

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



**Bc. Kateřina Macholdová**

Rozdíl v T regulačních buňkách pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek

Difference in T regulatory cells in cord blood of children of healthy and allergic mothers

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Praha, 2018

**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, DD.MM.RRRR

Podpis

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení při zpracovávání mé diplomové práce. Zároveň děkuji celému kolektivu laboratoře Obecné imunologie na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1.LF UK a VFN v Praze za velice příjemné pracovní prostředí. Z kolektivu laboratoře pak jmenovitě děkuji MUDr. Mgr. Viktorovi Černému za spolupráci a mnoho cenných rad, které přispěly k vypracování mé diplomové práce.

Děkuji také své rodině a přátelům, kteří mě během celého studia neustále podporovali.

Tato práce byla podpořena granty AZV 15-26877A, SVV 260 369 a grantem univerzity Karlovy Progres Q25/LF1.

## Abstrakt

Alergická onemocnění patří mezi jedna z nejčastějších onemocnění a jejich incidence celosvětově stále stoupá zejména mezi dětmi a dospívajícími. K rozvoji alergického onemocnění dochází již v časném postnatálním období a bylo popsáno několik faktorů, které mohou novorozence predisponovat ke vzniku alergických onemocnění. Dosud však stále není zcela objasněn mechanismus vzniku alergie. Důležitými imunitními buňkami, které se na tomto mechanismu podílejí, jsou regulační T buňky (Treg, angl. regulatory T cells). Jejich funkcí je vytváření centrální tolerance vůči autoantigenům a periferní tolerance vůči neškodným antigenům vyskytujícím se ve vnějším prostředí, mezi něž patří i alergen.

Cílem této práce bylo porovnání proporčních a funkčních vlastností Treg u dětí zdravých matek (dětí s nízkým rizikem rozvoje alergického onemocnění) a dětí alergických matek (dětí s vysokým rizikem rozvojem alergického onemocnění). Byla sledována jak celková populace Treg tak i jednotlivé subpopulace (přirozené (n)Treg a indukované (i)Treg) v plné pupečnickové krvi obou skupin dětí. Pro posouzení funkčních vlastností byly Treg izolovány z pupečnickové krve pomocí magnetické separace a následně ko-kultivovány s CD4+CD25- T buňkami nebo mononukleární frakcí buněk pupečnickové krve (CBMC, angl. cord blood mononuclear cells), které byly obarveny carboxyfluorescein succinimidyl esterem (CFSE), polyklonálně stimulovány fytohemaglutininem a kultivovány po dobu 3 dní. Supernatanty kultur Treg s CD4+CD25- T lymfocyty či CBMC byly odebírány pro stanovení produkce regulačních cytokinů interleukinu (IL) 10 a transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ , angl. transforming growth factor beta). Z izolovaných Treg byla extrahována RNA pro následnou detekci genové exprese regulačních cytokinů IL-10, TGF- $\beta$  a IL-35.

Mezi dětmi zdravých a alergických matek nebyl pozorován významný rozdíl v zastoupení Treg definovaných na základě exprese povrchových znaků CD4, CD25 a intracelulárního znaku FoxP3. V pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek nebyl pozorován významný rozdíl ani v zastoupení nTreg a iTreg určených na základě intracelulární exprese FoxP3 a Helios. Pomocí imunopresivní eseje byla zjištěna vyšší proliferační kapacita CBMC i CD4+ T buněk dětí alergických matek, avšak nebyly pozorovány supresivní vlastnosti Treg vůči efektorovým buňkám v pupečnickové krvi dětí zdravých ani alergických matek. Produkce IL-10 v supernatantu kultur Treg s efektorovými buňkami byla nižší u dětí alergických matek ve srovnání s dětmi zdravých

matek. Nebyl pozorován významný rozdíl v genové expresi regulačních cytokinů Treg pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek.

Vyšší proliferační kapacita efektorových buněk a nižší produkce IL-10 v supernatantu kultur Treg s efektorovými buňkami ukazují na snížené imunoregulační vlastnosti Treg v pupečnickové krvi dětí alergických matek, které mohou přispívat ke snazšímu rozvoji nežádoucí imunitní odpovědi na relativně neškodné antigeny vnějšího prostředí vedoucí ke vzniku alergie u těchto dětí. Nebyly prokázány supresivní vlastnosti Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek poukazující na vysokou nezralost imunitního systému novorozence ve srovnání s imunitním systémem dospělého jedince.

**Klíčová slova:** regulační T buňky, Treg, alergická onemocnění, pupečnicková krev, FoxP3, Helios, IL-10, TGF- $\beta$ , imunosupresivní esej

## Abstract

Allergic diseases belong to one of the most common diseases and their incidence is increasing worldwide, especially among children and adolescents. The development of an allergic disorder occurs already in the early postnatal period and several factors have been described that can predispose the newborn to an allergic disease. However, the mechanism of allergy development has not yet been fully elucidated. The important immune cells involved in this mechanism are regulatory T cells (Treg). Their function is the formation of central tolerance to autoantigens and peripheral tolerance towards harmless antigens present in the external environment, including allergens.

The aim of this work is to compare the proportion and functional properties of Treg in children of healthy mothers (children with low risk of allergic disease development) and children of allergic mothers (children at high risk of allergic disease development). Both the total Treg population and individual subpopulations (natural (n) Treg and induced (i)Treg) in the whole umbilical cord blood of both groups of children were monitored. To assess the functional properties, Treg were isolated from cord blood by magnetic separation and subsequently co-cultured with CD4+CD25-T cells or cord blood mononuclear cells (CBMC) stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), polyclonally stimulated with phytohemagglutinin and cultured for 3 days. Cell culture supernatants from coculture of Treg with CD4+CD25-T lymphocytes or CBMC were harvested to determine production of regulatory cytokines interleukin (IL) 10 and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ). From the isolated Treg RNA was extracted for subsequent detection of the gene expression of the regulatory cytokines IL-10, TGF- $\beta$  and IL-35.

There was no significant difference in the frequency of Treg defined based on expression of cell surface markers CD4, CD25 and intracellular expression of FoxP3 between children of healthy and allergic mothers. No significant difference was observed either in the representation of nTreg and iTreg determined based on the intracellular expression of FoxP3 and Helios in the cord blood of children of healthy and allergic mothers. An immunosuppressive assay revealed a higher proliferation capacity of both CBMC and CD4+ T cells of children of allergic mothers but suppressive properties of Treg of cord blood children of healthy and allergic mothers were not observed. IL-10 production in supernatant of co-culture of Treg with effector cells was lower in children

of allergic mothers compared to children of healthy mothers. No significant difference in the gene expression of regulatory cytokines in Treg of cord blood between children of healthy and allergic mothers was observed.

Higher effector cell proliferation capacity and lower IL-10 production in the Treg cell culture supernatant demonstrate decreased Treg immunoregulatory properties in the cord blood of children of allergic mothers that may contribute to the easier development of undesirable immune responses to relatively harmless environmental antigens (allergens) resulting in easier allergy development in these children. The suppressive properties of Treg in the cord blood of healthy and allergic mothers have not been proven. This finding could indicate a general immaturity of the newborn's immune system compared to the immune system of adults.

**Key words:** regulatory T cells, Treg, allergic diseases, cord blood, FoxP3, Helios, IL-10, TGF- $\beta$ , immunosuppressive assay

# Obsah

Seznam zkratek .....	3
1 Úvod .....	6
2 Alergie a alergická onemocnění .....	7
2.1 Hypotézy vzniku alergických onemocnění .....	8
2.2 Th1/Th2 paradigma .....	8
2.2.1 Převaha Th2 imunitní odpovědi u novorozenců .....	10
2.3 Prediktivní znaky rozvoje alergických onemocnění u dětí .....	11
3 Regulační T buňky .....	12
3.1 Objev regulačních T buněk .....	13
3.2 Fenotypová charakteristika regulačních T buněk .....	14
3.2.1 Povrchové znaky .....	14
3.2.2 Intracelulární znaky .....	15
3.3 Subpopulace regulačních T buněk .....	16
3.3.1 Přirozené regulační T buňky (nTreg) .....	16
3.3.2 Indukované regulační T buňky (iTreg) .....	16
3.4 Mechanismy působení regulačních T buněk .....	18
3.5 Role regulačních T buněk u alergických onemocnění .....	19
4 Cíle práce .....	22
5 Materiál a metody .....	23
5.1 Materiál .....	23
5.2 Metody .....	26
5.2.1 Pupečnicková krev .....	26
5.2.2 Povrchové a intracelulární barvení regulačních T buněk z plné pupečnickové krve .....	26
5.2.3 Izolace mononukleární frakce leukocytů .....	26
5.2.4 Magnetická separace regulačních T buněk z mononukleární frakce leukocytů .....	27
5.2.5 Imunosupresivní esej – <i>in vitro</i> ko-kultivace regulačních T buněk s efektorovými buňkami .....	28
5.2.6 Izolace RNA a DNA .....	29
5.2.7 Reverzní transkripce .....	30
5.2.8 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) .....	31
5.2.9 Imunoenzymatické stanovení koncentrace cytokinů (ELISA) v supernatantech kultur .....	32
6 Výsledky .....	33

6.1	Analýza povrchových a intracelulárních znaků regulačních T buněk z plné pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek pomocí průtokové cytometrie.....	33
6.1.1	Analýza regulačních T buněk definovaných jako CD4+CD25+ T buňky	33
6.1.2	Analýza regulačních T buněk definovaných jako CD4+CD25+FoxP3+ T buňky .....	34
6.1.3	Analýza zastoupení přirozených a indukovaných regulačních T buněk...	36
6.2	Analýza imunosupresivní eseje – <i>in vitro</i> ko-kultivace izolovaných Treg s autologními mononukleárními buňkami a CD4+ T buňkami z pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek.....	39
6.2.1	Měření čistoty populací regulačních T buněk a CD4+ T buněk získaných magnetickou separací.....	39
6.2.2	Imunosupresivní esej .....	41
6.2.3	Imunosupresivní esej – buffy coat .....	44
6.3	Detekce imunoregulačních cytokinů v supernatantu buněčných kultur ko-kultivací Treg s CBMC/CD4+ T buňkami <i>in vitro</i> pomocí metody ELISA.....	45
6.4	Stanovení genové exprese cytokinů v regulačních T buňkách separovaných z pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek .....	48
7	Diskuze .....	51
8	Závěr.....	58
9	Seznam použité literatury .....	59

## Seznam zkratek

APC	buňka předkládající antigen (angl. antigen presenting cell)
BSA	bovinní sérový albumin
CBMC	mononukleární buňky pupečnickové krve (angl. cord blood mononuclear cells)
CCR	C-C chemokinový receptor
CD	diferenční antigen (angl. cluster of differentiation)
CD4+	buňka pozitivní pro znak CD4
cDNA	komplementární DNA (angl. complementary DNA)
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CTLA-4	angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAMPs	angl. danger associated molecular patterns
DNA	deoxyribonukleová kyselina (angl. deoxyribonucleic acid)
ELISA	enzymaticky značená imunosorbentní analýza (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
FBS	fetální bovinní sérum
FcεRI	vysokoafinní receptor pro imunoglobulin E (angl. high-affinity receptor for the Fc region of immunoglobulin E)
FoxP3	forkhead box protein P3
GITR	angl. glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli (angl. graft versus host disease)
IFN-γ	interferon gama
IgE	imunoglobulin E
IL	interleukin
IL-12Rβ2	angl. interleukin 12 receptor beta 2 subunit

IL-2R $\alpha$	alfa podjednotka receptoru pro interleukin 2
IL-R	interleukinový receptor
IPEX	imunitní polyendokrinopatie a enteropatie vázaná na X chromosom (angl. immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrom)
iTreg	indukované regulační T buňky (angl. induced regulatory T cells)
LAG3	angl. lymphocyte activation gene 3
LPS	lipopolysacharid (angl. lipopolysaccharide)
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
NK	buňky „přirození zabíječi“ (angl. natural killer cells)
nTreg	přirozené regulační T buňky (angl. natural regulatory T cells)
PBMC	mononukleární buňky periferní krve (angl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (angl. phosphate buffered saline)
PD-1	angl. program cell death 1
PHA	fytohemagglutinin (angl. phytohemagglutinin)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (angl. quantitative real-time polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina (angl. ribonucleic acid)
ROR $\gamma$ t	angl. retinoic acid receptor-related-orphan receptor gamma
TBS	Trisem pufrovaný fyziologický roztok (angl. Tris buffered saline)
TCR	T buněčný receptor (angl. T cell receptor)
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor beta (angl. transforming growth factor beta)
TGF- $\beta$ R	receptor transformujícího růstového faktoru beta (angl. transforming growth factor beta receptor)
Th	pomocné T buňky (angl. T helper cell)

TLR	angl. toll like receptors
TMB	3,3,5,5-tetrametylbenzidin
Tn	naivní pomocné T buňky (angl. naive T helper cells)
TNF- $\beta$	faktor nádorové nekrózy beta (angl. tumor necrosis factor beta)
Tr1	regulační buňky typu 1 (angl. type 1 regulatory T cells)
Treg	regulační T buňky
tTreg	angl. thymus-derived regulatory T cells
WHO	Světová zdravotnická organizace (angl. World Health Organization)

# 1 Úvod

Ve vyspělých zemích dochází k nárůstu výskytu civilizačních chorob u stále většího počtu lidí zejména v posledních 50 letech. Civilizační choroby jsou považovány za onemocnění způsobená životním stylem. Mezi tyto choroby s rostoucí incidencí především v zemích vyspělého světa mohou být bezesporu zařazena i alergická onemocnění. Alergie jsou multifaktoriální onemocnění. Kromě genetického vlivu má na rozvoj alergického onemocnění silný vliv právě životní prostředí. Vyšší výskyt alergií bývá spojován s životem v městském prostředí s vyššími hygienickými standardy, kde je imunitní systém lidí vystaven nižší alergenní a mikrobiální stimulaci v časném postnatálním období, které je důležité pro nastavení imunoregulačních odpovědí. Oproti tomu u lidí žijících na venkově bývá výskyt alergií nižší (Horak *et al.*, 2014).

K rozvoji alergického onemocnění může docházet již krátce po porodu. Pro novorozence je kritická relativně krátká časová perioda (pár měsíců), ve které jeho imunitní systém musí vyhodnotit, které antigeny z vnějšího prostředí má rozpoznávat jako tělu nebezpečné a které jako neškodné. Takto brzy vytvořená imunitní tolerance zůstane jedinci po zbytek života. Některé děti mají již po narození vyšší predispozici k rozvoji alergického onemocnění. Bylo popsáno několik prediktivních znaků poukazujících na vyšší riziko vzniku alergie u dítěte, avšak dosud nejspolehlivějším faktorem se zdá být přítomnost alergického onemocnění u matky (Prescott *et al.*, 2003). Dodnes však není jasné, jaké imunitní mechanismy jsou zodpovědné za rozvoj alergického onemocnění u těchto predisponovaných dětí. Významnou funkci u alergických onemocnění hrají Treg. Ty mají nezastupitelnou roli při zajišťování nejen centrální imunitní tolerance vůči vlastním antigenům ale i při zajišťování periferní tolerance právě vůči antigenům z vnějšího prostředí, kterým jsme vystavováni. Snížená funkční kapacita Treg u dětí alergických matek je zodpovědná za nedostatečné imunoregulační vlastnosti Treg při rozpoznání alergenů, a to by mohlo vést ke snazšímu rozvoji alergií u dětí s vyšší predispozicí ke vzniku alergického onemocnění.

## 2 Alergie a alergická onemocnění

Alergii lze popsat jako přehnanou či nepřiměřenou odpověď imunitního systému na neškodný antigen vnějšího prostředí (označovaného v tomto konkrétním případě jako alergen). Podle klasifikace dle Coombsa a Gella jsou alergie řazeny mezi imunopatologie I. typu zprostředkované protilátkami izotypu E (IgE – imunoglobulin E, angl. immunoglobulin E). Vlastní alergická reakce je vyvolána po setkání s alergenem u vnímavých jedinců, u kterých nejprve musí dojít k fázi senzibilizace – indukci diferenciaci pomocných T lymfocytů typu 2 (Th2, angl. type 2 T helper cells) a produkci cytokinů IL-4, IL-5 či IL-13 typických pro tento typ reakce s následnou tvorbou specifických protilátek IgE plazmocyty. Specifické IgE protilátky proti alergenu se váží na vysokoafinní receptor FcεRI (z angl. high-affinity receptor for the Fc region of immunoglobulin E) na bazofilech, eozinofilech či žírných buňkách (hlavních efektorových buňkách alergické reakce). Při každém dalším setkání se stejným alergenem probíhá tzv. časná fáze alergické reakce. Po vazbě alergenu na IgE dochází k agregaci FcεRI receptorů na žírných buňkách a „crosslinkingu“ FcεRI. Bazofily a žírné buňky následně reagují degranulací. Tím se do vnějšího buněčného prostředí dostanou hlavní mediátory způsobující symptomy alergické reakce (např. histamin).

Projevy alergických onemocnění jsou nejčastěji patrné na kůži a sliznicích. Mezi alergická onemocnění patří např. ekzém, astma, senná i chronická rýma. Dalšími alergickými poruchami jsou i potravinové či lékové alergie. Celosvětově mají alergická onemocnění stále vzrůstající prevalenci zejména mezi dospívajícími a dětmi. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO, z angl. World Health Organization) vykazuje 11-14 % dětí starších 5-ti let astmatické symptomy (<http://www.who.int/>).

V Evropě se alergie projevuje zhruba u 20 % lidí, kteří trpí nějakou formou alergického onemocnění, přičemž cca 150 milionů Evropanů má chronické alergické onemocnění (<http://www.eaaci.org/outreach/public-declarations.html>). V České republice se prevalence alergických onemocnění u dětí v roce 2016 pohybovala kolem 29 %. Od roku 1996 výskyt astmatu či alergické rýmy vzrostl, avšak od roku 2006 do roku 2016 se výskyt alergických onemocnění u předškolních dětí v České republice výrazně nezvýšil. Prevalence astmatu u dospívajících však stále rostla (<http://www.szu.cz/tema/prevence/alergie-deti>).

## 2.1 Hypotézy vzniku alergických onemocnění

Jelikož alergická onemocnění jsou ve své podstatě poruchou v periferní toleranci, Treg jsou díky své funkci považovány za jednu z důležitých buněčných populací podílející se na regulaci imunitní reakce vůči alergenům. Všeobecně známá hygienická hypotéza vysvětluje neustále vzrůstající výskyt alergických onemocnění a tvrdí, že nedostatečné vystavování se mikrobiálním antigenům z vnějšího okolí od útlého věku může vést k poruše imunitní tolerance vůči těmto antigenům a tedy ke snazšímu rozvoji alergických onemocnění (Strachan, 1989). Mikrobiální antigeny se řadí mezi tzv. DAMPs (z angl. danger associated molecular patterns), které jsou rozpoznávány např. TLR receptory (z angl. toll like receptors) přítomnými na imunitních buňkách. Mikrobiální antigeny stimulují imunitní buňky s TLR na svém povrchu k produkci prozánětlivých cytokinů a tím posilují Th1 imunitní odpověď (Negrini *et al.*, 2014).

V poslední době se začaly objevovat i další alternativní hypotézy vysvětlující zvýšený výskyt alergických onemocnění. Jednou z nich je i tzv. hapten-chemical atopy hypotéza. Tato hypotéza předpokládá, že na výskyt atopie nebo přímo vznik alergického onemocnění má vliv působení haptenu (tj. nízkomolekulárních chemických látek). Hapteny ve své nativní podobě jsou neškodné, avšak po vazbě na makromolekuly se stávají imunogenními. Do našeho okolí se hapteny dostávají průmyslovým zpracováním výrobků, např. v upravených potravinách, konzervantech, vůních i sprejích, barvách a nejběžnějších čistících prostředcích. Nejčastěji se jejich vliv projevuje na kůži kontaktní dermatitidou anebo po vdechnutí na sliznicích dýchacích cest. Působení haptenu vychyluje rovnováhu imunitního systému k Th2 imunitní odpovědi podporující alergie viz výše (shrnutí v McFadden *et al.*, 2009).

## 2.2 Th1/Th2 paradigma

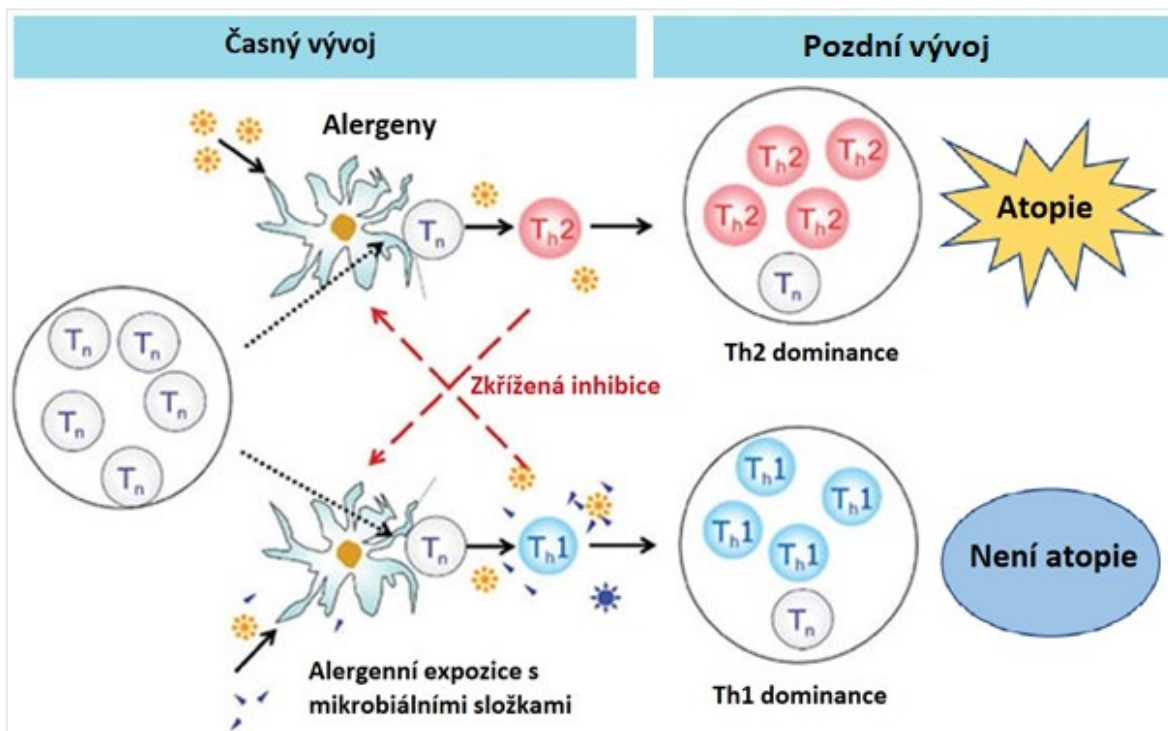
Ačkoliv patogeneze alergických onemocnění může být způsobena mnoha vlivy, z imunologického hlediska jsou tato onemocnění důsledkem poruchy imunoregulačních mechanismů, které vedou k nevyrovnané imunitní odpovědi mezi Th1 a Th2 buňkami (viz **Obrázek 1**).

Již dlouho se ví, že lidé trpící alergickým onemocněním mají rovnováhu imunitní odpovědi vychýlenou ve prospěch Th2 odpovědi a Th1 reakce je u těchto pacientů snížena, patrně kvůli nižší produkci interferonu gama (IFN- $\gamma$ , angl. interferon gamma)

(Wong *et al.*, 2001). Th2 buňky jsou imunitními buňkami stimulujícími B lymfocyty k produkci IgE. Původní fyziologická funkce produkce IgE iniciovaná Th2 buňkami byla obrana proti mnohobuněčným extracelulárním parazitům. Některé z majoritně se vyskytujících alergenů mohou však spouštět reakce, díky kterým se z naivních T buněk preferenčně diferencují Th2 buňky (Traidl-Hoffmann *et al.*, 2005).

Th1 buňky mají hlavní roli při eliminaci intracelulárních patogenů a o toto vyloučení se zaslouhují především produkcí IFN- $\gamma$ . Th1 imunitní odpověď a s ní související mediátory často vedou k potlačení Th2 odpovědi. Na myším experimentálním modelu bylo zjištěno, že IFN- $\gamma$  zmírňuje projevy alergických obtíží jako např. potlačení otoku nosní sliznice či produkce hlenu. Navíc se ukázalo, že IFN- $\gamma$  je schopen inhibovat produkci a diferenciaci eozinofilů v kostní dřeni (Mitchell *et al.*, 2011). Na druhou stranu, u chronické rinosinusitidy byla zjištěna zvýšená produkce Th1 cytokinů, zejména IFN $\gamma$ . To by mohlo poukazovat na možnou roli Th1 imunitní odpovědi při podpoře chronických zánětlivých alergických stavů (Van Zele *et al.*, 2006).

Z výše uvedeného vyplývá, že Th1 a Th2 imunitní odpovědi představují v lidském těle protipóly, které musejí být neustále v rovnováze, neboť vychýlením k jednomu nebo druhému typu imunitní reakce může dojít k rozvoji imunopatologické reakce. Cílem imunoterapeutických přístupů při léčbě alergických onemocnění je obrátit produkci antigenně specifických protilátek IgE na produkci specifických protilátek IgG (IgG4). Navíc přítomnost specifických IgG4 protilátek není podmínkou k rozvoji alergické reakce, protože se neváží na Fc $\epsilon$ RI. Účelem alergenně specifické imunoterapie bývá zároveň podpoření regulačních imunitních mechanismů, zejména právě aktivace regulačních T buněk, které funkce Th2 buněk potlačují a mohou zabráňovat i aktivaci žírných buněk, bazofilů či eozinofilů (shrnutí v Larsen *et al.*, 2016).



**Obrázek 1: Polarizace Th1 a Th2 imunitní odpovědi po narození**

Po narození převažují v imunitním systému dítěte naivní pomocné T buňky (Tn). Pokud brzy po porodu převládá stimulace imunitního systému alergeny bez přítomnosti mikrobiálních antigenů, dojde k rozvoji a převaze Th2 imunitní odpovědi. Dostatečná stimulace alergeny i mikrobiálními antigeny současně vede k přednostnímu rozvoji Th1 imunitní odpovědi. V pozdějším věku počet Tn výrazně klesne a polarizace imunitního systému již není modulována mikrobiálními antigeny (převzato z Orihara et al., 2008).

### 2.2.1 Převaha Th2 imunitní odpovědi u novorozenců

Ze studií zabývajících se nastavením imunitní tolerance a imunitního systému v průběhu těhotenství ve vztahu matka-plod bylo již dříve zjištěno, že imunitní systém novorozence bývá vychýlen ve prospěch Th2 imunitní odpovědi. Vyvíjející se plod je tak zřejmě chráněn před rozpoznáním aloantigenů otce matčíným imunitním systémem a zároveň je matka chráněna před rozeznáním svých antigenů imunitním systémem plodu. Oproti tomu Th1 imunitní odpověď (produkce cytokinů IL-2, IFN- $\gamma$  a TNF- $\beta$ ) v těhotenství není žádoucí, jelikož nemá ochranný účinek vůči plodu a převaha Th1 imunitní odpovědi může vést k rejekci plodu matkou. Během těhotenství bývá

podporována protilátková imunitní odpověď, jelikož je jednodušší potlačit tento typ imunitní odpovědi než buněčnou imunitu (Wegmann *et al.*, 1993). Převažující Th2 odpověď v imunitním systému novorozence podporují i výsledky práce, ve které buňky izolované z pupečnickové krve novorozenců a stimulované běžnými alergeny vyskytujícími se ve vnějším prostředí produkovaly především IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13, tzn. většinu cytokinů typických právě pro Th2 imunitní odpověď (Taylor and Bryson, 1985). Stimulace novorozeneckého imunitního systému k přednostnímu vývoji Th1 odpovědi, odklon od převažující Th2 odpovědi a vytvoření rovnováhy mezi oběma typy imunitní reakce je pro novorozené dítě stěžejní kvůli správnému vytvoření imunitní tolerance.

### **2.3 Prediktivní znaky rozvoje alergických onemocnění u dětí**

Predispozice dětí k rozvoji alergického onemocnění se dá odvozovat z rodinné historie výskytu těchto onemocnění. Jelikož plod se během těhotenství ocitá v intimní interakci s matčíným imunitním systémem, spolehlivým znakem, který by mohl ukazovat, zda dítě má či nemá predispozici k rozvoji alergického onemocnění, je pak alergický stav matky (Prescott *et al.*, 2003; Sandberg *et al.*, 2009).

Spolu s rodinnou historií výskytu alergie jsou dlouho považovány za prediktivní znaky rozvoje alergického onemocnění u dětí vyšší hodnoty protilátek IgE v pupečnickové krvi (Bergmann *et al.*, 1997). Důvodem k výskytu IgE protilátek v pupečnickové krvi je přímé vystavení plodu antigenu již v děloze (*in utero*) anebo právě výskyt alergie u matky. Množství IgE protilátek v matčíně krvi a jejich množství v pupečnickové krvi dítěte vzájemně souvisí. Předchozí senzibilizace matky má vliv na množství IgE protilátek v pupečnickové krvi i na senzibilizaci a případné alergické projevy u dítěte v pozdějším věku (Bergmann *et al.*, 1997; Ferguson *et al.*, 2009; De Amici *et al.*, 2017). Postupně se však ukázalo, že stanovení IgE protilátek v pupečnickové krvi se nezdá být spolehlivé tak, jako rodinná anamnéza, jelikož tyto hodnoty se mohou měnit např. v závislosti na ročním období, ve kterém bylo dítě narozené (Susanto *et al.*, 2017, 2018).

### 3 Regulační T buňky

Treg jsou buňky, které mají schopnost regulovat funkce ostatních imunitních buněk, a to jak přirozeného, tak adaptivního imunitního systému. Treg představují poměrně malou populaci T buněk. Výskyt v periferní krvi u dospělého člověka se pohybuje mezi 5-10 % z CD4+ T lymfocytů (Ling *et al.*, 2004b). Procentuální zastoupení Treg v pupečnickové krvi uváděné v literatuře není jednotné a rozsah může více oscilovat (Kim *et al.*, 2012). Přesto jsou Treg hlavními buňkami imunitního systému, které zajišťují centrální toleranci vůči vlastním antigenům (autoantigenům), zabraňují vzniku autoimunitních onemocnění odstraňováním potenciálně nebezpečných T buněk rozeznávajících autoantigeny a zároveň jsou Treg buňkami podílejícími se na utváření periferní tolerance. Periferní tolerance je mechanismus, který naivním T lymfocytům přiřazuje schopnost nerozpoznávat antigeny, které nejsou našemu tělu vlastní, ale přirozeně se v něm či jeho okolí vyskytují, např. komensální bakterie, alergeny, složky mikrobioty či potravinové antigeny. Patogenní antigeny rozpoznává přirozený imunitní systém, který signalizuje buňkám adaptivního imunitního systému přítomnost potenciálně nebezpečného antigenu. Složky adaptivního systému následně zahájí imunitní reakci odpovídající rozpoznávanému antigenu. Za fyziologických okolností autoantigeny a neškodné vnější antigeny na periférii nejsou potenciálně nebezpečnými agens aktivujícími přirozený imunitní systém. Pokud se naivní T lymfocyt na periférii setká s autoantigeny a neškodnými antigeny z vnějšího prostředí, absence kostimulačních signálů vede k tomu, že T lymfocyt na uvedené antigeny nereaguje. Toho může být docíleno klonální delecí, klonální anergií, klonální ignorací anebo supresí autoreaktivních klonů T buněk. Někdy může dojít k narušení mechanismu periferní tolerance a aktivace T lymfocytu neškodným vnějším antigenem vede ke spuštění neadekvátní imunitní reakce.

Správné nastavení periferní tolerance je rozhodující také v období těhotenství, kdy Treg mají významný úkol při zabránění rozpoznání antigenů otce matčiným imunitním systémem. Treg se během těhotenství nacházejí v hojném počtu na fetomaternálním rozhraní a starají se o to, aby nedošlo k rozpoznání autoantigenů na plodu, což by mohlo vést k rejekci plodu způsobené reakcí imunitního systému matky (shrnuto v Ruocco *et al.*, 2014).

Důležitou roli Treg zastávají i v protinádorové imunitě. Je všeobecně známo, že Treg pronikají do nádorového prostředí a mohou podporovat růst nádorů právě tím, že působí supresivně na efektorové imunitní buňky, které by mohly růst nádoru potlačit či ho zcela eliminovat. Navíc nádorová tkáň má sama schopnost indukce tvorby Treg (shrnuje v Nishikawa and Sakaguchi, 2010).

### 3.1 Objev regulačních T buněk

Imunomodulační vlastnosti lymfocytů odvozených z thymu (tzv. thymocytů) byly popsány u myši již v 70. letech minulého století. Bylo zjištěno, že tyto lymfocyty nejen moduluji funkce imunitního systému, ale jsou schopny zřetelné suprese ostatních T buněk. Vznikla tak domněnka, že by se tyto thymocyty mohly významně podílet na indukci imunitní tolerance nebo celkové regulaci imunitní odpovědi (Gershon and Kondo, 1970; Seddiki *et al.*, 2006a). Tím byly položeny základy pro další studium této populace T buněk.

Průlomem v oblasti výzkumu T buněk s imunoregulačními vlastnostmi byla publikace práce Shimona Sakaguchiho a kol. v roce 1995. Popisují v ní populaci T buněk s regulačními vlastnostmi na myším experimentálním modelu. Jako první provedli podrobnější charakterizaci této populace a zjistili, že se jedná o subpopulaci pomocných CD4<sup>+</sup> T buněk s charakteristickou expresí povrchového znaku CD25. Po depleci těchto buněk došlo u myši k vývoji nejrůznějších orgánových i systémových autoimunitních onemocnění a stejně tak i ke vzniku reakce podobné reakci štěpu proti hostiteli (GvHD, z angl. graft versus host disease). Tato zjištění potvrdila, že populace T buněk, kterou se zabývali, má významnou imunoregulační roli a je důležitá pro zachování centrální imunitní tolerance (Sakaguchi *et al.*, 1995).

Na přelomu tisíciletí se začaly objevovat studie zkoumající výskyt T buněk s regulačními nebo supresivními vlastnostmi u lidí. Treg (jako CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T buňky) v periferní krvi dospělého zdravého člověka popsal hned několik výzkumných skupin. Bylo zjištěno, že lidské Treg jsou fenotypově i funkčně podobné myším Treg. Tedy že vznikají v thymu a působí supresivně na efektorové buňky imunitního systému. Lidské Treg je možné izolovat i z pupečnickové krve novorozenců (Baecher-Allan *et al.*, 2001; Dieckmann *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2001).

## 3.2 Fenotypová charakteristika regulačních T buněk

### 3.2.1 Povrchové znaky

Jak již bylo zmíněno výše, Treg představují subpopulaci pomocných CD4<sup>+</sup> T buněk. U lidí jsou fenotypově charakterizovány expresí povrchového znaku CD4 a vysokou expresí alfa podjednotky receptoru pro interleukin 2 (IL-2R $\alpha$ ) neboli povrchového znaku CD25 (viz výše). IL-2 je cytokin nezbytný pro aktivaci a proliferaci lymfocytů po setkání s antigenem. Aktivované pomocné T lymfocyty zároveň samy IL-2 tvoří. Treg nejsou schopny produkovat IL-2, ale potřebují jej k zachování své buněčné populace a tím k udržení správné imunitní homeostáze. Zdá se, že signalizace skrze receptor pro IL-2 (IL-2R) není stěžejní pro vývoj Treg, avšak mutace IL-2R vede k rozvoji autoimunitních onemocnění (Fontenot *et al.*, 2005a; Setoguchi *et al.*, 2005).

Charakterizace Treg jen pomocí znaků CD4 a CD25 není dostačující, jelikož CD25 je znak vyskytující se rovněž na povrchu aktivovaných T buněk. Ostatně dříve bylo CD25 využíváno pro stanovení aktivovaných buněk (Sakaguchi *et al.*, 1995). Jedním z dalších významných znaků pro bližší fenotypovou charakterizaci Treg se ukázala být nízká exprese alfa podjednotky receptoru pro IL-7 neboli povrchový znak CD127 (Liu *et al.*, 2006a). Tento znak v kombinaci s vysokou expresí CD25 je považován za dostačující pro odlišení populace Treg od konvenčních CD4<sup>+</sup> T buněk v lidské periferní ale i pupečnickové krvi (Seddiki *et al.*, 2006). Na rozdíl od lidské periferní krve, nízká exprese CD127 se nedá považovat za charakteristický znak populace Treg u myši, jelikož myši Treg se naopak vyznačují vysokou expresí znaku CD127 (Simonetta *et al.*, 2010).

Některé studie uvádějí další rozpoznávací fenotypové znaky Treg např. glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor (GITR), imunoregulační molekuly jako programmed death-1 (PD-1) nebo cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4). Jiné uváděné znaky umožňují lépe rozlišit mezi subpopulacemi Treg např. molekula CD45RA (hlavní povrchový znak pro naivní T buňky) nebo neuropilin-1 (koreceptor receptoru tyrosin kinázy pro vaskulární endoteliální růstový faktor a proteinů z rodiny semaforinů) jsou někdy používány jako charakteristické znaky nTreg a integrin CD103 jako povrchový znak slizničních Treg (Chen *et al.*, 2008; Sarris *et al.*, 2008; Rodríguez-Perea *et al.*, 2016). Všechny tyto znaky však nejsou výhradně přítomny na Treg, ale jsou exprimovány i na jiných buňkách v těle.

### 3.2.2 Intracelulární znaky

Až na výjimku (viz níže) je pro Treg typická konstitutivní exprese transkripčního faktoru forkhead box protein P3 (FoxP3). Transkripční faktor FoxP3 se řadí do podskupiny P rodiny FOX proteinů. Tato rodina proteinů má charakteristickou konzervovanou DNA vazebnou doménu jménem forkhead/winged helix (Bandukwala *et al.*, 2011). FoxP3 je hlavní faktor, díky kterému Treg vykazují významné imunosupresivní vlastnosti a alespoň u myši má exprese FoxP3 u Treg vyvíjejících se v thymu velkou roli při vymezení buněčné linie Treg (Fontenot *et al.*, 2005b). Oproti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T buňkám CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg exprimují FoxP3 i v klidovém stavu a exprese FoxP3 na úrovni mRNA i proteinu je pro klidové Treg ojedinělá (Fontenot *et al.*, 2003). Na druhou stranu je role FoxP3 při specifikaci Treg u lidí více kontroverzní, jelikož bylo zjištěno, že u konvenčních CD4<sup>+</sup> T buněk dochází po polyklonální stimulaci k přechodné expresi FoxP3, ale tyto buňky nevykazují supresivní vlastnosti (Wang *et al.*, 2007). FoxP3 se tedy nedá u lidských buněk považovat za specifický znak pro Treg.

Mutace v genu pro transkripční faktor FoxP3 u lidí vede k rozvoji vážného autoimunitního onemocnění zvaného imunitní polyendokrinopatie a enteropatie vázaná na X chromosom (tzv. IPEX syndrom, z angl. Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome) (Craig L. Bennett *et al.*, 2001). Myši s mutací genu *foxp3* vykazují tzv. *scurfy* fenotyp. Tyto myši mají recesivní mutaci vázanou na X chromosom byl pozorován rozvoj podobně závažných autoimunit jako u lidí. Bylo zjištěno, že CD4<sup>+</sup> T buňky jsou právě těmi efektorovými buňkami zodpovědnými za vznik těchto onemocnění (Blair *et al.*, 1994) a o pár let později vyšlo najevo, že se jedná o mutovaný gen pro FoxP3 (Fontenot *et al.*, 2003).

Druhým intracelulárním znakem, kterým se CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg vyznačují, je transkripční faktor Helios, transkripční faktor z rodiny Ikaros. Bylo pozorováno, že pokud jsou lidské i myši T buňky (jak CD4<sup>+</sup> T buňky, včetně Treg, tak CD8<sup>+</sup> T buňky) aktivovány skrze T buněčný receptor (TCR, angl. T cell receptor), po následné proliferaci exprimují mimo jiné i Helios (Akimova *et al.*, 2011). Helios je preferenčně exprimován v buněčných liniích vznikajících v thymu. V thymu a lymfatických uzlinách byl Helios nejvíce detekován u populace CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T buněk, která má současně zvýšenou expresi FoxP3. Navíc na periférii bývá Helios pozorován asi u 70 % Treg současně pozitivních i pro FoxP3. Expresie obou těchto transkripčních faktorů je tedy výhradně vlastní populaci

Treg, která vzniká v thymu a na periférii se vyskytuje druhá populace CD4+CD25+FoxP3+Helios- Treg (viz níže) (Thornton *et al.*, 2010).

### 3.3 Subpopulace regulačních T buněk

Treg se dají rozdělit na dvě základní subpopulace – přirozené Treg (nTreg, z angl. natural Treg) a indukované Treg (iTreg, z angl. induced Treg) (shrnuto v Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009).

#### 3.3.1 Přirozené regulační T buňky (nTreg)

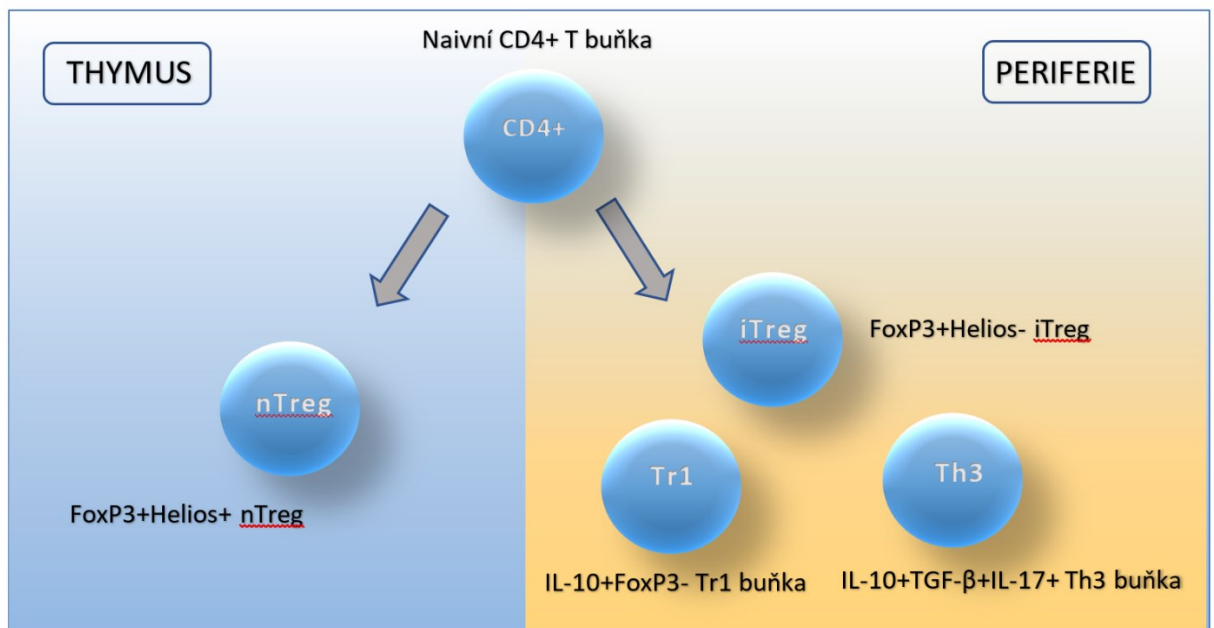
nTreg vznikají v thymu negativní selekcí, proto se také někdy v literatuře uvádějí jako tTreg (z angl. thymus-derived Treg). Tato subpopulace Treg je charakterizována jako CD4+CD25+CD127-FoxP3+Helios+ buňky (Thornton *et al.*, 2010).

nTreg tvoří majoritní populaci Treg a mají za úkol nastavit v těle centrální toleranci vůči vlastním antigenům. nTreg představují subpopulaci se silnými supresivními vlastnostmi a jsou hlavními buňkami, které zabraňují rozvoji nežádoucích autoimunitních reakcí v těle (Sakaguchi, 2005). U alergických reakcí jsou nTreg právě ony buňky, které mohou potlačovat produkci alergenně specifických protilátek IgE a také inhibovat funkce či migraci efektorových buněk jak Th1, Th2 i Th17 tak bazofilů, žírných buněk či eozinofilů (Sogut *et al.*, 2012).

#### 3.3.2 Indukované regulační T buňky (iTreg)

iTreg vznikají v sekundárních lymfoidních orgánech z konvenčních CD4+ T buněk po určité antigenní stimulaci nebo pod vlivem cytokinového mikroprostředí, zejména při působení TGF- $\beta$ . Hlavní úkol iTreg spočívá v nastavení periferní tolerance. Často se iTreg nacházejí pod slizničními povrchy nebo bývají tkáňově specifické (shrnuto v Lehtimäki and Lahesmaa, 2013). Bylo zjištěno, že iTreg oproti nTreg chybí exprese transkripčního faktoru Helios. Toto zjištění někteří autoři vyvracejí, jelikož se ukázalo, že Helios je exprimován Treg jak v thymu tak na periférii (Ross *et al.*, 2014) a Helios tak nemůže být považován za věrohodný znak pro odlišení nTreg a iTreg (Szurek *et al.*, 2015). Doposud však nebyl nalezen jiný spolehlivý intracelulární nebo extracelulární znak, který by iTreg od nTreg jinak odlišoval. Podle zjištění Thorntonové a kol. jsou tedy iTreg charakterizovány jako CD4+CD25+CD127-FoxP3+Helios- buňky (Thornton *et al.*, 2010).

iTreg představují heterogenní populaci buněk. Mezi iTreg bývají řazeny Th3 buňky. Tyto buňky mají mezi iTreg své místo díky schopnosti produkovat regulační cytokiny IL-10, TGF- $\beta$  či dokonce IL-17 typický pro Th17 typ imunitní odpovědi (Ayyoub *et al.*, 2009). Kromě Th3 buněk byla charakterizována i populace Th17 buněk s regulačními vlastnostmi, resp. buňky exprimující chemokinový receptor CCR6, transkripční faktor retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma (ROR $\gamma$ t) a FoxP3 (CD4+ROR $\gamma$ t+FoxP3+CCR6+ buňky) navíc produkující IL-17 (Voo *et al.*, 2009). Zvláštní subpopulaci Treg představují regulační buňky typu 1 (Tr1, angl. type 1 regulatory T cell), které rovněž jsou řazeny mezi iTreg. Tr1 byly popsány jako CD4+ T buňky, kterým chybí exprese FoxP3, přesto však vykazují supresivní vlastnosti a regulují imunitní funkce produkcí IL-10 (Groux *et al.*, 1997) viz **Obrázek 2**. Dalších nově charakterizovaných subpopulací iTreg pravděpodobně bude v budoucnu přibývat.



**Obrázek 2: Nejdůležitější subpopulace Treg.**

Centrální toleranci vůči autoantigenům zajišťují nTreg vznikající v thymu. Na periférii zajišťují toleranci vůči neškodným vnějším antigenům iTreg, mezi něž se řadí Tr1 buňky produkující IL-10 a Th3 buňky s produkcí regulačních cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  i IL-17.

(Treg – regulační T buňky; CD4+ - buňka pozitivní pro znak CD4, nTreg – přirozené regulační T buňky, iTreg – indukované regulační T buňky, Tr1 – regulační buňky typu 1, Th3 – pomocné T buňky typu 3; FoxP3 – forkhead box protein 3, IL-X – interleukin, TGF- $\beta$  – transformující růstový faktor beta)

### 3.4 Mechanismy působení regulačních T buněk

V současné době je známo několik typů mechanismů, kterými Treg potlačují funkci ostatních imunitních buněk. Nejvýznamnějšími z nich jsou: produkce regulačních cytokinů, přímý kontakt mezi buňkami a suprese zprostředkovaná povrchovými molekulami, kompetice o růstové faktory a produkce granzymů či perforinů.

Nejdůležitější cytokiny, které Treg produkují, jsou regulační cytokiny IL-10, TGF- $\beta$  a IL-35. IL-10 je protizánětlivý cytokin se širokým spektrem imunomodulačních účinků. IL-10 je produkován buňkami adaptivního imunitního systému (např. Th1, Th2, Th17 buňkami, Treg, B buňkami) ale i přirozeného imunitního systému (např. dendritickými buňkami, makrofágy, NK buňkami). IL-10 může také inhibovat produkci chemokinů, které jsou zodpovědné za migraci efektorových buněk do místa zánětu. Produkce IL-10 má inhibiční efekt na Th1 typ odpovědi a zároveň u alergických reakcí IL-10 potlačuje funkce Th2 buněk (shrnuto v Saraiva and O'Garra, 2010).

TGF- $\beta$  je důležitý regulační cytokin známý svou klíčovou rolí při řízení indukce Treg. TGF- $\beta$  potlačuje proliferaci těch efektorových T buněk, které potřebují IL-2 pro svoje dělení a přežívání. TGF- $\beta$  řídí indukci konvenčních CD4+CD25- T buněk na periferní iTreg. CD4+CD25- T buňky k této přeměně vyžadují stimulaci pomocí TCR. Takto vzniklé iTreg jsou uvedeny do stavu anergie, ale stále vykazují supresivní vlastnosti. Navíc TGF- $\beta$  u konvenčních CD4+CD25- T buněk na periférii indukuje expresi transkripčního faktoru FoxP3, což jim přivlastňuje regulační schopnosti Treg (Chen *et al.*, 2003).

IL-35 se řadí do rodiny cytokinu IL-12 a ze všech jejích členů je IL-35 zatím posledním objeveným cytokinem. Do této rodiny cytokinů řadíme kromě IL-12, IL-35 ještě IL-23 a IL-27 známé svými prozánětlivými vlastnostmi. Ze všech těchto cytokinů IL-35 jako jediný vykazuje imunosupresivní efekt. IL-35 je heterodimerní cytokin tvořený podjednotkami p35 (jinak také IL-12A neboli podjednotka alfa interleukinu 12) a EB13 (angl. Epstein-Barr Virus-Induced Gene 3). IL-35 působí na efektorové T buňky přímo díky tomu, že IL-12R $\beta$ 2 podjednotka receptoru pro IL-35 je exprimovaná na aktivovaných T buňkách, B buňkách, NK buňkách i dendritických buňkách (Levings *et al.*, 2001). Přítomnost IL-35 navíc přímo potlačuje proliferaci efektorových T buněk *in vitro* a absence produkce IL-35 u Treg vede k významnému poklesu jejich imunosupresivních vlastností (Collison *et al.*, 2007). Také byla popsána schopnost IL-35

indukovat přeměnu konvenčních CD4<sup>+</sup> T buněk na buňky produkující regulační cytokiny (hlavně IL-35) a tímto mechanismem se podílet na potlačení aktivity ostatních imunitních buněk. Později však vyšlo najevo, že se zřejmě jedná o další subpopulaci iTreg, tzv. iTr35 buňky (Collison *et al.*, 2011).

Dalším ze supresivních mechanismů Treg je přímý mezibuněčný kontakt. Ten může být zprostředkován např. díky povrchově vázanému TGF- $\beta$ 1 tvořenému aktivovanými Treg. TGF- $\beta$ 1 se váže na TGF- $\beta$ R (receptor pro transformující růstový faktor) přítomný na buněčné membráně T a B buněk (Nakamura *et al.*, 2001). Membránově vázaný TGF- $\beta$ 1 není jediným mediátorem imunosuprese pomocí mezibuněčného kontaktu. Dalšími molekulami zprostředkovávajícími mezibuněčný kontakt mezi Treg a efektorovými buňkami jsou např. lymphocyte activation gene 3 (LAG3), CTLA-4, cytolytické molekuly (Fas nebo Granzym B) (Yokosuka *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2012). Nejdůležitějším imunosupresivním mechanismem Treg se zdá být interakce skrze inhibiční molekulu CTLA-4. Tu exprimují na svém povrchu aktivované T buňky a CTLA-4 konkuruje kostimulaci přes CD28 tím, že se s vyšší afinitou váže na kostimulační receptory CD80 a CD86 (B7.1 a B7.2). Treg jsou charakteristické konstitutivní expresí CTLA-4 na svém povrchu, tudíž preferenční vazbou CTLA-4 na CD80/86 přítomné na povrchu buňky předkládající antigen (APC, angl. antigen presenting cell) mohou potlačovat antigenní prezentaci a aktivaci efektorových T buněk (Yokosuka *et al.*, 2010). Bylo prokázáno *in vivo*, že za přítomnosti Treg kontakt mezi efektorovými T buňkami a dendritickými buňkami (nebo jinými APC) bývá výrazně kratší než bez přítomnosti Treg (Tadokoro *et al.*, 2006; Matheu *et al.*, 2015).

Treg také mohou působit na efektorové buňky tím, že lépe vyvazují růstový faktor IL-2 ze svého okolí díky vysoké expresi CD25. Tím o něj připravují právě ony efektorové buňky, které potřebují IL-2 ke svému přežívání, proliferaci a efektorové funkci. Pro Treg je tato vazba IL-2 z vnějšího prostředí stěžejní, protože samy jej produkovat neumí (Setoguchi *et al.*, 2005).

### **3.5 Role regulačních T buněk u alergických onemocnění**

Není zatím přesně známo, jakým mechanismem Treg zabraňují vzniku alergických onemocnění. Je však zřejmé, že Treg izolované z periferní krve zdravého (neatopického) dospělého člověka jsou plně funkční a zastávají v plném rozsahu své supresivní funkce

vůči efektorovým buňkám podílejících se na alergické reakci. U atopických či přímo alergických jedinců mají Treg snížené funkční vlastnosti, tím pádem nejsou schopné dostatečně potlačovat převažující Th2 odpověď vůči konkrétním alergenům (Ling *et al.*, 2004a).

Výsledky prací, které se zabývaly vlastnostmi Treg izolovaných z pupečnickové krve se výrazně rozcházejí. Někteří autoři popisují novorozenecké Treg jako plně funkční, ačkoliv jejich imunitní reakce nejsou ve srovnání s dospělými jedinci plně vyvinuté. Co se týče supresivních vlastností těchto Treg, jsou schopny potlačovat funkce Th2 imunitních buněk avšak méně efektivně, což ukazuje na obecnou nezralost novorozeneckého imunitního systému (Schaub *et al.*, 2008b). Toto pozorování potvrzuje i práce Smith a kol. zabývající se Treg izolovanými z pupečnickové krve dětí, u kterých byl pozorován rozvoj alergického onemocnění v prvním roce života. Treg jsou plně schopny suprese vůči superantigenům indukujícím Th1 imunitní odpověď, avšak mají snížené supresivní vlastnosti vůči efektorovým Th2 buňkám (Smith *et al.*, 2008). Snížené regulační schopnosti vůči Th2 imunitní odpovědi by podporovaly teorii, že u alergických jedinců je narušena funkce Treg (Bellinghausen *et al.*, 2003). Novější studie uvádí, že děti alergických matek mají sníženou funkčnost Treg což může být odvozeno např. z nižšího počtu Treg v pupečnickové krvi, snížené exprese genu *foxp3* a nižší produkce IL-10 oproti dětem zdravých (nealergických) matek. Narušení regulačních vlastností Treg u novorozenců pravděpodobně vede k nerovnoměrné diferenciaci naivních T buněk na Th1 či Th2 buňky (tedy rozvratu v imunitní rovnováze), a tím zřejmě snáze dochází k rozvoji alergického onemocnění v časném věku dítěte (Meng *et al.*, 2016).

Výsledky studií zaměřujících se na charakterizaci rozdílu v počtu Treg mezi dětmi s predispozicí a bez predispozice k rozvoji alergického onemocnění se také rozcházejí. Někteří autoři uvádí, že v počtu Treg izolovaných z CBMC těchto dětí není statisticky významný rozdíl anebo byl pozorován pouze trend ke sníženému množství Treg u dětí predisponovaných k rozvoji alergického onemocnění (např. s ohledem atopii matky) (Schaub *et al.*, 2008a; Smith *et al.*, 2008). Jiní autoři naopak popisují statisticky významně nižší počet Treg (definovaných jako CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T buňky) u dětí s predispozicí k rozvoji alergie oproti zdravým dětem (Stelmaszczyk-Emmel *et al.*, 2013). Vzhledem k nižšímu počtu Treg u astmatických dětí, Treg dětí s vyšší predispozicí ke vzniku alergického onemocnění nebudou pravděpodobně schopny dostatečně tlumit převládající Th2 imunitní odpověď (Chauhan *et al.*, 2015). V kontextu s hygienickou

hypotézou se uvádí zvýšený počet Treg v pupečníkové krvi dětí, jejichž matky byly během těhotenství vystaveny působení vlivů života na venkově jako např. většímu množství mikrobiálních antigenů. Díky větší mikrobiální zátěži byl u těchto dětí pozorován snížený výskyt alergických onemocnění (Schaub *et al.*, 2009). Další autoři naopak uvádějí zvýšený počet CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg i vyšší zastoupení CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg u dětí s vyšší predispozicí k rozvoji alergických onemocnění. Vysvětlením je kompenzace nižší funkční kapacity Treg dětí s vyšším rizikem vzniku alergického onemocnění (Hrdý *et al.*, 2012; Mcloughlin *et al.*, 2012; Strömbeck *et al.*, 2014).

Imunitní buňky pupečníkové krve dětí s vysokým rizikem rozvoje alergického onemocnění mají vyšší proliferační kapacitu než imunitní buňky dětí s nižším rizikem rozvoje alergického onemocnění (Žižka *et al.*, 2007). U novorozenců se vyskytuje převaha Th2 imunitní odpovědi a u dětí s vyšším rizikem vzniku alergie je tato predominance ještě více umocněna. U dětí predisponovaných k rozvoji alergických onemocnění po antigenní stimulaci CBMC byla zjištěna vyšší produkce IL-10 a nižší produkce IFN- $\gamma$  oproti dětem s nižším rizikem rozvoje alergií. Srovnatelná produkce IFN- $\gamma$  byla u těchto dětí pozorována po polyklonální stimulaci CBMC, bez ohledu na vyšší či nižší predispozici ke vzniku alergického onemocnění. U skupiny dětí s predispozicí k rozvoji alergických onemocnění oproti dětem bez predispozice byly pozorovány vyšší hladiny Th2 cytokinů produkované mononukleárními buňkami periferní krve (PBMC, angl. peripheral blood mononuclear cells) v 6 i 12 měsících života. Snížená Th1 imunitní odpověď a zřetelná Th2 predominance u dětí s vyšším rizikem rozvoje alergických onemocnění by mohla poukazovat na horší imunoregulační funkce oproti dětem s nižším rizikem vzniku alergie. Nedostatečná funkční kapacita Treg u dětí alergických matek by tím pádem mohla být významným rizikovým faktorem přispívajícím ke vzniku alergických onemocnění u těchto dětí (Hrdý *et al.*, 2010, 2012; Kraj and Ignatowicz, 2018).

## 4 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo objasnit vliv Treg na vznik alergických onemocnění v časném postnatálním období. Byly porovnávány Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých matek (dětí s nižším rizikem rozvoje alergického onemocnění) a dětí alergických matek (dětí s vyšším rozvojem alergického onemocnění).

Pro dosažení vytyčeného cíle byly u dětí zdravých a alergických matek sledovány následující charakteristiky Treg:

- a) Proporční a funkční vlastnosti Treg na základě exprese povrchových a intracelulárních znaků
- b) Proliferační kapacita CBMC a CD4<sup>+</sup> T lymfocytů a vliv supresivní funkce Treg na proliferaci CBMC a CD4<sup>+</sup> T lymfocytů
- c) Stanovení produkce regulačních cytokinů v supernatantu kultur z ko-kultivací Treg s CBMC a CD4<sup>+</sup> T lymfocyty
- d) Detekce genové exprese regulačních cytokinů v Treg izolovaných z pupečnickové krve

## 5 Materiál a metody

### 5.1 Materiál

#### POUŽITÉ ROZTOKY

Pufrovaný fyziologický roztok (PBS, phosphate buffered saline): 9 % NaCl, 3,35 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O, 1,28 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O

Suplementované medium RPMI 1640 obsahující L-glutamin pro buněčné kultury: 2mM HEPES, 5 % fetální bovinní sérum (FBS), 40mg/ml gentamycin

Citrátový pufr: 0,1 M citronan sodný v destilované vodě, pH 4,2 upraveno pomocí nasycené kyseliny citronové

Blokovací roztok pro metodu ELISA: 5 % sacharóza, 1 % bovinní sérový albumin (BSA) v PBS

Ředící roztok pro metodu ELISA (TGF-β): 20mM Trisma, 150 mM NaCl v H<sub>2</sub>O, pH 7,3, 0,1 % BSA, 0,05 % Tween

Ředící roztok ELISA (IL-10): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % BSA

#### POUŽITÉ REAGENCIE A KITY

Heparin (Zentiva v.n., Nizozemsko)

Histopaque®1077, medium RPMI 1640, β-merkaptóetanol, Tween, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HCl, 3,3,5,5-tetrametylbenzidin (TMB), fytohemaglutinin (PHA), carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)

FBS (Cambrex, USA)

Streptavidin s navázanou křenovou peroxidázou (Immunotech Inc., USA)

Citronan sodný (Lachema, Česká Republika)

75 % etanol (Lékárna Všeobecné fakultní nemocnice)

Gentamycin (Pharmaceuticals dd, Slovinsko)

BSA, Trisma (SERVA, Německo)

TregFlowEx® Kit (Exbio a.s., Česká Republika)

EasySep™ HumanCD4+CD127lowCD25+Regulatory T Cell Isolation Kit, EasySep™ Magnet, RoboSep™ buffer (Stemcell Technologies, Kanada)

AllPrep DNA/RNA Mini Kitu (Qiagen, Německo)

High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA)

Primární navazovací a sekundární biotinylované protilátky, rekombinantní cytokiny pro detekci cytokinů pomocí metody ELISA (R&D System Inc. USA), viz **Tabulka 3**

**Tabulka 1: Seznam použitých protilátek při průtokové cytometrii.**

Protilátka	Klon	Konjugát	Výrobce
CD4/CD25	MEM-241/181	FITC/PE	Exbio, a.s.
FoxP3	3G3	APC	Exbio, a.s.
Helios	22F6	PE-Cy7	Exbio, a.s.
CD4	MEM-241	APC	Exbio, a.s.
CD127	eBioRDR5	APC	eBioscience™

**Tabulka 2: Seznam použitých sond při qPCR.**

Sonda	Katalogové číslo	Výrobce
ACTB	Hs 99999903_m1	Applied Biosystems
IL-10	Hs 00174086_m1	
TGF-β1	Hs 00171257_m1	
IL-12A(p35)	Hs 00168405_m1	

**Tabulka 3: Použité protilátky při metodě ELISA.**

Cytokiny	Primární protilátka	Sekundární protilátka	Rekombinantní standard	Výrobce
IL-10	DY217B (Duoset)			R&D Systems
TGF-β	MAB 240	BAF 240	240-IL	

## POUŽITÝ MATERIÁL

Zkumavky na průtokovou cytometrii FALCON 5 ml BD Pharmingen™ (Biosciences, USA)

Destičky na buněčnou kultivaci CELLSTAR® 48 jamková kultivační destička (Greiner Bio-One, Rakousko)

PCR destičky 96 well Reaction Plates (Applied Biosystems, USA)

Destičky pro ELISU F96 Maxisorp, Nunc™ (Sigma-Aldrich, USA)

## POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Centrifuga Micro 22 R, Universal 30 RF, Universal 320R (Hettich, Německo)

Box pro molekulární biologii MSC Advantage (Thermo Scientific, USA)

Box s laminárním prouděním Sentinel Gold (ESCO, Singapur), HOTTE MSC.12, STD GAZ (Jouan, Francie)

Inkubátor ESCO CellCulture Inkubator CO<sub>2</sub> (Singapur)

NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

Průtokový cytometr BD FACS Canto™ II FloW Cytometer (BD Biosciences, USA)

Termální cyklér pro PCR 7300 Realtime PCR System (Applied Biosystems, Singapur)

Termální cyklér pro reverzní transkripci Peltier Cyclor 200 (MJ Research, Inc., USA)

## POUŽITÝ SOFTWARE

BD FACS Diva Software v6.1.2 (BD Biosciences, USA)

FlowJo 7.6.5 (FlowJo LLC, USA)

Nanodrop 1000 V3.30 (Thermo Scientific, USA)

7300 System SDS Software (Applied Biosystems, Singapur)

KIM Immunochemical Processing (Daniel Kittrich, Česká Republika)

GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., USA)

## **5.2 Metody**

### **5.2.1 Pupečnicková krev**

Pupečnicková krev byla odebírána v Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze 4 Podolí. K odběru pupečnickové krve došlo po podepsání písemného informovaného souhlasu matkou. Za alergickou matku byla považována žena s klinicky potvrzeným alergickým onemocněním a docházející k alergologovi alespoň 2 roky před porodem. Odběr pupečnickové krve byl prováděn z plánovaných císařských řezů.

Přibližně 30 ml pupečnickové krve bylo odebráno do sterilní transfuzní nádoby s připravenými 300 µl Heparinu (1000 jednotek/ml, výsledná koncentrace 10 j heparinu/1 ml krve). Krev byla od doby odebrání do doby zpracování uchovávána při pokojové teplotě.

### **5.2.2 Povrchové a intracelulární barvení regulačních T buněk z plné pupečnickové krve**

Ke 100 µl pupečnickové krve bylo přidáno 10 µl směsi protilátek CD4 FITC/CD25 PE. Obsah zkumavky byl promíchán a inkubován 10 min ve tmě při 4°C. Buňky byly promyty 2 ml chladného PBS a stočeny po dobu 5 min, při 450 g a 4°C. Supernatant byl odsán pomocí Pasteurovy pipety.

Byl přidán 1 ml chladného a naředěného Fix and Lysing Solution. Obsah zkumavky byl promíchán a inkubován 10 min ve tmě při 4°C. Bylo přidáno 0,5 ml Permeabilizing Solution, obsah zkumavky promíchán a inkubován 10 min ve tmě při 4°C. Buňky byly stočeny po dobu 5 min při 450 g a 4°C. Supernatant byl slit. Do zkumavky bylo přidáno 50 µl chladného Blocking Buffer a 50 µl chladného PBS. Obsah zkumavky byl promíchán a inkubován po dobu 5 min ve tmě při 4°C. Do zkumavky bylo následně přidáno 5 µl FoxP3 APC protilátky a Helios PE-Cy7 protilátky obsah zkumavky promíchán a inkubován 30 min ve tmě při 4°C. Buňky byly dvakrát promyty 2 ml chladného PBS a stočeny po dobu 5 min při 450 g a 4°C. Supernatant byl slit. Do zkumavky bylo přidáno 300 µl roztoku 1% formaldehydu v PBS a vzorek byl změřen na průtokovém cytometru.

### **5.2.3 Izolace mononukleární frakce leukocytů**

Izolace mononukleární frakce leukocytů z pupečnickové krve (CBMC) byla prováděna pomocí gradientové centrifugace na médiu Histopaque. Heparinizovaná pupečnicková krev byla naředěna PBS v poměru 1:1. Ve sterilních zkumavkách bylo

navrstveno 6 ml naředěné krve na 3 ml připraveného media Histopaque. Obsah zkumavek byl stočen po dobu 30 min, při 20 °C a 450 g. „Prstýnky“ s CBMC byly následně odsáty, přeneseny do 15 ml nové sterilní zkumavky, která byla doplněna PBS do 10 ml a zkumavky byly stočeny po dobu 10 min, při 20 °C a 1000 g. Následně byl slit supernatant, peleta buněk resuspendována v PBS, sterilně přenesena ze dvou zkumavek do jedné a zkumavka byla doplněna PBS do celkového objemu 10 ml. Následně byly CBMC promyty ještě 2x a centrifugovány po dobu 10 min, při 20°C a 500 g. Ve výsledku byla získána jedna zkumavka s CBMC. Peleta buněk byla resuspendována v 5 ml RPMI media a buňky byly spočítány v Bürkerově počítací komůrce.

#### **5.2.4 Magnetická separace regulačních T buněk z mononukleární frakce leukocytů**

Ze získaných CBMC bylo do 5 ml sterilní polystyrenové zkumavky odebráno 60–80 milionů buněk pro separaci Treg pomocí komerčního kitu EasySep™ HumanCD4+CD127lowCD25+Regulatory T Cell Isolation kit. Buňky byly stočeny po dobu 10 min, při 4 °C a 500 g a následně resuspendovány v 1 ml RoboSep bufferu. Bylo přidáno 50 µl CD25+Positive Selection Cocktail, promícháno a inkubováno 5 min při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 30 µl Releasable RapidSpheres, které byly předem promíchávány 30 s pomocí vortexu. Vzápětí bylo přidáno 50 µl CD4+Enrichment Cocktail, promícháno a inkubováno 5 min při pokojové teplotě. Zkumavka byla doplněna RoboSep bufferem do objemu 2,5 ml, vložena do EasySep magnetu a ponechána v magnetu po dobu 10 min při pokojové teplotě. Buněčná frakce ze zkumavky umístěné v magnetu byla přelita do nové sterilní 5 ml polystyrenové zkumavky (takto byla získána negativní buněčná frakce pro následnou separaci CD4+CD25- T buněk, buňky byly do zpracování uchovávány na ledu). Původní zkumavka byla vyjmuta z magnetu, doplněna RoboSep bufferem do objemu 2,5 ml a inkubována po dobu 5 min při pokojové teplotě. Zkumavka byla ponechána v magnetu a supernatant byl slit. Takto byly buňky promyty ještě 2x.

Nakonec byla zkumavka vyjmuta z magnetu a byl napipetován 1 ml RoboSep bufferu, bylo přidáno 100 µl Release Bufferu a vše promícháno pipetou. Vzápětí bylo přidání 50 µl CD127<sup>high</sup>Depletion Cocktail, promícháno a inkubováno 5 min při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 10 µl Dextran RapidSpheres, které byly předtím promíchávány 30 s pomocí vortexu. Vzorek byl promíchán a inkubován 5 min při pokojové teplotě. Zkumavka byla doplněna RoboSep bufferem do objemu 2,5 ml, vložena do magnetu

a inkubována 5 min při pokojové teplotě. Obsah zkumavky umístěné v magnetu byl přelit do nové sterilní 5 ml zkumavky, která nakonec obsahovala cílovou buněčnou frakci získanou pozitivní separací, tedy CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> Treg. Buňky byly stočeny po dobu 10 min, při 4 °C a 500 g. Nakonec byly resuspendovány v suplementovaném RPMI mediu a spočítány v Bürknerově počítací komůrce.

Pomocí magnetické separace ze stejných CBMC byly získány i CD4+CD25- T buňky z negativní buněčné frakce (viz výše). Ke vzorku v 5 ml polystyrenové zkumavce bylo přidáno 90 µl Dextran RapidSpheres, které byly předem promíchávány 30 s pomocí vortexu. Vzorek ve zkumavce byl promíchán a inkubován 5 min při pokojové teplotě. Následně byla zkumavka umístěna do magnetu a v něm ponechána dalších 5 min při pokojové teplotě. Obsah zkumavky umístěné v magnetu byl přelit do nové 5 ml polystyrenové zkumavky. Tato nová zkumavka byla umístěna do magnetu a v něm inkubována po dobu 1 min při pokojové teplotě. Obsah zkumavky umístěné v magnetu byl přelit do nové 5 ml polystyrenové zkumavky čímž byla získána cílová buněčná frakce – CD4+CD25- T buňky. Buňky byly stočeny po dobu 10 min, při 4 °C a 500 g. Nakonec byly resuspendovány v suplementovaném RPMI mediu a spočítány v Bürkerově počítací komůrce.

### **5.2.5 Imunosupresivní esej – *in vitro* ko-kultivace regulačních T buněk s efektorovými buňkami**

#### **5.2.5.1 Značení efektorových buněk CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl esterem)**

Na základě počtu separovaných Treg pomocí magnetické separace byly odebrány CD4+CD25- T buňky a CBMC pro obarvení carboxyfluorescein succinimidyl esterem (CFSE). CFSE je fluorescenční látka, která se váže na volné NH<sub>2</sub> skupiny proteinů v cytoplasmě buněk. Při buněčném dělení je pak CFSE přítomno nejen v počáteční populaci buněk, ale dochází k rovnoměrné distribuci CFSE do dceřiných buněk při buněčném dělení. Při každém dalším dělení buněk se CFSE vyředuje a intenzita fluorescence klesá. Pokles intenzity fluorescence CFSE bylo analyzováno pomocí průtokové cytometrie.

CD4+CD25- T buňky a CBMC ve sterilních zkumavkách byly resuspendovány v RPMI mediu. Bylo přidáno 10 µl 5mM CFSE na 1 milion buněk. Zkumavky byly promíchány a inkubovány v termostatu při 37°C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub> po dobu 10 min. Po inkubaci byl přidán pětinasobný objem chladného RPMI media s 10 % FBS.

Zkumavky s buněčnou frakcí byly inkubovány po dobu 5 min na ledu. Následně byly stočeny po dobu 10 min, při 4 °C a 450 g. Peleta buněk byla resuspendována v chladném RPMI mediu a znovu stočena po dobu 10 min, při 4 °C a 450 g. Takto byly buňky promyty 2x. Nakonec byly buněčná peleta resuspendována v suplementovaném RPMI mediu a připravena pro kultivaci s Treg.

#### **5.2.5.2 *In vitro* ko-kultivace regulačních T buněk s efektorovými buňkami**

Separované Treg byly kultivovány s efektorovými CD4<sup>+</sup> T buňkami a CBMC v poměrech 1:2, 1:5, 1:10 či 1:20 v 48 jamkových destičkách v celkovém počtu 500 000 buněk na jamku. Buňky byly stimulovány fytohemaglutininem (PHA, 10 µg/ml), inkubovány po dobu 3 dnů při 37 °C a 5 % koncentraci CO<sub>2</sub>.

Po 3 dnech byly buňky odebrány z jamek, stočeny 10 min při 20 °C a 450 g. Byly odebrány supernatanty kultur pro stanovení produkce cytokinů (viz níže). Odebrané buňky byly označeny protilátkou proti CD4<sup>+</sup> APC, obsah ve zkumavce byl promíchán pomocí vortexu a inkubován po dobu 20 min ve tmě při 4 °C. Následně byly buňky dvakrát promyty 2 ml chladným PBS, stočeny po dobu 5 min při 4 °C a 450 g a analyzovány na průtokovém cytometru.

#### **5.2.6 Izolace RNA a DNA**

Část separovaných Treg byla využita na izolaci RNA a DNA z buněk. Izolace byla prováděna pomocí AllPrep DNA/RNA Mini Kitu. 1 milion Treg byl odebrán z buněčné frakce a zkumavka byla stočena po dobu 10 min, při 20 °C a 500 g. Peleta buněk byla resuspendována v 346,5 µl Bufferu RLT Plus s 3,5 µl β-merkapt ethanolu a dobře promíchána pomocí vortexu kvůli homogenizaci vzorku. Homogenní lyzát byl přenesen na AllPrep DNA kolonku, která byla stočena po dobu 30 s, při 8000 g a 20 °C. Obsah zkumavky, ve které byla umístěna kolonka, byl využit pro izolaci RNA. AllPrep DNA kolonka byla umístěna do nové 2ml zkumavky a ponechána při pokojové teplotě pro následnou izolaci DNA.

##### **5.2.6.1 Izolace RNA**

Do zkumavky se vzorkem pro izolaci RNA bylo přidáno 350 µl 70 % etanolu a vzorek byl promíchán pipetou. Obsah zkumavky byl přenesen na Rneasy spin kolonku umístěnou ve 2ml zkumavce. Kolonka byla stočena po dobu 15 s, při 8000 g a 20 °C. Obsah proteklý kolonkou byl slit. Na kolonku bylo přidáno 700 µl Bufferu RW1 a byla

stočena po dobu 15 s, při 8000 g a 20 °C, obsah proteklý kolonkou byl slit. Na kolonku bylo přidáno 500 µl Bufferu RPE, kolonka byla stočena po dobu 15 s, při 8000 g a 20 °C a obsah proteklý kolonkou byl slit. Na kolonku bylo přidáno 500 µl Bufferu RPE a kolonka byla stočena po dobu 2 min, při 8000 g a 20 °C. Rneasy kolonka byla umístěna do nové 2 ml zkumavky a stočena po dobu 1 min, při 26 000g a 20 °C. Kolonka byla následně umístěna do nové 1,5 ml zkumavky. Bylo přidáno 30 µl Rnase-free vody. Uzavřená zkumavka byla stočena po dobu 1 min, při 8000 g a 20 °C, aby došlo k uvolnění RNA navázané na kolonku. Koncentrace RNA byla určena spektrofotometricky pomocí nanodropu.

#### **5.2.6.2 Izolace DNA**

Na AllPrep DNA spin kolonku (viz výše) bylo přidáno 500 µl Bufferu AW1. Uzavřená zkumavka byla stočena po dobu 15 s, při 8000 g a 20 °C. Obsah proteklý kolonkou byl slit. Bylo přidáno 500 µl Bufferu AW2. Uzavřená zkumavka byla stočena po dobu 2 min při 26 000 g kvůli promytí membrány v kolonce. Kolonka byla umístěna do nové 1,5 ml zkumavky. Bylo přidáno 100 µl Bufferu EB. Uzavřená zkumavka byla inkubována 1 min při pokojové teplotě. Nakonec byla zkumavka stočena po dobu 1 min při 8000 g a 20 °C. Eluát obsahoval izolovanou DNA. Koncentrace DNA byla určena spektrofotometricky pomocí nanodropu. Izolace DNA byla prováděna pro následné stanovení epigenetické regulace Treg.

#### **5.2.7 Reverzní transkripce**

Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí komerčního kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Do 200 µl zkumavky byl napipetován vzorek izolované RNA. Zkumavka byla doplněna vodou neobsahující Rnázy do objemu 5 µl. K obsahu zkumavek bylo přidáno 5 µl připravených reagensů z komerčního kitu (viz **Tabulka 4**). Průběh reverzní transkripce byl následující: 10 min při 25 °C, 120 min při 37 °C, 5 min při 85 °C a nakonec cca 10 min při 4 °C. Po proběhlé reverzní transkripci bylo do zkumavky přidáno 40 µl vody neobsahující Rnázy a vzorky byly skladovány při -20 °C.

**Tabulka 4: Reagencie použité pro reverzní transkripci.**

Reagencie	Množství na 1 vzorek
Pufř RT	1 $\mu$ l
Mix dNTP	0,4 $\mu$ l
Směs náhodných primerů	1 $\mu$ l
Reverzní transkriptáza	0,5 $\mu$ l
Inhibitor Rnáz	0,5 $\mu$ l
Voda neobsahující Rnázy	1,6 $\mu$ l
Naředitelný vzorek	5 $\mu$ l

### 5.2.8 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Genová exprese regulačních cytokinů v separovaných Treg byla stanovena pomocí metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR, angl. real time quantitative polymerase chain reaction). Jako endogenní kontrola byl zvolen  $\beta$ -aktin.

Reakce PCR probíhala v 96 jamkové destičce. Vzorky komplementární DNA (cDNA, angl. complementary DNA) byly napipetovány v dubletech po 5  $\mu$ l. Do jamek na destičce bylo ke vzorkům cDNA přidáno 20  $\mu$ l mixu s připravenými reagensy podle **Tabulky 5**. qPCR probíhala za termálního režimu 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, 40 cyklů – denaturace 15 s 95 °C, elongace 60 s 60 °C s poslední elongací 5 min při 60 °C.

**Tabulka 5: Reagencie použité při qPCR.**

Reagencie	Množství na 1 vzorek
Voda neobsahující RNázy	6,25 $\mu$ l
Specifická sonda s primery	1,25 $\mu$ l
TaqMan Universal PCR MasterMix	12,5 $\mu$ l
Vzorek cDNA	5 $\mu$ l

### **5.2.9 Imunoenzymatické stanovení koncentrace cytokinů (ELISA) v supernatantech kultur**

Produkce cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  v supernatantu kultur Treg s efektorovými buňkami polyklonálně stimulovanými po dobu 3 dní byla stanovena pomocí metody ELISA (angl. enzyme-linked immunosorbent assay).

Na 96 jamkovou destičku byla navázána primární monoklonální protilátka proti IL-10 anebo TGF- $\beta$  (anti-human IL-10/TGF- $\beta$  po 75  $\mu$ l na jamku) naředěná dle údajů výrobce. Destička byla inkubována přes noc při pokojové teplotě. Následně byla destička 3x promyta PBS s 0,05 % Tween. Do každé jamky bylo nanášeno 150  $\mu$ l blokovacího roztoku (v případě IL-10 ředícího roztoku) a byla inkubována 1 hod při laboratorní teplotě. Poté byla destička 3x promyta PBS s 0,05 % Tween. Vzorky supernatantů z buněčných kultur byly 2x naředěny v Trisem pufovaným PBS (TBS, angl. Tris buffered saline) nebo ředícím roztokem pro IL-10 a nanášeny na destičku v dubletech po 50  $\mu$ l. U detekce TGF- $\beta$  předcházela ředění vzorků inkubace 100  $\mu$ l vzorku s 20  $\mu$ l 1M HCl po dobu 10 minut a následné přidání 20  $\mu$ l 1,2M NaOH s Hapes. Standardy byly naředěny dle údajů výrobce. Destička byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě a přes noc uložena do lednice. Třetí den byla destička 3x promyta PBS s 0,05 % Tween. Do každé jamky byla nanášena sekundární biotinylovaná protilátka ředěná v TBS/ředícím roztoku pro IL-10. Destička byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě a 3x promyta PBS s 0,05 % Tween. Do každé jamky bylo nanášeno 50  $\mu$ l streptavidinu značeného křenuvou peroxidázou 1000x naředěného v TBS. Destička byla inkubována 20 min při pokojové teplotě a následně 3x promyta PBS s 0,05 % Tween. Byl připraven vyvolávací roztok z citrátového pufru, roztoku TMB a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Do každé jamky bylo nanášeno 50  $\mu$ l vyvolávacího roztoku a destička byla inkubována v temnu. Reakce byla nakonec zastavena 50  $\mu$ l 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

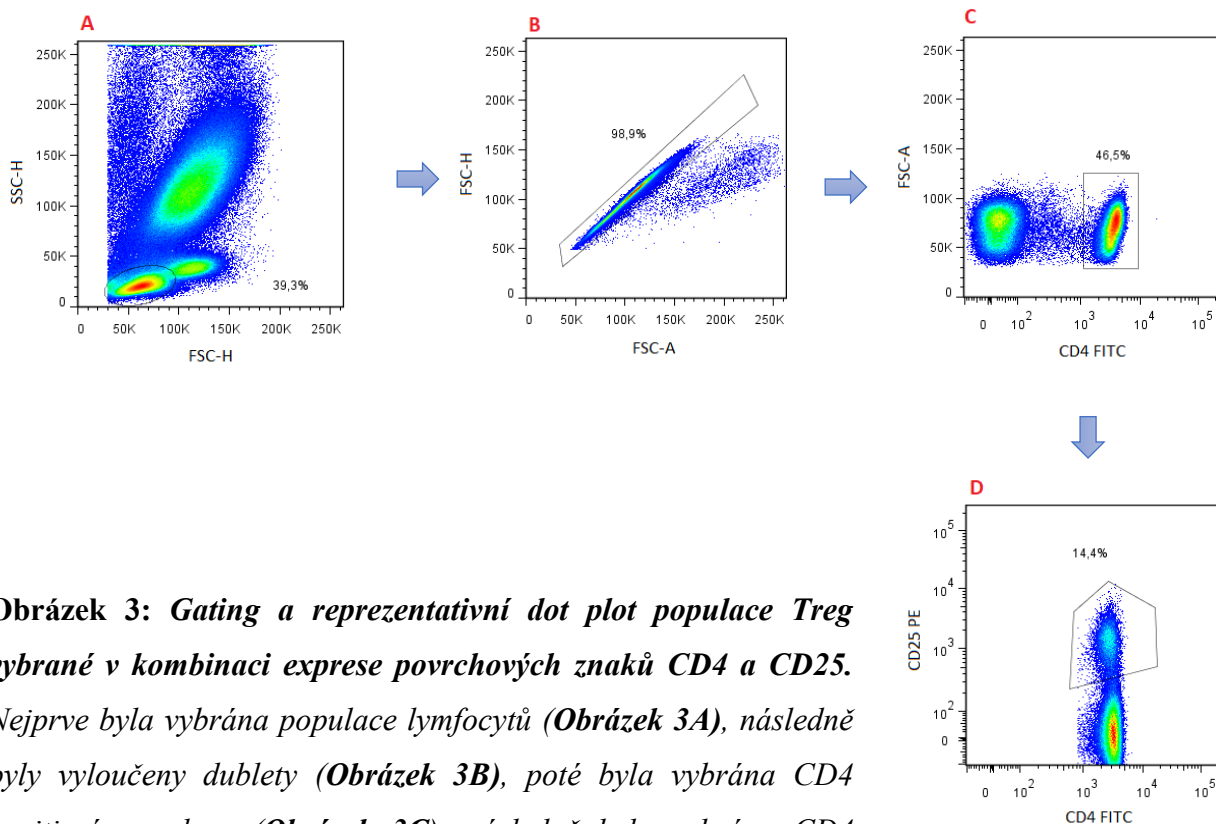
Optická densita byla měřena při 450 nm a pomocí kalibrační křivky byla odečtena koncentrace cytokinů.

## 6 Výsledky

### 6.1 Analýza povrchových a intracelulárních znaků regulačních T buněk z plné pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek pomocí průtokové cytometrie

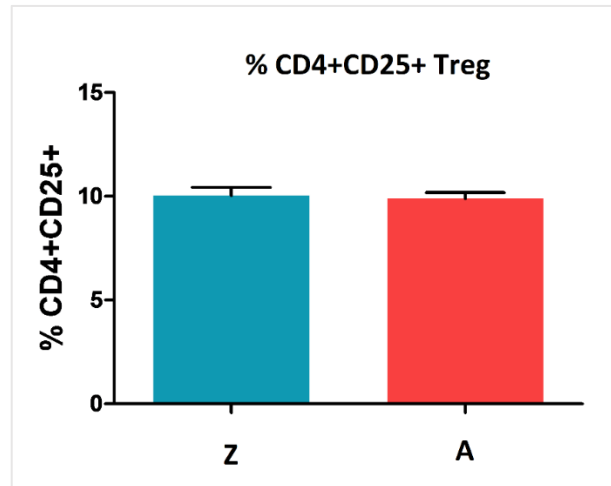
Detekce celkové populace Treg a jejich subpopulací v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek byla založena na kombinaci povrchových znaků CD4 a CD25 a intracelulárních transkripčních faktorů FoxP3 a Helios. Fenotypová charakteristika Treg z pupečnickové krve byla stanovena u 99 dětí (45 dětí zdravých matek a 54 dětí alergických matek). Pro stanovení celkové populace Treg byla zvolena dvojitá gateovací strategie (jednou byly Treg definovány pouze jako CD4+CD25+ (**Obrázek 3**) a podruhé jako CD4+CD25+FoxP3+ (**Obrázek 5**). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny t-testem.

#### 6.1.1 Analýza regulačních T buněk definovaných jako CD4+CD25+ T buňky



**Obrázek 3:** *Gating a reprezentativní dot plot populace Treg vybrané v kombinaci exprese povrchových znaků CD4 a CD25. Nejprve byla vybrána populace lymfocytů (Obrázek 3A), následně byly vyloučeny dublety (Obrázek 3B), poté byla vybrána CD4 pozitivní populace (Obrázek 3C), následně byla vybrána CD4 a CD25 pozitivní populace Treg (Obrázek 3D). Procenta v ukázkových dot plotech ukazují procentuální zastoupení jednotlivých vybraných populací.*

Mezi procentuálním zastoupením CD4+CD25+ Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek nebyl žádný statisticky významný rozdíl (**Obrázek 4**).

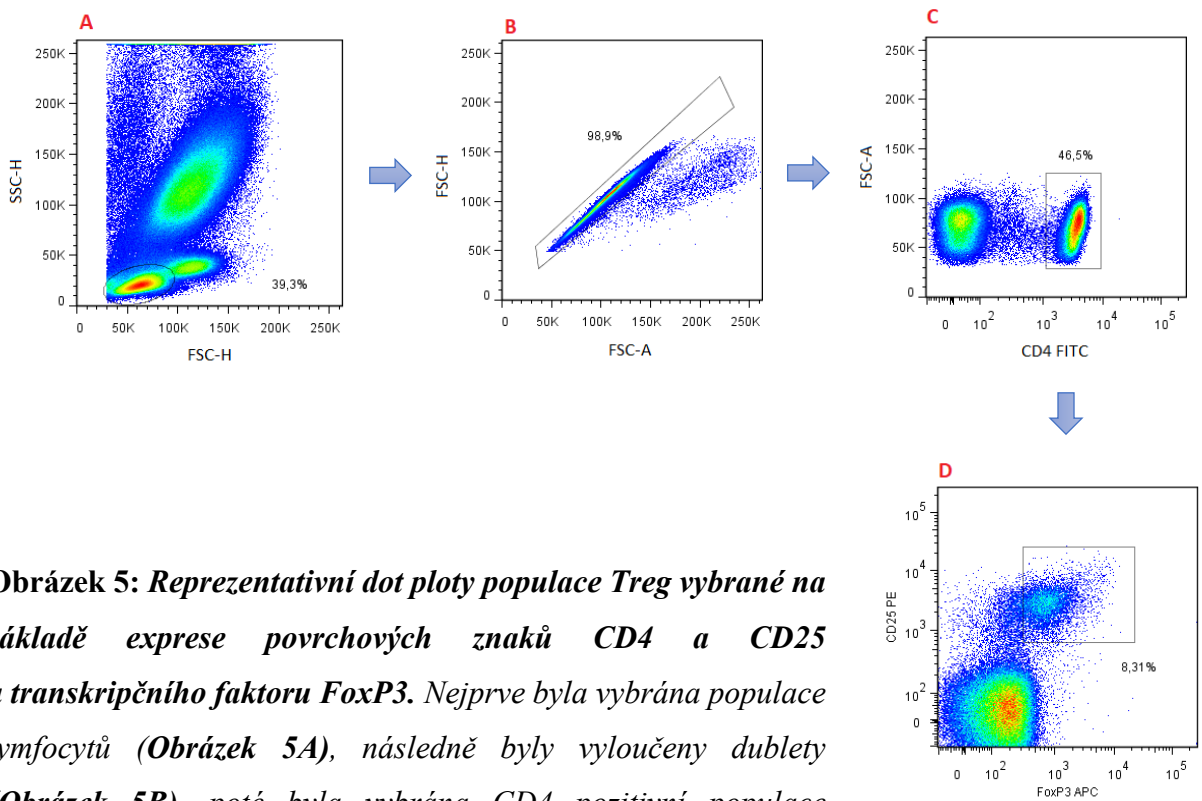


**Obrázek 4:** Procentuální zastoupení CD4+CD25+ Treg v plně pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek.

Z – Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých matek

A – Treg v pupečnickové krvi dětí alergických matek

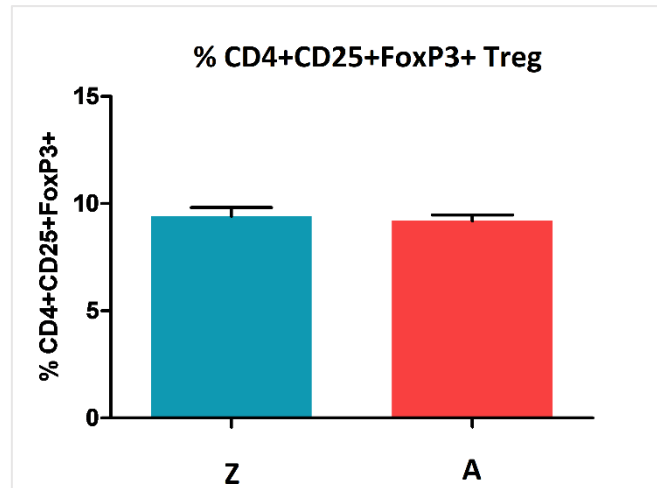
### 6.1.2 Analýza regulačních T buněk definovaných jako CD4+CD25+FoxP3+ T buňky



**Obrázek 5:** Reprezentativní dot ploty populace Treg vybrané na základě exprese povrchových znaků CD4 a CD25 a transkripčního faktoru FoxP3. Nejprve byla vybrána populace lymfocytů (**Obrázek 5A**), následně byly vyloučeny dublety (**Obrázek 5B**), poté byla vybrána CD4 pozitivní populace

*(Obrázek 5C), následně byla vybrána CD25 a FoxP3 pozitivní populace Treg (Obrázek 5D). Procenta v ukázkových dot plotech ukazují procentuální zastoupení jednotlivých vybraných populací.*

Procentuální zastoupení CD4+CD25+FoxP3+ Treg v plné pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek se mezi oběma skupinami statisticky významně nelišilo (Obrázek 6).



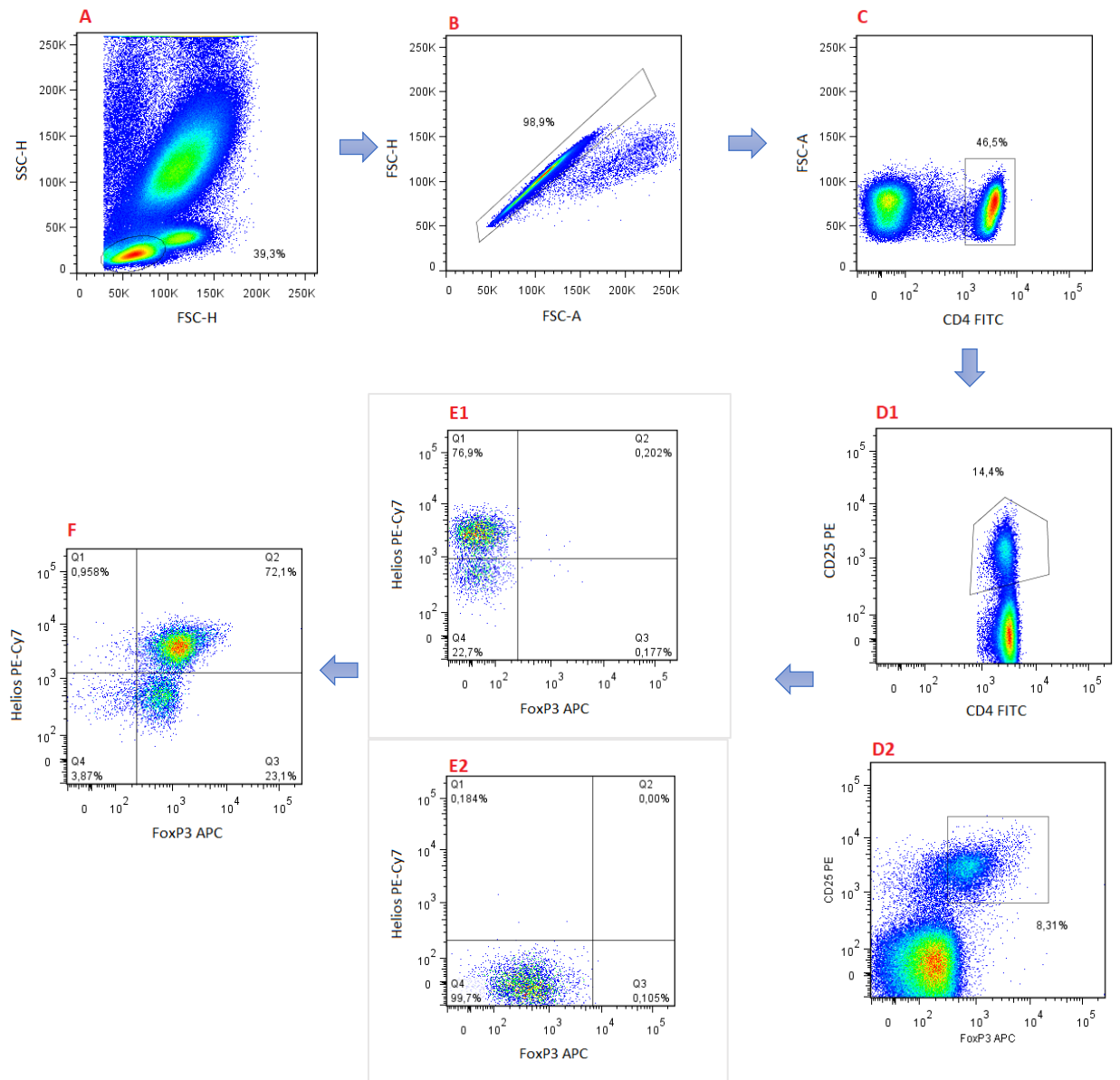
**Obrázek 6: Procento CD4+CD25+FoxP3+Treg z plné pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek.**

*Z – Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých matek*

*A – Treg v pupečnickové krvi dětí alergických matek*

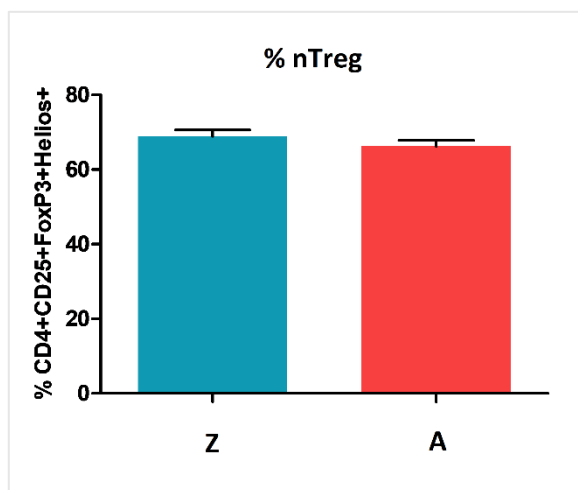
### 6.1.3 Analýza zastoupení přirozených a indukovaných regulačních T buněk

Subpopulace nTreg a iTreg byly vybrány podle Obrázku 7.



**Obrázek 7:** Gating a reprezentativní dot plot populace nTreg a iTreg vybrané podle exprese transkripčních faktorů FoxP3 a Helios. Nejprve byla vybrána populace lymfocytů (Obrázek 7A), následně byly vyloučeny dublety (Obrázek 7B), poté byla vybrána CD4 pozitivní populace (Obrázek 7C), následně z populace CD4+CD25+ Treg (Obrázek 7D1) a CD4+CD25+FoxP3+ Treg (Obrázek 7D2) byly na základě FMO kontroly pro FoxP3 (Obrázek 7E1) a pro Helios (Obrázek 7E2) vybrány populace nTreg a iTreg (Obrázek 7F). Procenta v ukázkových dot plotech ukazují procentuální zastoupení jednotlivých vybraných populací.

V zastoupení nTreg z CD4+CD25+ Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, ačkoliv u dětí zdravých matek bylo procentuální zastoupení nTreg mírně zvýšené (**Obrázek 8**).

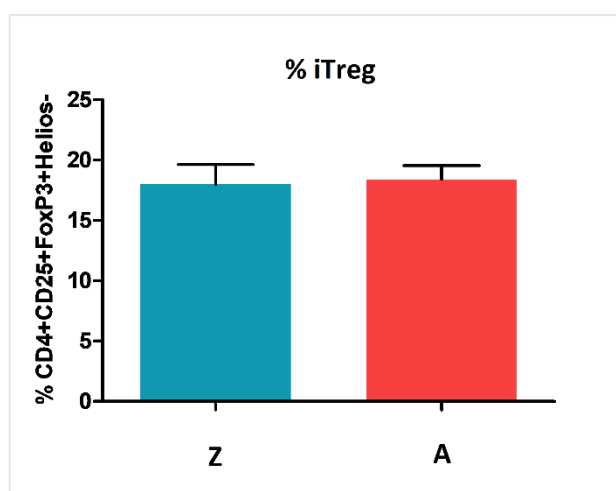


**Obrázek 8:** Procentuální zastoupení nTreg z CD4+CD25+ Treg v plné pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek.

Z – nTreg v pupečnickové krvi dětí zdravých matek

A – nTreg v pupečnickové krvi dětí alergických matek

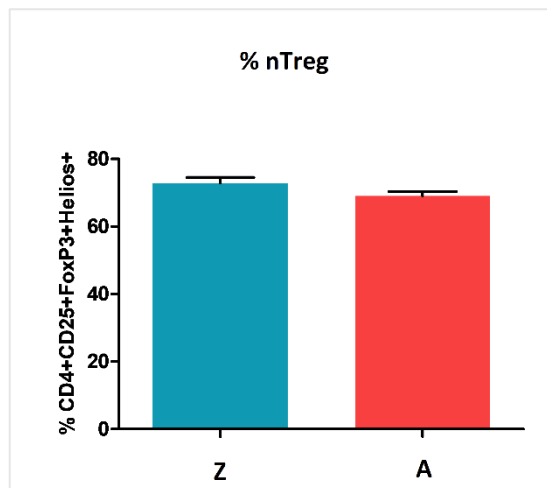
V procentuálním zastoupením iTreg z CD4+CD25+ Treg v plné pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl (**Obrázek 9**).



**Obrázek 9:** Procentuální zastoupení iTreg z CD4+CD25+ Treg v plné pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek.

*Z – iTreg v pupečnickové krvi dětí zdravých matek*  
*A – iTreg v pupečnickové krvi dětí alergických matek*

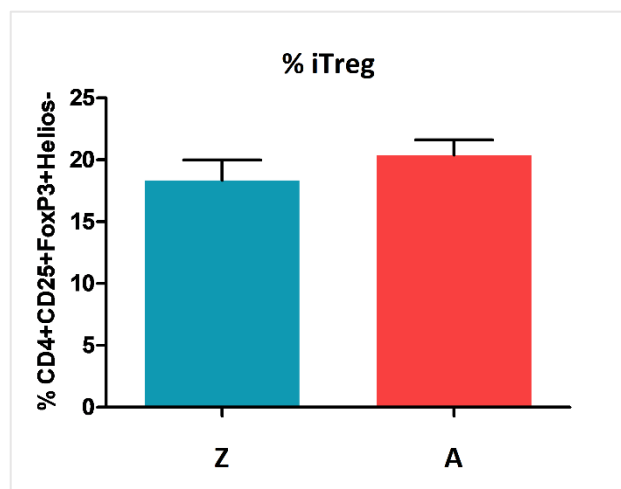
V procentuální zastoupení nTreg z CD4+CD25+FoxP3+ Treg v plné pupečnickové krvi u dětí zdravých matek nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (Obrázek 10).



**Obrázek 10: Procentuální zastoupení nTreg z CD4+CD25+FoxP3+ Treg v plné pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek.**

*Z – nTreg v pupečnickové krvi dětí zdravých matek*  
*A – nTreg v pupečnickové krvi dětí alergických matek*

V zastoupení iTreg z CD4+CD25+FoxP3+ Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek nebyl žádný statisticky významný rozdíl, ačkoliv u dětí alergických matek bylo procentuální zastoupení iTreg mírně zvýšené (Obrázek 11).



**Obrázek 11: Procento iTreg z CD4+CD25+FoxP3+ Treg v plné pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek.**

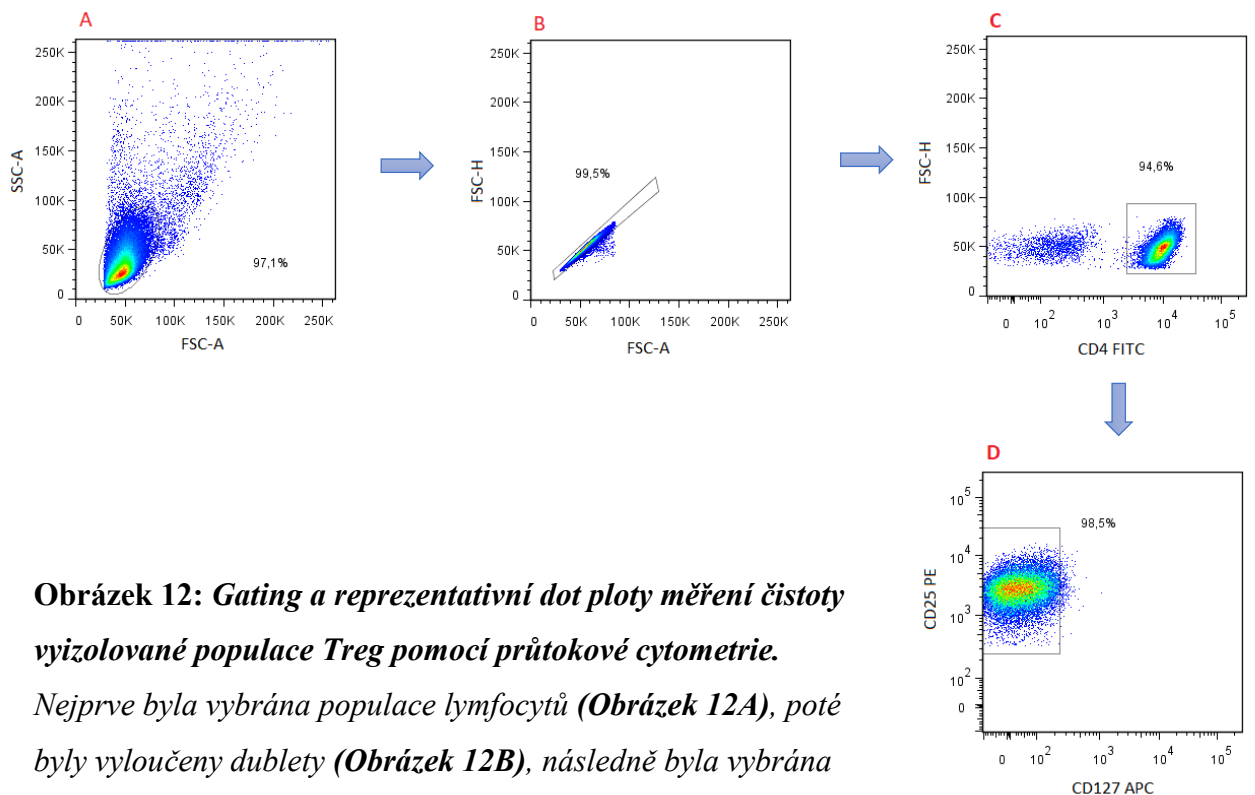
Z – iTreg v pupečnickové krvi dětí zdravých matek  
A – iTreg v pupečnickové krvi dětí alergických matek

## 6.2 Analýza imunosupresivní eseje – *in vitro* ko-kultivace izolovaných Treg s autologními mononukleárními buňkami a CD4+ T buňkami z pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek

Efaktorové CD4+ T buňky a CBMC ko-kultivované s Treg v poměrech 1:2, 1:5, 1:10 a 1:20 byly fluorescenčně označeny CFSE. Pomocí průtokové cytometrie byl u těchto buněk měřen úbytek fluorescence CFSE po 3 dnech kultivace. Analyzována byla celková proliferace CD4+ T buněk a CBMC i supresivní vlastnosti Treg. Imunosupresivní esej byla provedena u 38 dětí (17 dětí zdravých matek a 21 dětí alergických matek). Data byla statisticky vyhodnocena t-testem.

### 6.2.1 Měření čistoty populací regulačních T buněk a CD4+ T buněk získaných magnetickou separací

Čistota populace separovaných Treg byla analyzována podle **Obrázku 12**.



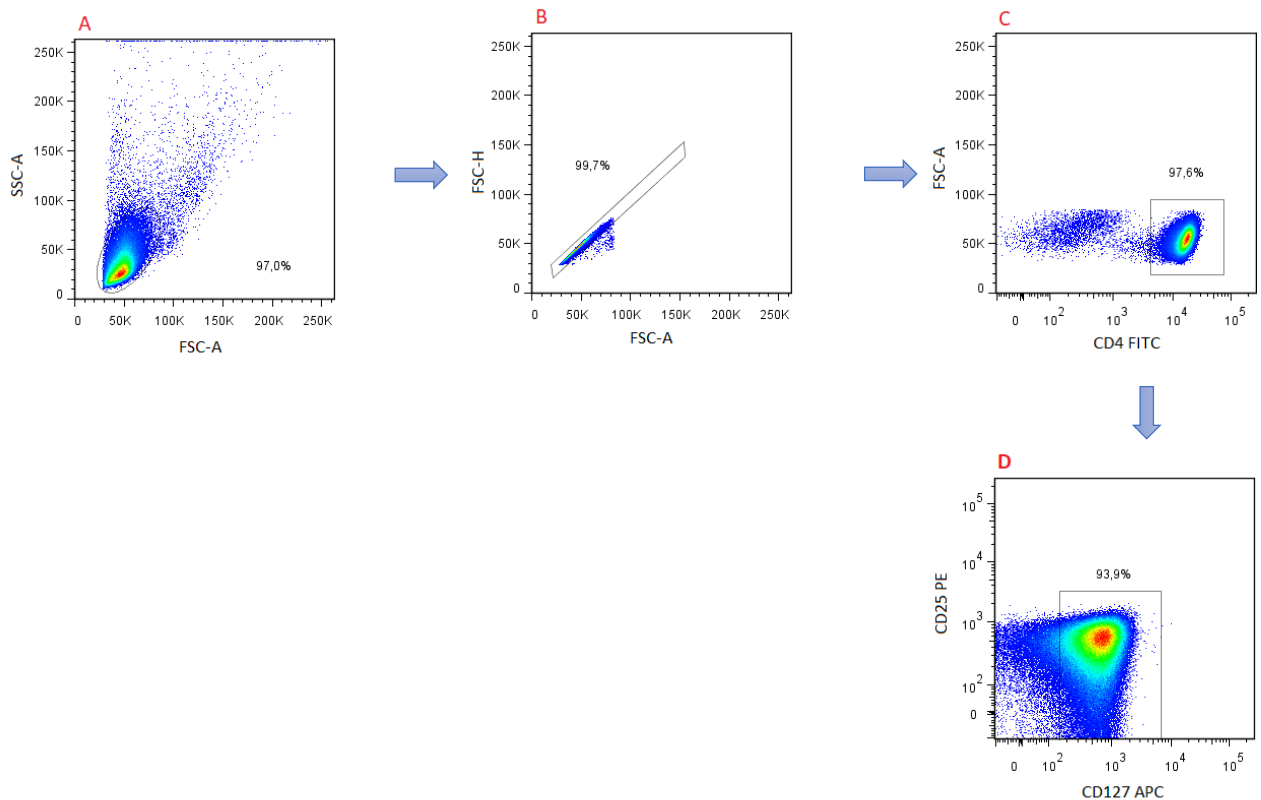
**Obrázek 12: Gating a reprezentativní dot ploty měření čistoty vyzolované populace Treg pomocí průtokové cytometrie.**

Nejprve byla vybrána populace lymfocytů (**Obrázek 12A**), poté byly vyloučeny dublety (**Obrázek 12B**), následně byla vybrána CD4 pozitivní populace (**Obrázek 12C**) a poté populace Treg pozitivní pro znak CD25 a negativní pro znak CD127 (**Obrázek 12D**). Procenta

v reprezentativních dot plotech ukazují procentuální zastoupení jednotlivých vybraných populací.

Čistota populace separovaných CD4+ T buněk byla analyzována podle **Obrázku**

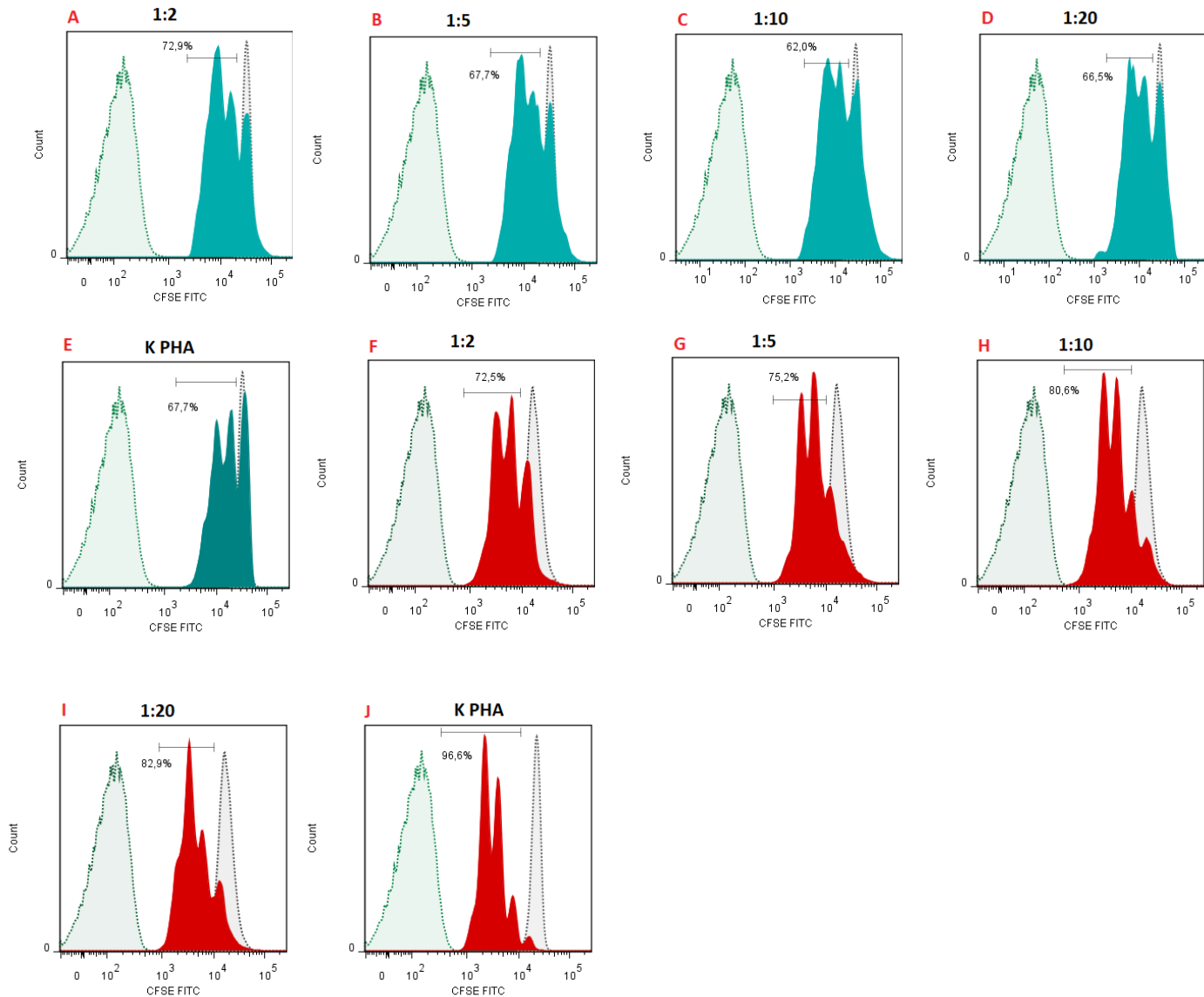
**13.**



**Obrázek 13:** *Gating a reprezentativní dot ploty měření čistoty populace CD4+ T buněk pomocí průtokové cytometrie. Nejprve byla vybrána populace lymfocytů (Obrázek 13A), poté byly vyloučeny dublety (Obrázek 13B), následně byla vybrána CD4 pozitivní populace (Obrázek 13C) a poté populace CD4+ T buněk negativní pro znak CD25 a pozitivní pro znak CD127(Obrázek 13D). Procenta v ukázkových dot plotech ukazují procentuální zastoupení jednotlivých vybraných populací.*

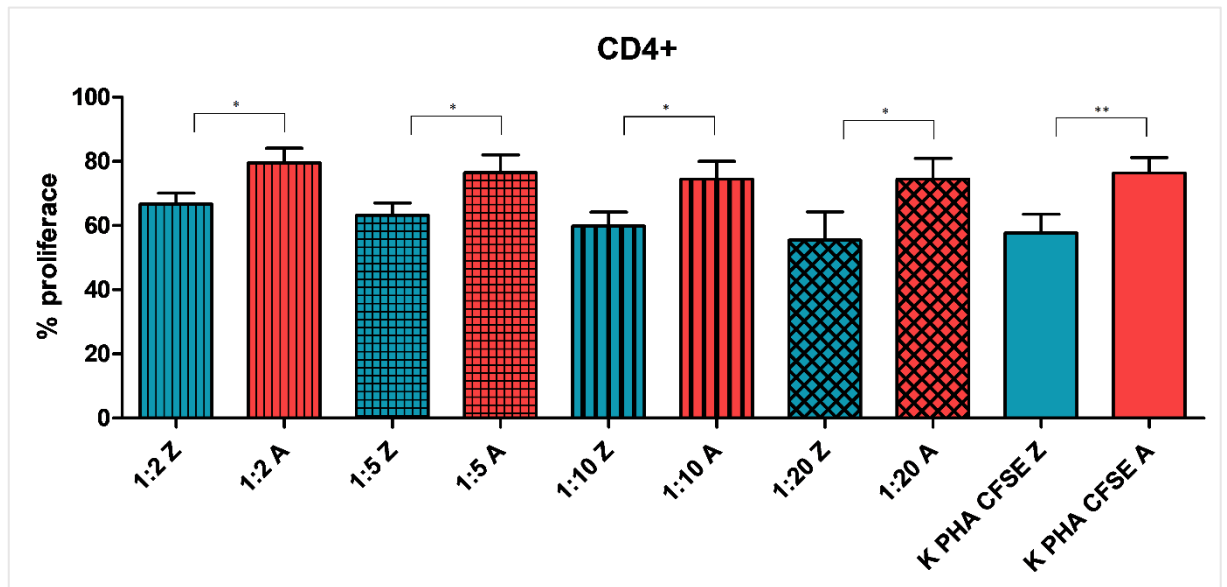
## 6.2.2 Imunosupresivní esej

Imunosupresivní esej byla analyzována podle histogramů na **Obrázku 14**.



**Obrázek 14: Reprezentativní histogramy imunosupresivních esejí.** Ukázány jsou reprezentativní histogramy ko-kultivací Treg s efektorovými T buňkami v poměrech 1:2, 1:5, 1:10 a 1:20 a kultivací polyklonálně stimulovaných efektorových buněk bez Treg u dětí zdravých matek (**Obrázek 14A-E**) a dětí alergických matek (**Obrázek 14G-J**). Procenta uvedená u jednotlivých histogramů představují procento celkové proliferace efektorových buněk po ko-kultivaci s Treg. Na histogramu nejvíce vpravo je vždy uvedena pozitivní nestimulovaná kontrola obarvená CFSE, na histogramu nejvíce vlevo je vždy uvedena negativní nestimulovaná kontrola neobarvená CFSE.

Při ko-kultivaci Tregs CD4<sup>+</sup> T buňkami proliferovaly CD4<sup>+</sup> T buňky dětí alergických matek statisticky významně více než děti zdravých matek ve všech poměrech Treg : CD4<sup>+</sup> T buňkám (1:2, 1:5, 1:10 i 1:20), ale rovněž i kontroly bez Treg (**Obrázek 15**). Překvapivě nebyl pozorován vliv různého poměru Treg s CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T lymfocytů na supresi proliferace CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T lymfocytů.



**Obrázek 15: Imunosupresivní esej – kultivace Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami při stimulaci PHA po dobu 3 dní. Efektorové CD4<sup>+</sup> T buňky byly obarveny CFSE. Díky úbytku fluorescence CFSE po 3 dnech kultivace bylo možné sledovat celkovou proliferaci CD4<sup>+</sup> T buněk.**

**1:2 Z – 1:2 A:**  $p=0,0174$

**1:5 Z -1:5 A:**  $p=0,0317$

**1:10 Z – 1:10 A:**  $p=0,0286$

**1:20 Z – 1:20 A:**  $p=0,0462$

**K PHA CFSE Z – K PHA CFSE A:**  $p= 0,0092$

Z – děti zdravých matek

A – děti alergických matek

K – nestimulovaná kontrola

K PHA – kontrola stimulovaná fytohemaglutininem (PHA) bez Treg

CFSE – carboxyfluorescein succinimidyl ester

1:2 – Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami kultivované v poměru 1:2

1:5 – Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami kultivované v poměru 1:5

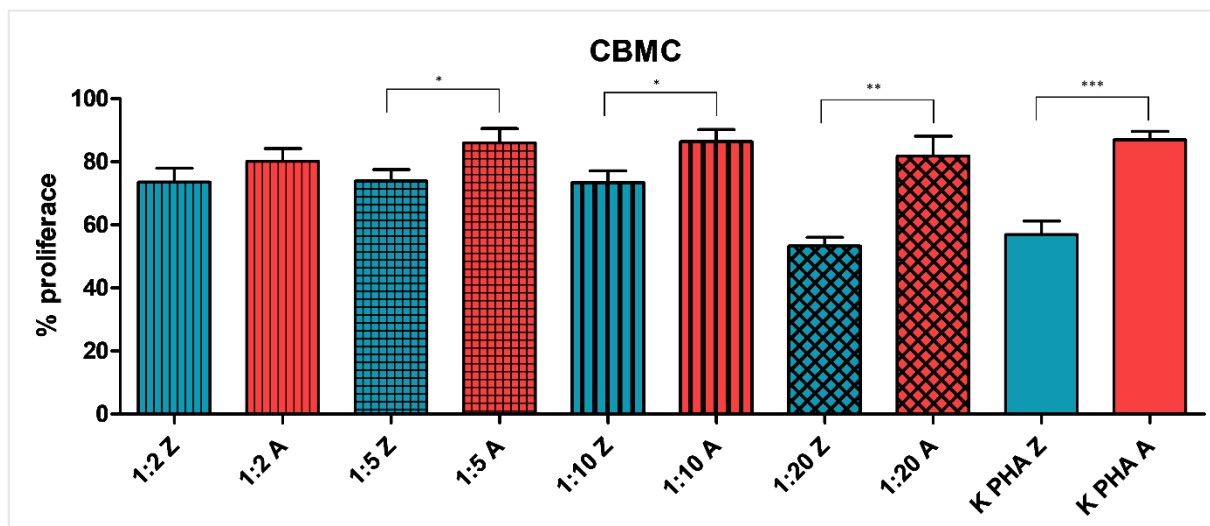
1:10 – Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami kultivované v poměru 1:10

1:20 – Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami kultivované v poměru 1:20

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

Při ko-kultivaci Treg s CBMC celkově proliferovaly efektorové CBMC dětí alergických matek statisticky významně více v poměrech 1:5, 1:10 a 1:20 a u pozitivní kontroly než CBMC dětí zdravých matek (**Obrázek 16**).



**Obrázek 16:** Celková proliferace CBMC po třídenní ko-kultivaci s Treg dětí zdravých a alergických matek. Efektorové CBMC byly obarveny CFSE. Díky úbytku fluorescence CFSE během ko-kultivace bylo možné sledovat celkovou proliferaci CBMC.

*1:5 Z – 1:5 A:  $p = 0,0326$*

*1:10 Z - 1:10 A:  $p = 0,0151$*

*1:20 Z - 1:20 A:  $p = 0,0096$*

*K PHA Z - K PHA A:  $p = <0,0001$*

*CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve*

*Z – děti zdravých matek*

*A – děti alergických matek*

*K – nestimulovaná kontrola*

*K PHA – kontrola stimulovaná fytohemaglutininem (PHA) bez Treg*

*CFSE – carboxyfluorescein succinimidyl ester*

*1:2 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:2*

*1:5 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:5*

*1:10 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:10*

*1:20 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:20*

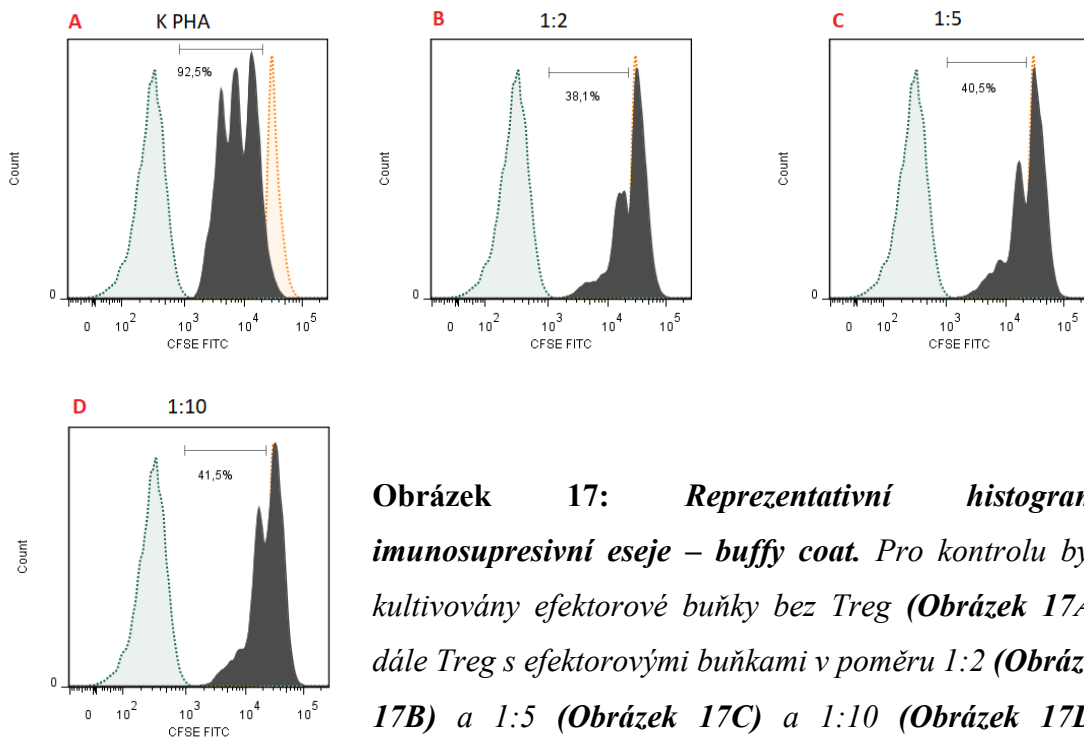
*\*  $p < 0,05$*

*\*\*  $p < 0,01$*

*\*\*\*  $p < 0,001$*

### 6.2.3 Imunosupresivní esej – buffy coat

Jelikož se nám nepodařilo prokázat supresivní efekt Treg na proliferaci CD4+ T buněk ani CBMC, rozhodli jsme se ověřit funkčnost metody s využitím buněk dospělého jedince. Byly použity buňky z buffy coatů dospělého zdravého člověka. Treg a CD4+ T buňky byly separovány pomocí magnetické separace stejně jako u pupečnickové krve. Treg byly ko-kultivovány s CD4+ T buňkami a PBMC 3 dny a stimulovány PHA. Imunosupresivní esej z buffy coatů byla analyzována podle **Obrázku 17**.



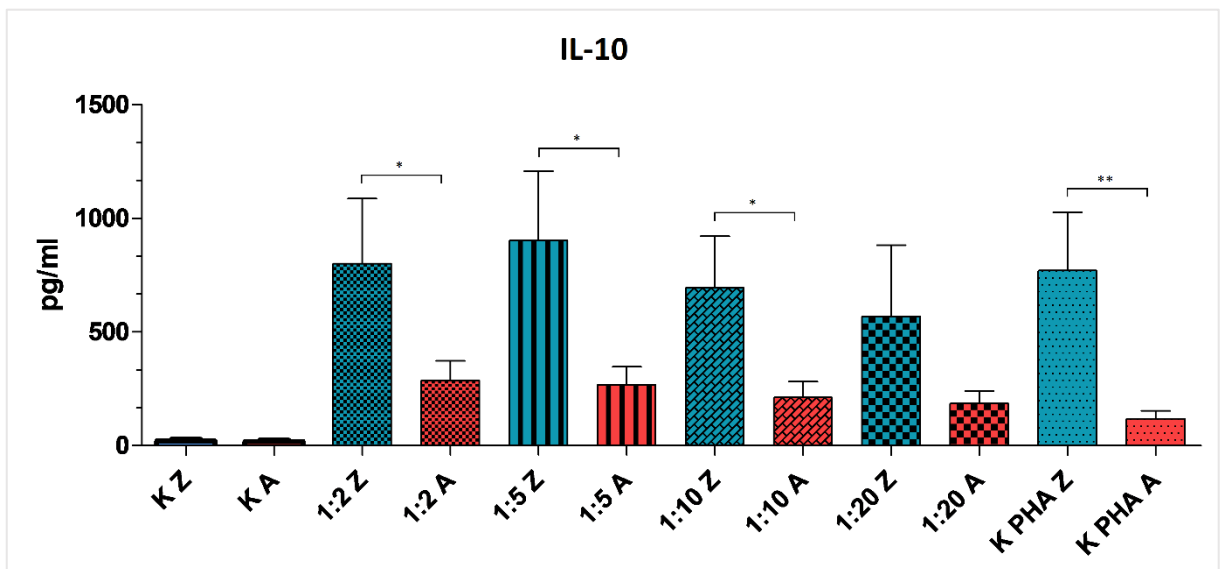
**Obrázek 17: Reprezentativní histogramy imunosupresivní eseje – buffy coat.** Pro kontrolu byly kultivovány efektorové buňky bez Treg (**Obrázek 17A**), dále Treg s efektorovými buňkami v poměru 1:2 (**Obrázek 17B**) a 1:5 (**Obrázek 17C**) a 1:10 (**Obrázek 17D**).

Procenta uvedená u jednotlivých histogramů představují procento celkové proliferace efektorových buněk po ko-kultivaci s Treg. Na histogramu nejvíce vpravo je vždy uvedena pozitivní nestimulovaná kontrola obarvená CFSE, na histogramu nejvíce vlevo je vždy uvedena negativní nestimulovaná kontrola neobarvená CFSE.

### 6.3 Detekce imunoregulačních cytokinů v supernatantu buněčných kultur ko-kultivací Treg s CBMC/CD4+ T buňkami *in vitro* pomocí metody ELISA

Imunoenzymatickou metodou ELISA byla stanovena produkce regulačních cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  v supernatantech odebraných z *in vitro* ko-kultivací separovaných Treg s efektorovými CD4+ T buňkami či CBMC z pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek. Treg s efektorovými buňkami byly kultivovány v poměrech 1:2, 1:5, 1:10 a 1:20 a byly stimulovány PHA. Stanovení produkce IL-10 bylo provedeno u 34 dětí (13 dětí zdravých matek a 21 dětí alergických matek); stanovení produkce TGF- $\beta$  bylo provedeno u 13 dětí (7 dětí zdravých matek a 6 dětí alergických matek). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí t-testu.

V poměru 1:2 Treg:CD4+ T buňkám byla produkce IL-10 statisticky významně nižší u dětí alergických matek. Statisticky významně nižší produkce IL-10 u dětí alergických matek byla i v poměru 1:5 a 1:10 Treg:CD4+ T buňkám. Statisticky významný rozdíl byl pozorován i mezi kontrolou bez Treg stimulovanou PHA u dětí zdravých a alergických matek. U nestimulované kontroly bez Treg nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl mezi CD4+ T buňkami dětí zdravých a alergických matek patrně z důvodu nízké produkce IL-10 na hranici detekčního limitu (**Obrázek 18**).



Obrázek 18: Koncentrace IL-10 v supernatantu kultur Treg s CD4+ T buňkami dětí zdravých a alergických matek, různé poměry.

$1:2 Z - 1:2 A: p = 0,0347$   
 $1:5 Z - 1:5 A: p = 0,0151$   
 $1:10 Z - 1:10 A: p = 0,0146$   
 $K PHA Z - K PHA A: p = 0,0046$

Z – děti zdravých matek

A – děti alergických matek

K – nestimulovaná kontrola

K PHA – kontrola stimulovaná fytohemaglutininem (PHA) bez Treg

1:2 – Treg s CD4+ T buňkami kultivované v poměru 1:2

1:5 – Treg s CD4+ T buňkami kultivované v poměru 1:5

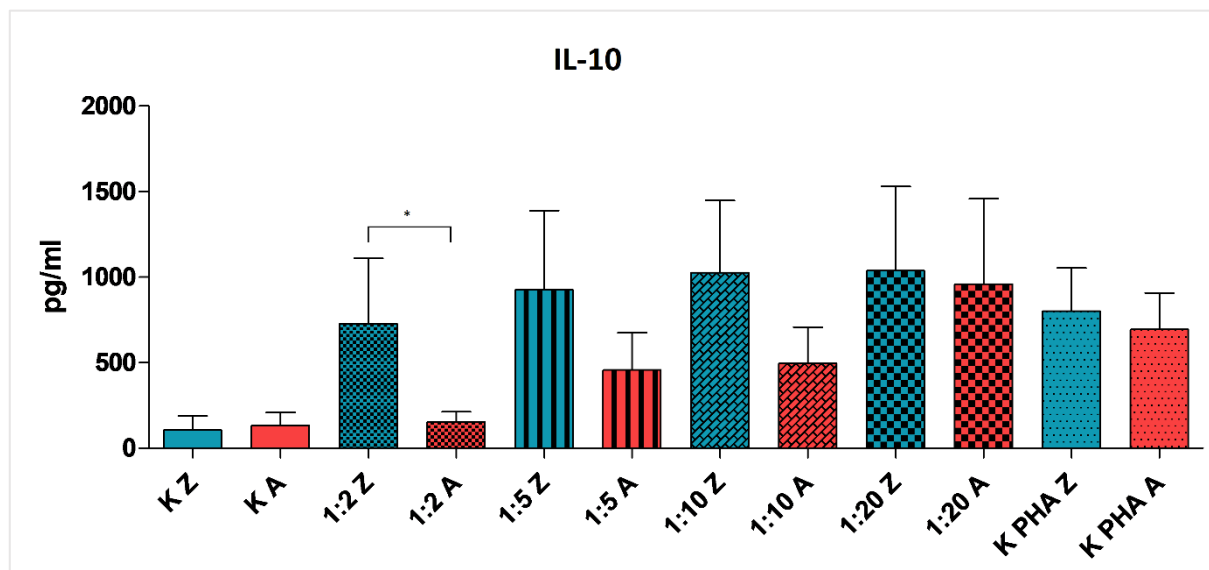
1:10 – Treg s CD4+ T buňkami kultivované v poměru 1:10

1:20 – Treg s CD4+ T buňkami kultivované v poměru 1:20

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

V produkci IL-10 v supernatantu kultur Treg s CBMC dětí zdravých a alergických matek byl prokázán statisticky významný rozdíl pouze v poměru 1:2 (Treg:CBMC). Mezi ostatními poměry Treg : CBMC či kontrolami bez Treg nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v sekreci IL-10 (**Obrázek 19**).



**Obrázek 19: Koncentrace IL-10 v supernatantu kultur Treg s CBMC dětí zdravých a alergických matek.**

$1:2 Z - 1:2 A: p = 0,0496$

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

Z – děti zdravých matek

*A – děti alergických matek*

*K – nestimulovaná kontrola*

*K PHA – kontrola stimulovaná fytohemaglutininem (PHA) bez Treg*

*1:2 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:2*

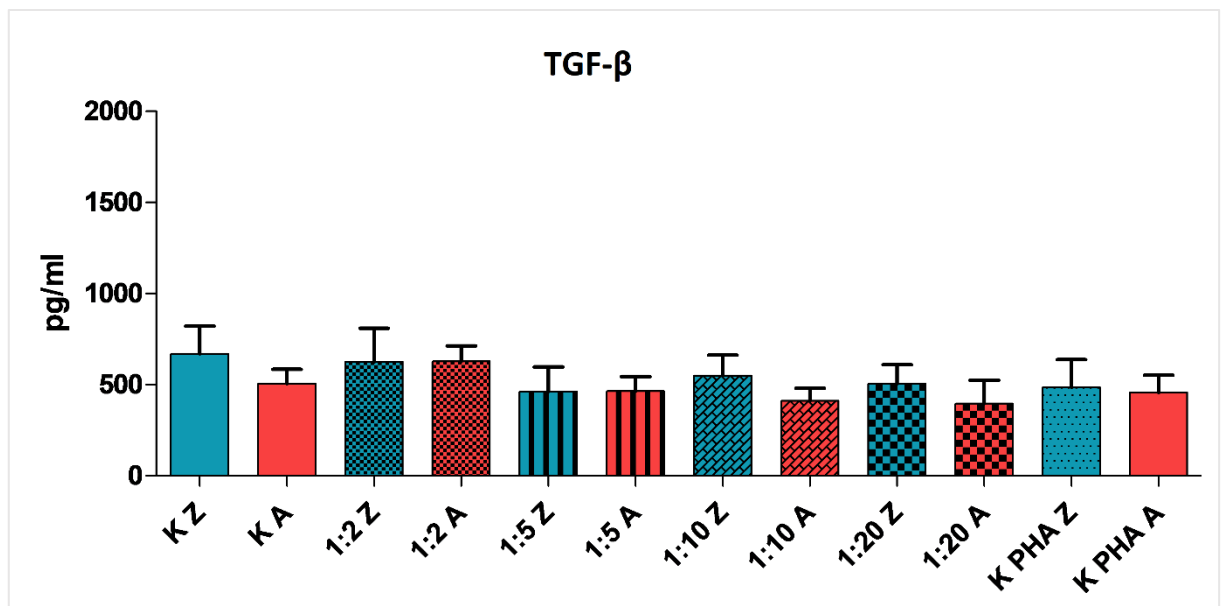
*1:5 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:5*

*1:10 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:10*

*1:20 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:20*

*\*  $p < 0,05$*

Mezi hodnotami produkce TGF- $\beta$  v kulturách Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek nebyl pozorován statisticky významný rozdíl (**Obrázek 20**).



**Obrázek 20: Koncentrace TGF- $\beta$  v supernatantu kultur Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami dětí zdravých a alergických matek.**

*Z – děti zdravých matek*

*A – děti alergických matek*

*K – nestimulovaná kontrola*

*K PHA – kontrola stimulovaná fytohemaglutininem (PHA) bez Treg*

*1:2 – Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami kultivované v poměru 1:2*

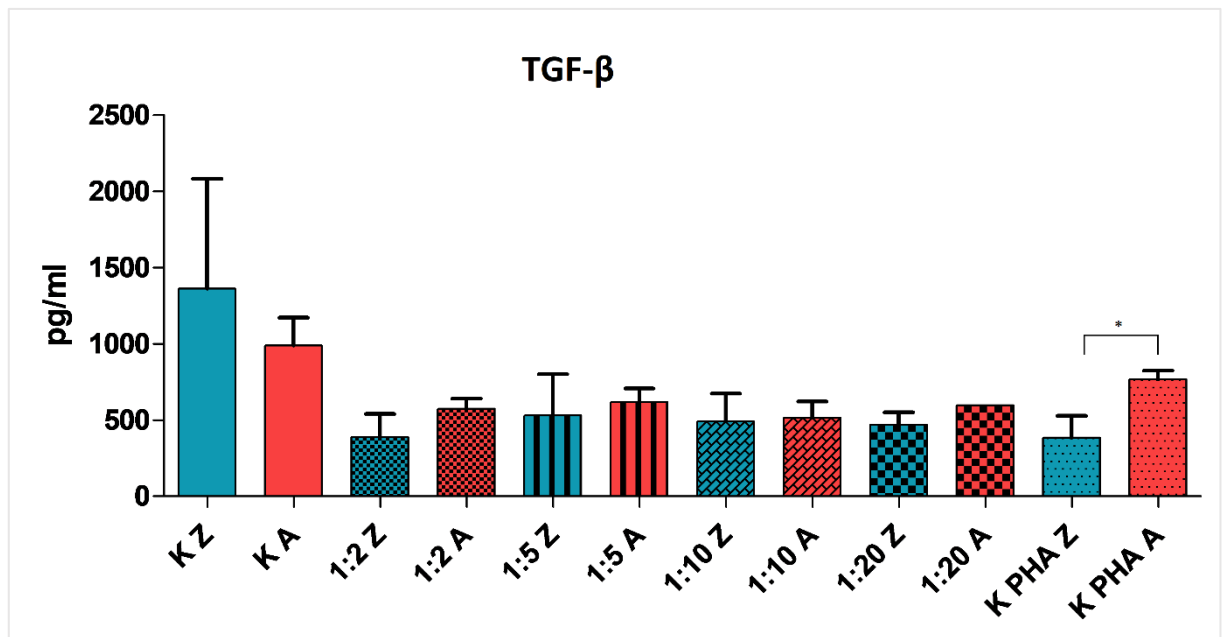
*1:5 – Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami kultivované v poměru 1:5*

*1:10 – Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami kultivované v poměru 1:10*

*1:20 – Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami kultivované v poměru 1:20*

Produkce TGF- $\beta$  v supernatantu ko-kultivací Treg s CBMC dětí zdravých a alergických matek se statisticky významně lišila pouze u kontrol bez Treg stimulovaných PHA. Děti alergických matek měly signifikantně zvýšenou produkci

TGF- $\beta$  u CBMC. Statisticky významný rozdíl v produkci TGF- $\beta$  nebyl pozorován u žádného poměru kultivace Treg s CBMC (Obrázek 21).



Obrázek 21: *Koncentrace TGF- $\beta$  v supernatantu kultur Treg s CBMC dětí zdravých a alergických matek.*

*K PHA Z – K PHA A:  $p = 0,0189$*

*CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve*

*Z – děti zdravých matek*

*A – děti alergických matek*

*K – nestimulovaná kontrola*

*K PHA – kontrola stimulovaná fytohemaglutininem (PHA) bez Treg*

*1:2 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:2*

*1:5 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:5*

*1:10 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:10*

*1:20 – Treg s CBMC kultivované v poměru 1:20*

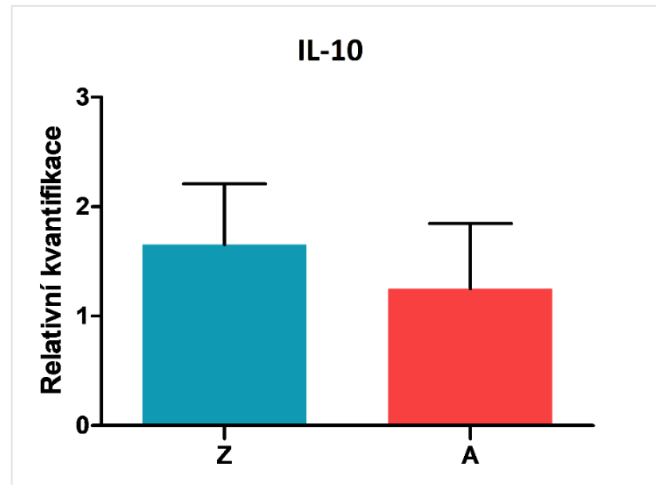
*\*  $p < 0,05$*

#### 6.4 Stanovení genové exprese cytokinů v regulačních T buňkách separovaných z pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek

Pomocí qPCR byla stanovena exprese regulačních cytokinů IL-10, TGF- $\beta$  a IL-35 (resp. podjednotky p35 IL-12A) u Treg izolovaných pomocí magnetické separace

z pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek. Jako endogenní kontrola byl zvolen  $\beta$ -aktin. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny t-testem.

V genové expresi IL-10 u Treg dětí zdravých a alergických matek nebyl žádný statisticky významný rozdíl, ačkoliv děti alergických matek měly expresi IL-10 mírně sníženou (**Obrázek 22**).

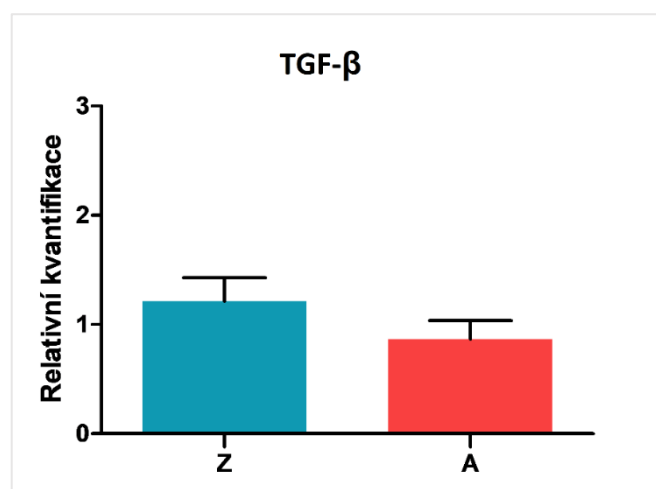


**Obrázek 22:** Genová exprese IL-10 u Treg dětí zdravých a alergických matek.

Z – Treg dětí zdravých matek

A – Treg dětí alergických matek

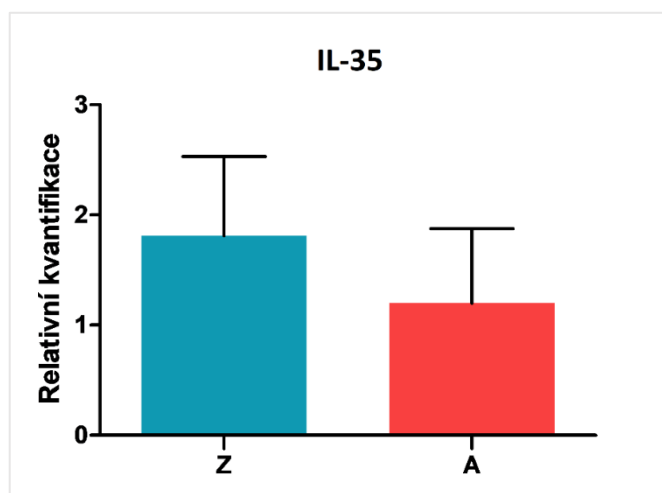
V genové expresi TGF- $\beta$  v Treg dětí zdravých a alergických matek také nebyl žádný statisticky významný rozdíl, ačkoliv děti alergických matek měly expresi TGF- $\beta$  mírně sníženou (**Obrázek 23**).



**Obrázek 23:** Genová exprese TGF- $\beta$  u Treg dětí zdravých a alergických matek.

*Z – Treg dětí zdravých matek*  
*A – Treg dětí alergických matek*

Ani v genové expresi IL-35 (p35) u Treg dětí zdravých a alergických matek nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl, ačkoliv děti alergických matek měly opět expresi IL-35 mírně sniženou (**Obrázek 24**).



**Obrázek 24:** *Genová exprese IL-35 u Treg dětí zdravých a alergických matek.*

*Z – Treg dětí zdravých matek*  
*A – Treg dětí alergických matek*

## 7 Diskuze

V rámci této diplomové práce bylo sledováno zastoupení celkové populace Treg a subpopulací nTreg a iTreg a v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek. Rovněž jsme se zaměřili na charakterizaci funkčních vlastností Treg pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek. Při porovnávání procentuálního zastoupení Treg v nestimulované pupečnickové krvi nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi dětmi zdravých a alergických matek. Proporční zastoupení v plné pupečnickové krvi bylo měřeno pomocí průtokové cytometrie a stanoveno na základě kombinace exprese povrchových znaků CD4 a CD25 i intracelulárních transkripčních faktorů FoxP3 a Helios. Při hodnocení vlastní imunosupresivní kapacity Treg nebyla pozorována výrazná schopnost Treg dětí jak zdravých, tak alergických matek potlačit proliferaci CD4+ T lymfocytů či CBMC, což poukazuje na funkční nezralost Treg přítomných v pupečnickové krvi. V souladu s předchozími výsledky byla zjištěna vyšší proliferativní kapacita CD4+ T buněk i CBMC izolovaných z pupečnickové krve dětí alergických matek ve srovnání s proliferativní kapacitou CD4+ T buněk a CBMC dětí zdravých matek. V supernatantech těchto buněčných kultur měly děti alergických matek významně nižší koncentraci imunoregulačního cytokinu IL-10 a na úrovni mRNA měly děti alergických matek sníženou expresi regulačních cytokinů IL10, TGF- $\beta$  i IL-35, avšak zjištěné rozdíly nedosáhly statistické významnosti.

Jelikož dodnes nebyl popsán dostatečně specifický znak pro Treg a hodnoty týkající se procentuálního zastoupení Treg v pupečnickové krvi se v literatuře liší, bylo proporční zastoupení Treg v pupečnickové krvi vyhodnoceno dvěma způsoby. Jednak byly Treg definovány jako CD4+CD25+ T buňky, což považujeme za nejméně přesné, ačkoliv v mnoha pracích je tato charakteristika stále používána (Hoffmann *et al.*, 2007) (zejména pak v klinice (Quan and Yang, 2017)). V procentuálním zastoupení Treg (CD4+CD25+) v plné nestimulované pupečnickové krvi nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi dětmi zdravých a alergických matek. Statisticky významný rozdíl mezi procentuálním zastoupením Treg (charakterizovaných jako CD4+CD25+(CD127<sup>lo/-</sup>)) izolovaných z CBMC dětí zdravých a alergických matek (dětí s následnými alergickými projevy ve 12 měsících života) nepopisuje ani Smith a kol., ačkoliv uvádějí trend k nižšímu zastoupení Treg v CBMC u dětí, u kterých došlo později k rozvoji alergického onemocnění (Smith *et al.*, 2008).

Při charakteristice Treg jako CD4+CD25+FoxP3+ nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi zastoupením Treg v plné pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky dříve zjištěnými v laboratoři (Hrdý *et al.*, 2012) i s výsledky Fu a kol., kteří nezjistili rozdíl v procentuálním zastoupení CD4+CD25+FoxP3+ Treg v pupečnickové krvi mezi dětmi zdravých a alergických matek (Fu *et al.*, 2013). Naopak Kim a kol. uvádějí, že zastoupení CD4+CD25+FoxP3+ Treg v pupečnickové krvi zdravých dětí se pohybuje v průměru kolem 3,2 % (Kim *et al.*, 2012). V našich výsledcích je průměrná hodnota procentuálního zastoupení Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých matek vyšší, a to 9,42 %. Tento rozdíl může být zapříčiněn různým definováním skupiny zdravých a alergických dětí (resp. dětí zdravých a alergických matek). V naší práci jsme zohledňovali anamnézu matky (výskyt alergie), zatímco Kim a kol. brali v potaz dědičné poruchy, komplikace z důvodu infekce a hematologické anomálie přímo u novorozence. Nižší zastoupení CD4+CD25+FoxP3+ Treg (1,57 %) v pupečnickové krvi dětí alergických matek popisuje i Meng a kol. V procentuálním zastoupení Treg v CBMC dětí atopických a zdravých matek, které byly nespecificky polyklonálně stimulovány PHA, nebyl popsán významný rozdíl. Procentuální zastoupení Treg v CBMC těchto dětí bylo po stimulaci PHA vyšší (26,81 % u dětí zdravých matek a 37,28 u dětí atopických matek) v porovnání s procentuálním zastoupením Treg v nestimulovaných CBMC (Schaub *et al.*, 2008a). Strömbeck a kol. uvádí vyšší procentuální zastoupení CD4+CD25+FoxP3+ Treg u dětí, u kterých došlo k fázi senzibilizace v 18 a 36 měsících života. Tyto děti měly vyšší zastoupení Treg nejen v periferní krvi, ale i v pupečnickové krvi (data nebyla uvedena) (Strömbeck *et al.*, 2014). Naše výsledky nevykazují vyšší zastoupení CD4+CD25+FoxP3+ Treg u dětí alergických matek, možná právě proto, že opět nebyl brán ohled na alergické projevy dítěte v pozdějším věku, ale pouze na alergický stav matky. Faktorů, které mohou ovlivnit výsledné procentuální zastoupení Treg v krvi, je více. Postup při zpracování vzorku pro analýzu Treg pomocí průtokové cytometrie může výrazně ovlivnit celkové výsledky experimentu. Klíčová je titrace protilátky proti FoxP3, jelikož se ukázalo, že doporučené množství od výrobce nemusí být dostačující pro označení všech FoxP3+ buněk. Důležitým faktorem je, zda jsou Treg značeny z čerstvé krve (zpracované do 24 hod. od odebrání) anebo zda byly před zpracováním kryokonzervovány. Ukázalo se, že počet kryokonzervovaných Treg je průměrně nižší než počet Treg analyzovaných v čerstvé krvi. Dále může procentuální zastoupení Treg ovlivnit i permeabilizace a fixace vzorku, pokud nejsou předem optimalizovány (Nettenstrom *et al.*, 2013). Významnou roli hraje

i konkrétní klon protilátky. Použití různých klonů protilátky nejen proti FoxP3, ale i CD25, může vést k rozporuplným výsledkům (Law *et al.*, 2009). V ještě větší variabilitě výsledků studií zabývající se lidskými Treg může hrát roli konkrétní alela genu *foxp3*. Nezávisle na sobě polymorfismus genu *foxp3* související s predispozicí k rozvoji alergické rýmy byl popsán u čínské i maďarské populace (Zhang *et al.*, 2009; Fodor *et al.*, 2011).

Důležitým faktorem ovlivňujícím imunitní systém novorozence, jeho predispozice ke vzniku alergických onemocnění a zastoupení Treg, je i okolní prostředí, ve kterém se matka vyskytuje během těhotenství. Život matky na venkově a s ním spojená vyšší antigenní stimulace (zejména stimulace mikrobiálními antigeny) vede u novorozenců ke snížené Th2 imunitní odpovědi a vyššímu procentuálnímu zastoupení Treg v pupečnickové krvi než u novorozenců matek žijících v městském prostředí (Schaub *et al.*, 2009; Lisciandro *et al.*, 2012). Bohužel, ani tento faktor nebyl mezi dětmi zdravých a alergických matek porovnáván. V naší práci se jednalo o ženy bydlící v Praze a jejím okolí.

Na základě exprese FoxP3 a Helios jsme odlišovali dvě hlavní subpopulace Treg – nTreg a iTreg. V současné době je snaha o identifikaci fenotypových buněčných znaků umožňujících rozlišení mezi těmito dvěma subpopulacemi Treg. Za jeden takový slibný znak je považován transkripční faktor Helios (Thornton *et al.*, 2010). Naši hypotézou bylo, že děti alergických matek budou mít nižší zastoupení iTreg, jelikož iTreg představují důležitou populaci imunitních buněk podílející se na vzniku periferní tolerance vůči alergenům. Naše data nepotvrdila statisticky významný rozdíl mezi nTreg a iTreg analyzovaných jak z CD4+CD25+ Treg tak z CD4+CD25+FoxP3+ Treg.

Treg hrají stěžejní roli při inhibici efektorových T buněk a při nastavování periferní tolerance vůči alergenům z vnějšího okolí v časném postnatálním období. Pomocí imunopresivní eseye v této práci jsme chtěli zjistit, zda Treg separované z pupečnickové krve jsou této inhibice schopny a zda u dětí alergických matek není tato jejich funkční vlastnost narušena, čímž by mohlo docházet ke snazšímu rozvoji nežádoucí imunitní odpovědi na relativně neškodné antigeny vnějšího prostředí u jedinců s predispozicí k rozvoji alergie. Byla měřena jak celková proliferace CD4+ T buněk tak CBMC ko-kultivovaných s Treg v různých poměrech. Zjistili jsme, že CD4+ T buňky a CBMC dětí alergických matek mají po stimulaci statisticky významně vyšší celkovou proliferaci.

To je v souladu s výsledky práce Žížky a kol. (Žížka *et al.*, 2007). Vyšší reaktivita CBMC dětí alergických matek by mohla poukazovat na mechanismus snazšího rozvoje alergických onemocnění u těchto dětí, kdy by buňky imunitního systému dětí s vyšší predispozicí k rozvoji alergického onemocnění reagovaly na antigeny vnějšího prostředí neadekvátní imunitní odpovědí.

V této práci však nebyl potvrzen žádný statisticky významný rozdíl v míře suprese Treg vůči CD4+ T buňkám či CBMC mezi dětmi zdravých a alergických matek. Dokonce jsme nepozorovali žádnou imunosupresi při ko-kultivaci Treg s CD4+ T lymfocyty či CBMC. Pro ověření funkčnosti metody byla stejná imunosupresivní esej provedena u buněk pocházejících z buffy coatů zdravých dospělých jedinců. V tomto případě bylo dosaženo zřetelné inhibice proliferace efektorových T buněk. Lze tedy říci, že Treg v pupečnickové krvi mají nižší funkční kapacitu než Treg z periferní krve dospělých jedinců poukazující na obecnou nezralost novorozeneckého imunitního systému (Vosters *et al.*, 2010; Torelli *et al.*, 2012).

Informace týkající se supresivních vlastností Treg v pupečnickové krvi se značně rozcházejí. Meng a kol. popisují, že Treg izolované z pupečnickové krve dětí alergických matek jsou významně méně schopné suprese vůči efektorovým buňkám než Treg izolované z pupečnickové krve dětí zdravých matek (Meng *et al.*, 2016). Navíc bylo zjištěno, že novorozenecké Treg (oproti Treg dospělých lidí) nejsou schopny vyvolat dostatečné supresivní funkce ani vůči NK (angl. natural killer) buňkám, důležité buněčné složky přirozeného imunitního systému (Xu *et al.*, 2014).

V porovnání s Treg z periferní krve dospělých jedinců, Treg v pupečnickové krvi dětí atopických matek jsou schopné nižší imunosuprese vůči CD4+CD25- efektorovým T buňkám (Schaub *et al.*, 2008a). Dostačující supresivní efekt Treg v pupečnickové krvi vůči efektorovým CD4+CD25- T buňkám je popisován i dalšími autory, a to jak po polyklonální stimulaci (Takahata *et al.*, 2004), tak i po specifické antigenní stimulaci (Wing *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 2012). Na základě našich výsledků předpokládáme, že novorozenecký adaptivní imunitní systém je po narození nezralý včetně snížených imunosupresivních schopností Treg. Brzká poporodní antigenní stimulace novorozeneckého imunitního systému je tedy zřejmě stěžejní pro nastavení potřebných imunoregulačních funkcí Treg.

Pomocí metody ELISA byla stanovena produkce regulačních cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  v supernatantu buněčných kultur. IL-10 má významnou roli při navozování anergie T buněk, inhibuje totiž proliferaci Th1 i Th2 buněk. Treg jsou jedny z imunitních buněk tvořících tento cytokin. Produkce IL-10 však byla popsána u Th1 i Th2 buněk, B buněk, dendritických buněk a makrofágů (Nagalakshmi *et al.*, 2004). Nižší produkce IL-10 v pupečnickové krvi byla popsána u dětí s vysokým rizikem vzniku alergického onemocnění v pozdějším věku (Bullens *et al.*, 2012). Statisticky významně nižší hodnoty produkce IL-10 byly zjištěny v supernatantu kultur Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami dětí alergických matek. Nevýznamný rozdíl v poměru 1:20 mohl být zapříčiněn malým počtem vzorků a vyšší variabilitou výsledků. Tyto výsledky u dětí alergických matek poukazují na sníženou schopnost tvorby regulačního cytokinu IL-10 buňkami pupečnickové krve a snížené schopnosti potlačovat imunitní odpověď efektorových CD4<sup>+</sup> T buněk, což potvrzuje i vyšší proliferační kapacita jak CD4<sup>+</sup> T lymfocytů tak CBMC u dětí alergických matek v porovnání s dětmi zdravých matek. Nedávno publikovaná studie Coomese a kol. zabývající se rolí IL-10 u myšího modelu alergického zánětu dýchacích cest indukovaného alergenem roztoče zjistila, že produkce IL-10 a signalizace pomocí IL-10R přímo ovlivňuje přežívání Th2 T buněk. Signalizace přes IL-10R indukuje v Th2 buňkách expresi granzymu B a způsobuje tím buněčnou smrt Th2 T buněk indukovanou přes TCR. Signalizace zahrnující IL-10R je tedy u myšího modelu alergického zánětu dýchacích cest stěžejní v prevenci rozvoje alergické reakce. Pokud by tento mechanismus byl stejný i u lidí, znamenalo by to, že vzhledem k nedostatečné signalizaci vedoucí přes IL-10R alergičtí jedinci nejsou schopni dostatečně efektivně potlačit proliferaci efektorových buněk zodpovědných za projevy onemocnění (Coomes *et al.*, 2017).

Rozdíl v produkci IL-10 v supernatantu kultur Treg s CBMC mezi dětmi alergických a zdravých matek nevyšel statisticky významně. Výsledky práce Vosters a kol. popisují, že novorozenecké CBMC stimulované lipopolysacharidem (LPS, angl. lipopolysaccharide) oproti dospělým jedincům produkují významně méně IL-10 (Vosters *et al.*, 2010). Jak již bylo zmíněno, IL-10 je produkován dalšími imunitními buňkami než Treg, což při ko-kultivaci Treg s CBMC mohlo smazat významné rozdíly v produkci tohoto cytokinu CD4<sup>+</sup> T lymfocyty u dětí zdravých a alergických matek. Zároveň je možné, že CBMC dětí zdravých matek produkují IL-10 ve vyšší míře než děti alergických matek. Vyšší produkci IL-10 CBMC dětí zdravých matek však nemůžeme prokázat,

jelikož nebyla měřena koncentrace IL-10 v supernatantu kultur samotných Treg bez efektorových buněk.

V supernatantech kultur byla stejně jako produkce IL-10 stanovena i produkce TGF- $\beta$ . Výsledky produkce TGF- $\beta$  po *in vitro* ko-kultivaci Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami nepotvrdily statisticky významný rozdíl mezi dětmi zdravých a alergických matek. V literatuře se informace ohledně koncentrace TGF- $\beta$  produkovaného buňkami pupečnickové krve rozcházejí. Někde je uváděna vyšší koncentrace TGF- $\beta$  v pupečnickové krve než u jiných cytokinů (Takahashi *et al.*, 2015). Výsledky experimentu prováděného dříve v laboratoři ukazují také vysoké koncentrace TGF- $\beta$  v séru pupečnickové krve, avšak nižší hodnoty u dětí alergických matek než u dětí matek zdravých (Hrdý *et al.*, 2010). V porovnání s Treg dospělých lidí bylo zjištěno, že novorozenecké Treg produkují v buněčných kulturách méně solubilního TGF- $\beta$  a exprimují méně membránově vázaného TGF- $\beta$  (Xu *et al.*, 2014). Studie zaměřená na analýzu Treg městské kohorty matek a jejich dětí zjistila, že v porovnání s PBMC matky, CBMC novorozence po polyklonální stimulaci produkují méně TGF- $\beta$  (Ly *et al.*, 2009). Koncentrace TGF- $\beta$  v této práci byla měřena v supernatantu kultur Treg s CD4<sup>+</sup> T buňkami a CBMC. Statisticky nevýznamné výsledky se shodují s výsledky Balossini a kol. V jejich práci nebyl popsán rozdíl v produkci IL-10 a TGF- $\beta$ 1 v pupečnickové krvi dětí zdravých či alergických rodičů. Zajímali se však především o alergický stav otce. Dokonce zjistili, že děti alergických otců mají v pupečnickové krvi snížené hladiny TGF- $\beta$ 1 (Balossini *et al.*, 2009). V naší práci jsme alergický stav otce nebrali v úvahu proto, že vyvíjející se plod je v intimní interakci s tělem matky v průběhu intrauterinního vývoje, a ne s tělem otce, tudíž alergický stav matky má zřejmě výrazně vyšší vliv na potenciální rozvoj alergie u dítěte. Zanedbatelný vliv alergie či atopie otce na případné riziko rozvoje alergie u dítěte popisují ve své práci i Schaub a kol. (Schaub *et al.*, 2008a).

Kromě produkce regulačních cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  na proteinové úrovni byla v supernatantech buněčných kultur stanovena i genová exprese regulačních cytokinů na úrovni mRNA v Treg izolovaných přímo z pupečnickové krve. Rozdíl v genové expresi všech tří regulačních cytokinů u Treg separovaných z pupečnickové krve nebyl statisticky významný mezi dětmi zdravých a alergických matek. Avšak snížená exprese IL-10, TGF- $\beta$  i IL-35 byla naznačena u dětí alergických matek. Krogulska a kol., kteří měřili expresi IL-10 a TGF- $\beta$  u dětí s potvrzenými potravinovými alergiemi závislými na IgE protilátkách, popisují statisticky významně nižší expresi IL-10 u skupiny alergických dětí.

V expresi TGF- $\beta$  Krogulska a kol. neuvádějí žádný významný rozdíl mezi zdravými a alergickými dětmi a obecně exprese těchto dvou cytokinů u alergických dětí nekorelovala (Krogulska *et al.*, 2011).

Nízká produkce IL-10 po polyklonální stimulaci spolu se sníženou genovou expresí regulačních cytokinů IL-10, TGF- $\beta$  a IL-35 (ačkoliv statisticky nevýznamnou) poukazuje na možnou poruchu regulačních mechanismů u dětí s vysokou predispozicí k rozvoji alergického onemocnění. Spolu se sníženou produkcí regulačních cytokinů na úrovni mRNA i proteinů, vysoká proliferační aktivita buněk pupečnickové krve dětí alergických matek by mohla u těchto dětí přispívat ke snazšímu rozvoji alergií. Bylo by zajímavé vyhodnotit tato data s ohledem na skutečný rozvoj alergických onemocnění u těchto dětí 2 roky či 6 let po porodu pro ověření, zda by proporční a funkční vlastnosti Treg mohly mít prediktivní hodnotu při posouzení budoucího rozvoje alergických onemocnění.

## 8 Závěr

V procentuálním zastoupení Treg (definovaných jako CD4+CD25+ T buňky i jako CD4+CD25+FoxP3+ T buňky) v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. V zastoupení subpopulací nTreg a iTreg definovaných na základě přítomnosti transkripčních znaků FoxP3 a Helios nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi dětmi zdravých a alergických matek.

Děti alergických matek mají obecně vyšší proliferační kapacitu CBMC i CD4+ T buněk v pupečnickové krvi oproti dětem zdravých matek. Spolu s Th2 novorozeneckou predominancí vyšší reaktivita efektorových buněk dětí alergických matek by mohla poukazovat na snazší rozvoj nežádoucí alergické reakce u těchto dětí již v časném období.

Oproti Treg dospělých lidí novorozenecké Treg nevykazují dostatečné imunosupresivní vlastnosti vůči efektorovým buňkám při ko-kultivaci Treg jak s CD4+ T lymfocyty tak CBMC *in vitro*. Neschopnost Treg pupečnickové krve potlačit proliferaci CBMC či CD4+ T buněk může být dalším znakem poukazujícím na obecnou nezralost novorozeneckého imunitního systému.

Nižší produkce regulačního cytokinu IL-10 v supernatantu ko-kultivací Treg s efektorovými buňkami pupečnickové krve dětí alergických matek ukazuje na horší imunoregulační funkce Treg dětí alergických matek, což by opět mohlo vést ke snazšímu vzniku alergických onemocnění u dětí alergických matek.

## 9 Seznam použité literatury

Sekundární citace označeny \*

Akimova, T., Beier, U. H., Wang, L., Levine, M. H., and Hancock, W. W. (2011). Helios Expression Is a Marker of T Cell Activation and Proliferation. *PLoS One* 6, e24226.

De Amici, M., Perotti, F., Marseglia, G. L., Ierullo, A. M., Bollani, L., Decembrino, L., Licari, A., Quaglini, S., Stronati, M., and Spinillo, A. (2017). Cord and blood levels of newborn IgE: Correlation, role and influence of maternal IgE. *Immunobiology* 222, 450–453.

Ayyoub, M., Deknuydt, F., Raimbaud, I., Dousset, C., Leveque, L., Bioley, G., and Valmori, D. (2009). Human memory FOXP3<sup>+</sup> Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the TH17 lineage-specific transcription factor ROR t. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 8635–8640.

Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., and Hafler, D. A. (2001). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 167, 1245–1253.

Balossini, V., Monzani, A., Rapa, A., Vivenza, D., Caristo, E., and Oderda, G. (2009). Interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ 1 in cord blood: relationship with paternal allergy and cesarean section. *Acta Paediatr.* 98, 812–816.

Bandukwala, H. S. *et al.* (2011). Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity* 34, 479–491.

Bellinghausen, I., Klostermann, B., Knop, J., and Saloga, J. (2003). Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 862–868.

Bergmann, R. L., Edenharter, G., Bergmann, K. E., Guggenmoos-Holzmann, I., Forster, J., Bauer, C. P., Wahn, V., Zepp, F., and Wahn, U. (1997). Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history. *Clin. Exp. Allergy* 27, 752–760.

Blair, P. J., Bultman, S. J., Haas, J. C., Rouse, B. T., Wilkinson, J. E., and Godfrey, V. L. (1994). CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J. Immunol.* 153, 3764–3774.

Bullens, D. M. A., Kasran, A., Dilissen, E., and Ceuppens, J. L. (2012). Neonatal IL-10 production and risk of allergy development. *Clin. Exp. Allergy* 42, 483–484.

Chauhan, A., Singh, M., Agarwal, A., and Paul, N. (2015). Correlation of TSLP, IL-33, and CD4 + CD25 + FOXP3 + T regulatory (Treg) in pediatric asthma. *J. Asthma* 52, 868–872.

Chen, M.-L., Yan, B.-S., Bando, Y., Kuchroo, V. K., and Weiner, H. L. (2008). Latency-associated peptide identifies a novel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell subset with TGF $\beta$ -mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 180, 7327–7337.

- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4 + CD25 – Naive T Cells to CD4 + CD25 + Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.
- Collison, L. W. *et al.* (2011). Interleukin-35-mediated induction of a novel regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* *11*, 1093–1101.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., and Vignali, D. A. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566–569.
- Coomes, S. M., Kannan, Y., Pelly, V. S., Entwistle, L. J., Guidi, R., Perez-Lloret, J., Nikolov, N., Müller, W., and Wilson, M. S. (2017). CD4 + Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation. *Mucosal Immunol.* *10*, 150–161.
- Craig L. Bennett, Jacinda Christie, Fred Ramsdell, Mary E. Brunkow, Polly J. Ferguson, Luke Whitesell, Thaddeus E. Kelly, Frank T. Saulsbury, Phillip F. Chance, and Hans D. Ochs (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.
- \* Curotto de Lafaille, M. A., and Lafaille, J. J. (2009). Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* *30*, 626–635.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* *193*, 1303–1310.
- Ferguson, A., Dimich-Ward, H., Becker, A., Watson, W., DyBuncio, A., Carlsten, C., and Chan-Yeung, M. (2009). Elevated cord blood IgE is associated with recurrent wheeze and atopy at 7 yrs in a high risk cohort. *Pediatr. Allergy Immunol.* *20*, 710–713.
- Fodor, E., Garaczi, E., Polyánka, H., Koreck, A., Kemény, L., and Széll, M. (2011). The rs3761548 polymorphism of FOXP3 is a protective genetic factor against allergic rhinitis in the Hungarian female population. *Hum. Immunol.* *72*, 926–929.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2005a). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *28*, 402–413.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., and Rudensky, A. Y. (2005b). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* *22*, 329–341.
- Fu, Y., Lou, H., Wang, C., Lou, W., Wang, Y., Zheng, T., and Zhang, L. (2013). T cell subsets in cord blood are influenced by maternal allergy and associated with atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* *24*, 178–186.
- Gershon, R. K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* *18*, 723–737.

- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., De Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997). A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.
- Hoffmann, H. J., Malling, T. M., Topcu, A., Ryder, L. P., Nielsen, K. R., Varming, K., Dahl, R., Omland, Ø., and Sigsgaard, T. (2007). CD4<sup>dim</sup>CD25<sup>bright</sup> Treg cell frequencies above a standardized gating threshold are similar in asthmatics and controls. *Cytom. Part A* 71A, 371–378.
- Horak, E., Morass, B., Ulmer, H., Genuneit, J., Braun-Fahrländer, C., and von Mutius, E. (2014). Prevalence of wheezing and atopic diseases in Austrian schoolchildren in conjunction with urban, rural or farm residence. *Wien. Klin. Wochenschr.* 126, 532–536.
- Hrdý, J., Kocourková, I., and Prokešová, L. (2012). Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers. *Clin. Exp. Immunol.* 170, 10–17.
- Hrdý, J., Zanvit, P., Novotná, O., Kocourková, I., Žižka, J., and Prokešová, L. (2010). Cytokine expression in cord blood cells of children of healthy and allergic mothers. *Folia Microbiol. (Praha)*. 55, 515–519.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193, 1285–1294.
- Kim, H., Moon, H.-W., Hur, M., Park, C.-M., Yun, Y.-M., Hwang, H. S., Kwon, H. S., and Sohn, I. S. (2012). Distribution of CD4 + CD25 high FoxP3 + regulatory T-cells in umbilical cord blood. *J. Matern. Neonatal Med.* 25, 2058–2061.
- Kraj, P., and Ignatowicz, L. (2018). The mechanisms shaping the repertoire of CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Immunology* 153, 290–296.
- Krogulska, A., Borowiec, M., Polakowska, E., Dynowski, J., Młynarski, W., and Wasowska-Królikowska, K. (2011). FOXP3, IL-10, and TGF-β Genes Expression in Children with IgE-Dependent Food Allergy. *J. Clin. Immunol.* 31, 205–215.
- \* Larsen, J. N., Broge, L., and Jacobi, H. (2016). Allergy immunotherapy: the future of allergy treatment. *Drug Discov. Today* 21, 26–37.
- Law, J. P., Hirschhorn, D. F., Owen, R. E., Biswas, H. H., Norris, P. J., and Lanteri, M. C. (2009). The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Cytom. Part A* 75A, 1040–1050.
- \* Lehtimäki, S., and Lahesmaa, R. (2013). Regulatory T Cells Control Immune Responses through Their Non-Redundant Tissue Specific Features. *Front. Immunol.* 4, 294.
- Levings, M. K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M. G. (2001). Human CD25<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup> regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* 193, 1295–1302.
- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A., and Robinson, D. S. (2004a). Relation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet (London, England)* 363, 608–615.

- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A., and Robinson, D. S. (2004b). Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363, 608–615.
- Lisciandro, J. G., Prescott, S. L., Nadal-Sims, M. G., Devitt, C. J., Pomat, W., Siba, P. M., Holt, P. G., Strickland, D., and van den Biggelaar, A. H. J. (2012). Comparison of neonatal T regulatory cell function in Papua New Guinean and Australian newborns. *Pediatr. Allergy Immunol.* 23, 173–180.
- Liu, W. *et al.* (2006a). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 + T reg cells. *J. Exp. Med.* 203, 1701–1711.
- Liu, W. *et al.* (2006b). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 + T reg cells. *J. Exp. Med.* 203, 1701–1711.
- Ly, N. P., Ruiz-Perez, B., McLoughlin, R. M., Visness, C. M., Wallace, P. K., Cruikshank, W. W., Tzianabos, A. O., O'Connor, G. T., Gold, D. R., and Gern, J. E. (2009). Characterization of regulatory T cells in urban newborns. *Clin. Mol. Allergy* 7, 8.
- Matheu, M. P., Othy, S., Greenberg, M. L., Dong, T. X., Schuijs, M., Deswarte, K., Hammad, H., Lambrecht, B. N., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2015). Imaging regulatory T cell dynamics and CTLA4-mediated suppression of T cell priming. *Nat. Commun.* 6, 6219.
- Mayer, E., Bannert, C., Gruber, S., Klunker, S., Spittler, A., Akdis, C. A., Szépfalusi, Z., and Eiwegger, T. (2012). Cord blood derived CD4+ CD25(high) T cells become functional regulatory T cells upon antigen encounter. *PLoS One* 7, e29355.
- \* McFadden, J. P., White, J. M. L., Basketter, D. A., and Kimber, I. (2009). Does hapten exposure predispose to atopic disease? The hapten-atopy hypothesis. *Trends Immunol.* 30, 67–74.
- McLoughlin, R. M. *et al.* (2012). Longitudinal relationship of early life immunomodulatory T cell phenotype and function to development of allergic sensitization in an urban cohort *Clinical & Experimental Allergy. Clin. Exp. Allergy* 42, 392–404.
- Meng, S., Gao, R., Yan, B., Ren, J., Wu, F., Chen, P., Zhang, J., Wang, L., Xiao, Y., and Liu, J. (2016). Maternal allergic disease history affects childhood allergy development through impairment of neonatal regulatory T-cells. In: *Respiratory Research*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Mitchell, C., Provost, K., Niu, N., Homer, R., and Cohn, L. (2011). IFN-gamma Acts on the Airway Epithelium To Inhibit Local and Systemic Pathology in Allergic Airway Disease. *J. Immunol.* 187, 3815–3820.
- Nagalakshmi, M. L., Murphy, E., McClanahan, T., and De Waal Malefyt, R. (2004). Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int. Immunopharmacol.* 4, 577–592.
- Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (2001). Cell Contact-Dependent Immunosuppression by Cd4 + Cd25 + Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-Bound Transforming Growth Factor  $\beta$ . *J. Exp. Med.* 194, 629–644.

- Negrini, T. D. C., Ferreira, L. S., Arthur, R. A., Alegranci, P., Placeres, M. C. P., Spolidorio, L. C., and Carlos, I. Z. (2014). Influence of TLR-2 in the immune response in the infection induced by fungus *Sporothrix schenckii*. *Immunol. Invest.* *43*, 370–390.
- Nettenstrom, L., Alderson, K., Raschke, E. E., Evans, M. D., Sondel, P. M., Olek, S., and Seroogy, C. M. (2013). An optimized multi-parameter flow cytometry protocol for human T regulatory cell analysis on fresh and viably frozen cells, correlation with epigenetic analysis, and comparison of cord and adult blood. *J. Immunol. Methods* *387*, 81–88.
- Ng, W. F., Duggan, P. J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A. D., Isaacs, J. D., and Lechler, R. I. (2001). Human CD4 + CD25 + cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* *98*, 2736–2744.
- \* Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* *127*, n/a-n/a.
- \* Orihara, K., Nakae, S., Pawankar, R., and Saito, H. (2008). Role of Regulatory and Proinflammatory T-Cell Populations in Allergic Diseases. *World Allergy Organ. J.* *1*, 9–14.
- Prescott, S. L., King, B., Strong, T. L., and Holt, P. G. (2003). The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy* *58*, 1187–1194.
- Quan, X., and Yang, X. (2017). Correlation between unexplained recurrent spontaneous abortion with CD4+CD25+ regulatory T-cell and killer cell immunoglobulin-like receptor levels. *Exp. Ther. Med.* *14*, 1459–1462.
- Rodríguez-Perea, A. L., Arcia, E. D., Rueda, C. M., and Velilla, P. A. (2016). Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clin. Exp. Immunol.* *185*, 281–291.
- Ross, E. M., Bourges, D., Hogan, T. V., Gleeson, P. A., and van Driel, I. R. (2014). Helios defines T cells being driven to tolerance in the periphery and thymus. *Eur. J. Immunol.* *44*, 2048–2058.
- \* Ruocco, M. G., Chaouat, G., Florez, L., Bensussan, A., and Klatzmann, D. (2014). Regulatory T-Cells in Pregnancy: Historical Perspective, State of the Art, and Burning Questions. *Front. Immunol.* *5*, 389.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* *6*, 345–352.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* *155*, 1151–1164.
- Sandberg, M., Frykman, A., Ernerudh, J., Berg, G., Matthiesen, L., Ekerfelt, C., Nilsson, L. J., and Jenmalm, M. C. (2009). Cord blood cytokines and chemokines and development of allergic disease. *Pediatr. Allergy Immunol.* *20*, 519–527.
- \* Saraiva, M., and O’Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 170–181.

- Sarris, M., Andersen, K. G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A. G. (2008). Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity* 28, 402–413.
- Schaub, B., Liu, J., Höppler, S., Haug, S., Sattler, C., Lluís, A., Illi, S., and von Mutius, E. (2008a). Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1491–1499.e13.
- Schaub, B., Liu, J., Höppler, S., Schleich, I., Huehn, J., Olek, S., Wieczorek, G., Illi, S., and von Mutius, E. (2009). Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 774–782.e5.
- Schaub, B., Liu, J., Schleich, I., Höppler, S., Sattler, C., and von Mutius, E. (2008b). Impairment of T helper and T regulatory cell responses at birth. *Allergy* 63, 1438–1447.
- Seddiki, N. *et al.* (2006a). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203, 1693–1700.
- Seddiki, N. *et al.* (2006b). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203, 1693–1700.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3 + CD25 + CD4 + regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201, 723–735.
- Simonetta, F., Chiali, A., Cordier, C., Urrutia, A., Girault, I., Bloquet, S., Tanchot, C., and Bourgeois, C. (2010). Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 40, 2528–2538.
- Smith, M., Tourigny, M. R., Noakes, P., Thornton, C. A., Tulic, M. K., and Prescott, S. L. (2008). Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4+CD25+CD127<sup>lo/-</sup> regulatory T cell function. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1460–1466.e7.
- Sogut, A., Yilmaz, O., Kirmaz, C., Ozbilgin, K., Onur, E., Celik, O., Pinar, E., Vatansever, S., Dinc, G., and Yuksel, H. (2012). Regulatory-T, T-Helper 1, and T-Helper 2 Cell Differentiation in Nasal Mucosa of Allergic Rhinitis with Olive Pollen Sensitivity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 157, 349–353.
- Stelmaszczyk-Emmel, A., Zawadzka-Krajewska, A., Szypowska, A., Kulus, M., and Demkow, U. (2013). Frequency and Activation of CD4+CD25 high FoxP3+ Regulatory T Cells in Peripheral Blood from Children with Atopic Allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 162, 16–24.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259–1260.
- Strömbeck, A., Rabe, H., Lundell, A.-C., Andersson, K., Johansen, S., Adlerberth, I., Wold, A. E., Hesselmar, B., and Rudin, A. (2014). High proportions of FOXP3(+) CD25(high) T cells in neonates are positively associated with allergic sensitization later in childhood. *Clin. Exp. Allergy* 44, 940–952.
- Susanto, N. H. *et al.* (2017). Effect of season of birth on cord blood IgE and IgE at birth: A systematic review and meta-analysis. *Environ. Res.* 157, 198–205.

- Susanto, N. H. *et al.* (2018). Environmental grass pollen levels in utero and at birth and cord blood IgE: Analysis of three birth cohorts. *Environ. Int.* *119*, 295–301.
- Szurek, E., Cebula, A., Wojciech, L., Pietrzak, M., Rempala, G., Kisielow, P., and Ignatowicz, L. (2015). Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells. *PLoS One* *10*, e0141161.
- Tadokoro, C. E., Shakhari, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A. C., Maraver, A., Lafaille, J. J., and Dustin, M. L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4 + T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *203*, 505–511.
- Takahashi, N., Takahashi, K., Kobayashi, M., Yada, Y., Koike, Y., and Kono, Y. (2015). Constitutively high-level expression of TGFβ isoforms in cord blood and its relationship to perinatal findings. *Cytokine* *73*, 101–107.
- Takahata, Y., Nomura, A., Takada, H., Ohga, S., Furuno, K., Hikino, S., Nakayama, H., Sakaguchi, S., and Hara, T. (2004). CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp. Hematol.* *32*, 622–629.
- Taylor, S., and Bryson, Y. J. (1985). Impaired production of gamma-interferon by newborn cells in vitro is due to a functionally immature macrophage. *J. Immunol.* *134*, 1493–1497.
- Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y., and Shevach, E. M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* *184*, 3433–3441.
- Torelli, G. F. *et al.* (2012). Functional analysis and gene expression profile of umbilical cord blood regulatory T cells. *Ann. Hematol.* *91*, 155–161.
- Traidl-Hoffmann, C., Mariani, V., Hochrein, H., Karg, K., Wagner, H., Ring, J., Mueller, M. J., Jakob, T., and Behrendt, H. (2005). Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J. Exp. Med.* *201*, 627–636.
- Voo, K. S. *et al.* (2009). Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4793–4798.
- Vosters, O., Lombard, C., André, F., Sana, G., Sokal, E. M., and Smets, F. (2010). The interferon-alpha and interleukin-10 responses in neonates differ from adults, and their production remains partial throughout the first 18 months of life. *Clin. Exp. Immunol.* *162*, 494–499.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I. H., Huizinga, T. W. J., and Toes, R. E. M. (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* *37*, 129–138.
- Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., and Mosmann, T. R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today* *14*, 353–356.

Wing, K., Larsson, P., Sandstrom, K., Lundin, S. B., Suri-Payer, E., and Rudin, A. (2005). CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses. *Immunology* 115, 516–525.

Wong, C. K., Ho, C. Y., Ko, F. W. S., Chan, C. H. S., Ho, A. S. S., Hui, D. S. C., and Lam, C. W. K. (2001). Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin. Exp. Immunol.* 125, 177–183.

Woo, S.-R. *et al.* (2012). Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape. *Cancer Res.* 72, 917–927.

Xu, L., Tanaka, S., Bonno, M., Ido, M., Kawai, M., Yamamoto, H., and Komada, Y. (2014). Cord blood CD4+CD25+ regulatory T cells fail to inhibit cord blood NK cell functions due to insufficient production and expression of TGF-beta1. *Cell. Immunol.* 290, 89–95.

Yokosuka, T., Kobayashi, W., Takamatsu, M., Sakata-Sogawa, K., Zeng, H., Hashimoto-Tane, A., Yagita, H., Tokunaga, M., and Saito, T. (2010). Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation. *Immunity* 33, 326–339.

Van Zele, T., Claeys, S., Gevaert, P., Van Maele, G., Holtappels, G., Van Cauwenberge, P., and Bachert, C. (2006). Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 61, 1280–1289.

Zhang, L., Zhang, Y., Desrosiers, M., Wang, C., Zhao, Y., and Han, D. (2009). Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population. *Hum. Immunol.* 70, 930–934.

Žižka, J., Hrdý, J., Lodinová-Žádníková, R., Kocourková, I., Novotná, O., Šterzl, I., and Prokešová, L. (2007). Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on in vitro stimulation of cord blood lymphocytes. *Pediatr. Allergy Immunol.* 18, 486–494.

Internetové zdroje: <http://www.who.int/>

<http://www.eaaci.org/outreach/public-declarations.html>

<http://www.szu.cz/tema/prevence/alergie-deti>