

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Radka Císařová

Vliv obezity na funkci imunitního systému se zaměřením na NK buňky
The impact of obesity on the immune system with a focus on NK cells

Bakalářská práce

RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2017

Velké poděkování patří mé školitelce RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. za odborné rady a velmi pohotové jednání. Dále bych chtěla poděkovat svému otci Zdeňku Císařovi za podporu a trpělivost a kamarádce Johaně Sobotkové za chápavost projevenou „rádiovým mlčením“.

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, 15.05.2017

Radka Císařová

Abstrakt

Obezita má negativní důsledky na zdraví lidí a v dnešní době se rozmáhá i v rozvojových zemích. Za příčinu negativního vlivu obezity se považuje chronický zánět vznikající ve viscerální tukové tkáni. Nejvýznamnější změnou ve viscerální tukové tkáni, z hlediska rozvoje zánětu, je indukce M1 fenotypu makrofágů a jejich následná akumulace. Nicméně prvotní impuls, který vede k těmto změnám je nejednoznačný. Za jednu z možností se považuje i změna fenotypu a aktivace NK buněk. Obezita narušuje hlavní funkci NK buněk spočívající v lýzi virem infikovaných nebo rakovinových buněk. Leptin, jehož množství je při obezitě chronicky zvýšeno, má na NK buňky dvojí efekt. Krátkodobé působení leptinu zvyšuje jejich cytotoxicitu a naopak dlouhodobé působení ji snižuje. Současné studie fenotypu NK buněk ve viscerální tukové tkáni poukazují na zvýšenou produkci INF- γ a expresi NKG2D v NK buňkách. Studium NK buněk v kontextu obezity a hlavně v kontextu viscerální tukové tkáně obézních jedinců je důležité pro pochopení negativních účinků obezity.

Klíčová slova

Obezita, viscerální tuková tkáň, M1 makrofágy, NK buňky, fenotyp, leptin, cytotoxicita, INF- γ

Abstract

Obesity is expanding rapidly even in developing countries and has negative effect on human health. The emerging low-grade chronic inflammation of visceral adipose tissue is generally accepted as the cause of this negative effect. The most important factor in the inflammation development is the induction of inflammatory phenotype of macrophages and their subsequent accumulation in visceral adipose tissue. The first impulse for these changes is ambiguous but can be associated with changes in phenotype and activation status of NK cells. NK cell mediated cytotoxicity against viral infected or cancer cells is impaired by obesity. Leptin level is chronically elevated in obesity and has the counter effects on NK cells. Short-term leptin exposure causes lower cytotoxicity of NK cells but long-term leptin exposure has opposite effect. The few studies about phenotype of NK cells in visceral adipose tissue during obesity point on higher production of INF- γ and expression of NKG2D by NK cells. Further studies of NK cell phenotype in the context of obesity and in particularly in the context of visceral adipose tissue of obese subjects are important for understanding the negative effect of obesity.

Keywords

Obesity, visceral adipose tissue, M1 macrophages, NK cells, phenotype, leptin, cytotoxicity, INF- γ

Obsah

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
1 SEZNAM ZKRATEK	6
2 ÚVOD	7
3 ZMĚNY V TUKOVÉ TKÁNI V DŮSLEDKU OBEZITY	9
3.1 ZMĚNY ADIPOCYTŮ	9
3.2 ZMĚNY BUNĚK IMUNITNÍHO SYSTÉMU	11
3.2.1 MAKROFÁGY	11
3.2.2 NEUTROFILY	13
3.2.3 T LYMFOCYTY	13
4 INZULINOVÁ REZISTENCE	14
5 ZMĚNA FENOTYPU NK BUNĚK	16
5.1 NK BUŇKY	16
5.2 ZMĚNA FENOTYPU NK BUNĚK PŘI OBEZITĚ	18
5.2.1 ZMĚNA NK BUNĚK V KRVÍ	19
5.2.1.1 Změna v počtu jednotlivých populací NK buněk v krvi	19
5.2.1.2 Změny fenotypu NK buněk v krvi	20
5.2.1.3 Ovlivnění cytotoxicity NK buněk	22
5.2.1.4 Vliv leptinu na fenotyp a funkčnost NK buněk z krve	22
5.2.1.5 Obnovení fenotypu a funkce NK buněk po návratu obézních jedinců k štíhlému metabolickému fenotypu	23
5.2.2 ZMĚNA NK BUNĚK VE VISCERÁLNÍ TUKOVÉ TKÁNI	24
5.2.2.1 Změna v počtu jednotlivých populací NK buněk ve VAT	24
5.2.2.2 Změny fenotypu NK buněk ve viscerální tukové tkáni	25
5.3 DALŠÍ FAKTORY, KTERÉ BY MOHLY OVLIVŇOVAT FUNKCI NK BUNĚK PŘI OBEZITĚ	26
6 ZÁVĚR	27
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	29

1 Seznam zkratek

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
BMI	index tělesné hmotnosti
CD	diferenciační skupina
CLS	korunám podobné struktury
FFA	volné mastné kyseliny
HFD	dieta s vysokým obsahem tuku
IRS	substrát inzulinového receptoru
KIRs	imunoglobulinu podobné receptory zabíjecích buněk
NCRs	receptory přirozené cytotoxicity
NK buňky	přirození zabijáci
SVF	stromální vaskulární frakce
TLR	receptor podobný genu Toll
Treg	T regulační lymfocyty
VAT	viscerální tuková tkáň
WAT	bílá tuková tkáň
WHO	Světová zdravotnická organizace

2 Úvod

Obezita je velmi častá ve vyspělých zemích, kde je potrava velmi snadno k dostání. Nicméně v posledních letech se podle Světové zdravotnické organizace (WHO = World Health Organisation) velmi rozmáhá i v zemích rozvojových. V dřívějších dobách, kdy si lidé museli jídlo obstarávat vlastní fyzickou námahou, docházelo k obezitě velmi zřídka. Nicméně rozvoj techniky a postupná automatizace vede ke změně stylu života a člověk už nemusí vynaložit téměř žádné úsilí k získání potravy. Když se k tomu připočte ještě sedavé zaměstnání, velmi snadno denní příjem energie překročí denní výdej energie.

Naše těla ukládají přebytečnou energii převážně v podobě tuku a v případě potřeby ji zase z tuků uvolní. Pokud ale bude v dlouhodobém horizontu převažovat přísun energie, dojde nejdříve k nadváze a poté k obezitě jedince. Podle WHO je za nadváhu považován index tělesné hmotnosti (BMI = body mass index) vyšší nebo roven 25 kg/m^2 a za obezitu vyšší nebo roven 30 kg/m^2 (<http://www.who.int/topics/obesity/en/>). Existují ještě další ukazatele nadváhy, ale stejně jako BMI se jedná pouze o orientační zhodnocení. Nicméně víme, že při nadměrném procentuálním obsahu tuku v těle, dochází v organismu ke změnám, za účelem zachování homeostáze.

Největší změny se při obezitě odehrávají v tukové tkáni, která se snaží uskladnit přebytečnou energii a je tudíž nucena k velké objemové expanzi. Postupně s rostoucími tukovými zásobami dochází k různým odchylkám od funkce a tvaru tukové tkáně za štíhlého stavu. Tyto odchylky se týkají morfologie, fyziologie, ale i jednotlivých buněčných složek imunitního systému. Probíhající změny ovlivňují lokální prostředí tukové tkáně i celý organismus.

Zdá se, že k nejvýznamnějším dějům ve spojení s obezitou dochází ve viscerální tukové tkáni. Původní prostředí viscerální tukové tkáně je udržováno protizánětlivými imunitními buňkami, ale v důsledku progresu obezity se toto prostředí mění. Poměrně brzy s přebytečným přísunem energie dochází k infiltraci prozánětlivých imunitních buněk, které se výrazně podílí na utváření prostředí tukové tkáně. A právě tento přechod z protizánětlivého k prozánětlivému prostředí způsobuje zdravotní komplikace, jako je například inzulinová rezistence (Lee et al. 2011).

Obezita je spojována s mnoha dalšími zdravotními riziky. Mezi nejznámější patří diabetes druhého typu, ale dále by se dalo vyjmenovat například vysoký krevní tlak, větší náchylnost k infekcím, dyslipidémie, z níž se může vyvinout ateroskleróza, rakovina, artritida nebo nealkoholická steatohepatitida (Haslam et al. 2005).

Cílem této práce je studium vlivu obezity na funkci imunitního systému. Konkrétně je zaměřena na změnu fenotypu a funkce NK buněk u obézních jedinců oproti štíhlým a možnému vlivu NK buněk na chronický zánět, který při obezitě vzniká.

3 Změny v tukové tkáni v důsledku obezity

Tuková tkáň se přizpůsobuje zvýšeným nárokům na uskladnění přebytečné energie. U myši jsou patrné změny tukové tkáně již po 3 dnech diety s vysokým obsahem tuku (HFD = high fat diet). Roste váha viscerální tukové tkáně a velikost adipocytů, mění se procentuální zastoupení imunitních buněk v tukové tkáni a exprese genů. Tyto a další události vedou k rozvoji zánětu nejdříve v tukové tkáni, později i v celém organismu a ústí v systémovou inzulinovou rezistenci (Lee et al. 2011).

Tuková tkáň se skládá z adipocytů a stromální vaskulární frakce (SVF = stromal vascular fraction), v které se nacházejí mezenchymální kmenové buňky, preadipocyty, endoteliální prekurzorové buňky a imunitní buňky (Riordan et al. 2009). Podle fyziologické funkce se tuková tkáň rozlišuje na dva typy; bílou tukovou tkáň (WAT = white adipose tissue) a hnědou tukovou tkáň. Hlavní funkce hnědé tukové tkáně je termogeneze, kdežto WAT skladuje přebytečnou energii v adipocytech ve formě triglyceridů. Dále lze tukovou tkáň rozdělit podle anatomického umístění v organismu. Ve spojení s obezitou je nejvíce prozkoumaná podkožní tuková tkáň a jednotlivé části viscerální tukové tkáně (VAT = visceral adipose tissue) (Liechocki et al. 2017).

Probíhající změny ve VAT se týkají převážně adipocytů a imunitních buněk. Adipocyty podléhají hypertrofii, hyperplazii a mění svůj fenotyp. Co se týče imunitních buněk, většina změn nastává v zastoupení jejich jednotlivých populací (Apostolopoulos et al. 2016).

3.1 Změny adipocytů

V první fázi, po začátku podávání HFD myším, dochází k zvětšování tukové hmoty převážně hypertrofií a až po 4 týdnech HFD hyperplazií adipocytů (Jeffery et al. 2015, Wang et al. 2013; cit. dle Wensveen et al. 2015). Problémy spojené s obezitou způsobuje spíše hypertrofie než hyperplazie adipocytů (Cotillard et al. 2014). Hypertrofované adipocyty vykazují například znaky buněčného stresu, větší produkci volných kyslíkových radikálů, aktivaci NLRP3 inflamazomu (Giordano et al. 2013) a sníženou expresi CD1d, což by mohlo souviset s poklesem iNKT buněk v tukové tkáni (Huh et al. 2013).

Mezi další problémové faktory spojené s rostoucí hmotou WAT je hypoxie, která vzniká rychlou expanzí tukové tkáně a zároveň nedostatečnou rychlostí angiogeneze. Kvůli přizpůsobení hypoxickým podmínkám dochází k akumulaci transkripčního faktoru HIF-1 a tím k zvýšené transkripci cílových genů. Dále je hypoxie spojována se zvýšenou infiltrací makrofágů do tukové tkáně, které zde zvýší produkci prozánětlivých cytokinů, a podílí se na diferenciaci T lymfocytů na T regulační a Th17 fenotyp (Johnson et al. 2012).

Adipocyty mohou fungovat jako antigen prezentující buňky pro T lymfocyty. Již kolem 2 týdnů po začátku HFD je na povrchu adipocytů zvýšena exprese genů z rodiny MHC II a kostimulačních molekul CD80 a CD86 (Deng et al. 2013). Lidské adipocyty produkují prozánětlivé cytokiny a jsou schopné aktivovat T lymfocyty *in vitro*; indukují proliferaci CD3⁺, CD4⁺ a CD8⁺ buněčných populací T lymfocytů. Proliferace T lymfocytů není indukována pouze médiem z kultury adipocytů, což naznačuje nutnost mezibuněčného kontaktu pro aktivaci T lymfocytů (Poloni et al. 2015).

Bílá tuková tkáň má mimo zásobní a izolační funkce také funkci endokrinní. Je z ní uvolňováno značné množství cytokinů a adipokinů (neboli adipocytokinů), které ovlivňují homeostázi organismu. Mohou mít protizánětlivé nebo prozánětlivé účinky, ale při obezitě zapříčiňují převážně prozánětlivé procesy, jež vedou k inzulinové rezistenci a dalším problémům spojeným s metabolismem. Adipokiny ale nejsou sekretovány pouze adipocyty, ale i jinými buňkami, které se v tukové tkáni nacházejí, jako jsou například makrofágy (Ouchi et al. 2011).

Adiponectin je asi nejvíce prozkoumaný protizánětlivý adipokin. Je produkován převážně adipocyty v tukové tkáni štíhlých jedinců a s rostoucí obezitou jeho produkce klesá. Protizánětlivé účinky adiponectinu spočívají především v indukci produkce IL-10 a IL-1Ra populací M2 makrofágů a inhibici produkce TNF- α M1 makrofágy. Dále zeslabuje glukoneogenezi v játrech a potlačuje signalizaci přes receptor podobný genu Toll (TLR = toll-like receptor) 4, čímž podporuje inzulinovou senzitivitu (Wensveen et al. 2015).

Většina adipokinů je prozánětlivého charakteru a jejich produkce je v tukové tkáni obézních jedinců zvýšena. Patří mezi ně leptin, který je asi nejprobádanější, a poté například cytokin IL-6 nebo chemokin MCP-1 (Wensveen et al. 2015). S rostoucí tukovou tkání se zvyšuje množství leptinu, který působením na hypotalamus navozuje pocit sytosti, ale s přetrvávajícím působením zřejmě dochází k leptinové rezistenci, což by vysvětlovalo neúčinnost leptinu v pozdních fázích obezity (Johnson et al. 2012). Leptin ovlivňuje i imunitní buňky, které mají na cytoplasmatických membránách jeho receptor, jako jsou například makrofágy, neutrofilů, NK buňky nebo B a T lymfocyty. U makrofágů zvyšuje produkci TNF- α a IL-6, u T lymfocytů produkci IL-2 a INF- γ a naopak potlačuje produkci IL-4, čímž podporuje Th1 fenotyp (Ouchi et al. 2011).

Za zmínku ještě stojí MCP-1, jehož produkce je indukována v tukové tkáni myši. Zvýšená exprese mRNA pro MCP-1 je detekována jak v adipocytech tak i v SVF epididymální tukové tkáni. Také koncentrace tohoto chemokinů v plazmě myši krmených HFD je téměř dvakrát větší než u myši na normální dietě. MCP-1 je chemokin, který přispívá k infiltraci makrofágů

do tukové tkáně. Transgenní myši, které mají větší expresi MCP-1 oproti myším divokého typu i na normální dietě, vykazují zvýšenou infiltraci makrofágů do VAT (Kanda et al. 2006).

3.2 Změny buněk imunitního systému

S rozvojem obezity probíhají změny v zastoupení jednotlivých buněčných populacích, takže se tuková tkáň štíhlých a obézních jedinců liší ve složení a množství imunitních buněk. V tukové tkáni štíhlých jedinců se nacházejí především M2 makrofágy, CD4⁺ Th2 a T regulační lymfocyty (Treg = T regulating lymphocytes), eozinofily a iNKT buňky. Tyto imunitní buňky se podílejí na udržování protizánětlivého prostředí. Nicméně s nárůstem obezity dochází k akumulaci buněk, které exprimují geny spíše s prozánětlivými účinky. Mezi tyto buňky můžeme zařadit M1 makrofágy, CD4⁺ Th1 a Th17 lymfocyty, CD8⁺ T lymfocyty, neutrofilů, žírné buňky a B lymfocyty. Tato změna v buněčných populacích vede k zvýšené produkci prozánětlivých mediátorů v tukové tkáni a následně přispívá k chronickému zánětu (Apostolopoulos et al. 2016).

3.2.1 Makrofágy

Podle dosavadních studií se zdá, že nejdůležitějším krokem k rozvoji zánětu ve VAT je změna fenotypu tkáňově rezidentních makrofágů z alternativně aktivovaných M1 na klasicky aktivované M2. V tukové tkáni štíhlých jedinců se makrofágy vyskytují převážně v protizánětlivém stavu, konkrétně v alternativně aktivovaném stavu M2 a produkují cytokiny IL-4, IL-10, IL-1Ra, TGF-β1 a aktivují arginázu 1. Naopak v tukové tkáni obézních jedinců je více klasicky aktivovaných makrofágů M1, které se označují za prozánětlivé a exprimují TNF-α, MCP-1, IL-1β, IL-6, IL-12 a produkují NO pomocí syntázy oxidu dusnatého (Apostolopoulos et al. 2016).

Pro rozlišení makrofágů od ostatních imunitních buněk se nejčastěji používá marker F4/80⁺ a M1 makrofágy mají navíc CD11c⁺, který je odlišuje od M2 makrofágů. Procentuální zastoupení celkové populace F4/80⁺ makrofágů v SVF z VAT štíhlých myší je 5 – 15 % a u myší na HFD se zvýší na 30 – 50 % (Weisberg et al. 2003). Procentuální zastoupení CD11c⁺ buněk z F4/80⁺ frakce se signifikantně zvyšuje u obézních oproti štíhlým myším (Lumeng et al. 2007). Počet makrofágů v tukové tkáni pravděpodobně roste jak infiltrací monocytů z krve a jejich následnou diferenciací, tak i lokální proliferací makrofágů v tkáni. Pokusy na myších, které mají inaktivovaný gen MCP-1, ukazují důležitost infiltrace monocytů z krve, jelikož makrofágy z VAT těchto myší si ponechávají protizánětlivý fenotyp (Lumeng et al. 2007). Na

druhou stranu je zřejmé, že i lokální proliferace makrofágů v tukové tkáni přispívá k zvýšení jejich množství v průběhu obezity (Amano et al. 2014).

Buňky imunitního systému, které jsou v tukové tkáni štíhlých jedinců, podporují makrofágy ve stavu M2 protizánětlivými cytokiny. Mezi tyto cytokiny patří IL-4, IL-10, IL-13 a adiponectin. Hlavním zdrojem IL-4 v tukové tkáni jsou eozinofily. IL-10 je produkován Treg lymfocyty, IL-13 NKT buňkami a adiponectin adipocyty (Wensveen et al. 2015). V průběhu zvětšování objemu tukové tkáně dochází ke změnám v adipocytech, jak bylo uvedeno výše, a akumulaci prozánětlivých imunitních buněk. Tyto změny vedou k hojnějšímu výskytu M1 makrofágů. Velmi účinným cytokinem, který makrofágy podporuje v M1 fenotypu, je například $\text{INF-}\gamma$ (O'Rourke et al. 2012).

Makrofágy nejsou ve WAT náhodně rozptýleny, ale jsou organizovány do struktur podobných korunám (CLS = crown-like structures) a dokonce se mohou spojit do velkých vícejaderných buněk. U obézních myší je takto organizováno až 90 % makrofágů a CLS se v tukové tkáni obézních jedinců vyskytují přibližně třicetkrát více než v tukové tkáni štíhlých jedinců. Tyto struktury se tvoří kolem mrtvých adipocytů, které vykazují známky nekrózy (Cinti et al. 2005). Zvýšená úmrtnost adipocytů u lidských subjektů koreluje s rostoucím BMI a také s rostoucí průměrnou velikostí adipocytů. Cinti et al. (2005) navíc ukazuje, že nekróza adipocytů a následná formace CLS je způsobena pravděpodobně hypertrofií adipocytů. U geneticky modifikovaných myší, které mají hypertrofované adipocyty, ale nemají zvětšenou tukovou tkáň, dochází k nekróze adipocytů, formaci CLS a zánětu tkáně obdobně jako ve WAT obézních myší i lidí. Podle těchto poznatků byla nastíněna posloupnost kroků vedoucí k formaci CLS při obezitě. Nejdříve dojde k hypertrofii adipocytů, což je příčina k jejich následné degeneraci a uvolnění lipidové kapénky do extracelulární matrix. K mrtvým adipocytům se poté začnou shlukovat aktivované makrofágy a utvoří CLS (Giordano et al. 2013).

Fenotyp makrofágů je ovlivňován také volnými mastnými kyselinami (FFA = free fatty acids). Nicméně i v adipocytech mohou FFA indukovat expresi $\text{TNF-}\alpha$ a IL-6 (Shi et al. 2006). Obecně se dá říci, že makrofágy v odpovědi na nasycené mastné kyseliny aktivují expresi prozánětlivých mediátorů a nenasycené mastné kyseliny naopak protizánětlivých (Shi et al. 2006; Williams-Bey et al. 2014). Signalizace po působení směsi kyseliny olejové a palmitové přes TLR4 indukuje expresi $\text{TNF-}\alpha$ a IL-6 v makrofázích. Samotné nasycené mastné kyseliny zvyšují expresi mRNA pro $\text{TNF-}\alpha$, ale pokud jsou makrofágy předem inkubovány s kyselinou dokosaheptaenovou, nemá následné vystavení saturevaným mastným

kyselinám žádný efekt. Nasycené mastné kyseliny výrazně indukují expresi mRNA pro IL-6 oproti nenasyceným mastným kyselinám, které expresi zvyšují pouze nepatrně (Shi et al. 2006). Exprese IL-6 je navíc zvýšena pouze v F4/80⁺ CD11b⁺ CD11c⁺, tedy v M1 makrofázích, a ne v M2 F4/80⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ makrofázích (Nguyen et al. 2007).

Kyselina palmitová aktivuje NLRP3-ASC inflamazom a tím umožňuje sekreci IL-1 β a IL-18 z makrofágů, ale pouze u makrofágů, které jsou předtím aktivovány lipopolysacharidy nebo INF- γ . Množství exprimovaného IL-1 β a IL-18 pozitivně koreluje s dávkou kyseliny palmitové (Wen et al. 2011). Exprese IL-1 β , IL-6 a TNF- α se nezvýší po použití nenasycené mastné kyseliny olejové (Wen et al. 2011), což přispívá k tvrzení, že satureované mastné kyseliny mají prozánětlivý efekt a nenasycené spíše protizánětlivý.

Na druhou stranu makrofágy podporují lipolýzu v lidských adipocytech produkcí TNF- α , čímž zapřičiňují následné uvolnění FFA do okolí (Zhang et al. 2002). Takže nasycené mastné kyseliny zvyšují v makrofázích expresi TNF- α , který podporuje lipolýzu v adipocytech a takto do okolí uvolněné FFA zase můžou zpětně ovlivňovat expresi TNF- α a tím podporovat pozitivní zpětnou vazbu.

3.2.2 Neutrofilly

Změna fenotypu makrofágů na M1 sice může být stěžejním krokem vedoucím k zánětu tukové tkáně a poté k chronickému systémovému zánětu, nicméně před akumulací makrofágů dochází ve VAT k zvýšení počtu jiných imunitních buněk. U myší krměných HFD dochází k akumulaci neutrofilů ve VAT již po 3 dnech. Zvýší se až dvacetkrát oproti myším na normální dietě a představují přibližně 1,5 % SVF (Talukdar et al. 2012). Nicméně prvotní impuls pro akumulaci neutrofilů v tukové tkáni stále není jednoznačný. Jako jeden z možných faktorů se jeví leptin, jehož receptor se nachází na membránách neutrofilů (Bruno et al. 2005). Leptin by mohl u neutrofilů regulovat jejich množství, stimulovat granulopoézu, spouštět chemotaxi, oxidativní vzplanutí a inhibovat apoptózu (Claycombe et al. 2008; Bruno et al. 2005). Neutrofilly v krvi obézních lidí vykazují zvýšenou produkci superoxidů oproti štíhlým lidem (Brotfain et al. 2015), což přispívá k hypotéze většího oxidativního stresu v obézním stavu.

3.2.3 T lymfocyty

Další typ buněk, který při obezitě infiltruje tukovou tkáň dříve než makrofágy, jsou T lymfocyty. Již během dvou týdnů po začátku HFD je v tukové tkáni myší patrná změna v expresi genů jednotlivých populací T lymfocytů. Exprese Th1 genů je zvýšena během

prvních 2 týdnů HFD a dál roste. Naopak signifikantní snížení exprese Th2 genů je detekováno během 3. týdne HFD. Exprese FoxP3, který je specifický pro Treg, se sníží ve 12. týdnu. Změna polarizace makrofágů, a tím pádem zvýšení exprese M1 a snížení M2 genů, nastává až ve 12. týdnu. Na základě těchto údajů se zdá, že změny v počtu a fenotypu T lymfocytů nastávají před změnami u makrofágů (Deng et al. 2013).

Podle Nishimura et al. (2009), který prováděl pokus na obézních myších krmených HFD po dobu 16 týdnů a stejně starých kontrolních myších, nastává změna v množství $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocytů ve viscerální tukové tkáni, ale ne v podkožní. Počet $CD8^+$ T lymfocytů se začíná zvyšovat již během 2. týdne HFD, čímž předchází akumulaci makrofágů. Přitom množství $CD8^+$ T lymfocytů v krvi se s obezitou nemění. Navíc se ukazuje, že jsou $CD8^+$ T lymfocyty esenciální pro infiltraci makrofágů do tukové tkáně, jejich aktivaci a zahájení zánětu tukové tkáně u obézních myší. Tuková tkáň z obézních subjektů, která je kultivována s $CD8^+$ T lymfocyty, je schopna lymfocyty aktivovat. A teprve poté mohou tyto $CD8^+$ T lymfocyty aktivovat a diferenciovat makrofágy. $CD8^+$ T lymfocyty byly navíc detekovány v CLS, což také poukazuje na vzájemnou interakci těchto lymfocytů a makrofágů (Nishimura et al. 2009).

4 Inzulinová rezistence

Obezita může vést k inzulinové rezistenci a dále až k diabetes druhého typu. Při obezitě vzniká mírný chronický zánět v tukové tkáni, který přispívá k inzulinové rezistenci nejdříve v adipocytech a později se rozšiřuje do celého organismu, kde způsobuje inzulinovou rezistenci ve svalech a játrech (Wensveen et al. 2015). Příznaky snížené inzulinové senzitivity jsou detekovatelné již po 3 dnech HFD a stále se zhoršují, zřejmě kvůli postupně rostoucímu zánětu v tukové tkáni. Průběh nastupující inzulinové rezistence v tukové tkáni je srovnatelný s průběhem ve svalech i játrech (Lee et al. 2011).

Nicméně exprese prozánětlivých mediátorů je v tukové tkáni signifikantně zvýšena již po 3 dnech podávání HFD, ale v daleko menší míře než po 16 týdnech a pravděpodobně by nestačila na indukování inzulinové rezistence. Navíc v játrech a svalech je detekována až po 16 týdnech, což by naznačovalo, že trvá určitý čas než se zánět z tukové tkáně rozšíří do zbytku těla. Dále se ukazuje, že i bez makrofágů dojde ke snížení inzulinové senzitivity v průběhu 1. týdne HFD, ale naopak u dlouhodobé HFD (14 týdnů) jsou makrofágy pro inzulinovou rezistenci stěžejní. Na druhou stranu rostoucí počet makrofágů ve VAT pozitivně koreluje s rostoucí inzulinovou rezistencí. Tyto poznatky vedou k domněnce, že v brzké fázi

HFD probíhají jiné prozánětlivé procesy, které ke snížení inzulínové senzitivity stačí (Lee et al. 2011).

Inzulínová rezistence by v tukové tkáni mohla vznikat kvůli stavu hypoxie, zvýšené produkci volných kyslíkových radikálů, většího množství prozánětlivých mediátorů a nasycených mastných kyselin vedoucích k aktivaci transkripčních faktorů, které jsou zodpovědné za následnou zvýšenou transkripci cytokinů, které podporují zánět ve VAT. Tyto cytokiny a nasycené mastné kyseliny mohou přes membránové receptory aktivovat kinázy, které fosforylují substrát inzulínového receptoru (IRS = insulin receptor substrate) 1 na aminokyselinovém zbytku serinu. Insulinový receptor totiž signalizuje přes fosforylaci IRS1 na aminokyselinovém zbytku tyrozinu, která je inhibována fosforylací na aminokyselinovém zbytku serinu a to je jeden z možných mechanismů vzniku inzulínové rezistence (Johnson et al. 2012).

Při *in vitro* pokusech TNF- α i IL-1 β způsobují fosforylaci IRS1 na serinovém aminokyselinovém zbytku a tlumí tak signalizaci inzulínového receptoru. Kyselina palmitová aktivuje NLRP3, což vede k sekreci IL-1 β , který zhoršuje inzulínovou rezistenci také *in vivo* (Wen et al. 2011). Stejně tak i FFA můžou přispívat ke zhoršení inzulínové rezistence. Lipidy signalizací přes TLR4 zvyšují fosforylaci serinového zbytku na IRS1 ve svalech. K tomu ještě mohou FFA přes TLR4 signalizaci zvýšit expresi genů pro IL-6 a TNF- α v adipocytech a makrofázích. Také IL-6 a TNF- α mohou přispívat k inzulínové rezistenci (Shi et al. 2006).

Za zmínku ještě stojí MCP-1, který je produkován hlavně adipocyty myši krmených HFD a dochází k jeho zvýšené koncentraci i v plazmě. MCP-1 přispívá k inzulínové rezistenci pravděpodobně svými chemoatraktantními účinky na makrofágy, které rekrutuje do tukové tkáně, kde makrofágy následně zhoršují prozánětlivé procesy (Kanda et al. 2006).

Naopak pozitivní účinek na inzulínovou senzitivitu má například IL-10. Receptor pro IL-10 se nachází více na membránách adipocytů než buněk SVF a nejsou detekované žádné signifikantní rozdíly v množství mezi VAT štíhlých a obézních subjektů. Receptor IL-10 fosforyluje aminokyselinový zbytek tyrozinu na transkripčním faktoru STAT3, což se ukazuje jako stěžejní pro protizánětlivé působení IL-10. Dále IL-10 snižuje sekreci MCP-1 adipocyty a brání pozdějšímu vlivu TNF- α , čímž zlepšuje inzulínovou senzitivitu. Pokud jsou adipocyty inkubovány s IL-10, nemá TNF- α nepříznivý vliv na inzulínovou senzitivitu. IL-10 tedy chrání adipocyty před nepříznivými účinky TNF- α a zajišťuje jejich inzulínovou senzitivitu (Lumeng et al. 2007).

5 Změna fenotypu NK buněk

5.1 NK buňky

Přirození zabijáci (NK buňky = natural killer cells), mají společný lymfoidní progenitor s B a T lymfocyty, tudíž se zařazují mezi lymfocyty. Ale na rozdíl od B a T lymfocytů, které rekombinují genové segmenty svých receptorů a jsou součástí získané imunity, NK buňky nemají antigen specifické receptory a jsou součástí vrozeného imunitního systému (Caligiuri 2008).

Povrchový fenotyp NK buněk používaný pro identifikaci při průtokové cytometrii je rozdílný pro lidské a myší subjekty. NK buňky navíc nemají svůj specifický marker, takže se definují průnikem vícero diferenciačních skupin (CD = cluster of differentiation). Lidské NK buňky jsou identifikovány jako $CD45^+CD56^+CD3^-$ leukocyty (Viel et al. 2016). Nicméně CD56 není specifický pouze pro NK buňky, protože se nachází například i na $CD56^+CD3^+$ NK T lymfocytech, které se vyznačují společnými znaky jak pro NK buňky tak pro T lymfocyty. CD3 je specifický marker T lymfocytů, takže $CD3^-$ se používá pro vyloučení všech T a NK T lymfocytů (O'Rourke et al. 2013).

Jelikož myší NK buňky neexprimují CD56 (Caligiuri 2008), musí se pro jejich identifikaci průtokovou cytometrií používat jiný marker. Metodiky článků se v použitých markerech často rozcházejí. $CD3^-$ se používá, stejně jako u rozlišování lidských NK buněk, pro vyřazení T a NK T lymfocytů, ale dále se myší NK buňky identifikují například jako $NK1.1^+$ (Wensveen et al. 2015) nebo $CD161a^+$ (Bähr et al. 2017) nebo $NKp46^+$ (Caligiuri 2008) a někdy se používá více než dvou markerů (Lee et al. 2016).

Primární funkce NK buněk spočívá v rozeznávání povrchových molekul cílových buněk a v případné lýzi těchto buněk pomocí indukce apoptózy, jako například u rakovinových buněk nebo buněk napadených virem. Nicméně aktivované NK buňky také sekretují velké množství cytokinů a chemokinů, čímž mohou ovlivňovat další typy buněk imunitního systému. Cytotoxicita NK buněk závisí na rovnováze signalizace inhibičních a aktivačních receptorů, které se nacházejí na povrchu buňky (Zotto et al. 2016).

Inhibiční receptory NK buněk se dělí do dvou proteinových rodin a to sice na imunoglobulinu podobné receptory zabíjecích buněk (KIRs = killer cell immunoglobulin-like receptors), které jsou exprimované pouze na lidských NK buňkách; druhá proteinová rodina má lektinové domény typu C a patří do ní například myší receptory Ly49 nebo skupina NKG2 receptorů, které většinou tvoří heterodimer s CD94 a jsou exprimovány jak na lidských tak

i myších NK buňkách (Pegram et al. 2010). Inhibiční receptory jako své ligandy rozpoznávají klasické MHC I molekuly i neklasické MHC I na cílových buňkách (Campbell et al. 2013).

Receptory ze skupiny KIRs a Ly49 mohou mít kromě inhibiční i aktivační funkci. Další skupinou aktivačních receptorů jsou receptory přirozené cytotoxicity (NCRs = natural cytotoxicity receptors), které patří do imunoglobulinové rodiny. Zástupci NCRs jsou například NKp46 nebo NKp30. Dalším důležitým aktivačním receptorem je NKG2D receptor, který patří do rodiny receptorů s lektinovými doménami typu C a je důležitý pro rozpoznání a lýzi rakovinových buněk. NKG2D je vzdáleně příbuzný s NKG2 rodinou receptorů, do které patří převážně inhibiční receptory, a tvoří homodimer (Pegram et al. 2010). Mezi aktivační receptory patří ještě FcγRIII (CD16), který rozpoznává imunoglobuliny G opsonizující cílové buňky a zodpovídá za buněčnou cytotoxicitu závisující na protilátkách (ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity) (Zotto et al. 2016). Některé ligandy pro aktivační receptory jsou stále neznámé, nicméně mezi ty známé patří molekuly, jejichž exprese je většinou indukována buněčným stresem a jsou poté translokovány na buněčnou membránu. Mezi tyto ligandy patří například MIC-A a MIC-B, které jsou podobně MHC I a jsou rozpoznávány receptorem NKG2D (Campbell et al. 2013).

NK buňky nejsou homogenní populace, jelikož mají různou expresi odlišných povrchových molekul. Na základě heterogenity těchto povrchových molekul lze definovat fenotypově a funkčně odlišné populace NK buněk a stejně tak odlišná vývojová stadia jak u lidí tak i u myši (Fu et al. 2011; Chiossone et al. 2010). Lidské NK buňky lze rozdělit podle míry exprese CD56 na CD56^{bright} a CD56^{dim}. CD56^{bright} NK buňky mají většinou expresi CD16^{dim} a CD56^{dim} NK buňky mají naopak expresi CD16^{bright}, takže jsou rozlišovány dvě nejvíce zastoupené populace NK buněk a to sice CD56^{bright}CD16^{dim} a CD56^{dim}CD16^{bright} (Grzywacz et al. 2007). Nicméně existují i názory, že se nejedná o dvě rovnocenné populace NK buněk, ale spíše o jednotlivá vývojová stadia a CD56^{dim} NK buňky se považují za konečné vývojové stadium, které se vyvíjí z CD56^{bright} NK buněk (Zotto et al. 2016). Lidské CD56^{bright} a CD56^{dim} NK buňky mají odlišný fenotyp a s tím spojené funkce. CD56^{dim} NK buňky, exprimují CD158a, CD158b a NKB1, což jsou receptory patřící do rodiny KIRs. Dále jsou CD56^{dim} NK buňky přibližně dvakrát efektivnější v tvorbě konjugátů s K562 (buněčná linie, které chybí MHC I glykoproteiny a hojně se používá ke studiu cytotoxicity NK buněk proti rakovinovým buňkám), obsahují více granul s perforinem a granzymem a sekretují méně cytokinů INF-γ a TNF-α než CD56^{bright} NK buňky. Tento fenotyp předurčuje CD56^{dim} NK buňky k převážně cytolytickým funkcím (Jacobs et al. 2001). Na druhou stranu CD56^{bright} NK

buňky exprimují minimum KIRs, jsou méně účinné v tvorbě konjugátů s K562 buňkami, mají méně granul s perforinem a granzymem a sekretují více INF- γ a TNF- α oproti CD56^{dim} NK buňkám. Takže funkce CD56^{bright} NK buněk spočívá spíše v ovlivňování imunitní odpovědi sekrecí cytokinů (Jacobs et al. 2001). NKG2/CD94 receptory se rovnoměrně vyskytují v obou populacích CD56^{bright} a CD56^{dim} NK buněk (Jacobs et al. 2001).

Vzhledem k tomu, že myši NK buňky neexprimují CD56 (Caligiuri 2008) a je problematické aplikovat poznatky ze studií prováděných na myších NK buňkách na lidské NK buňky, je snaha o jinou klasifikaci NK buněk, která by platila u obou druhů. Na myších NK buňkách byly klasifikovány dva markery, které jsou exprimovány i na lidských NK buňkách a odlišují jednotlivé populace NK buněk z hlediska vývojového stádia a funkčnosti (Chiossone et al. 2010; Fu et al. 2011). Jedná se o CD11b, který je považován za marker dospělých NK buněk, a receptor CD27. Diferenciace NK buněk postupuje od CD27⁻CD11b⁻ přes CD27⁺CD11b⁻ a přes CD27⁺CD11b⁺ k CD27⁻CD11b⁺ (Chiossone et al. 2010). Tuto klasifikaci lze vztáhnout i na lidské NK buňky, takže jsou definovány čtyři populace na základě exprese CD27 a CD11b. CD27⁻CD11b⁻ populace NK buněk má největší vývojový potenciál. Dvě populace CD27⁺CD11b⁻ a CD27⁺CD11b⁺ jsou hlavními populacemi NK buněk sekretující cytokiny. CD27⁻CD11b⁺ NK buňky vykazují konečnou diferenciaci a mají převážně cytolytické funkce (Fu et al. 2011). Nicméně tato klasifikace dodnes není hojně používána.

5.2 Změna fenotypu NK buněk při obezitě

Je prokázáno, že obézní jedinci jsou mimo jiné více náchylní k virovým infekcím a rozvoji rakoviny (Haslam et al. 2005). Konkrétně větší náchylnost obézních jedinců k rakovině tlustého střeva by mohla být spojena s celkově nižším počtem NK buněk a jejich zhoršenou funkcí (Bähr et al. 2017).

Většina současných studií týkajících se NK buněk v souvislosti s obezitou se zabývá NK buňkami nacházejícími se v krvi a o NK buňkách ve VAT je zatím pouze minimum studií. Co se týče změny počtu a fenotypu NK buněk mezi štíhlými a obézními subjekty, nemálo dosavadních pozorování je kontroverzních. Nicméně se většina studií shoduje na tom, že NK buňky při obezitě sice vykazují aktivovaný fenotyp, ale na druhou stranu mají zhoršenou schopnost cytotoxicity a produkce cytokinů (O'Rourke et al. 2013; Viel et al. 2016).

5.2.1 Změna NK buněk v krvi

5.2.1.1 Změna v počtu jednotlivých populací NK buněk v krvi

Co se týče změny v počtu NK buněk v krvi lidí, existují konfliktní pozorování mezi jednotlivými studii. Absolutní množství NK buněk v lidské krvi se sice s rostoucím BMI zvyšuje, nicméně procentuální zastoupení NK buněk mezi lymfocyty zůstává konstantní a to asi 11 % všech lymfocytů (Viel et al. 2016), což potvrzuje i Laue et al. (2015). Tudiž absolutní množství NK buněk vzrůstá pouze díky rostoucímu celkovému množství lymfocytů (Viel et al. 2016). Na druhou stranu se podle jiné studie ukazuje, že je procentuální zastoupení mezi lymfocyty obézních lidí signifikantně nižší (~9 %) než u štíhlých (~12 %) (Lynch et al. 2009). Tyto rozdílné hodnoty by mohly být způsobeny nesourodostí zkoumaných statistických souborů mezi oběma studii. Studie Lynch et al. (2009) pozoruje větší statistický soubor obézních lidí ($n = 46$), který má vyšší průměrné BMI (~47 kg/m²) a větší poměr žen oproti mužům (40/12), než studie Viel et al. (2016), ve které je velikost statistického souboru obézních lidí menší ($n = 11$), má nižší průměrné BMI (40 kg/m²) a menší poměr žen oproti mužům (7/4).

Dále Lynch et al. (2009) ukazuje, že na počet NK buněk v krvi má vliv, zda jsou obézní subjekty metabolicky zdraví, či nikoliv. Za metabolicky zdravé považuje lidi, kteří v minulosti neměli žádnou kardiovaskulární příhodu, ani respirační nebo metabolické onemocnění a dále mají hodnotu glukózy na lačno $\leq 5,6$ mmol/l, krevní tlak $\leq 130/85$ a poměr triglyceridy/HDL cholesterol $\leq 1,65$ u mužů a $\leq 1,32$ u žen. Metabolicky nezdraví obézní lidé mají totiž méně NK buněk v krvi (~7 %) než metabolicky zdraví obézní lidé (~12 %), jejichž procentuální zastoupení NK buněk mezi lymfocyty v krvi je srovnatelné se štíhlými jedinci (Lynch et al. 2009). Což potvrzuje i další studie, ve které byli všichni jedinci ve statistickém souboru obézních lidí metabolicky nezdraví. O'Shea et al. (2010) udává procentuální zastoupení NK buněk mezi lymfocyty v krvi ~8 % u metabolicky nezdravých obézních a ~17% u štíhlých lidí. Tato rozdílná pozorování poukazují na důležitost rozlišování metabolicky zdravých a nezdravých obézních jedinců.

Poměr jednotlivých populací CD56^{bright} a CD56^{dim} NK buněk v lidské krvi se s nástupem obezity nemění, zůstává přibližně na hodnotách 90 % CD56^{dim} a 10 % CD56^{bright} NK buněk stejně jako u štíhlých jedinců (O'Rourke et al. 2013).

5.2.1.2 Změny fenotypu NK buněk v krvi

Změny fenotypu NK buněk v krvi jsou pro větší přehlednost shrnuty v Tabulce 1.

Expresce povrchového aktivačního markeru NK buněk CD69 je u zkoumané skupiny obézních lidí signifikantně vyšší než u skupiny štíhlých lidí nebo u skupiny, která má podle BMI identifikovanou pouze nadváhu (Viel et al. 2016). Zvýšení exprese CD69 v NK buňkách u obézních lidí oproti štíhlým lidem potvrzuje i Lynch et al. (2009), avšak poukazuje na rozdílnost metabolicky zdravých a metabolicky nezdravých lidí. Metabolicky nezdraví obézní lidé mají totiž přibližně dvojnásobnou expresi CD69 v NK buňkách než metabolicky zdraví obézní lidé (Lynch et al. 2009).

Expresce TRAIL, který ligací receptoru na cílových buňkách indukuje jejich apoptózu, je v NK buňkách obézních jedinců snižena oproti štíhlým (Laue et al. 2015). TRAIL je exprimováno šestkrát více v CD56^{bright} než v CD56^{dim} populaci NK buněk (Huebner et al. 2013).

Expresce CD27 není rozdílná mezi NK buňkami v krvi štíhlých a obézních lidí (O'Rourke et al. 2013).

Také expresce některých receptorů NK buněk je rozdílná mezi štíhlými a obézními subjekty. Expresce CD16 je negativně korelována s rostoucím BMI (Viel et al. 2016). Ovšem procentuální zastoupení jednotlivých populací CD16 NK buněk se v celkové populaci NK buněk v krvi s nárůstem obezity nemění, zůstává stejné na hodnotách ~90 % CD16^{bright} a ~10 % CD16^{dim} (O'Rourke et al. 2013). Expresce CD16 je v NK buňkách snížena po jejich degranulaci, což značí aktivaci NK buněk. Jinými slovy snížení CD16 se považuje za známku aktivovaných NK buněk (Grzywacz et al. 2007).

Míra exprese CD158b, někdy také nazývaný KIR2DL2/3, což je inhibiční receptor z rodiny KIRs vázající ligand HLA-C1 (Pegram et al. 2010), se u NK buněk metabolicky zdravých obézních jedinců nemění oproti štíhlým kontrolám, ale signifikantně vzrůstá v metabolicky nezdravých obézních jedincích (Lynch et al. 2009).

Expresce dalšího inhibičního receptoru z rodiny KIRs CD158a, který váže ligand HLA-C2 a nazývá se také KIR2DL1 (Pegram et al. 2010), se v NK buňkách v krvi nemění mezi obézními a štíhlými jedinci (O'Rourke et al. 2013).

Další prozkoumaný receptor z rodiny KIRs je NKB1, neboli KIR3DL1, který je také inhibičním receptorem a váže ligand HLA-Bw4 (Pegram et al. 2010). Expresce NKB1 je větší u metabolicky nezdravých obézních lidí než u metabolicky zdravých obézních lidí a mezi metabolicky zdravými obézními a štíhlými lidmi není signifikantní rozdíl (Lynch et al. 2009).

Další ze zkoumaných receptorů, NKp46, patří do rodiny NCRs, je aktivačním receptorem (Pegram et al. 2010) a rozdíl jeho exprese v NK buňkách mezi štíhlými a obézními lidmi je poněkud kontroverzní. Podle O'Rourke et al. (2013) není mezi mírou exprese v NK buňkách štíhlých a obézních jedinců signifikantní rozdíl. Nicméně podle více recentní studie, je absolutní množství exprimovaného NKp46 negativně korelováno s rostoucím BMI (Viel et al. 2016). Tato odlišná pozorování mohou být dána nesourodostí statistických souborů, stejně jako v předchozím případě. O'Rourke et al. (2013) hodnotí statistický soubor obézních lidí s průměrným BMI 52 kg/m² a 85% zastoupením žen, kdežto Viel et al. (2016) má statistický soubor s průměrným BMI 40 kg/m² a ~64% zastoupením žen.

NKG2D je aktivační receptor, jehož ligandy (jako jsou například MHC I příbuzné MIC-A a MIC-B nebo ULBP1-4) jsou translokovány na povrch buněk, které procházejí buněčným stresem. Ligace lidského NKG2D receptoru ústí v cytotoxickou odpověď NK buňky a sekreci cytokinů (Pegram et al. 2010). Procentuální zastoupení NKG2D se v populaci NK buněk s nárůstem obezity nemění (O'Rourke et al. 2013).

Tabulka 1

	Obézní jedinci oproti štíhlým jedincům:	Metabolicky nezdraví obézní jedinci oproti metabolicky zdravým obézním jedincům:
CD69	↑ (Viel et al. 2016; Lynch et al. 2009)	2x↑ (Lynch et al. 2009)
TRAIL	↓ (Laue et al. 2015)	N.D.
CD27	bez rozdílu (O'Rourke et al. 2013)	N.D.
CD16	↓ (Viel et al. 2016)	N.D.
CD158b	N.D.	↑ (Lynch et al. 2009)
CD158a	bez rozdílu (O'Rourke et al. 2013)	N.D.
NKB1	N.D.	↓ (Lynch et al. 2009)
NKp46	bez rozdílu (O'Rourke et al. 2013) / ↓ (Viel et al. 2016)	N.D.
NKG2D	bez rozdílu (O'Rourke et al. 2013)	N.D.

Porovnání změn exprese v NK buňkách v krvi. ↑ vyšší; ↓ nižší; N.D. není definováno

Tabulka je vlastní tvorba na základě dat: Viel et al. (2016); Laue et al. (2015); O'Rourke et al. (2013); Lynch et al. (2009)

Všechny lymfocyty v krvi obézních lidí, bez rozdílu mezi metabolicky zdravými a metabolicky nezdravými, vykazují odlišnou míru diferenciaci než lymfocyty štíhlých lidí. Mají nižší expresi diferenciačního markeru CD38, markeru naivních lymfocytů CD45RA a markeru nedospělých lymfocytů CD7 než lymfocyty ze štíhlých kontrol (Lynch et al. 2009).

5.2.1.3 Ovlivnění cytotoxicity NK buněk

Ukazuje se, že NK buňky z krve obézních lidí mají sníženou schopnost přirozené cytotoxicity a ADCC oproti NK buňkám štíhlých jedinců.

In vitro pokusy dokládají, že NK buňky z krve obézních jedinců vykazují sníženou schopnost lýze K562 buněk (O'Shea et al. 2010; Moulin et al. 2011). Po *in vitro* inkubaci s K562 buňkami mají NK buňky z obézních subjektů sníženou expresi CD107a a chemokinu CCL4, kdežto produkce INF- γ se nemění (Viel et al. 2016). CD107a je považováno za aktivační marker, jehož výskyt se na povrchu NK buněk zvyšuje po jejich degranulaci (Grzywacz et al. 2007). Snížení exprese CD107a v NK buňkách obézních lidí potvrzuje i Laue et al. (2015). Dále *in vitro* studie poukazují na sníženou cytotoxicitu NK buněk po stimulaci leptinem (Jahn et al. 2015; Bähr et al. 2017), což by vzhledem k zvýšené koncentraci leptinu v plazmě obézních subjektů (Jahn et al. 2015), expresi leptinového receptoru Ob-R v NK buňkách (Wrann et al. 2012) a snížené schopnosti cytotoxicity NK buněk z obézních subjektů (O'Shea et al. 2010; Moulin et al. 2011), mohlo poukazovat na leptin jako na možnou příčinu snížené cytotoxicity NK buněk při obezitě. Na základě těchto pozorování je tedy zřejmé, že NK buňky obézních lidí mají oproti NK buňkám štíhlých lidí sníženou senzitivitu pro rakovinné buňky.

Stejně tak mají NK buňky obézních sníženou schopnost ADCC. *In vitro* inkubace NK buněk s buňkami opsonizovanými protilátkou anti-CD20 poukazuje na sníženou expresi INF- γ a CCL4 u NK buněk obézních lidí oproti štíhlým jedincům. Míra exprese CD107a je sice také negativně korelována s rostoucím BMI, ale pouze nesignifikantně (Viel et al. 2016).

5.2.1.4 Vliv leptinu na fenotyp a funkčnost NK buněk z krve

NK buňky jsou leptinem prokazatelně ovlivňovány, ale dosavadní studie dokládají, že pouze ~5 % NK buněk má na svém povrchu leptinový receptor Ob-R (Wrann et al. 2012). Exprese CD16 je u Ob-R⁺ NK buněk signifikantně nižší než u celkové populace NK buněk (Wrann et al. 2012). U statistického souboru obézních lidí je lehké, ale pouze nesignifikantní, zvýšení v procentu Ob-R⁺ NK buněk oproti souboru štíhlých lidí (Laue et al. 2015).

Existují signifikantní rozdíly v množství fosforylovaných komponent signální transdukce leptinového receptoru mezi obézními a štíhlými subjekty. NK buňky z obézních jedinců mají méně častou fosforylaci tyrozinové kinázy JAK2 než štíhlí jedinci (Laue et al. 2015). *In vitro* stimulace NK buněk leptinem vede k vyšší fosforylaci JAK2 u buněk ze štíhlých jedinců oproti buňkám z obézních jedinců (Wrann et al. 2012). Intravenózní podání leptinu myším zvyšuje fosforylaci JAK2 a PKB, což je další komponent signální transdukce leptinového receptoru, pouze u štíhlých myší, ale ne u obézních (Nave et al. 2008). Lautenbach et al. (2009) svými *in vivo* pokusy na myších potvrzuje vliv obezity na snížení fosforylace JAK2 a dále poukazuje na snížení fosforylace dalších molekul v signální transdukcii a to konkrétně PKB.

Zdá se, že krátkodobé (maximálně 24 hodin) a dlouhodobé (více jak 3 dny) působení leptinu na NK buňky má odlišné výsledky (Wrann et al. 2012). Krátkodobé působení leptinu na NK buňky zvyšuje po 4,5 hodinách expresi aktivačního markeru CD69 a exprese INF- γ se prokazatelně zvyšuje až po 18 hodinách. Krátkodobé působení leptinu dále zvyšuje expresi TRAIL v NK buňkách, zvyšuje procento NK buněk, které exprimují Ob-R, a lýzi K562 buněk NK buňkami (Wrann et al. 2012), ale pouze u štíhlých subjektů (Nave et al. 2008). Také pouze u štíhlých subjektů se zvyšuje produkce INF- γ NK buňkami po aktivaci leptinem (Laue et al. 2015). Krátkodobé působení leptinu u myší *in vivo* zvyšuje absolutní množství NK buněk v krvi štíhlých subjektů (Nave et al. 2008), a *in vitro* snižuje expresi aktivačních receptorů NKG2D a NKp46, ale nemá vliv na expresi NKp30 (Bähr et al. 2017).

Dlouhodobé působení leptinu snižuje u NK buněk proliferaci, cytotoxicitu a produkci INF- γ (Wrann et al. 2012). Sníženou cytotoxicitu a produkci INF- γ NK buněk po dlouhodobé inkubaci s leptinem potvrzuje i Bähr et al. (2017). Tyto poznatky shrnují, že krátkodobé působení leptinu na NK buňky zvyšuje jejich míru aktivace, cytotoxicity a produkce cytokinů, ale dlouhodobé působení tyto funkce NK buněk naopak tlumí. Zobecněně by se dalo říci, že leptin má tyto účinky pouze na NK buňky štíhlých subjektů, ale ne na NK buňky obézních subjektů, u kterých je koncentrace leptinu v plazmě dlouhodobě zvýšena.

5.2.1.5 Obnovení fenotypu a funkce NK buněk po návratu obézních jedinců k štíhlému metabolickému fenotypu

Pozměněný počet a fenotyp NK buněk v obézních jedincích lze vrátit k počtu a fenotypu NK buněk odpovídající štíhlým jedincům jak u myší tak i u lidí (Lautenbach et al. 2009; Viel et al. 2016). U lidí, kteří dříve byli obézní, ale poté snížili svá BMI pod 30 kg/m², je vidět tendence NK buněk, navracet se k fenotypu, který mají NK buňky v krvi štíhlých lidí.

S klesajícím BMI klesá i absolutní množství NK buněk v krvi. Dále s klesajícím BMI roste exprese NKp46, CD94 a CD16, která je u obézních jedinců snižena. Naopak exprese CD69 a granzymu signifikantně klesá na hodnoty štíhlých jedinců. I míra přirozené cytotoxicity a ADCC NK buněk se s klesajícím BMI navrácí k míře NK buněk štíhlých lidí. Roste procento NK buněk exprimujících CD107a, INF- γ a CCL4 (Viel et al. 2016). Vliv zhubnutí na obnovení produkce INF- γ NK buňkami potvrzuje i další studie, kde u mužů dochází k téměř dvojnásobnému zvýšení procent INF- γ produkujících CD56^{dim} NK buněk. U mužů je také viditelné snížení koncentrace leptinu v plazmě, kdežto u žen, které při obezitě mají přibližně dvojnásobné hodnoty leptinu, nedochází k signifikantní změně (Jahn et al. 2015). Přenos NK buněk z obézních myší do krevního oběhu štíhlých myší, jejichž NK buňky byly předem odebrány, snižuje počet NK buněk na hodnotu srovnatelnou se štíhlými kontrolami. Tento transfer NK buněk lehce zvyšuje množství jejich fosforylovaných komponent signální kaskády leptinového receptoru (JAK2, PKB, ERK2), nicméně množství ještě nedosahuje na míru fosforylace ve štíhlých kontrolách (Lautenbach et al. 2009).

5.2.2 Změna NK buněk ve viscerální tukové tkáni

Studii, které se zabývají NK buňkami ve VAT ve spojení s obezitou, je méně než studií ohledně NK buněk v krvi. Nicméně se ukazuje, že i NK buňky v tukové tkáni procházejí s nárůstem obezity určitými fenotypovými změnami stejně jako NK buňky v krvi a změny jsou daleko výraznější ve VAT než v podkožní tukové tkáni (O'Rourke et al. 2009; O'Rourke et al. 2013).

5.2.2.1 Změna v počtu jednotlivých populací NK buněk ve VAT

Co se týče počtu NK buněk ve VAT z obézních subjektů, většina studií se ve svých pozorováních rozchází. U myší je více NK buněk na gram tkáně ve viscerální tukové tkáni než v podkožní (O'Rourke et al. 2009). Podle O'Rourke et al. (2013) není v lidské VAT rozdíl v procentuálním zastoupení populace NK buněk mezi štíhlými a obézními jedinci; v obou případech NK buňky zastupují přibližně 6 % ze všech lymfocytů. Ovšem dvě studie u myší dokládají protichůdné informace, co se týče změny počtu NK buněk mezi obézními a štíhlými subjekty. Ve SVF VAT štíhlých myší může být až 30 % lymfocytů zastoupeno NK buňkami a s nástupem obezity toto procentuální zastoupení NK buněk klesá přibližně na polovinu (Caspar-Bauguil et al. 2005). Druhá, více recentní, studie naopak u obézních myší udává zvýšení počtu NK buněk na gram viscerální tukové tkáně oproti myším štíhlým (O'Rourke et al. 2012).

Jak u lidí tak i u myši dochází s obezitou ke změně v zastoupení jednotlivých populací NK buněk. Ve VAT štíhlých lidí je populace CD56^{dim} NK buněk zastoupena přibližně 90 % z celkové populace NK buněk a v obézních jedincích klesá na 75 %. Jinými slovy štíhlí lidé mají ve VAT stejné procentuální zastoupení CD56^{dim} a CD56^{bright} jako v krvi a s obezitou se poměr mezi CD56^{dim} a CD56^{bright} NK buňkami zmenšuje (O'Rourke et al. 2013). U myši, které neexprimují CD56 a jednotlivé populace jejich NK buněk mohou být charakterizované na základě CD27 a CD11b molekul (Chiossone et al. 2010), dochází po 4 týdnech HFD také ke změně v zastoupení jednotlivých populací NK buněk ve VAT. Procentuální zastoupení CD27⁺CD11b⁺ populace, která se označuje jako konečné vývojové stádium a je nejvíce cytotoxická (Chiossone et al. 2010), v důsledku HFD stoupá oproti počtu na normální dietě na přibližně 50 % všech NK buněk. CD27⁺CD11b⁻ populace naopak klesá na 30 % a CD27⁺CD11b⁺ populace se významně nemění a zůstává okolo 20 % ze všech NK buněk (Wensveen et al. 2015).

5.2.2.2 Změny fenotypu NK buněk ve viscerální tukové tkáni

U myši krměných HFD je produkce INF- γ ve VAT výrazně zvýšena a až 47 % INF- γ je produkováno NK buňkami (Wensveen et al. 2015).

U obézních lidí je významně zvýšeno pouze procento NK buněk exprimujících aktivační receptor NKG2D, procento NK buněk exprimujících inhibiční receptor CD158a (neboli KIR2DL1) je sice také zvýšeno asi o 10 %, ale pouze nesignifikantně, a procenta NK buněk exprimujících CD16^{bright}, CD16^{dim}, NKp46 a CD27 se mezi štíhlými a obézními jedinci v podstatě nemění (O'Rourke et al. 2013).

Co se týče *in vivo* fenotypu NK buněk ve VAT, zatím neexistují téměř žádné komplexní studie, které by fenotyp zkoumaly. Nicméně *in vitro* pokusy, se snahou o co nejlepší namodelování *in vivo* podmínek, poukazují na určité změny prvků fenotypu NK buněk. *In vitro* inkubace lidských NK buněk s mediem z buněčné linie lidských adipocytů neindukuje změny v jednotlivých populacích CD56^{bright} a CD56^{dim} NK buněk, dále nemá vliv na expresi TRAIL v NK buňkách, nemá vliv na tvorbu konjugátů s K562 a tvorba konjugátů není rozdílná mezi CD56^{bright} a CD56^{dim} populacemi (Huebner et al. 2013). Medium z adipocytů naopak významně zvyšuje celkovou expresi INF- γ a zvyšuje expresi v CD56^{dim}, ale nemá vliv na expresi v CD56^{bright}, která je už tak velmi vysoká. Také je zvýšeno procento CD56^{bright} NK buněk, které exprimují granzym. Dále pak zvyšuje procenta NK buněk, které exprimují Ob-R (Huebner et al. 2013).

5.3 Další faktory, které by mohly ovlivňovat funkci NK buněk při obezitě

Adipocyty mají na svém povrchu ligandy některých receptorů NK buněk. Ve VAT obézních myší je vyšší exprese Rae-1 a Mult-1, což jsou myší ligandy aktivačního receptoru NK buněk NKG2D (Pegram et al. 2010), než ve VAT štíhlých myší. Exprese Rae-1 je mnohonásobně vyšší v adipocytech než v SVF, kdežto v expresi Mult-1 není rozdíl mezi adipocyty a SVF z VAT obézních myší. Exprese Rae-1 je největší po 3 týdnech HFD, poté se ale snižuje až do 12 týdne, kdy studie končí. Naopak exprese Mult-1 se moc nesnižuje (Chung et al. 2014). V *in vitro* podmínkách je exprese v myších adipocytech Rae-1 a Mult-1 zvyšována působením insulinu a TNF- α . Nicméně inaktivace genu pro NKG2D nemá vliv na míru insulinové rezistence mezi štíhlými a HFD myšmi, ani na množství NK buněk ve VAT, což poukazuje na nedůležitost NKG2D receptoru na ovlivnění insulinové rezistence a infiltrace NK buněk do VAT (Chung et al. 2014). Adipocyty z VAT obézních subjektů také zvyšují expresi ligandů pro NCR1 receptory u myší, popřípadě ligandů pro NKp46 u lidí. Změny v expresi ligandů pro NCR1 receptory nastávají po 4 týdnech od začátku HFD (Wensveen et al. 2015). Navíc membrány adipocytů z myší krmených HFD indukují produkci INF- γ v NK buňkách a *in vitro* aktivace NK buněk přes NCR1 receptor vede k diferenciaci makrofágů na M1 fenotyp. Myši, které mají inaktivovaný gen pro NCR1, se na HFD stávají insulin rezistentními později než WT kontroly (Wensveen et al. 2015).

INF- γ produkovaný NK buňkami by mohl být prvotním spouštěčem pro změnu fenotypu makrofágů na M1 fenotyp a následného zánětu ve VAT (O'Rourke et al. 2009). *In vivo* pokusy na myších ukazují, že jsou NK buňky stěžejní k akumulaci makrofágů a změně na M1 fenotyp ve VAT a ke vzniku insulinové rezistence při HFD (Wensveen et al. 2015).

6 Závěr

Cílem této práce bylo studium vlivu obezity na funkci imunitního systému. Konkrétně jsem se zaměřila na změnu fenotypu a funkce NK buněk u obézních jedinců oproti štíhlým a na možné přispění NK buněk k chronickému zánětu organismu, který při obezitě vzniká.

Negativní vliv obezity na imunitní systém je nepopiratelný. V posledních letech výzkumu se ukazuje, že dříve opomíjená tuková tkáň, neslouží pouze jako zásobárna energie, ale má také endokrinní funkci a tím pádem může ovlivňovat homeostázi organismu. Nejčastější částí tukové tkáně, která je spojována s negativním vlivem obezity, je VAT. U štíhlých jedinců jsou ve VAT nejhojnější populace M2 makrofágů, CD4⁺ Th2 a Treg lymfocytů, eozinofilů a iNKT buněk, což se s obezitou mění na populace M1 makrofágů, CD4⁺ Th1 a Th17 lymfocytů, CD8⁺ T lymfocytů, neutrofilů, žirných buněk a B lymfocytů. Tyto změny v populacích rezidentních buněk vedou k mírnému chronickému zánětu.

Za nejdůležitější reorganizaci populací buněk imunitního systému se považuje změna protizánětlivého fenotypu M2 makrofágů na prozánětlivý M1 fenotyp a vzrůst množství M1 makrofágů ve VAT. Nicméně není jednoznačně jisté, co je příčinou těchto změn. Ještě než dojde k akumulaci M1 makrofágů v tukové tkáni, dochází k infiltraci jiných buněk imunitního systému, jakou jsou neutrofilů nebo T lymfocytů, které by tedy mohly být příčinou akumulace M1 makrofágů ve VAT. Jako jednou z možných příčin byl také navrhnout INF- γ produkovaný NK buňkami.

Při obezitě je snižená odolnost proti virovým infekcím a zvýšená incidence rakoviny. Vzhledem k tomu, že hlavní funkce NK buněk je lýze infikovaných nebo jinak pozměněných buněk, mohl by vliv obezity na funkci a fenotyp NK buněk být příčinou této vyšší náchylnosti organismu k nemocem.

Dosavadní studie fenotypu NK buněk v obézních jedincích se zabývají převážně NK buňkami v krvi a v některých pozorováních se rozcházejí, což by mohlo být způsobeno nesourodostí statistických souborů mezi studiemi. Ukazuje se, že pro správnou statistickou analýzu, je nutné brát zřetel na pohlaví studovaných jedinců, velikost BMI u skupiny obézních lidí a zda jsou tito jedinci metabolicky zdraví či nikoliv.

Jednotlivé studie o fenotypu NK buněk v krvi se sice v některých případech neshodují, ale všechny se přiklánějí k tomu, že NK buňky v obézních jedincích sice vykazují známky aktivace, ale zároveň mají sníženou expresi TRAIL a aktivačních receptorů Fc γ RIII a NKp46 a naopak zvýšenou expresi inhibičních receptorů CD158b a NKB1, což by mohl být důvod prokazatelně nižší schopnosti cytotoxicity NK buněk.

In vitro působení leptinu na NK buňky má dvojitý efekt v závislosti na délce působení. Krátkodobé působení má obecně aktivační účinky na NK buňky, zvyšuje jejich produkci INF- γ a schopnost cytotoxicity, ale pouze u buněk ze štíhlých jedinců. Naopak dlouhodobé působení leptinu snižuje proliferaci, produkci INF- γ a cytotoxicitu NK buněk.

Fosforylace komponentů signální transdukce leptinového receptoru, jako jsou JAK2 a PKB, je snížena v NK buňkách obézních jedinců a navíc leptin tuto fosforylaci zvyšuje pouze u NK buněk ze štíhlých jedinců. Vzhledem k účinku leptinu pouze na NK buňky ze štíhlých subjektů, rozdílů v krátkodobém a dlouhodobém působení leptinu na NK buňky a dlouhodobě chronicky zvýšené koncentraci leptinu v plazmě při obezitě by se dalo říci, že se NK buňky v obézních jedincích stávají rezistentními vůči leptinu.

Zmínky o fenotypu NK buněk ve VAT obézních jedinců jsem našla pouze ve třech studiích. NK buňky ve VAT prokazatelně zvyšují produkci INF- γ a expresi aktivačního receptoru NKG2D.

Prozatím neexistuje dostatečné množství studií o NK buňkách v kontextu obezity. Vzhledem k tomu, že VAT je spojována s negativním vlivem obezity na zdraví lidí a funkce NK buněk je v důsledku obezity zhoršena, by bylo vhodné budoucí výzkum této problematiky zaměřit převážně na studium NK buněk ve VAT a pečlivě vybírat zkoumaný statistický soubor, aby studie byly více signifikantní.

7 Seznam použité literatury

Amano, Shinya U., Jessica L. Cohen, Pranitha Vangala, Michaela Tencerova, Sarah M. Nicolero, Joseph C. Yawe, Yuefei Shen, Michael P. Czech, and Myriam Aouadi. 2014. "Local Proliferation of Macrophages Contributes to Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation." *Cell Metabolism* 19 (1): 162–71

Apostolopoulos, Vasso, Maximilian P J de Courten, Lily Stojanovska, Gregory L. Blatch, Kathy Tangalakis, and Barbora de Courten. 2016. "The Complex Immunological and Inflammatory Network of Adipose Tissue in Obesity." *Molecular Nutrition and Food Research* 60 (1): 43–57 *

Bähr, Ina, Vincent Goritz, Henriette Doberstein, Grit Gesine, Ruth Hiller, Philip Rosenstock, Janine Jahn, et al. 2017. "Diet-Induced Obesity Is Associated with an Impaired NK Cell Function and an Increased Colon Cancer Incidence" *Journal of nutrition and metabolism*: 1–14

Brotfain, E., N. Hadad, Y. Shapira, E. Avinoah, A. Zlotnik, L. Raichel, and R. Levy. 2015. "Neutrophil Functions in Morbidly Obese Subjects." *Clinical and Experimental Immunology* 181 (1): 156–63

Bruno, Andreina, Sébastien Conus, Inès Schmid, and Hans-Uwe Simon. 2005. "Apoptotic Pathways Are Inhibited by Leptin Receptor Activation in Neutrophils." *Journal of Immunology* 174 (12): 8090–96

Caligiuri, Michael A. 2008. "Human Natural Killer Cells." *Blood* 112 (3): 461–469 *

Campbell, Kerry S, and Jun Hasegawa. 2013. "NK Cell Biology: An Update and Future Directions." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132(3): 536–44 *

Caspar-Bauguil, S., B. Cousin, A. Galinier, C. Segafredo, M. Nibbelink, M. André, L. Casteilla, and L. Pénicaud. 2005. "Adipose Tissues as an Ancestral Immune Organ: Site-Specific Change in Obesity." *FEBS Letters* 579 (17): 3487–92

Cinti, Saverio, Grant Mitchell, Giorgio Barbatelli, Incoronata Murano, Enzo Ceresi, Emanuela Faloia, Shupe Wang, Melanie Fortier, Andrew S Greenberg, and Martin S Obin. 2005. "Adipocyte Death Defines Macrophage Localization and Function in Adipose Tissue of Obese Mice and Humans." *Journal of Lipid Research* 46 (11): 2347–55

Claycombe, Kate, Louis E King, and Pamela J Fraker. 2008. "A Role for Leptin in Sustaining Lymphopoiesis and Myelopoiesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6): 2017–21

Cotillard, Aurelie, Christine Poitou, Adriana Torcivia, Jean Luc Bouillot, Arne Dietrich, Nora Klötting, Cécile Grégoire, Karine Lolmede, Matthias Blüher, and Karine Clément. 2014. "Adipocyte Size Threshold Matters: Link with Risk of Type 2 Diabetes and Improved Insulin Resistance after Gastric Bypass." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99 (8): 1466–70

- Deng, Tuo, Christopher J. Lyon, Laurie J. Minze, Jianxin Lin, Jia Zou, Joey Z. Liu, Yuelan Ren, et al. 2013. "Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation." *Cell Metabolism* 17 (3): 411–22
- Fu, Binqing, Fuyan Wang, Rui Sun, Bin Ling, Zhigang Tian, and Haiming Wei. 2011. "CD11b and CD27 Reflect Distinct Population and Functional Specialization in Human Natural Killer Cells." *Immunology* 133 (3): 350–59
- Giordano, Antonio, Incoronata Murano, Eleonora Mondini, Jessica Perugini, Arianna Smorlesi, Ilenia Severi, Rocco Barazzoni, Philipp E Scherer, and Saverio Cinti. 2013. "Obese Adipocytes Show Ultrastructural Features of Stressed Cells and Die of Pyroptosis." *Journal of Lipid Research* 54 (9): 2423–36
- Grzywacz, B, N Kataria, and M R Verneris. 2007. "CD56dimCD16+ NK Cells Downregulate CD16 Following Target Cell Induced Activation of Matrix Metalloproteinases." *Leukemia* 21 (2): 356–59
- Haslam, David W., and W. Philip T James. 2005. "Obesity." *Lancet* 366 (9492): 1197–1209 *
- Huebner, Lena, Stefan Engeli, Christiane D. Wrann, Lilia Goudeva, Tobias Laue, and Heike Kielstein. 2013. "Human NK Cell Subset Functions Are Differentially Affected by Adipokines." *PLoS ONE* 8 (9)
- Huh, Jin Young, Jong In Kim, Yoon Jeong Park, In Jae Hwang, Yun Sok Lee, Jee Hyung Sohn, Sung Kyu Lee, et al. 2013. "A Novel Function of Adipocytes in Lipid Antigen Presentation to iNKT Cells." *Molecular and Cellular Biology* 33 (2): 328–39
- Chiossone, Laura, Julie Chaix, Nicolas Fuseri, Claude Roth, Eric Vivier, and Thierry Walzer. 2010. "Maturation of Mouse NK Cells Is a Four-Stage Developmental Program." *Clinical Immunology* 135 (22): S48
- Chung, Jun-Jae, Mary A Markiewicz, Bojan Polić, and Andrey S Shaw. 2014. "Role of NKG2D in Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance." *PloS One* 9 (10)
- Jacobs, Roland, Gabriele Hintzen, Almut Kemper, Katrin Beul, Sandra Kempf, Georg Behrens, Karl Walter Sykora, and Reinhold E. Schmidt. 2001. "CD56bright Cells Differ in Their KIR Repertoire and Cytotoxic Features from CD56dim NK Cells." *European Journal of Immunology* 31 (10): 3121–26
- Jahn, Janine, Marco Spielau, Corinna Brandsch, Gabriele I. Stangl, Karl Stefan Delank, Ina Bähr, Tobias Berreis, Christiane D. Wrann, and Heike Kielstein. 2015. "Decreased NK Cell Functions in Obesity Can Be Reactivated by Fat Mass Reduction." *Obesity* 23 (11): 2233–41
- Jeffery, Elise, Christopher D Church, Brandon Holtrup, Laura Colman, and S Matthew. 2015. "Rapid Depot-Specific Activation of Adipocyte Precursor Cells at the Onset of Obesity" 17 (4): 376–85 #

Johnson, Amy R., J. Justin Milner, and Liza Makowski. 2012. "The Inflammation Highway: Metabolism Accelerates Inflammatory Traffic in Obesity." *Immunological Reviews* 249 (1): 218–38 *

Kanda, Hajime, Sanshiro Tateya, Yoshikazu Tamori, Ko Kotani, Ken-ichi Hiasa, Riko Kitazawa, Sohei Kitazawa, et al. 2006. "MCP-1 Contributes to Macrophage Infiltration into Adipose Tissue, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Obesity." *Journal of Clinical Investigation* 116 (6): 1494–1505

Laue, Tobias, Christiane D Wrann, Birgit Hoffmann- Castendiek, Daniel Pietsch, Lena Hübner, and Heike Kielstein. 2015. "Altered NK Cell Function in Obese Healthy Humans." *BMC Obesity* 2 (1): 1

Lautenbach, Anne, Christiane D Wrann, Roland Jacobs, Guenter Müller, Georg Brabant, and Heike Nave. 2009. "Altered Phenotype of NK Cells from Obese Rats Can Be Normalized by Transfer into Lean Animals." *Obesity* 17 (10): 1848–55

Lee, Byung-Cheol, Myung-Sunny Kim, Munhyong Pae, Yasuhiko Yamamoto, Delphine Eberlé, Takeshi Shimada, Nozomu Kamei, et al. 2016. "Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity." *Cell Metabolism* 23 (4): 685–98

Lee, Yun Sok, Pingping Li, Jin Young Huh, In Jae Hwang, Min Lu, Jong In Kim, Mira Ham, et al. 2011. "Inflammation Is Necessary for Long-Term but Not Short-Term High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance." *Diabetes* 60 (10): 2474–83

Liechocki, Sally, Ivar Carneiro, Karina Ribeiro Silva, Isis Co, Augusto Peixoto Souza, Radovan Borojevic, Clarissa Menezes Maya-monteiro, and Leandra Santos Baptista. 2017. "Characterization of Stromal Vascular Fraction and Adipose Stem Cells from Subcutaneous, Preperitoneal and Visceral Morbidly Obese Human Adipose Tissue Depots." *PLoS ONE* 12 (3): 1–15

Lumeng, Carey N., Jennifer L. Bodzin, and Alan R. Saltiel. 2007. "Obesity Induces a Phenotypic Switch in Adipose Tissue Macrophage Polarization." *Journal of Clinical Investigation* 117 (1): 175–84

Lynch, Lydia a, Jean M O'Connell, Anna K Kwasnik, Thomas J Cawood, Cliona O'Farrelly, and Donal B O'Shea. 2009. "Are Natural Killer Cells Protecting the Metabolically Healthy Obese Patient?" *Obesity* 17 (3): 601–5

Moulin, Cristiane Martins, Ivo Marguti, Jean Pierre Schatzmann Peron, Alfredo Halpern, and Luiz Vicente Rizzo. 2011. "Bariatric Surgery Reverses Natural Killer (NK) Cell Activity and NK-Related Cytokine Synthesis Impairment Induced by Morbid Obesity." *Obesity Surgery* 21 (1): 112–18

Nave, Heike, Guenter Mueller, Britta Siegmund, Roland Jacobs, Thorsten Stroh, Ulrike Schueler, Matthias Hopfe, et al. 2008. "Resistance of Janus Kinase-2 Dependent Leptin Signaling in Natural Killer (NK) Cells: A Novel Mechanism of NK Cell Dysfunction in Diet-Induced Obesity." *Endocrinology* 149 (7): 3370–78

- Nguyen, M. T Audrey, Svetlana Favelyukis, Anh Khoi Nguyen, Donna Reichart, Peter A. Scott, Alan Jenn, Ru Liu-Bryan, Christopher K. Glass, Jaap G. Neels, and Jerrold M. Olefsky. 2007. "A Subpopulation of Macrophages Infiltrates Hypertrophic Adipose Tissue and Is Activated by Free Fatty Acids via Toll-like Receptors 2 and 4 and JNK-Dependent Pathways." *Journal of Biological Chemistry* 282 (48): 35279–92
- Nishimura, Satoshi, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki, Koji Eto, Hiroshi Yamashita, Mitsuru Ohsugi, Makoto Otsu, et al. 2009. "CD8+ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity." *Nature Medicine* 15 (8): 914–20
- O'Rourke, Robert W., Garen D. Gaston, Kevin A. Meyer, Ashley E. White, and Daniel L. Marks. 2013. "Adipose Tissue NK Cells Manifest an Activated Phenotype in Human Obesity." *Metabolism: Clinical and Experimental* 62 (11): 1557–61
- O'Rourke, Robert W., Ashley E. White, Monja D. Metcalf, Brian R. Winters, Brian S. Diggs, Xinxia Zhu, and Daniel L. Marks. 2012. "Systemic Inflammation and Insulin Sensitivity in Obese IFN- γ Knockout Mice." *Metabolism: Clinical and Experimental* 61 (8): 1152–61
- O'Rourke, RW, MD Metcalf, AE White, A Madala, BR Winters, II Maizlin, BA Jobe, CT Roberts Jr, MK Slifka, and DL Marks. 2009. "Depot-Specific Differences in Inflammatory Mediators and a Role for NK Cells and IFN-G in Inflammation in Human Adipose Tissue." *Int J Obes* 33 (9): 978–90
- O'Shea, Donal, Tom J. Cawood, Cliona O'Farrelly, and Lydia Lynch. 2010. "Natural Killer Cells in Obesity: Impaired Function and Increased Susceptibility to the Effects of Cigarette Smoke." *PLoS ONE* 5 (1): 1–8
- Ouchi, N, J L Parker, J J Lugas, and K Walsh. 2011. "Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease." *Nat Rev Immunol* 11 (2): 85–97 *
- Pegram, Hollie J, Daniel M Andrews, Mark J Smyth, Phillip K Darcy, and Michael H Kershaw. 2010. "Activating and Inhibitory Receptors of Natural Killer Cells." *Immunology and Cell Biology* 89 (10): 216–24 *
- Poloni, Antonella, Giulia Maurizi, Marco Ciarlantini, Martina Medici, Domenico Mattiucci, Stefania Mancini, Angela Maurizi, Massimo Falconi, Attilio Olivieri, and Pietro Leoni. 2015. "Interaction between Human Mature Adipocytes and Lymphocytes Induces T-Cell Proliferation." *Cytotherapy* 17 (9): 1292–1301
- Riordan, Neil H, Thomas E Ichim, Wei-Ping Min, Hao Wang, Fabio Solano, Fabian Lara, Miguel Alfaro, et al. 2009. "Non-Expanded Adipose Stromal Vascular Fraction Cell Therapy for Multiple Sclerosis." *Journal of Translational Medicine* 7: 29
- Shi, Hang, Maia V Kokoeva, Karen Inouye, Iphigenia Tzamelis, Huali Yin, and Jeffrey S Flier. 2006. "TLR4 Links Innate Immunity and Fatty Acid – Induced Insulin Resistance." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (11): 3015–25
- Talukdar, Saswata, Da Young Oh, Gautam Bandyopadhyay, Dongmei Li, Jianfeng Xu, Joanne McNelis, Min Lu, et al. 2012. "Neutrophils Mediate Insulin Resistance in Mice Fed a High-Fat Diet through Secreted Elastase." *Nature Medicine* 18 (9): 1407–12

Viel, Sébastien, Laurie Besson, Emily Charrier, Antoine Marçais, Emmanuel Disse, Jacques Biennu, Thierry Walzer, and Charles Dumontet. 2016. "Alteration of Natural Killer Cell Phenotype and Function in Obese Individuals." *Clinical Immunology*: 5–10

Wang, Qiong A, Caroline Tao, Rana K Gupta, and Philipp E Scherer. 2013. "Tracking Adipogenesis during White Adipose Tissue Development, Expansion and Regeneration." *Nature Medicine* 19 (10): 1338–44 #

Weisberg, Stuart P., Daniel McCann, Manisha Desai, Michael Rosenbaum, Rudolph L. Leibel, and Anthony W. Ferrante. 2003. "Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue." *Journal of Clinical Investigation* 112 (12): 1796–1808

Wen, Haitao, Denis Gris, Yu Lei, Sushmita Jha, Lu Zhang, Max Tze-Han Huang, Willie June Brickey, and Jenny P-Y Ting. 2011. "Fatty Acid-Induced NLRP3-ASC Inflammasome Activation Interferes with Insulin Signaling." *Nature Immunology* 12 (5): 408–15

Wensveen, Felix M., Sonja Valentić, Marko Šestan, Tamara Turk Wensveen, and Bojan Polić. 2015. "The 'Big Bang' in Obese Fat: Events Initiating Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation." *European Journal of Immunology* 45 (9): 2446–56 *

Wensveen, Felix M, Vedrana Jelenčić, Sonja Valentić, Marko Šestan, Tamara Turk Wensveen, Sebastian Theurich, Ariella Glasner, et al. 2015. "NK Cells Link Obesity-Induced Adipose Stress to Inflammation and Insulin Resistance." *Nature Immunology* 16 (4): 376–85

Williams-Bey, Yolanda, Cedric Boullaran, Ali Vural, Ning Na Huang, Il Young Hwang, Chong Shan-Shi, John H. Kehrl. 2014. "Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF-kappaB activation and enhancing autophagy." *PLoS ONE* 9 (6): 1–8

Wrann, Christiane D, Tobias Laue, Lena Hübner, Susanne Kuhlmann, Roland Jacobs, Lilia Goudeva, and Heike Nave. 2012. "Short-Term and Long-Term Leptin Exposure Differentially Affect Human Natural Killer Cell Immune Functions." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302 (1): E108-16

Zhang, Hui H, Melanie Halbleib, Faiyaz Ahmad, Vincent C Manganiello, and Andrew S Greenberg. 2002. "Tumor Necrosis Factor Alfa Stimulates Lipolysis in Differentiated Human Adipocytes Through Activation of Extracellular Signal-Related Kinase and Elevation of Intracellular cAMP." *Diabetes* 51: 2929–35

Zotto, Genny Del, Emanuela Marcenaro, Paola Vacca, Simona Sivori, Daniela Pende, Mariella Della Chiesa, Francesca Moretta, et al. 2016. "Markers and Function of Human NK Cells in Normal and Pathological Conditions." *Associazione Italiana Ricerca Sul Cancro (AIRC)* 9962 (January): 100–114 *

Články označené * jsou review

Články označené # jsou převzaté jako sekundární citace z Wensveen et al. (2015)