$ T lymfocytů na termogenezi.** Předpokládaný mechanismus vlivu  $\gamma\delta$ T lymfocytů na termogenezi za fyziologických podmínek (27A) a během infekce (27B).



## 7. Závěr

- Zaznamenali jsme zlepšení přežívání splenocytů izolovaných ze zvířat dlouhodobě vystavených chladu.
- **V části I**, ve které byl sledován vliv působení chladu na odpověď splenocytů po *in vitro* stimulaci třemi různými ligandy TLR jsme pozorovali nárůst relativního zastoupení B lymfocytů a populace CD11b/c<sup>hi</sup> po krátkodobém působení chladu a stimulaci Pam2. Došlo také k nárůstu relativního zastoupení aktivovaných B lymfocytů a myeloidních buněk po krátkodobém působení chladu. K nejvýraznějším změnám došlo v populaci  $\gamma\delta$ T lymfocytů, jejichž relativní zastoupení vzrostlo po stimulaci I:C a Pam2 po dlouhodobém vystavení chladu.
- Byla pozorována tendence k tvorbě prozánětlivých cytokinů po jednom dni v chladu a naopak tendence k tvorbě protizánětlivého prostředí po 14 dnech chladové adaptace.
- Detekovali jsme zvýšení exprese TLR2 ve slezině po chladovém stresu. Zjistili jsme také tendenci ke zvýšení exprese TLR2 po stimulaci Pam2 a TLR4 po stimulaci LPS u splenocytů získaných z dlouhodobě adaptovaných zvířat poukazující na protektivní vliv chladové adaptace.
- **V části II** jsme sledovali, zda změna fenotypu splenocytů navozená krátkodobým chladovým stresem a chladovou adaptací bude modulován podáním ligandu TLR2/6 potkanům jeden den před koncem vystavení chladu. Byl zaznamenán výrazný nárůst relativního zastoupení myeloidních buněk, zejména ve skupině krátkodobě vystavené chladu. V modelu, kdy byl potkanům podán Pam2 a potom byli vystaveni 1 den chladu, jsme detekovali pokles IL-17<sup>+</sup> a TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T lymfocytů, který může přispívat k atenuaci adaptivní termogeneze.
- Po kultivaci splenocytů s ligandy TLR jsme pozorovali zvýšení zastoupení aktivovaných B lymfocytů a myeloidních buněk po chladové adaptaci, které může souviset se změnami, které se projeví až během infekce.

## 8. Seznam použité literatury

- Abram, Q. H., Dixon, B., and Katzenback, B. A. (2017). Impacts of low temperature on the teleost immune system. *Biology (Basel)*. 6. doi:10.3390/biology6040039.
- Aldiss, P., Betts, J., Sale, C., Pope, M., Budge, H., and Symonds, M. E. (2018). Exercise-induced 'browning' of adipose tissues. *Metabolism* 81, 63–70. doi:10.1016/j.metabol.2017.11.009.
- Altshuler-Keylin, S., Shinoda, K., Hasegawa, Y., Ikeda, K., Hong, H., Kang, Q., et al. (2016). Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab.* 24, 402–419. doi:10.1016/j.cmet.2016.08.002.
- Appleton, J. (2018). The Gut-Brain Axis: Influence of Microbiota on Mood and Mental Health. *Integr. Med. (Encinitas)*. 17, 28–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31043907>.
- Araujo, L. P., Maricato, J. T., Guerreschi, M. G., Takenaka, M. C., Nascimento, V. M., de Melo, F. M., et al. (2019). The Sympathetic Nervous System Mitigates CNS Autoimmunity via  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Signaling in Immune Cells. *Cell Rep.* 28, 3120–3130.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.08.042.
- Artemniak-Wojtowicz, D., Kucharska, A., and Pyrzak, B. (2020). Obesity and chronic inflammation crosslinking. *Cent. Eur. J. Immunol.* 45, 461–468. doi:10.5114/ceji.2020.103418.
- Audi, A., Allbrahim, M., Kaddoura, M., Hijazi, G., Yassine, H. M., and Zaraket, H. (2020). Seasonality of Respiratory Viral Infections: Will COVID-19 Follow Suit? *Front. Public Heal.* 8. doi:10.3389/fpubh.2020.567184.
- Bae, J., Ricciardi, C. J., Esposito, D., Komarnytsky, S., Hu, P., Curry, B. J., et al. (2014). Activation of pattern recognition receptors in brown adipocytes induces inflammation and suppresses uncoupling protein 1 expression and mitochondrial respiration. *Am. J. Physiol. Physiol.* 306, C918–C930. doi:10.1152/ajpcell.00249.2013.
- 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. doi:10.1093/femspd/ftx045.
- Bellavance, M.-A., and Rivest, S. (2014). The HPA – immune axis and the immunomodulatory actions of glucocorticoids in the brain. *Front. Immunol.* 5, 1–13. doi:10.3389/fimmu.2014.00136.
- Boulet, N., Luijten, I. H. ., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2021). Thermogenic recruitment of brown and brite/beige adipose tissues is not obligatorily associated with macrophage accretion or attrition. *Am. J. Physiol. Metab.* 320, E359–E378. doi:10.1152/ajpendo.00352.2020.
- Bradley, P. W., Brawner, M. D., Raffel, T. R., Rohr, J. R., Olson, D. H., and Blaustein, A. R. (2019). Shifts in temperature influence how *Batrachochytrium dendrobatidis* infects amphibian larvae. *PLoS One* 14, e0222237. doi:10.1371/journal.pone.0222237.
- Brazaitis, M., Eimantas, N., Daniuseviciute, L., Baranauskiene, N., Skrodeniene, E., and Skurvydas, A. (2014). Time Course of Physiological and Psychological Responses in Humans during a 20-Day Severe-Cold–Acclimation Programme. *PLoS One* 9, e94698. doi:10.1371/journal.pone.0094698.
- Brestoff, J. R., Kim, B. S., Saenz, S. A., Stine, R. R., Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., et al. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* 519, 242–246. doi:10.1038/nature14115.
- Brinkman, N. E., Fout, G. S., and Keely, S. P. (2017). Retrospective Surveillance of Wastewater To

- Examine Seasonal Dynamics of Enterovirus Infections. *mSphere* 2, 1–16. doi:10.1128/msphere.00099-17.
- Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Brock, R., Akira, S., et al. (2005). Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur. J. Immunol.* 35, 282–289. doi:10.1002/eji.200424955.
- Cao, W., Huang, H., Xia, T., Liu, C., Muhammad, S., and Sun, C. (2018). Homeobox a5 Promotes White Adipose Tissue Browning Through Inhibition of the Tenascin C/Toll-Like Receptor 4/Nuclear Factor Kappa B Inflammatory Signaling in Mice. *Front. Immunol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fimmu.2018.00647.
- Cereijo, R., Gavaldà-Navarro, A., Cairó, M., Quesada-López, T., Villarroya, J., Morón-Ros, S., et al. (2018). CXCL14, a Brown Adipokine that Mediates Brown-Fat-to-Macrophage Communication in Thermogenic Adaptation. *Cell Metab.* 28, 750-763.e6. doi:10.1016/j.cmet.2018.07.015.
- Chadha, M., Hirve, S., Bancej, C., Barr, I., Baumeister, E., Caetano, B., et al. (2020). Human respiratory syncytial virus and influenza seasonality patterns—Early findings from the WHO global respiratory syncytial virus surveillance. *Influenza Other Respi. Viruses* 14, 638–646. doi:10.1111/irv.12726.
- Chan, A. J., Alikhan, M. A., Odobasic, D., Gan, P. Y., Khouri, M. B., Steinmetz, O. M., et al. (2014). Innate IL-17A–Producing Leukocytes Promote Acute Kidney Injury via Inflammasome and Toll-Like Receptor Activation. *Am. J. Pathol.* 184, 1411–1418. doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.023.
- Chan, G. C.-F., Chan, W. K., and Sze, D. M.-Y. (2009). The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* 2, 25. doi:10.1186/1756-8722-2-25.
- Chan, H., Huang, H.-S., Sun, D.-S., Lee, C.-J., Lien, T.-S., and Chang, H.-H. (2018). TRPM8 and RAAS-mediated hypertension is critical for cold-induced immunosuppression in mice. *Oncotarget* 9, 12781–12795. doi:10.18632/oncotarget.24356.
- Cheshire, W. P. (2016). Thermoregulatory disorders and illness related to heat and cold stress. *Auton. Neurosci.* 196, 91–104. doi:10.1016/j.autneu.2016.01.001.
- Cong, P., Liu, Y., Liu, N., Zhang, Y., Tong, C., Shi, L., et al. (2018). Cold exposure induced oxidative stress and apoptosis in the myocardium by inhibiting the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *BMC Cardiovasc. Disord.* 18, 36. doi:10.1186/s12872-018-0748-x.
- Costa, M. F. de S., de Souza-Martins, R., de Souza, M. C., Benjamim, C. F., Piva, B., Diaz, B. L., et al. (2010). Leukotriene B<sub>4</sub> mediates  $\gamma\delta$  T lymphocyte migration in response to diverse stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 87, 323–332. doi:10.1189/jlb.0809563.
- Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Elía, E. F., Kessler, S. H., Kahn, P. A., et al. (2015). Activation of Human Brown Adipose Tissue by a  $\beta$ 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Cell Metab.* 21, 33–38. doi:10.1016/j.cmet.2014.12.009.
- Deetz, C. O., Hebbeler, A. M., Propp, N. A., Cairo, C., Tikhonov, I., and Pauza, C. D. (2006). Gamma Interferon Secretion by Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T Cells after Stimulation with Antibody against the T-Cell Receptor plus the Toll-Like Receptor 2 Agonist Pam3Cys. *Infect. Immun.* 74, 4505–4511. doi:10.1128/IAI.00088-06.
- Demir, G., Klein, H. O., Mandel-Molinas, N., and Tuzuner, N. (2007). Beta glucan induces proliferation and activation of monocytes in peripheral blood of patients with advanced breast cancer. *Int. Immunopharmacol.* 7, 113–116. doi:10.1016/j.intimp.2006.08.011.
- Dhaka, A., Murray, A. N., Mathur, J., Earley, T. J., Petrus, M. J., and Patapoutian, A. (2007). TRPM8 Is

- Required for Cold Sensation in Mice. *Neuron* 54, 371–378. doi:10.1016/j.neuron.2007.02.024.
- Ecoeur, F., Weiss, J., Schleegeer, S., and Guntermann, C. (2020). Lack of evidence for expression and function of IL-39 in human immune cells. *PLoS One* 15, e0242329. doi:10.1371/journal.pone.0242329.
- Egecioglu, E., Anesten, F., Schéle, E., and Palsdottir, V. (2018). Interleukin-6 is important for regulation of core body temperature during long-term cold exposure in mice. *Biomed. Reports* 9, 206–212. doi:10.3892/br.2018.1118.
- Etogo, A. O., Nunez, J., Lin, C. Y., Toliver-Kinsky, T. E., and Sherwood, E. R. (2008). NK but Not CD1-Restricted NKT Cells Facilitate Systemic Inflammation during Polymicrobial Intra-Abdominal Sepsis. *J. Immunol.* 180, 6334–6345. doi:10.4049/jimmunol.180.9.6334.
- Fabbiano, S., Suárez-Zamorano, N., Rigo, D., Veyrat-Durebex, C., Stevanovic Dokic, A., Colin, D. J., et al. (2016). Caloric Restriction Leads to Browning of White Adipose Tissue through Type 2 Immune Signaling. *Cell Metab.* 24, 434–446. doi:10.1016/j.cmet.2016.07.023.
- Fischer, K., Ruiz, H. H., Jhun, K., Finan, B., Oberlin, D. J., van der Heide, V., et al. (2017). Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat. Med.* 23, 623–630. doi:10.1038/nm.4316.
- Foxman, E. F., Storer, J. A., Fitzgerald, M. E., Wasik, B. R., Hou, L., Zhao, H., et al. (2015). Temperature-dependent innate defense against the common cold virus limits viral replication at warm temperature in mouse airway cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 827–832. doi:10.1073/pnas.1411030112.
- García, M., 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, 2569. doi:10.3390/ijms19092569.
- Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007). TLR Agonists Selectively Promote Terminal Plasma Cell Differentiation of B Cell Subsets Specialized in Thymus-Independent Responses. *J. Immunol.* 178, 7779–7786. doi:10.4049/jimmunol.178.12.7779.
- Gustafsson, K., Herrmann, T., and Dieli, F. (2020). Editorial: Understanding Gamma Delta T Cell Multifunctionality - Towards Immunotherapeutic Applications. *Front. Immunol.* 11, 1–4. doi:10.3389/fimmu.2020.00921.
- Haman, F., and Blondin, D. P. (2017). Shivering thermogenesis in humans: Origin, contribution and metabolic requirement. *Temperature* 4, 217–226. doi:10.1080/23328940.2017.1328999.
- Han, J., Meng, Q., Shen, L., and Wu, G. (2018). Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. *Lipids Health Dis.* 17, 14. doi:10.1186/s12944-018-0657-0.
- Heine, M., Fischer, A. W., Schlein, C., Jung, C., Straub, L. G., Gottschling, K., et al. (2018). Lipolysis Triggers a Systemic Insulin Response Essential for Efficient Energy Replenishment of Activated Brown Adipose Tissue in Mice. *Cell Metab.* 28, 644–655.e4. doi:10.1016/j.cmet.2018.06.020.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., et al. (2002). Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1–10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168, 4531–4537. doi:10.4049/jimmunol.168.9.4531.
- Hu, B., Jin, C., Zeng, X., Resch, J. M., Jedrychowski, M. P., Yang, Z., et al. (2020).  $\gamma\delta$  T cells and

- adipocyte IL-17RC control fat innervation and thermogenesis. *Nature* 578, 610–614. doi:10.1038/s41586-020-2028-z.
- Hu, G.-Z., Yang, S.-J., Hu, W.-X., Wen, Z., He, D., Zeng, L.-F., et al. (2016). Effect of cold stress on immunity in rats. *Exp. Ther. Med.* 11, 33–42. doi:10.3892/etm.2015.2854.
- Huang, Z., Zhong, L., Lee, J. T. H., Zhang, J., Wu, D., Geng, L., et al. (2017). The FGF21-CCL11 Axis Mediates Beiging of White Adipose Tissues by Coupling Sympathetic Nervous System to Type 2 Immunity. *Cell Metab.* 26, 493-508.e4. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.003.
- Ikäheimo, T., Jaakkola, K., Jokelainen, J., Saukkoriipi, A., Roivainen, M., Juvonen, R., et al. (2016). A Decrease in Temperature and Humidity Precedes Human Rhinovirus Infections in a Cold Climate. *Viruses* 8, 244. doi:10.3390/v8090244.
- Imamura, T., Ishizuka, O., and Nishizawa, O. (2013). Cold stress induces lower urinary tract symptoms. *Int. J. Urol.* 20, 661–669. doi:10.1111/iju.12129.
- Johnson, R. H., Kho, D. T., O’Carroll, S. J., Angel, C. E., and Graham, E. S. (2018). The functional and inflammatory response of brain endothelial cells to Toll-Like Receptor agonists. *Sci. Rep.* 8, 1–12. doi:10.1038/s41598-018-28518-3.
- Kawahara, T., Ohdan, H., Zhao, G., Yang, Y.-G., and Sykes, M. (2003). Peritoneal Cavity B Cells Are Precursors of Splenic IgM Natural Antibody-Producing Cells. *J. Immunol.* 171, 5406–5414. doi:10.4049/jimmunol.171.10.5406.
- Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 5, 1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
- Kim, K., Suzuki, K., Peake, J., Ahn, N., Ogawa, K., Hong, C., et al. (2014). Physiological and Leukocyte Subset Responses to Exercise and Cold Exposure in Cold-Acclimatized Skaters. *Biol. Sport* 31, 39–48. doi:10.5604/20831862.1086731.
- Kim, M., Goto, T., Yu, R., Uchida, K., Tominaga, M., Kano, Y., et al. (2016). Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci. Rep.* 5, 18013. doi:10.1038/srep18013.
- Kohlgruber, A. C., Gal-Oz, S. T., LaMarche, N. M., Shimazaki, M., Duquette, D., Koay, H.-F., et al. (2018).  $\gamma\delta$  T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. *Nat. Immunol.* 19, 464–474. doi:10.1038/s41590-018-0094-2.
- Kong, X., Liu, H., He, X., Sun, Y., and Ge, W. (2020). Unraveling the Mystery of Cold Stress-Induced Myocardial Injury. *Front. Physiol.* 11, 1–9. doi:10.3389/fphys.2020.580811.
- Kurokawa, K., Kim, M.-S., Ichikawa, R., Ryu, K.-H., Dohmae, N., Nakayama, H., et al. (2012). Environment-Mediated Accumulation of Diacyl Lipoproteins over Their Triacyl Counterparts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 194, 3299–3306. doi:10.1128/JB.00314-12.
- LaMarche, N. M., Kohlgruber, A. C., and Brenner, M. B. (2018). Innate T Cells Govern Adipose Tissue Biology. *J. Immunol.* 201, 1827–1834. doi:10.4049/jimmunol.1800556.
- Lee, M.-W., Odegaard, J. I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A. B., Nussbaum, J. C., et al. (2015). Activated Type 2 Innate Lymphoid Cells Regulate Beige Fat Biogenesis. *Cell* 160, 74–87. doi:10.1016/j.cell.2014.12.011.
- Lee, Y. H., Kim, S. N., Kwon, H. J., Maddipati, K. R., and Granneman, J. G. (2016). Adipogenic role of alternatively activated macrophages in  $\beta$ -adrenergic remodeling of white adipose tissue. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 310, R55–R65. doi:10.1152/ajpregu.00355.2015.

- Lettieri-Barbato, D., and Aquilano, K. (2020). Aging and Immunometabolic Adaptations to Thermogenesis. *Ageing Res. Rev.* 63, 101143. doi:10.1016/j.arr.2020.101143.
- Li, B., Li, L., Li, M., Lam, S. M., Wang, G., Wu, Y., et al. (2019). Microbiota Depletion Impairs Thermogenesis of Brown Adipose Tissue and Browning of White Adipose Tissue. *Cell Rep.* 26, 2720–2737.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.02.015.
- Lian, S., Guo, J., Wang, L., Li, W., Wang, J., Ji, H., et al. (2017). Impact of prenatal cold stress on placental physiology, inflammatory response, and apoptosis in rats. *Oncotarget* 8, 115304–115314. doi:10.18632/oncotarget.23257.
- Lian, S., Li, W., Wang, D., Xu, B., Guo, X., Yang, H., et al. (2020). Effects of prenatal cold stress on maternal serum metabolomics in rats. *Life Sci.* 246, 117432. doi:10.1016/j.lfs.2020.117432.
- Loof, T. G., Goldmann, O., and Medina, E. (2008). Immune Recognition of *Streptococcus pyogenes* by Dendritic Cells. *Infect. Immun.* 76, 2785–2792. doi:10.1128/IAI.01680-07.
- Lowen, A. C., Mubareka, S., Steel, J., and Palese, P. (2007). Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLoS Pathog.* 3, e151. doi:10.1371/journal.ppat.0030151.
- MacCannell, A. D. V., Sinclair, K. J., McKenzie, C. A., and Staples, J. F. (2019). Environmental temperature effects on adipose tissue growth in a hibernator. *J. Exp. Biol.* 222, jeb194548. doi:10.1242/jeb.194548.
- Macpherson, R. E. K., Huber, J. S., Frendo-Cumbo, S., Simpson, J. A., and Wright, D. C. (2015). Adipose Tissue Insulin Action and IL-6 Signaling after Exercise in Obese Mice. *Med. Sci. Sport. Exerc.* 47, 2034–2042. doi:10.1249/MSS.0000000000000660.
- Madden, C. J., and Morrison, S. F. (2019). Central nervous system circuits that control body temperature. *Neurosci. Lett.* 696, 225–232. doi:10.1016/j.neulet.2018.11.027.
- Mahlaköiv, T., Flamar, A.-L., Johnston, L. K., Moriyama, S., Putzel, G. G., Bryce, P. J., et al. (2019). Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33. *Sci. Immunol.* 4, eaax0416. doi:10.1126/sciimmunol.aax0416.
- Mancini, F., Rossi, O., Necchi, F., and Micoli, F. (2020). OMV Vaccines and the Role of TLR Agonists in Immune Response. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4416. doi:10.3390/ijms21124416.
- Mansson, A., Adner, M., and Cardell, L. O. (2006). Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir. Res.* 7, 36. doi:10.1186/1465-9921-7-36.
- Marongiu, L., Gornati, L., Artuso, I., Zanoni, I., and Granucci, F. (2019). Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9. *J. Leukoc. Biol.* 106, 147–160. doi:10.1002/JLB.3MIR1218-483RR.
- Martin, B., Hirota, K., Cua, D. J., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2009). Interleukin-17-Producing  $\gamma\delta$  T Cells Selectively Expand in Response to Pathogen Products and Environmental Signals. *Immunity* 31, 321–330. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.020.
- Medrikova, D., Sijmonsma, T. P., Sowodniok, K., Richards, D. M., Delacher, M., Sticht, C., et al. (2015). Brown Adipose Tissue Harbors a Distinct Sub-Population of Regulatory T Cells. *PLoS One* 10, e0118534. doi:10.1371/journal.pone.0118534.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397. doi:10.1038/41131.

- Mehta, P., Nuotio-Antar, A. M., and Smith, C. W. (2015).  $\gamma\delta$  T cells promote inflammation and insulin resistance during high fat diet-induced obesity in mice. *J. Leukoc. Biol.* 97, 121–134. doi:10.1189/jlb.3A0414-211RR.
- 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. doi:10.1002/bies.201400066.
- Miura, K., Ishioka, M., and Iijima, K. (2017). The Roles of the Gut Microbiota and Toll-like Receptors in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Obes. Metab. Syndr.* 26, 86–96. doi:10.7570/jomes.2017.26.2.86.
- Moresco, E. M. Y., LaVine, D., and Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Curr. Biol.* 21, R488–R493. doi:10.1016/j.cub.2011.05.039.
- Morilak, D. A., Barrera, G., Echevarria, D. J., Garcia, A. S., Hernandez, A., Ma, S., et al. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 29, 1214–1224. doi:10.1016/j.pnpbp.2005.08.007.
- Mutlu, G. M., and Factor, P. (2008). Alveolar Epithelial  $\beta$  2 -Adrenergic Receptors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38, 127–134. doi:10.1165/rcmb.2007-0198TR.
- Nagajyothi, F., Desruisseaux, M. S., Machado, F. S., Upadhy, R., Zhao, D., Schwartz, G. J., et al. (2012). Response of Adipose Tissue to Early Infection With *Trypanosoma cruzi* (Brazil Strain). *J. Infect. Dis.* 205, 830–840. doi:10.1093/infdis/jir840.
- Nguyen, A. D., Lee, N. J., Wee, N. K. Y., Zhang, L., Enriquez, R. F., Khor, E. C., et al. (2018). Uncoupling protein-1 is protective of bone mass under mild cold stress conditions. *Bone* 106, 167–178. doi:10.1016/j.bone.2015.05.037.
- Nishimura, M., and Naito, S. (2005). Tissue-Specific mRNA Expression Profiles of Human Toll-Like Receptors and Related Genes. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 886–892. doi:10.1248/bpb.28.886.
- Nord, A., Hegemann, A., and Folkow, L. P. (2020). Reduced immune responsiveness contributes to winter energy conservation in an Arctic bird. *J. Exp. Biol.* 223, 1–11. doi:10.1242/jeb.219287.
- Okla, M., Wang, W., Kang, I., Pashaj, A., Carr, T., and Chung, S. (2015). Activation of Toll-like Receptor 4 (TLR4) Attenuates Adaptive Thermogenesis via Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* 290, 26476–26490. doi:10.1074/jbc.M115.677724.
- Okla, M., Zaher, W., Alfayez, M., and Chung, S. (2018). Inhibitory Effects of Toll-Like Receptor 4, NLRP3 Inflammasome, and Interleukin-1 $\beta$  on White Adipocyte Browning. *Inflammation* 41, 626–642. doi:10.1007/s10753-017-0718-y.
- Palma, C., Iona, E., Ebensen, T., Guzman, C. A., and Cassone, A. (2009). The Toll-like Receptor 2/6 Ligand MALP-2 Reduces the Viability of *Mycobacterium tuberculosis* in Murine Macrophages. *Open Microbiol. J.* 3, 47–52. doi:10.2174/1874285800903010047.
- Papotto, P. H., and Silva-Santos, B. (2018). Got my  $\gamma\delta$ 17 T cells to keep me warm. *Nat. Immunol.* 19, 427–429. doi:10.1038/s41590-018-0090-6.
- Parcina, M., Miranda-Garcia, M. A., Durlanik, S., Ziegler, S., Over, B., Georg, P., et al. (2013). Pathogen-Triggered Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells Induces IL-10–Producing B Cells in Response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 190, 1591–1602. doi:10.4049/jimmunol.1201222.
- Park, J.-W., Kim, K.-H., Choi, J.-K., Park, T. S., Song, K.-D., and Cho, B.-W. (2020). Regulation of Toll-like receptors Expression in Muscle cells by Exercise-induced Stress. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*,

1–23. doi:10.5713/ab.20.0484.

- Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 285, 7153–7164. doi:10.1074/jbc.M109.053942.
- Pietschmann, K., Beetz, S., Welte, S., Martens, I., Gruen, J., Oberg, H.-H., et al. (2009). Toll-Like Receptor Expression and Function in Subsets of Human  $\gamma\delta$  T Lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 70, 245–255. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02290.x.
- Qiu, Y., Nguyen, K. D., Odegaard, J. I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R. M., et al. (2014). Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat. *Cell* 157, 1292–1308. doi:10.1016/j.cell.2014.03.066.
- Rao, R. R., Long, J. Z., White, J. P., Svensson, K. J., Lou, J., Lokurkar, I., et al. (2014). Meteorin-like Is a Hormone that Regulates Immune-Adipose Interactions to Increase Beige Fat Thermogenesis. *Cell* 157, 1279–1291. doi:10.1016/j.cell.2014.03.065.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 588–593. doi:10.1073/pnas.95.2.588.
- Rubtsov, A. V., Swanson, C. L., Troy, S., Strauch, P., Pelanda, R., and Torres, R. M. (2008). TLR Agonists Promote Marginal Zone B Cell Activation and Facilitate T-Dependent IgM Responses. *J. Immunol.* 180, 3882–3888. doi:10.4049/jimmunol.180.6.3882.
- Sakamoto, T., Nitta, T., Maruno, K., Yeh, Y.-S., Kuwata, H., Tomita, K., et al. (2016). Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. *Am. J. Physiol. Metab.* 310, E676–E687. doi:10.1152/ajpendo.00028.2015.
- 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. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.10.009.
- Sandig, H., and Bulfone-Paus, S. (2012). TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Front. Immunol.* 3, 1–13. doi:10.3389/fimmu.2012.00185.
- Savva, A., and Roger, T. (2013). Targeting Toll-Like Receptors: Promising Therapeutic Strategies for the Management of Sepsis-Associated Pathology and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00387.
- Sayi, A., Kohler, E., Toller, I. M., Flavell, R. A., Müller, W., Roers, A., et al. (2011). TLR-2-Activated B Cells Suppress Helicobacter -Induced Preneoplastic Gastric Immunopathology by Inducing T Regulatory-1 Cells. *J. Immunol.* 186, 878–890. doi:10.4049/jimmunol.1002269.
- Sindhu, S., Thomas, R., Kochumon, S., Wilson, A., Abu-Farha, M., Bennakhi, A., et al. (2019). Increased Adipose Tissue Expression of Interferon Regulatory Factor (IRF)-5 in Obesity: Association with Metabolic Inflammation. *Cells* 8. doi:10.3390/cells8111418.
- Skabytska, Y., Wölbing, F., Günther, C., Köberle, M., Kaesler, S., Chen, K.-M., et al. (2014). Cutaneous Innate Immune Sensing of Toll-like Receptor 2-6 Ligands Suppresses T Cell Immunity by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Immunity* 41, 762–775. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.009.
- Tan, C. L., and Knight, Z. A. (2018). Regulation of Body Temperature by the Nervous System. *Neuron* 98, 31–48. doi:10.1016/j.neuron.2018.02.022.
- Tansey, E. A., and Johnson, C. D. (2015). Recent advances in thermoregulation. *Adv. Physiol. Educ.* 39,



- 139–148. doi:10.1152/advan.00126.2014.
- Ullah, M. O., Sweet, M. J., Mansell, A., Kellie, S., and Kobe, B. (2016). TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *J. Leukoc. Biol.* 100, 27–45. doi:10.1189/jlb.2ri1115-531r.
- 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. doi:10.1515/enr-2016-0015.
- Villarroya, F., Cereijo, R., Gavaldà-Navarro, A., Villarroya, J., and Giralto, M. (2018). Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *J. Intern. Med.* 284, 492–504. doi:10.1111/joim.12803.
- Wang, J. Q., Jeelall, Y. S., Ferguson, L. L., and Horikawa, K. (2014a). Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front. Immunol.* 5, 1–10. doi:10.3389/fimmu.2014.00367.
- Wang, N., Liang, H., and Zen, K. (2014b). Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Front. Immunol.* 5, 1–9. doi:10.3389/fimmu.2014.00614.
- Wang, X.-P., Yu, X., Yan, X.-J., Lei, F., Chai, Y.-S., Jiang, J.-F., et al. (2017). TRPM8 in the negative regulation of TNF $\alpha$  expression during cold stress. *Sci. Rep.* 7, 45155. doi:10.1038/srep45155.
- Wang, X., Che, H., Zhang, W., Wang, J., Ke, T., Cao, R., et al. (2015). Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 1171–1180. doi:10.7150/ijbs.12161.
- Wei, H., Zhang, R., Su, Y., Bi, Y., Li, X., Zhang, X., et al. (2018). Effects of acute cold stress after long-term cold stimulation on antioxidant status, heat shock proteins, inflammation and immune cytokines in broiler heart. *Front. Physiol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fphys.2018.01589.
- Weller, P. F., and Spencer, L. A. (2017). Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 746–760. doi:10.1038/nri.2017.95.
- Wesch, D., Beetz, S., Oberg, H.-H., Marget, M., Kregel, K., and Kabelitz, D. (2006). Direct Costimulatory Effect of TLR3 Ligand Poly(I:C) on Human  $\gamma\delta$  T Lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 1348–1354. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1348.
- Willemsen, L., Neele, A. E., van der Velden, S., Prange, K. H. M., den Toom, M., van Roomen, C. P. A. A., et al. (2019). Peritoneal macrophages have an impaired immune response in obesity which can be reversed by subsequent weight loss. *BMJ Open Diabetes Res. Care* 7, e000751. doi:10.1136/bmjdr-2019-000751.
- Wolf, Y., Boura-Halfon, S., Cortese, N., Haimon, Z., Sar Shalom, H., Kuperman, Y., et al. (2017). Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure. *Nat. Immunol.* 18, 665–674. doi:10.1038/ni.3746.
- Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., et al. (2014). Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* 40, 274–288. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.006.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., et al. (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324–329. doi:10.1038/nature01182.
- Yang, L., Li, L., Lewington, S., Guo, Y., Sherliker, P., Bian, Z., et al. (2015). Outdoor temperature, blood pressure, and cardiovascular disease mortality among 23 000 individuals with diagnosed cardiovascular diseases from China. *Eur. Heart J.* 36, 1178–1185. doi:10.1093/eurheartj/ehv023.

- Yau, W. W., and Yen, P. M. (2020). Thermogenesis in adipose tissue activated by thyroid hormone. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi:10.3390/ijms21083020.
- Yeh, D.-W., Huang, L.-R., Chen, Y.-W., Huang, C.-Y. F., and Chuang, T.-H. (2016). Interplay between Inflammation and Stemness in Cancer Cells: The Role of Toll-Like Receptor Signaling. *J. Immunol. Res.* 2016, 1–14. doi:10.1155/2016/4368101.
- Yildirim, N. C., and Yurekli, M. (2010). The effect of adrenomedullin and cold stress on interleukin-6 levels in some rat tissues. *Clin. Exp. Immunol.* 161, no-no. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04156.x.
- Yoon, J., Um, H. N., Jang, J., Bae, Y. A., Park, W. J., Kim, H. J., et al. (2019). Eosinophil Activation by Toll-Like Receptor 4 Ligands Regulates Macrophage Polarization. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fcell.2019.00329.
- Zeng, W., Pirzgalska, R. M., Pereira, M. M. A., Kubasova, N., Barateiro, A., Seixas, E., et al. (2015). Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis. *Cell* 163, 84–94. doi:10.1016/j.cell.2015.08.055.

## 9. Další použité zdroje:

TLR2 RNA single cell type specificity, proteinatlas.org [online databáze], Aktualizováno: 24.2.2021, citováno: 18.4.2021, Dostupné z:

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000137462-TLR2/celltype>

TLR3 cell type Flow sorted data, proteinatlas.org [online databáze], Aktualizováno: 24.2.2021, citováno: 19.4.2021, Dostupné z:

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000164342-TLR3/celltype>

TLR6 RNA single cell type specificity, proteinatlas.org [online databáze], Aktualizováno: 24.2.2021, citováno: 18.4.2021, Dostupné z:

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000174130-TLR6/celltype>