

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

**Autor: Paulina Kowalczyk**

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

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

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

Aby ustalić, w jaki sposób DIO wpływa na reakcję CHS mediowaną przez komórki NK, wątrobowe komórki jednojądrzaste (LMNC) hodowano przez 48 godzin w obecności antygeny DNP-BSA w celu uzyskania supernatantów do oceny stężenia cytokin. Ponadto LMNC wybarwiono przeciwciałami monoklonalnymi skonigowanymi z flurochromem

i oceniano przy użyciu cytometrii przepływowej. Analiza cytokin wykazała, że karmienie HFD znacząco zwiększa stężenie IFN- $\gamma$  i IL-12p70 oraz zmniejsza stężenie adiponektyny w supernatantach z hodowli LMNC. Analiza cytometryczna ujawniła, że podawanie HFD przed uczuleniem na DNFB zwiększa odsetek komórek NK1.1<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> i wpływa na rozwój i dojrzewanie komórek NK1.1<sup>+</sup>. Dodatkowo DIO zmniejsza odsetek komórek NK1.1<sup>+</sup> i NK1.1-CD11b<sup>+</sup> wytwarzających IL-10 w wątrobie. Ostatnie badania z wykorzystaniem modelu adoptywnego transferu wykazały, że LMNC są w stanie przenieść odpowiedź CHS na naiwnych syngenicznym biorców, podczas gdy komórki izolowane z węzłów chłonnych i śledziony nie mają takiej zdolności. Biorąc to pod uwagę, aby zweryfikować, czy DIO wpływa na funkcjonowanie wątrobowych komórek NK, przeprowadzono adoptywny transferu komórek. Eksperyment ten wykazał, że przeniesienie komórek LMNC z otyłych myszy do syngenicznych naiwnych biorców o normalnej wadze przenosi reakcję CHS, ale jej nie zaostrza. Jednak uzyskane dane mogą sugerować, że wywołany otyłością stan metazapalenia istotnie wpływa na aktywności komórek NK i jest niezbędny zarówno w fazie indukcji, jak i w fazie efektorowej reakcji CHS.

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

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

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

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