

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Kateřina Vlasáková

**Odlišné vlastnosti buněk pupečnickové krve novorozenců  
zdravých a alergických matek**

Different characteristics of cord blood cells of newborns  
of healthy and allergic mothers

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Praha 2017

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Hrdého, Ph.D. 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.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Podpis:

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Hrdému, PhD. a prof. MUDr. Ludmile Prokešové, CSc. za trpělivost, cenné připomínky, odborné rady a pomoc při zpracování této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře obecné imunologie na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za pomoc s experimentální částí a vytvoření příjemných pracovních podmínek, Ústavu pro péči o matku a dítě v Podolí za spolupráci při sběru klinického materiálu a firmám Dyntec spol., s.r.o. a ArdeyPharm, jmenovitě Ulrichu Sonnenbergovi, za poskytnutí probiotických vakcín.

V neposlední řadě patří dík rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Práce byla finančně podpořena z následujících finančních zdrojů: AZV-15-26877A; PRVOUK P25/LF1/2; Progres Q25/LF1, UNCE 204017, SVV 260 369.

## Abstrakt

Prevalence alergie narůstá a stává se čím dál větším problémem nejen medicínským, ale i sociálním a ekonomickým. Nejeftivnější způsob jak minimalizovat rozvoj alergických onemocnění představují preventivní opatření. V posledních letech se mnoho studií snaží potvrdit nebo vyvrátit hypotézu, že včasné podání probiotických bakterií novorozencům a těhotným ženám před porodem by mohlo mít preventivní účinky na rozvoj alergie. V České republice se pro prevenci vzniku alergií dlouhodobě používá probiotický kmen *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83), který je registrován Státním zdravotním ústavem pro kontrolu léčiv pod název Colinfant Newborn, který je pediatrům dlouhodobě znám a používají jej proti různým průjmům.

Cílem této práce bylo objasnit vliv působení EC O83 na CBMC (mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve, „cord blood mononuclear cells“) a porovnat schopnost buněk pupečnickové krve dětí zdravých matek (dětí s relativně nízkým rizikem vzniku alergického onemocnění) a alergických matek (dětí s vysokým rizikem vzniku alergie) tvořit cytokiny v odpovědi na stimulaci EC O83. Stimulace fytohemaglutininem byl použita jako pozitivní kontrola, *Escherichia coli* Nissle 1917 jsme zařadili jako referenční probiotický kmen, který je v zahraničí podstatně známější než EC O83. Produkce cytokinů byla detekována třemi různými metodami - qPCR, ELISA a průtokovou cytometrií. Každá z metod má své výhody a umožňuje sledování odpovědi CBMC po stimulaci na různých úrovních (tvorba mRNA, sekrece proteinu) a charakterizaci jednotlivých buněčných subpopulací exprimujících daný cytokin. Byly měřeny cytokiny a transkripční faktory charakteristické pro jednotlivé subpopulace T lymfocytů - Th1, Th2, Th17 a Treg (T regulační buňky).

Po stimulaci CBMC EC O83 dochází k indukci IFN- $\gamma$ . Stimulace kmenem EC O83 ovlivňuje pouze minimálně expresi IL-4, ale dochází ke slabé indukci IL-5 a IL-13. Po stimulaci CBMC EC O83 nebyly zjištěny signifikantní změny exprese IL-17A či ROR $\gamma$ t. Po stimulaci EC O83 byla naměřena vyšší exprese IL-22 proti nestimulované kontrole. EC O83 indukuje tvorbu IL-10.

Detekovali jsme podstatně zvýšenou expresi IFN- $\gamma$  u CBMC dětí zdravých matek ve srovnání s dětmi alergických matek. Po stimulaci CBMC nebyl rozdíl v produkci IL-4, IL-5 a IL-13 mezi CBMC dětí zdravých a alergických matek. Je pozorován trend vyšších hodnot IL-17A a ROR $\gamma$ t u CBMC dětí alergických matek. Po stimulaci EC O83 byla na-

měřena vyšší exprese IL- 22 u dětí zdravých matek. Exprese IL-10 je signifikantně vyšší u CBMC dětí alergických matek.

EC O83 podporuje Th1 (IFN- $\gamma$ ) imunitní opověď, čímž přispívá k vyžívání imunitního systému novorozenců. Obecně se dá říci, že CBMC dětí alergických matek jsou reaktivnější a po stimulaci exprimují vyšší hodnoty všech námi sledovaných znaků. Velmi zajímavým zjištěním je schopnost EC O83 podporovat tvorbu imunoregulačního cytokinu IL-10, který by mohl potlačovat nepřiměřenou odpověď imunitního systému novorozence po setkání s alergenem.

**Klíčová slova:** mononukleární leukocyty, pupečnicková krev, alergie, probiotika, *Escherichia coli* O83:K24:H31, cytokiny, ELISA, real-time PCR, průtoková cytometrie

## Abstract

The prevalence of allergy is increasing and it is becoming a serious problem not only in medicine, but also in social and economic terms. The most effective way to minimize the development of allergic diseases is preventive measures. In recent years, many studies have attempted to confirm or rebut the hypothesis that early administration of probiotic bacteria to newborns and pregnant women before birth could have preventive effects on the development of allergy. In the Czech Republic, the probiotic strain *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83), being registered with the State Health Institute for Drug Control under the name Colinfant Newborn, has long been used to prevent allergies and paediatricians have long been known and used it against various diarrhoea.

The aim of this work was to elucidate the effect of EC O83 on CBMC (cord blood mononuclear cells) and to compare the ability of CBMC of healthy mothers (children with a relatively low risk of developing allergic disease) and allergic mothers (children at high risk of developing allergies) to form cytokines in response to EC O83 stimulation. Phytohemagglutinin was used as a positive control, *Escherichia coli* Nissle 1917 was used as a reference probiotic strain, which is much more known abroad than EC O83. Cytokine production was detected by three different methods - qPCR, ELISA and flow cytometry. Each of the methods has its advantages and allows the monitoring of CBMC responses to stimulation at various levels (mRNA formation, protein secretion, and characterization of individual cell subpopulations expressing the cytokine). Cytokines and transcription factors characteristic of individual T cell subpopulation (Th1, Th2, Th17 and Treg (T regulatory cells)) were measured.

Stimulation of CBMC with EC O83 induces IFN- $\gamma$ . Stimulation with the EC O83 strain affects only minimal expression of IL-4, but IL-5 and IL-13 are poorly induced. No significant changes in IL-17A or ROR $\gamma$ t expression were detected after stimulation of CBMC with EC O83. Following EC O83 stimulation, higher IL-22 compared to unstimulated control expression was measured. EC O83 induces IL-10 production.

We detected significantly increased expression of IFN- $\gamma$  in CBMC children of healthy mothers compared to children of allergic mothers. After CBMC stimulation, there was no difference in the production of IL-4, IL-5 and IL-13 among CBMC children of healthy and allergic mothers. The trend of higher values of IL-17A and ROR $\gamma$ t in CBMC children of allergic mothers is observed. Following EC O83 stimulation, higher

IL-22 expression was measured in children of healthy mothers. Expression of IL-10 is significantly higher in CBMC of children of allergic mothers.

EC O83 promotes Th1 (IFN- $\gamma$ ) immune responses, thereby contributing to the maturation of the immune system of the newborns. Generally speaking, CBMC of children of allergic mothers exert higher reactivity. After stimulation CBMC of newborns of allergic mothers express higher values of all of our monitored markers in comparison to CBMC of newborns of healthy mothers. A very interesting finding is the ability of EC O83 to promote the production of immunoregulatory cytokine IL-10 that could suppress the inappropriate response of the newborn's immune system upon encountering the allergen.

**Keywords:** mononuclear leukocytes, umbilical cord blood, allergy, probiotics, *Escherichia coli* O83:K24:H31, cytokines, ELISA, real-time PCR, flow cytometry

## Obsah

Seznam použitých zkratek .....	9
1 Úvod .....	12
1.1 Alergie .....	12
1.1.1 Prevence .....	17
1.2 Vývoj imunitního systému .....	18
1.2.1 Pupečnicková krev .....	20
1.3 Střevní mikrobiota a probiotika .....	20
1.3.1 Střevní mikrobiota .....	20
1.3.2 Probiotika .....	22
1.4 Probiotika jako prevence alergie .....	26
2 Cíle .....	29
3 Materiál a metody .....	30
3.1 Použité metody .....	30
3.1.1 Získání materiálu a charakteristika pacientů .....	30
3.1.2 Izolace mononukleárních leukocytů z krve .....	31
3.1.3 Příprava suspenzí bakterií .....	32
3.1.4 Stimulace mononukleární frakce leukocytů .....	32
3.1.5 Izolace RNA z buněčných kultur .....	32
3.1.6 Měření koncentrace a čistoty RNA .....	33
3.1.7 Reverzní transkripce .....	33
3.1.8 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) .....	34
3.1.9 Intracelulární barvení mononukleárních leukocytů a jejich detekce pomocí průtokové cytometrie .....	35
3.1.10 Imunoenzymatické stanovení koncentrace cytokinů (ELISA) .....	36
3.2 Použitý materiál .....	37
3.2.1 Použité roztoky .....	37

3.2.2	Použité chemikálie .....	37
3.2.3	Použité komerční kity .....	39
3.2.4	Použité sondy pro qPCR .....	39
3.2.5	Použité protilátky pro intracelulární barvení pro průtokovou cytometrii .....	40
3.2.6	Použité protilátky pro ELISA .....	40
3.2.7	Použitý spotřební materiál .....	40
3.2.8	Použité přístroje .....	41
3.2.9	Použitý software .....	42
4	Výsledky.....	44
4.1	Stanovení genové exprese cytokinů CBMC dětí alergických a nealergických matek metodou kvantitativní real – time PCR .....	44
4.2	Detekce produkce cytokinů mononukleárními buňkami pupečnickové krve dětí alergických a nealergických matek po stimulaci <i>in vitro</i> metodou průtokové cytometrie 53	
4.3	Měření koncentrace cytokinů v supernatantech kultur CBMC dětí alergických a nealergických matek po stimulaci <i>in vitro</i> metodou ELISA .....	65
5	Diskuze .....	72
6	Závěr.....	79
7	Literatura .....	80

## Seznam použitých zkratek

<b>APC</b>	buňky předkládající antigen („antigen presenting cells“)
<b>bb</b>	buňky
<b>BSA</b>	bovinní sérový albumin
<b>CBMC</b>	mononukleární frakce leukocytů pupečnickové krve („cord blood mononuclear cells“)
<b>CD</b>	diferenční skupina („cluster of differentiation“)
<b>CD4+</b>	buňka pozitivní pro znak CD4
<b>CD40L</b>	ligand molekuly CD40
<b>CFU</b>	jednotky tvořící kolonie („colony forming units“)
<b>DC</b>	dendritická buňka („dendritic cells“)
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EAACI</b>	„European Academy of Allergology and Clinical Immunology“
<b>ECN</b>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<b>ECP</b>	eosinofilní kationický protein („eosinophil cationic protein“)
<b>EDN</b>	eosinofilní neurotoxin („eosinophil derived neurotoxin“)
<b>ELISA</b>	enzymaticky značená imunosorbentní analýza („enzyme-linked immunosorbent assay“)
<b>EPO</b>	eosinofilní peroxidáza („eosinophil peroxidase“)
<b>FcXR</b>	receptor pro Fc část protilátek izotypu IgX
<b>FoxP3</b>	„forkhead box P3“
<b>FTS</b>	fetální telecí sérum
<b>GALT</b>	lymfatická tkáň asociovaná se střevem („gut associated lymphoid tissue“)

<b>GM- CSF</b>	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů („granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“)
<b>HLA</b>	lidské lymfocytární antigeny („human lymphocyte antigens“)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>IgA</b>	imunoglobulin izotypu A
<b>IL</b>	interleukin
<b>LAC</b>	„leucocyte activation cocktail with BD GolgiPlug“
<b>LB</b>	Luria - Bertani
<b>LPS</b>	lipopolysacharid
<b>MAMP</b>	molekulové vzory spojené s mikroby („microbe - associated molecular pattern“)
<b>MBP</b>	hlavní bazický protein („main basic protein“)
<b>MC</b>	žírné buňky („mast cells“)
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex („major histocompatibility complex“)
<b>MIF</b>	faktor inhibující migraci makrofágů („macrophage migration inhibitory factor“)
<b>NK</b>	přirození zabíječi („natural killers“)
<b>EC O83</b>	<i>Escherichia coli</i> K24:H31:O83
<b>PAF</b>	faktor aktivující destičky („platelet activating factor“)
<b>PAMP</b>	molekulové vzory spojené s patogeny („pathogen-associated molecular pattern“)
<b>PBMC</b>	mononukleární buňky periferní krve („periferal blood mononuclear cells“)
<b>PBS</b>	fosfátem pufovaný fyziologický roztok („phosphate buffered saline“)
<b>PHA</b>	fytohemaglutinin

<b>PRR</b>	receptory rozeznávající molekulové vzory („pattern recognition receptors“)
<b>qPCR</b>	kvantitativní polymerázová řetězcová reakce v reálném čase („real time quantitative polymerase chain reaction“)
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	„RAR-related orphan receptor gamma“
<b>RPMI</b>	„Roswell Park Memorial Institute“
<b>SNP</b>	polymorfismus jednotlivých nukleotidů („single nucleotide polymorphism“)
<b>T-bet</b>	„T-box transcription factor“
<b>Treg</b>	T regulační buňky
<b>TBS</b>	Trisem pufovaný fyziologický roztok („Tris buffered saline“)
<b>TCR</b>	TCR- T buněčný receptor („T cell receptor“)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transformující růstový faktor, („transforming growth factor $\beta$ “)
<b>Th1, 2</b>	pomocné T lymfocyty typu 1,2 („T helpers“)
<b>TMB</b>	3,3,5,5-tetramethylbenzidin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	faktor nekrotizující nádory, („tumor necrosis factor“)

# 1 Úvod

## 1.1 Alergie

Termín alergie byl zaveden v roce 1906 Clemensem van Pirquetem (van Pirquet 1906). Dle směrnic EAACI („European Academy of Allergology and Clinical Immunology“) je alergie definována jako hypersenzitivní reakce iniciovaná imunitními mechanismy (Johansson et al. 2001). Dle Gela a Coombse se jedná o imunopatologickou reakci I. typu, zprostředkovanou protilátkami izotypu IgE (imunoglobulin izotypu E), vedoucí k překotné degranulaci žírných buněk a basofilů (Petrů 2012). Pojem atopie byl zaveden v roce 1920 Robertem Cookem (Coca and Cooke 1923). Atopická reaktivita je nepřiměřená reaktivita Th2 lymfocytů (pomocné T lymfocyty, „T helpers“) vedoucí k alergickému zánětu. Jedná se o tendenci imunitního systému tvořit protilátky izotypu IgE jako odpověď na nízké dávky alergenů (Johansson et al. 2001; Krejssek 2004).

Alergie způsobuje skupinu onemocnění, u kterých dochází v důsledku zánětlivých změn k poruše funkce nebo struktury orgánu. Nejčastěji jsou postiženy sliznice (alergická rýma, konjunktivitida, průduškové astma), kůže (atopický ekzém, kopřivka), nebo dochází k systémové anafylaxi (nejčastěji způsobené léky- např.  $\beta$ -laktámová antibiotika nebo kontrastní látky, potravinami- např. burské ořišky, nebo hmyzím jedem- alergenní složkou jedu je fosfolipáza A) (Asher et al. 2004; Johansson et al. 2001; Panzner and Špičák 2004; Sicherer and Leung 2015). U jedinců s atopickým ekzémem se mohou postupně vyvíjet i alergická rýma a astma. Tato následnost onemocnění je nazývána jako alergický pochod. Prvním krokem bývá potravinová alergie, která může být jedním ze spouštěcích faktorů pro atopický ekzém. Pochod uzavírá alergická rýma nebo astma. Posloupnost projevů ale není dogmatická a může se lišit mezi jedinci (Zheng et al. 2011).

Prevalence alergie během posledních 50 let narůstá. V České republice se prevalence jen mezi lety 1996-2006 zdvojnásobila. Situace v Evropě se za posledních 5-10 let stabilizovala. Nejčastěji lidé trpí sezonní alergickou rýmou, atopickým ekzémem a průduškovým astmatem (Kratěnová 2016; Kratěnová et al. 2007; Petrů 2012).

Vznik a rozvoj alergie je způsoben jak genetickými tak environmentálními vlivy. U alergie se jedná o polygenní dědičnost. Zcela běžně dochází k polymorfismu jednotlivých nukleotidů (SNP, „single nucleotide polymorphism“), tj. zaměnění jednotlivých nuk-

leotidů. V důsledku toho je do vznikajícího proteinu zařazena jiná aminokyselina. Při kombinaci určitých SNP dochází ke vzniku komplexních poruch. Na vzniku alergie se podílí polymorfismus genů pro nadměrnou produkci IgE (MHC (hlavní histokompatibilní komplex „major histocompatibility complex“)- konkrétně HLA- DR (lidský lymfocytární antigen („human lymphocyte antigens“)) a genů pro TCR (T buněčný receptor, „T cell receptor“), genů regulující imunitní odpověď (cytokiny IL-4, IL-13), genů proteinů ovlivňujících efektorové funkce postižených orgánů (metaloproteináza ADAM33, exprimovaná na buňkách hladkého svalstva a fibroblastech v plicích) nebo genů pro bílkoviny udržující bariérovou funkci (filagriny, chitinázy). Bylo zjištěno, že u dětí s pozitivní rodinnou anamnézou tvoří mononukleární buňky periferní krve (PBMC, „periferal blood mononuclear cells“) nižší hladiny interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Warner et al. 2000). Zvýšená prevalence alergie souvisí také s rozšiřující se nedostatečností vitamínu D, který negativně reguluje tvorbu IgE (Broide et al. 2011; Krejsek 2004; Nurmatov, Devereux, and Sheikh 2011).

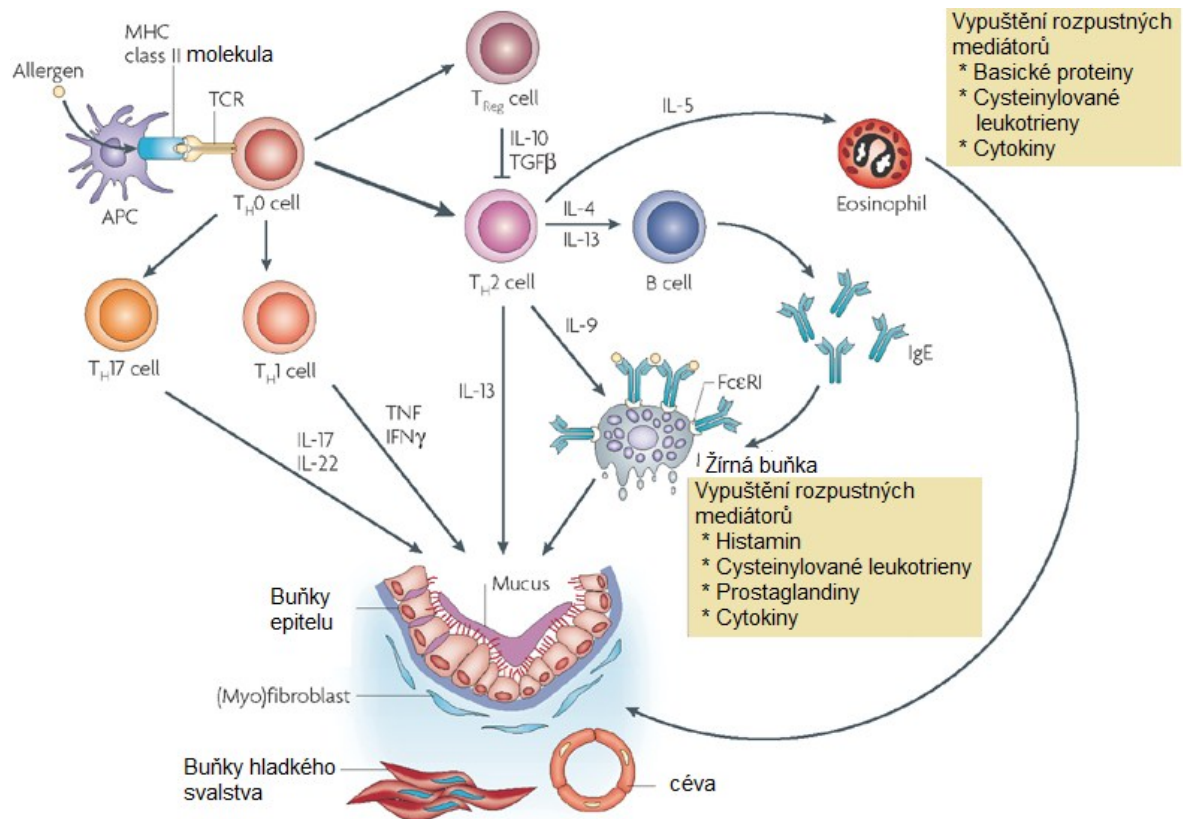
„Alergická onemocnění jsou cenou za osvobození od infekčních a parazitárních chorob“, řekl v roce 1976 J. W. Gerrard (Gerrard et al. 1976). Roku 1989 byla Davidem Strachanem vyslovena tzv. hygienická hypotéza, která říká, že přesmyk imunitní reaktivity od Th2 k Th1 je zprostředkován kontaktem s půdními organismy a expozicí endotoxinům gram negativních bakterií, střevní mikrobiotou a kontaktem s virovými nákazami, tzn., že růst ve farmářském, venkovském prostředí snižuje výskyt alergie (Strachan 1989). Tzv. „counter regulation hypotéza“ říká, že infekce chrání před rozvojem alergie produkcí IL-10 (interleukin 10) a TGF- $\beta$  (transformující růstový faktor, „transforming growth factor  $\beta$ “), kterou kromě jiného indukuje střevní mikrobiota a ta reguluje infekci. Děti s více sourozenci nebo ty, které se denně setkávají s dalšími dětmi, jsou lépe chráněny před rozvojem alergie (Wills - Karp, Santeliz, and Karp 2001). Vzhledem k tomu, že v časném postnatálním období převládá imunitní odpověď Th2, je prospěšná expozice mikroorganismům, které indukují Th1 imunitní odpověď (S. L. Prescott 2003). Mezi další vnější faktory ovlivňující rozvoj alergických onemocnění se řadí kouření, změna ovzduší nebo omezení fyzické aktivity. Kouření v těhotenství zvyšuje riziko tzv. „wheezingu“ (pískotu) v dětství (Lannerö et al. 2006). Některá respirační infekční onemocnění (lidský rhinovirus, respirační syncytiální virus) nebo nedostatek rané mikrobiální expozice mohou zvyšovat riziko rozvoje astmatu. (Çalışkan et al. 2013; Carroll et al. 2017) Vysoká expozice alergenům, především potravinovým, vede k rozvoji tolerance, naopak nízké dávky polarizují imunitní

odpověď směrem k Th2 reaktivitě (Asher et al. 2004; Çalişkan et al. 2013; Carroll et al. 2017; Petru 2012). Vyhýbání se alergenům při kojení nevede k prevenci, ale pouze k oddálení nástupu klinických projevů alergie (Warner et al. 2000).

Mnoho rizikových faktorů z prostředí, které se podílejí na rozvoji alergie, má vliv na časné imunoregulační pochody. Prenatálně je genová exprese pozměněna epigenetickými zásahy pod vlivem mateřské stravy, mikrobiální expozice nebo vystavování se dalším vlivům (kouření, vzdušné polutanty), a postnatálně je epigenetická regulace modifikována vlivem mikrobioty, stravy dítěte, kouření nebo znečištění ovzduší. Epigenetické procesy ovládají všechny aspekty fyziologického vývoje a jsou zásadní pro dosažení diferenciaci a diverzity buněk. Změny methylace a acetylce histonů rozhodují o přístupnosti DNA pro transkripci příslušných genů. Epigenetika řídí i diferenciaci T buněk do jednotlivých subtypů. Vzhledem k tomu, že epigenetické změny jsou přenositelné buněčným dělením, mohou se vzniklé změny předávat dalším generacím. U jedinců se zvýšeným rizikem rozvoje alergie se vyskytuje snížená schopnost odpovědi zprostředkované Th1 buňkami a redukované množství i funkce T regulačních buněk, což usnadní dominanci imunitní odpovědi typu Th2 (S. L. Prescott and Martino 2010). Existují práce popisující vliv venkovského prostředí během těhotenství na methylaci regionu specifického pro diferenciaci T regulačních buněk, čímž se zvyšuje počet T regulačních buněk a podporuje jejich funkce (Schaub et al. 2009). Matčina strava ovlivňuje plod především v závislosti na množství polynenasycených mastných kyselin, antioxidantů a vitaminů. Polynenasycené mastné kyseliny mají efekt na T buněčnou signalizaci, ale zatím není jasné, zda a jak ovlivňují epigenetické změny (S. Prescott and Saffery 2011). Antioxidanty indukují tvorbu IL-12 buňkami prezentujícími antigen (APC, „antigen presenting cells“). Přestože se ukazuje, že množství antioxidantů má imunomodulační efekt, není zcela jasné, jakým způsobem zasahují do epigenetických změn. Dalšími vlivy jsou medikace, kouření a další polutanty. Kouření může zvýšit bronchiální reaktivitu, čímž zvyšuje riziko vzniku astmatu. Působením cigaretového kouře a vzdušného znečištění dochází k hypermethyloci genu pro IFN- $\gamma$  a hypomethyloci genu pro IL-4 a tím se zvýší produkce protilátek IgE (S. L. Prescott and Martino 2010; S. Prescott and Saffery 2011).

Při alergické reakci dochází k akumulaci Th2 lymfocytů, makrofágů, žírných buněk (MC, „mast cells“). Produkce cytokinů charakteristických pro Th2 imunitní odpověď zasahuje do tvorby protilátek, funkce eozinofilů nebo žírných buněk. Průběh alergické reakce

dělíme do tří fází - fáze senzibilizace, časná a pozdní fáze (Krejsek 2004). Na **Obrázku 1** je schéma mechanismu alergické reakce.



Nature Reviews | Immunology

### Obrázek 1: Schéma mechanismu alergické reakce

U predisponovaných jedinců vede rozeznání alergenu profesionálními buňkami prezentujícími antigen k aktivaci Th2 buněk a syntéze protilátek izotypu IgE. Následuje rekrutování a aktivace buněk a uvolnění mediátorů zodpovědných za alergickou reakci. Při časné reakci dochází po vazbě alergenu na protilátky izotypu IgE na povrchu žírných buněk k jejich degranulaci, která vede ke zvýšení cévní propustnosti, kontrakci hladkého svalstva a produkci hlenu. Produkty žírných buněk rekrutují zánětlivé buňky (eozinofily, Th2 buňky), které způsobují pozdní alergickou reakci. Eozinofily produkují další mediátory. Th1 a Th17 buňky jsou zodpovědné za mechanismy při chronických procesech alergie. Rozeznání alergenu způsobuje aktivaci T regulačních buněk pomocí IL-10 a TGFβ. (upraveno dle (Bradding et al. 1994))

MHC - hlavní histokompatibilní komplex („major histocompatibility complex“), TCR - T buněčný receptor, („T cell receptor“), Th - pomocné T buňky („T helpers“), Treg - T regulační buňky, IL - interleukin, IgE - protilátky izotypu IgE, FcεR - receptor pro Fc část protilátky izotypu IgE, TGF-β - transformující růstový faktor, („transforming growth factor β“)

Prvním kontaktem s alergenem dochází ke spuštění stimulace imunitního systému. Vzdušné alergeny, malé a rozpustné, snadno pronikají sliznicí dýchacích cest. Alergen je

po vstupu do organismu pohlcen a zpracován dendritickými buňkami (DC, „dendritic cells“) a prezentován molekulami HLA II (lidské lymfocytární antigeny, „human lymphocyte antigens“). Kombinace kostimulačních molekul (CD86(diferenciační skupina, „cluster of differentiation“) na DC+ CD28 na T lymfocytech, CD40 (DC) + CD40L (ligand molekuly CD40) (T lymfocyty), CD30 (T lymfocyty)+ CD30L (DC), OX40 (T lymfocyty) + OX40L(DC)), aktivuje dendritické buňky, migrují do spádových lymfatických uzlin, v důsledku produkce interleukinu 4 (IL-4) dochází k diferenciaci T lymfocytů v Th2 subset a jejich expanzi. Pod vlivem IL-4 a IL-13 - dochází k produkci protilátek izotypu IgE. T regulační buňky atopiků mají sníženou schopnost utlumovat Th2 reaktivitu a tím může docházet k rozvoji alergického zánětu. Klinické projevy se objevují až při opakovaném setkání s alergenem (Broide et al. 2011; Murphy 2011; Panzner and Špičák 2004; Pearlman 1999; Petřů 2012; Stříž 2014).

Při opakovaném setkání organismu s alergenem dochází k okamžité reakci v řádu minut. Buňky imunitního systému a epitelu nesou na svém povrchu receptor pro Fc část protilátek IgE (FcεR). U atopiků dochází k jejich vyšší expresi. Vysokoafinní receptor FcεRI je exprimován na povrchu žírných buněk a basofilů. Specifické protilátky izotypu IgE jsou navázány na FcεRI a po vazbě alergenu dojde k prokřížení receptorů, což způsobí aktivaci buněk, následnou degranulaci a vyplavení mediátorů. Jedná se o mediátory preformované - histamin, tryptáza, heparin a serotonin - nebo následně produkované v důsledku aktivace buněk (a tím i fosfolipázy A) - prostaglandiny, destičky aktivující faktor (PAF, „platelet activating factor“), leukotrieny a některé cytokiny. Mediátory jsou vyplaveny ve dvou intervalech - po 10 - 30 min a pak po 4 - 8 hod. Způsobí další tvorbu prostaglandinů, chemotaxi leukocytů, rekrutování eozinofilů. V důsledku toho dochází k rozšíření cév, produkce hlenu, otok sliznice nebo kůže a kontrakci hladké svaloviny. Klinicky dochází k zúžení průdušek, překrvení spojivek nebo ke kopřivce (Krejsek 2004; Murphy 2011; Petřů 2012).

IL-5 a prostaglandin D2, které byly vyplaveny z žírných buněk, verbují eozinofily. Ty se vyskytují v menším množství v krevním oběhu, většina se nalézá v pojivové tkáni pod sliznicí a v průběhu reakce prostupují do postižených tkání. V místě zánětlivé reakce jsou aktivovány a po stimulaci IL-3, IL-5, GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů, „granulocyte - macrophage colony - stimulating factor“) uvolňují mediátory -

cysteinylované leukotrieny, prostaglandin E2, PAF, IL-3, IL-5, GM-CSF a histamin (Broide et al. 2011; Murphy 2011; Petru 2012; Stříž 2014).

V důsledku chronického alergického zánětu dochází ke zvýšení hladin monocytů, makrofágů, Th2 lymfocytů, destiček, neutrofilů, eozinofilů a basofilů. Kromě již zmíněných mediátorů jsou eosinofily produkovány proteázy jako např. MBP (hlavní bazický protein, „main basic protein“), ECP (eosinofilní kationický protein, „eosinophil cationic protein“), EPO (eosinofilní peroxidáza, „eosinophil peroxidase“), EDN (eosinofilní neurotoxin, „eosinophil derived neurotoxin“), ty poškozují struktury a amplifikují alergický zánět. Dochází ke snížení bariérové funkce sliznic, snížení prahu citlivosti a tvorbě odlišných struktur. V důsledku produkce IL-10 a TGF- $\beta$  dochází k remodelaci tkáně a indukci Treg buněk a následně inhibici efektorových buněk. Náhodný výskyt endotoxinů a peptidoglykanů působí jako adjuvans alergické reakce (Murphy 2011; Petru 2012; Stříž 2014).

### 1.1.1 Prevence

Na základě dlouhodobých studií se ukázalo, že přirozený průběh astmatu je neovlivnitelný léčbou, je tedy nutné provádět preventivní opatření (Novák 2006). Tím pádem bychom se měli zaměřit především na prevenci alergických chorob. Rozvoj alergických onemocnění se snažíme ovlivnit na primární, sekundární nebo terciární úrovni.

Primární prevence se snaží zabránit senzibilizaci plodu během prenatálního období. Těhotným je doporučována zdravá výživa, tj. konzumovat ryby, zeleninu, ovoce, nekouřit, redukovat venkovních vzdušné polutanty, doplňovat výživové deficity, např. vitamínu D3. V případě pozitivní rodinné anamnézy by mělo být zabráněno expozici alergenům, protože od druhého trimestru se mohou alergeny dostat až ke kůži plodu. Je ideální kojit bez speciálních diet. Primární prevence cílí na celou populaci (Asher et al. 2004; Panzner a Špičák 2004; Špičák 2006).

Mateřské mléko obsahuje obranné látky a řadu molekul, které napomáhají posilování epitelové bariéry kojence. Kompletní bariérová funkce střeva dozrává postupně, minimálně 4 měsíce. Radí se proto do 4. měsíce věku dítěte výlučně kojit. Poté nastává zhruba dvouměsíční období zvané toleranční okno, kdy je střevo připraveno postupně se setkávat se všemi složkami potravy. S pokračujícím kojením by měly být mezi 4. a 6. měsícem zařazovány nemléčné příkrmy. Kojení zachovává prostředí pro vývoj mikrobioty a vytváří

podmínky pro rozvoj tolerance, mateřské mléko obsahuje významné množství TGF- $\beta$ , který spolu s IL-10 zajišťuje mechanismy tolerance (MacDonald a Di Sabatino 2009).

Sekundární prevence je určena pro atopické jedince a předchází rozvoji alergického onemocnění. Jedná se o eliminaci alergenů a spouštěcích vlivů. Doporučuje se časté větrání, redukce roztočů v domácím prostředí a nemít domácí zvíře, léčit ekzém a včasným léčením infekcí horních cest dýchacích předcházet astmatu (Asher et al. 2004; Panzner a Špičák 2004; Špičák 2006).

Cílem terciární prevence je zabránit dalšímu zhoršení onemocnění eliminací příčinných alergenů, např. záměna mléka za hypoalergenní náhradu (Asher et al. 2004; Panzner a Špičák 2004; Špičák 2006).

## **1.2 Vývoj imunitního systému**

Těhotenství je unikátní imunologický proces. Odehrává se ve specializovaném orgánu s vlastní sliznicí – děloze. Maternální systém regulují hormony a cytokiny. Imunitní interakce mezi matkou a plodem se mohou odehrávat jen v krvi nebo na decidui. Během těhotenství produkuje mateřský organismus protilátky proti paternálním antigenům na tkáňích plodu. Tolerance je nezbytná pro úspěšný průběh těhotenství. Hormonální změny mají vliv na toleranci proti alogenním antigenům plodu. Během těhotenství probíhá souboj mezi invazí trofoblastu do endometria matky a omezením Th1 aktivity matky. Klesá produkce IFN- $\gamma$  a stoupá produkce IL-4 a IL-10. Cytokiny jsou produkovány placentou a jejich hladiny jsou udržovány prostaglandinem E2 a progesteronem, což potlačuje Th1 reaktivitu. Kromě změny hladin cytokinů je těhotenství udržováno expresí HLA-G a deciduálními NK (přirození zabíječi, „natural killers“) buňkami. Molekuly HLA-G nespouští cytotoxickou reaktivitu. V placentě prakticky nejsou B buňky zastoupeny, T buňky tvoří pouze malou frakci lymfocytů, ale vyskytují se zde makrofágy a NK buňky. IL-4 a IL-10 nejsou plodem produkovány, jejich hladiny jsou udržovány díky matce (Krejsek 2004; Sacks, Sargent, a Redman 1999; Vince a Johnson 1996).

Imunitní systém dětí při narození není adaptován na postnatální vývoj, tj. má sníženou schopnost buněčné odpovědi, neschopnost produkovat některé izotypy protilátek, slabou protizánětlivou odpověď a narušenou obranu proti intracelulárním patogenům. Slizniční systém je připraven pro přijímání podnětů pro nastavení optimálních imunitních odpovědí. Složky přirozené imunity se vyskytují ve snížených hladinách oproti dospělému

organismu. Nedokonalá T buněčná odpověď limituje odstranění virových částic. Většina CD4/8+ lymfocytů nese „naivní“ fenotyp - CD45RA, počet paměťových CD45R0+ se podobá jako v periferní krvi dospělých. Aktivace přes CD40L je redukována. Neonatální cytokiny se rychle degradují, což vede ke zkrácené době jejich působení. IL-4 přítomný v době rozeznání antigenu inhibuje expresi IL-12 a směřuje k Th2 odpovědi i v přítomnosti IL-12. Cytotoxická reaktivita se vyskytuje v nižší míře než u dospělých. Do dvou let nejsou děti schopny plně odpovídat na bakteriální expozici. B buňky jsou po expozici schopné tvořit protilátky IgM, IgG, IgA. Nižší exprese CD21 a nižší aktivita komplementu vede k nedokonalé aktivaci B buněk (Kovarík a Siegrist 1998). Novorozenecké mononukleární fagocyty mají defektní funkci. Exprimují pouze nízkou hladinu kostimulačních molekul a cytokinů. Ale množství mRNA pro jednotlivé cytokiny je srovnatelné s hladinami u dospělých (Velilla, Rugeles, a Chougnet 2006).

Novorozenecké T buňky nesou znak nezralých lymfocytů. Schopnost produkce protilátek omezuje snížená exprese CD40L. T buněčné funkce dozrávají u atopických jedinců pomaleji. Novorozenecký organismus má sníženou schopnost tvorby IFN- $\gamma$ , která je ještě umocněna u atopických jedinců (Björkstén 1999). Novorozenci nejsou schopni produkovat IgG protilátky, ty jsou získávány kojením od matky (Maródi 2002). IgA mateřského mléka chrání novorozenecký imunitní systém, aby nebyl přetížen před tím, než bude plně vyvinut. Antigeny komenzálních bakterií se váží na maternální IgA, čímž činí antigen tolerogenním, a dochází tak k nastavení tolerance mezi imunitním systémem a komenzálními bakteriemi. Dozrání střevní sliznice a jejího GALTu (lymfatická tkáň asociovaná se střevem, „gut associated lymphoid tissue“) iniciuje právě mikrobiota (Maynard et al. 2012). Kolonizace je zahájena již při porodu a těsně po něm. Z hlediska atopie je nejkritičtějších prvních 6 měsíců po narození, oproti klesajícímu zastoupení populace Th0 se navyšuje zastoupení populace Th2. Díky kojení dochází k nastavení rovnováhy mezi Th2 a Th1 a postupnému nastavení orální tolerance (zabezpečené regulačními mechanismy) a osidlování trávicího traktu, které má mimořádně protektivní účinek proti atopické reaktivitě (Krejsek 2004; Panzner a Špičák 2004). Mateřské mléko obsahuje také cytokiny, které ovlivňují imunitní systém novorozence. U alergických matek byly v kolostru i mateřském mléce nalezeny vyšší hladiny IL-4 a IL-10, které s délkou kojení klesají (Žižka et al. 2007). Mikrobiální osidlování spolu s kojením posiluje Th1 dominanci. Novorozenci jsou chráněni protilátkami IgA přenesenými mateřským mlékem od matky (Krejsek 2004).

Promořování dětí infekčními agens je zcela přirozené. Virové a bakteriální stimuly posilují Th1 reaktivitu, která je nejsilnější na prahu dospělosti (Krejsek 2004).

### **1.2.1 Pupečnicková krev**

Objem pupečnickové krve je přibližně 80 - 100 ml na placentu.

Složky přirozené imunity se vyskytují ve snížených hladinách oproti dospělému organismu.

Pupečnicková krev obsahuje více než 1% CD34 pozitivních (kmenových) buněk. Lymfoidní buňky jsou obsaženy v přibližně dvojnásobné koncentraci proti periferní krvi. CD3, CD4 i CD8 „single“ pozitivní T buňky jsou zastoupeny v nižším poměru než v periferní krvi dospělého jedince. NK buňky a CD4, CD8 „double“ pozitivní T buňky jsou zastoupeny ve vyšší koncentraci. Většina lymfocytů nese „naivní“ fenotyp CD45RA. B buňky jsou v pupečnickové krvi zastoupeny stejně jako v periferní dospělého člověka. Po styku s antigenem tvoří protilátky IgM, IgG, IgA. Nedokonalá T buněčná odpověď limituje odstranění virových částic. Aktivace přes CD40L je redukována. Cytotoxická reaktivita se vyskytuje v nižší míře než u dospělých (D'Arena et al. 1998; Dimitriou et al. 1998; Kovarik a Siegrist 1998; Krejsek 2004).

## **1.3 Střevní mikrobiota a probiotika**

### **1.3.1 Střevní mikrobiota**

Lidská střevní mikrobiota složena zhruba z 1000 druhů, z nichž přibližně 90% jsou anaerobní bakterie (Fanaro et al. 2003; Krejsek, Novosad, a Kopecký 2003). Tvoří 1 - 2 kg střevního obsahu. Složení je ovlivněno genetikou hostitele, expozicí mikrobům. Liší se také podle lokace, způsobu bydlení, velikosti rodiny a stravovacích návyků. Negativní vliv na složení mikrobioty má celkově západní styl života, což zahrnuje zvýšené používání antibiotik, skladbu stravy, přehnanou hygienu, sanitaci, sterilizaci jídla nebo porod císařským řezem (Krejsek, Novosad, a Kopecký 2003; Palmer et al. 2007; Panzner a Špičák 2004; Tang, Lahtinen, a Boyle 2010). Mikrobiota je individuálně charakteristická a značně stabilní, poněkud se však mění s věkem (Romeo et al. 2010).

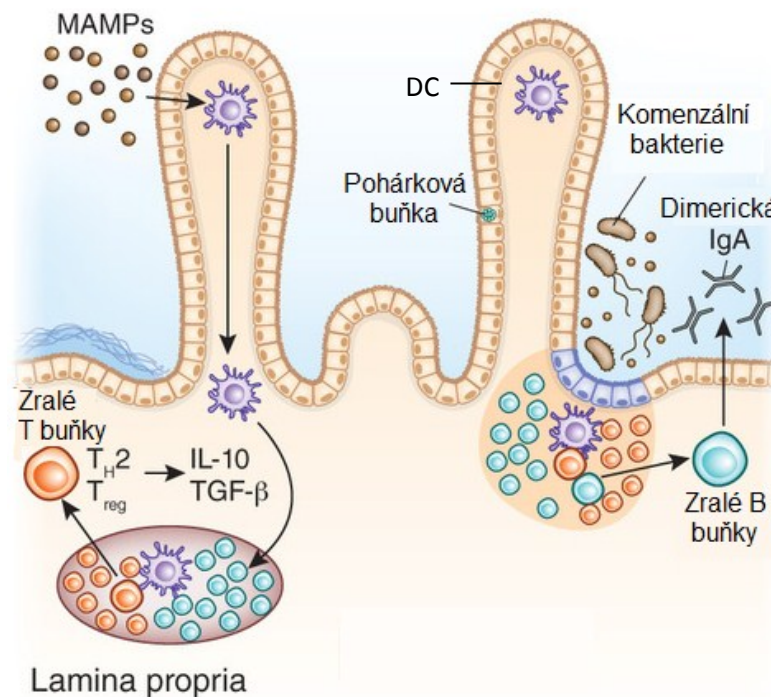
Do nedávna se myslelo, že při narození je střevní trakt prostý mikrobioty, ale ukazuje se, že se novorozenec setkává s mikroby již před narozením (Neu 2016). Při přirozeném porodu přichází organismus do kontaktu s vaginální mikrobiotou matky.

Rozdíl ve složení je patrný jak mezi dětmi narozenými přirozeně a císařským řezem, tak mezi kojenými a nekojenými (Sinn 2013). U porodu císařským řezem je osídlování opožděno o 10 dní. Osídlení kmeny *Escherichia coli* (*E. coli*) probíhá už od porodu orálním přenosem prostřednictvím matčiných bakterií, osídlení *E. coli* redukuje patogeny a má pozitivní vliv na vývoj imunitního systému novorozenců (Bettelheim et al. 1974). U kojených dětí převládají kmeny *Bifidobacteriaceae* a *Lactobacillaceae*, u nekojených *Enterobacteriaceae* a *Bacteroides*. Po odstavení se tento rozdíl postupně smývá (Fanaro et al. 2003; Palmer et al. 2007). S nasazením příkrmů se složení začíná podobat mikrobiotě dospělého člověka a „dospělý typ“ mikrobioty je dosažen asi okolo 2 let věku. A kolem 55. - 60. roku začíná klesat množství bifidobakterií (Hopkins, Sharp, a Macfarlane 2002; Romeo et al. 2010).

Mikrobiota osidluje veškeré povrchy lidského těla a při optimálním složení má ochrannou funkci. Udržuje střevní bariérovou funkci a zprostředkovává odolnost proti patogenům. Zprostředkováním orální tolerance zabezpečuje mikrobiota udržení homeostázy (Stanghellini et al. 2010). Mechanismus, jakým je tolerance nastavena, je ukázán na **Obrazku 2** (str. 22). Mikrobiota reguluje zánětlivé odpovědi ve střevě a představuje hlavní lokální i systémový stimul pro imunitní systém po porodu. Pomocí mikrobioty dochází k navození řady regulačních mechanismů, je nezbytná pro normální vývoj imunitního systému a také tvoří největší mikrobiální expozici během života. Tyto funkce jsou zabezpečeny následujícími mechanismy: obsazení potenciálních vazebných míst střevní výstelky a receptorů buněk, kompetice o nutriční zdroje, brždění růstu patogenů nebo produkce bakteriocinů, indukce T regulačních buněk krátkými nenasycenými kyselinami (Hooper a Macpherson 2010; Krejsek, Novosad, a Kopecký 2003; Lukáš 2008; Panzner a Špičák 2004; Tang, Lahtinen, a Boyle 2010).

Probiotika i komenzální bakterie interagují se střevní sliznicí. PRR („pattern recognition receptors“, receptory rozeznávající molekulové vzory (PAMP molekulové vzory spojené s patogeny, („pathogen - associated molecular pattern“) a MAMP- molekulové vzory spojené s mikroby, („microbe - associated molecular pattern“)) exprimované na povrchu mikrobů spouštějí aktivaci T buněk. Produkce IL-12 vede k indukci Th1 buněk, IL-4 k produkci IL-10 a TGF- $\beta$  jako induktorů T regulačních buněk (Tang, Lahtinen, a Boyle 2010). Po rozpadu gram negativních buněk dochází k uvolnění lipopolysacharidu (LPS) z jejich stěn. Cílové buňky (makrofágy, neutrofilů a endotel) po rozeznání endotoxinu

(LPS) syntetizují prozánětlivé cytokiny TNF- $\alpha$  (faktor nekrotizující nádory, „tumor necrosis factor“), MIF (faktor inhibující migraci makrofágů, „macrophage migration inhibitory factor“), IL-1, IL-6, IL-8, IL-12. Při nízkých dávkách endotoxinů tyto cytokiny způsobí mírně zvýšenou teplotu a antimikrobiální stimulaci. Tento fyziologický vliv na imunitní systém má LPS ze symbiotických bakterií (Beutler a Rietschel 2003; Braun - Fahrländer et al. 2002; Mazmanian et al. 2005; Von Mutius et al. 2000).



**Obrázek 2: Nastavení tolerogenních mechanismů pomocí mikrobioty**

Kolonizace střeva probíhá postnatálně. Dochází k interakcím mezi komenzálními bakteriemi a imunitním systémem. M buňky v Peyeroých plátech předávají dendritickým buňkám antigeny nebo celé bakterie, ty jsou prezentovány B a T buňkám, aby mohly podporovat produkci dimerního sIgA, nezbytného pro obranu proti patogenům. Antigeny transportované do lymfatických uzlin umožňují dozrávání T buněk do T regulačních buněk. (upraveno dle (Tamburini et al. 2016))

DC- dendritická buňka, MAMP - molekulové vzory spojené s mikroby, („microbe - associated molecular pattern“), Th - pomocné T buňky („T helpers“), Treg - T regulační buňky, IL - interleukin, TGF- $\beta$  - transformující růstový faktor, („transforming growth factor  $\beta$ “), IgA - protilátka izotypu IgA, sIgA - sekretované protilátka izotypu IgA

### 1.3.2 Probiotika

Na základě poznatku, že bulharští horalové se dožívají vysokého věku díky konzumaci fermentovaných mléčných výrobků, vyslovil Mečnikov hypotézu, že střevní mikrobiota má pozitivní vliv na lidské zdraví (Metchnikoff a Mitchell 1907). Složení mikro-

bioty můžeme ovlivňovat pomocí probiotik a prebiotik (Joint FAO/WHO Working Group 2001; Tang, Lahtinen, a Boyle 2010).

Prebiotika jsou neživé stimulatory bakteriálního růstu, nestravitelné složky potravy, většinou rostlinného původu. Aktivně a selektivně stimulují růst bakterií (Macfarlane, Macfarlane, a Cummings 2006). Probiotika jsou živé mikroorganismy, které, jsou-li podávány v přiměřeném množství, podporují zdraví hostitele (Joint FAO/WHO Working Group 2002). Jsou těžko definovatelná a s tím souvisí náročnost stanovení bezpečnostních směrnic a doporučení jejich používání (van den Nieuwboer et al. 2014).

Aby mohl být bakteriální kmen považován za probiotický, by měl splňovat následující podmínky:

- 1) Odolnost vůči nízkému pH, aby se bakterie dostaly až do tlustého střeva živé
- 2) Působení proti enteropatogenům
- 3) Termostabilita, aby v přípravku mohl být uchován co nejvyšší obsah živých bakterií
- 4) Vhodná léková forma, aby bakterie neztrácely během uskladnění životaschopnost
- 5) Synergie použitých kmenů
- 6) Pozitivní vliv převyšující nad možnými riziky
- 7) Doporučená jednotlivá terapeutická dávka přibližně  $10^8$  -  $10^9$  bakterií (van den Nieuwboer et al. 2014)

Jako probiotika se nejčastěji používají určité kmeny některých rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, nepatogenní *E. coli* a kvasinky *Saccharomyces*. Konkrétními příklady mohou být:

- 1) Mutaflor (ArdeyPharm) - *E. coli* Nissle 1917 (“Mutaflor - SD Pharma” 2014)
- 2) VSL-3 (VSL Pharmaceuticals, Inc.) - *Lactobacillus casei, plantarum, acidophilus, delbruckii subspecies, bulgaricus, Bifidobacterium longum, breve, infantis, Streptococcus salivarius* (“VSL Pharmaceuticals, Inc. - VSL#3” 2016)
- 3) BION3 (Merck) - *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium longum, bifidum* (“Merck- BION3” 2016)
- 4) Bio Kult (PROBIOTICS PROVITA, s.r.o.) obsahuje 14 probiotických kmenů (“PROBIOTICS PROVITA, S.r.o. - Bio Kult” 2017)

Probiotika dokáží modulovat střevní mikrobiotu (Tang, Lahtinen, a Boyle 2010). Obsazují vazebná místa na buňkách epitelu a APC, čímž vytěsňují patogeny (Strobel a Mowat 2006). Změnami složení a aktivity mohou obnovit mechanismy, jakými působí zdravá střevní mikrobiota (Fuller a Gibson 1998). Zesilují aktivitu Th1, tj. zvyšují produkci IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , a zvyšují aktivitu monocytů a periferních mononukleárů (Lukáš 2008; Sinn 2013). Indukují mírný zánět, což vede k produkci IL-6 dendritickými buňkami, který podporuje stimulaci naivních B buněk k produkci IgA (Kukkonen et al. 2010). Efekt probiotik je závislý na dávce. Nižší může působit stimulačně, vyšší tolerogenně. Mají-li mít nějaký účinek, musí být podávána opakovaně, často a dlouhodobě a účinek trvá po dobu podávání probiotika (Mañé et al. 2011).

#### **1.3.2.1 *E. coli* Nissle 1917**

*E. coli* Nissle 1917 (ECN), sérotyp O6:K5:H1, se vyskytuje přirozeně. Působí jako antagonist patogenních bakterií a byl kompletně typizován. Nemá žádné P, M, S fimbrie, ale pouze běžné fimbrie I. typu. Je geneticky stabilní, nemá žádné geny antibiotické rezistence ani nevytváří žádné známé proteinové toxiny (Blum, Hacker, a Marre 1995; Sonnenborn a Schulze 2009).

ECN tvoří hlavní složku přípravku Mutaflor vyráběného firmou ArdeyPharm. Tobolka Mutafloru obsahuje 2,5 - 25x10<sup>9</sup> bakterií ("Mutaflor - SD Pharma" 2014).

#### **1.3.2.2 *Colinfant Newborn / E. coli* O83:K24:H31**

Nedonošení novorozenci jsou ohroženi gastrointestinálními infekcemi, které představují zdravotní problém. Rizikovými faktory jsou hospitalizace, podávání antibiotik nebo infekce rezistentními kmeny bakterií. Riziko výskytu gastrointestinálních infekcí může být sníženo cílenou kolonizací střeva novorozence nepatogenními kmeny *E. coli* nebo kmeny *Lactobacillus*, tj. kmeny probiotických bakterií. MUDr. Žádníková použila pro tuto kolonizaci dva kmeny *E. coli* - ECN a O83:K24:H31 (EC O83). Jedná se o nepatogenní kmeny *E. coli*. Přítomnost těchto kmenů ve střevě vedla k tvorbě protilátek, redukci patogenů, nosokomiálních infekcí a použití antibiotik (Lodinová - Žádníková, Sonnenborn, a Tlaskalová 1998; Lodinová - Žádníková et al. 2010).

Bezpečnost kmene EC O83 byla testována u bezmikrobních selat. Selata byla po narození „císařským řezem“ osídlena kmenem EC O83 a nebyla kojena. Protože u nich nedochází k transplacentárnímu přenosu protilátek izotypu IgG, nemají žádné protilátky

a jsou proto náchylná k infekcím. Po osídlení bezmikrobních selat kmenem EC O83 nedošlo k patogenním procesům. U nich byl tedy tento kmen nepatogenní (Kozáková et al. 2006; Lodinová - Žádníková 2002). EC O83 se vyskytuje zřídka. EC O83 neprodukuje termostabilní ani termolabilní enterotoxiny. Široká škála genů (pro  $\alpha$ -hemolysin nebo P- fimbriální adheziny, které jsou zařazeny jako faktory virulence) může přispět k vysoké schopnosti kolonizace. Na svém povrchu nese EC O83 fimbrie I. typu. EC O83 je citlivý na antibiotika (Hejnova et al. 2005; Lodinová - Žádníková, Sonnenborn, a Tlaskalová 1998; Lodinová - Žádníková et al. 2010)

Od roku 1992 je tento kmen registrován jako probiotický imunopreparát Colinfant Newborn a je vyráběn firmou Dyntec. Při správném uchování (2 - 8°C, chráněno před světlem a vlhkostí) je deklarováno množství v jedné dávce  $0,8 \times 10^8$  -  $1,6 \times 10^8$  lyofylovaných bakterií ("Colinfant Newborn - DYNTEC" 2016, "Colinfant Newborn - SÚKL" 2015).

Mechanismus preventivního účinku EC O83 při snižování výskytu u osídlených dětí není objasněn, ale pravděpodobně může být způsoben stimulací tvorby protilátek jako důsledku dlouhodobé přítomnosti tohoto kmene. EC O83 byl podáván novorozencům do 48 hod po narození a dále 3krát za týden po dobu 4 týdnů. Dlouhodobá přítomnost byla ověřena při studii MUDr. Kocourkové, kdy u alergické kolonizované skupiny byla po 3 dnech od narození a prvního podání vakcíny prokázána u 71 % osídlených novorozenců, z toho u 19% jako monokultura, po 3 měsících byla přítomna u 91 % dětí a v 1 roce u 73 % jedinců. Incidence patogenních kmenů byla nižší než u nekolonizované skupiny. Před podáním probiotické bakterie se tento probiotický kmen v dětské stolici nevyskytoval (Kocourková et al. 2007; Lodinová - Žádníková et al. 2010). V rámci studie MUDr. Žádníkové byly účastníkům po 10 a 20 letech od primárního osídlení rozesílány dotazníky zjišťující zdravotní stav dotyčných. Dotazníky po 10 letech byly zacíleny na nedonošené jedince (osídlené i kontrolní) a po 20 letech zjišťovaly zdravotní stav donošených jedinců. Po 10 letech se opakované infekce vyskytovaly u 23% osídlených jedinců oproti 58% u skupiny kontrolní. Výskyt alergie byl dokumentován u 12% osídlených proti 33% neosídlených účastníků studie. Po 20 letech nebyl pozorován rozdíl ve výskytu infekcí mezi kontrolní a kolonizovanou skupinou. U neosídlené byl výskyt alergických onemocnění 32%, u osídlené skupiny pouze u 16% (Lodinová - Žádníková 2002). V rámci další studie bylo zjištěno, že pouze 1 dítě alergické matky, které bylo osídleno probiotickým

kmenem EC O83, z celkových 52, mělo ekzém, 6 neosídlených dětí alergických matek z celkových 50 mělo alergii, z toho 4 ekzém a 2 potravinovou alergii. Výsledky byly dosaženy díky časně kolonizaci (Kocourková et al. 2007).

Jak studie MUDr. Žádníkové ukazují, kromě snížení výskytu gastrointestinálních infekcí má podání tohoto probiotika vliv i na snížení rozvoje alergií. Výsledky studií u zvířat vedou k hypotéze, že specifické kmeny mikrobioty podporují ochranu hostitele proti senzibilizaci a vzniku alergie. U bezmikrobních zvířat chybí indukce vývoje tolerance (Lodinová - Žádníková 2002). Kolonizace kmenem EC O83 vede ke zvýšení lokální i systémové protilátkové odpovědi. Koncentrace sérových protilátek proti EC O83 rapidně stoupla po 4 týdnech od kolonizace (Lodinová - Žádníková, Cukrowska, a Tlaskalová-Hogenová 2003; Lodinová - Žádníková, Jouja, a Wagner 1973; Lodinová - Žádníková et al. 1991).

Kromě studií, na kterých se podílela MUDr. Žádníková, byl tento kmen použit ještě MUDr. Liškou, který podával Colinfant Newborn dětem se zvýšenou hladinou IgE. Hladina IgE se do 1 roku normalizovala a ve 3. roce života se neodlišovala od zdravých dětí (Liška et al. 2014).

#### **1.4 Probiotika jako prevence alergie**

Současná kauzální léčba alergických onemocnění se snaží indukovat toleranci, příkladem je specifická alergenová imunoterapie, podporující tvorbu T regulačních buněk specifických proti alergenu (Incorvaia et al. 2010). I výzkum se věnuje aktivní prevenci alergie s využitím faktorů indukujících toleranci (Peña a Versalovic 2003).

Fyziologická mikrobiota je důležitým modulátorem imunitní odpovědi. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že mikrobiota chrání před senzibilizací a vznikem alergie. Jednou z příčin alergie jsou i poruchy funkcí sliznic a kůže. Pozměněná mikrobiální expozice v gastrointestinálním traktu může být částečně zodpovědná za zvýšení výskytu alergie. Je to potvrzeno i tím, že u dětí s alergií byla nalezena změna ve složení střevní mikrobioty. K rozvoji alergie přispívá genetická predispozice k alergii, vnímavost ke kolonizaci a přirozená mikrobiální expozice (Lodinová - Žádníková et al. 2010; Petru 2012; Yao et al. 2010).

Jedinci s deficitem IgA mohou mít vyšší výskyt alergie. IgA má protizánětlivý účinek a zabraňuje prostupu alergenu přes sliznice. Kolonizace střev komenzálními i probio-

tickými bakteriemi může indukovat produkci TGF- $\beta$  a IL-10, které podporují populaci T regulačních buněk, posilují produkci IgA a IgG4 protilátek (mohou zablokovat vazbu IgE na alergen) a snižují aktivaci eosinofilů, basofilů, žírných buněk a produkci IgE (Tlaskalová - Hogenová a Městecký 2012).

Modifikace přirozeného osídlení použitím probiotik bylo čteně popisováno. Studie vycházely z předpokladu, že podáním jakýchkoliv probiotik lze předcházet rozvoji alergie. Ale vzhledem k tomu, že se během života, vyjma období po narození, mikrobiota příliš nemění a je těžké ji změnit, jednalo se u většiny studií o prenatální nebo perinatální podávání probiotik (Yao et al. 2010).

Jak ukazuje **Tabulka 1** (str.28), byly nejčastěji použity kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Pokud mělo podávání probiotických bakterií nějaký efekt, docházelo ke snížení výskytu ekzému, ale nedokazují snížení výskytu alergické rýmy nebo astmatu. Pozitivní účinek podání probiotik vymizel s ukončením podávání. Ve studii Lodinové- Žádníkové, ve které byl použit nepatogenní kmen EC O83, vedlo podání probiotického kmene ke snížení výskytů alergií (Lodinová - Žádníková et al. 2010; Yao et al. 2010). Kromě snížení výskytu nosokomiálních infekcí došlo i k získání dalších benefitů - posílení imunologické i neimunologické střevní bariéry, stimulace imunitní odpovědi, pokles bakteriálních patogenů nebo zmírnění zánětlivých procesů ve střevě (Lodinová - Žádníková, Sonnenborn, a Tlaskalová 1998). Porovnání zmíněných studií podporuje teorii, že ne všechna probiotika jsou efektivní, a jejich působení je kmenově specifické (Yao et al. 2010).

Rozsáhlá analýza ukazuje, že neexistuje zvýšené zdravotní riziko při použití probiotik pro prevenci alergie (van den Nieuwboer et al. 2014).

S používáním probiotik v souvislosti s alergií se nesou některé mýty. Ne všechna probiotika splňují požadavky, které by měly být splněny u bakteriálních kmenů považovaných za probiotikum. Není znám efekt dlouhodobé manipulace s nezralým imunitním systémem. Vliv je vzájemně specifický mezi kmenem, konkrétním alergickým onemocněním a jedincem. Proto výsledky s různými kmeny nejsou zcela srovnatelné. Výsledky by neměly být generalizovány i s ohledem na to, že ve studiích byly využity různé protokoly a dávky (van den Nieuwboer et al. 2014; Yao et al. 2010).

Využití probiotik jako prevence vzniku alergie je podporováno v průběhu těhotenství, po porodu i během kojení u žen i dětí s vysokým rizikem vzniku alergie. Ale vzhledem k tomu, že neexistuje dostatek důkazů o preventivním působení, je použití probiotik doporučeno pouze u zdravých jedinců (Fiocchi et al. 2015). Dle ESPHGAN by ale měla být probiotika přidávaná do umělé kojenecké výživy nebo jinak podávána kojencům plně charakterizována a měla by být otestována jejich bezpečnost (Agostoni et al. 2004).

**Tabulka 1: Přehled několika vybraných studií, které zjišťovaly vliv podání probiotik a na vznik a rozvoj alergie**

<b>Autor</b>	<b>Probiotický kmen</b>	<b>Efekt</b>
Abrahamsson <sup>1</sup>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Žádný efekt
Huurre <sup>2</sup>	<i>Bifidobacterium lactis</i>	Žádný efekt
Isolauri <sup>3</sup>	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Snížení výskytu ekzému
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Snížení výskytu ekzému
Kalliomäki <sup>4</sup>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Snížení výskytu ekzému
		Senzibilizace bez změny
Kopp <sup>5</sup>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Opakující se epizody
Kukkonen <sup>6</sup>	Směs probiotik	Snížení výskytu ekzému
		Senzibilizace bez změny
Lodinová - Žádníková <sup>7</sup>	<i>Escherichia coli</i> O83:K24:H31	Snížení výskytu alergie
Rautava <sup>8</sup>	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Žádný efekt
Taylor <sup>9</sup>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Nárůst senzibilizace
Wickens <sup>10</sup>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Snížení výskytu ekzému
	<i>Bifidobacterium animalis lactis</i>	Senzibilizace bez změny Žádný efekt

<sup>1</sup> (Abrahamsson et al. 2007)

<sup>2</sup> (Huurre et al. 2008)

<sup>3</sup> (Isolauri et al. 2000)

<sup>4</sup> (Kalliomäki et al. 2001, 2003)

<sup>5</sup> (Kopp, Hennemuth, et al. 2008)

<sup>6</sup> (Kukkonen et al. 2007)

<sup>7</sup> (R Lodinová-Žádníková, Sonnenborn, and Tlaskalová 1998; Raja Lodinová-Žádníková 2002)

<sup>8</sup> (Rautava, Arvilommi, and Isolauri 2006)

<sup>9</sup> (Taylor, Dunstan, and Prescott 2007)

<sup>10</sup> (Wickens et al. 2008)

## 2 Cíle

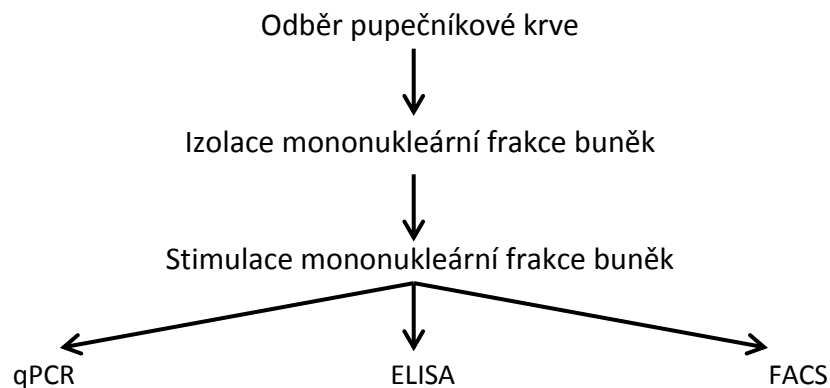
Hlavním cílem této diplomové práce bylo studium působení EC O83 na CBMC dětí zdravých a alergických matek. Dalším cílem byla charakterizace imunitní odpovědi u CBMC dětí zdravých (dětí s relativně nízkým rizikem vzniku alergie) a alergických matek (dětí s relativně vysokým rizikem rozvoje vzniku alergie).

Pro dosažení vytyčených cílů bylo nutné uskutečnit následující dílčí úkoly:

- 1) Stanovení změny exprese vybraných cytokinů stimulovaných CBMC dětí zdravých a alergických matek
- 2) Detekce intracelulárních cytokinů a transkripčních faktorů charakteristických pro jednotlivě subpopulace CD4 lymfocytů v pupečnickové krvi dětí zdravých a alergických matek
- 3) Měření koncentrace vybraných cytokinů v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek
- 4) Porovnání efektu EC O83 a ECN na CBMC dětí zdravých a alergických matek

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Použité metody



#### Obrázek 3: Schéma experimentu

Z krve odebrané v Ústavu pro péči o matku a dítě v Podolí byla vyizolována mononukleární frakce buněk, která byla následně stimulována polyklonálními aktivátory fytohemaglutininem a lipopolysacharidem a probiotickými kmeny *Escherichia coli* Nissle 1917 a *Escherichia coli* O83:K24:H31. Po 20 hod stimulaci byla izolována RNA, která byla následně přepsána do cDNA a ta byla použita na qPCR. Taktéž po 20 hod byly detekovány intracelulární cytokiny a transkripční faktory charakteristické pro jednotlivé subpopulace CD4+ T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie. Po 3 denní kultivaci byly zamraženy supernatanty kultur pro následné stanovení hladin cytokinů metodou ELISA.

qPCR- kvalitativní polymerázová řetězová reakce, ELISA- enzymaticky značená imunosorbentní analýza, („enzyme-linked immunosorbent assay“), FACS- buněčná separace založená na principu průtokové cytometrie

#### 3.1.1 Získání materiálu a charakteristika pacientů

Na odběr přibližně 30 ml pupečnickové krve byla připravena transfúzní nádoba s 300 µl heparinu (1000 jednotek/ml).

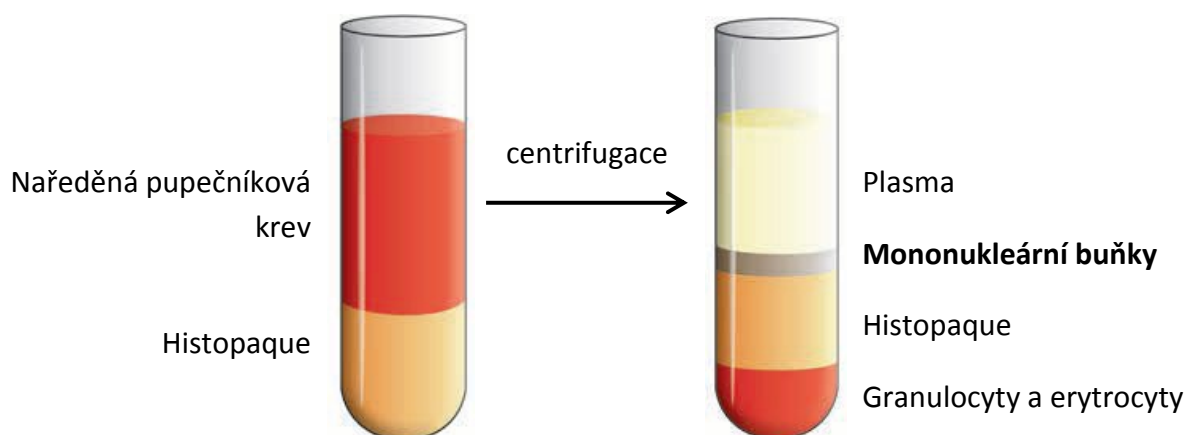
Pupečnicková krev byla odebírána na spolupracujícím pracovišti v Ústavu pro péči o matku a dítě v Podolí. Krev byla odebírána po plánovaném císařském řezu a po podepsání písemného informovaného souhlasu matky. Krev byla až do zpracování uchována při pokojové teplotě.

Za alergickou byla považována matka, která trpěla alergickým onemocněním a byla v péči alergologa nejméně dva roky. Onemocnění bylo potvrzeno pomocí kožních „Prick“ testů nebo laboratorního vyšetření (stanovení specifických IgE protilátek). Pacientka byla eventuálně léčena.

### 3.1.2 Izolace mononukleárních leukocytů z krve

Pro získání mononukleární frakce leukocytů byla zvolena gradientová centrifugace s použitím media Histopaque o hustotě 1,077 g/ml.

Heparinizovaná krev byla ředěna v poměru 1:1 vytemperovaným PBS (fyziologický roztok pufovaný fosfátem, „phosphate buffered saline“). Do 15 ml zkumavek byly naneseny 3 ml vytemperovaného Histopaque, které byly převrstveny 6 ml naředěné krve. Zkumavky byly centrifugovány po dobu 30 min, při 20°C a při otáčkách se zrychlením 400 g. Po centrifugaci byly pomocí sterilní Pasteurovy pipety odsáty prstence s mononukleární frakcí leukocytů (CBMC, „cord blood mononuclear cells“) - viz **Obrázek 3** - a přeneseny do nových 15 ml zkumavek, zkumavky byly pod okraj doplněny PBS a centrifugovány při 20°C, 10 min, 250 g. Po stočení byl odstraněn supernatant, peleta byla resuspendována v PBS a suspenze buněk byla přenesena vždy ze dvou do jedné zkumavky. Zkumavky byly doplněny PBS pod okraj a centrifugovány - 500 g, 20°C, 10 min. Resuspendování pelet bylo ještě jednou zopakováno. Po druhé centrifugaci byla peleta resuspendována v 5 ml chladného media RPMI 1640 („Roswell Park Memorial Institute“).



#### **Obrázek 4: Prstýnek s mononukleární frakcí leukocytů**

3 ml Histopaque byly převrstveny 6 ml heparinizované krve ředěné 1:1 pufovaným fyziologickým roztokem a centrifugovány po dobu 30 min, při 20°C a při otáčkách se zrychlením 400 g. Po centrifugaci se pomocí gradientu vytvořeného mediem Histopaque rozdělila krev na plasmu, frakci mononukleárních buněk frakci granulocytů a erytrocytů a Histopaque. Pro další použití byla odebrána vrstva mononukleárních buněk (upraveno dle (Nolta a Crooks 2005))

Po resuspendování pelety v mediu RPMI 1640 byly vzorky připraveny pro počítání buněk v počítací (Bürknerově) komůrce - k 950  $\mu$ l Türckova roztoku bylo přidáno 50  $\mu$ l buněčné suspenze, směs byla promíchána pomocí vortexu a přenesena do komůrky.

V komůrce bylo spočítáno 2x50 čtverců a pomocí aritmetického průměru byl získán počet buněk na základě vzorce:

$$\text{spočítaný počet buněk} \times 10^5 = \text{počet buněk na 1 ml buněčné suspenze}$$

### 3.1.3 Příprava suspenzí bakterií

Z lyofilizovaných bakterií přípravku Colinfant Newborn byla připravena dle návodu na příbalovém letáku suspenze, která byla naočkována na LB (Luria - Bertani) agar a inkubována přes noc. Druhý den byly vybrané kolonie přeneseny do 10 ml LB média a za stálého třepání ve vodní lázni o 37°C inkubovány 24 hodin. Po 24 hodinách byla bakteriální suspenze naředěna na optickou denzitu 3 jednotek stupnice McFarlanda v 50 % glycerolu v PBS, takže výsledná koncentrace byla  $2 \times 10^9$  CFU/ml (jednotek tvořících kolonie, „colony forming units“). Suspenze byla rozdělena do alikvótů a zamražena v -80°C.

Koncentrace byla ověřena opětovným zaočkováním na agarovou plotnu.

Kmen obsažený v přípravku Mutaflor byl poskytnut firmou ArdeyPharm (prof. Ulrich Sonnenberg) a připraven dle stejného protokolu jako EC O83.

### 3.1.4 Stimulace mononukleární frakce leukocytů

Pro stimulaci CBMC byly použity polyklonální aktivátory fytohemaglutinin (PHA) a lipopolysacharid (LPS) jako pozitivní kontroly a probiotické kmeny *E. coli* Nissle 1917 a *E. coli* O83:K24:H31.

Suspenze CMBC byla centrifugována při 500g, 4°C po dobu 10 min. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v mediu RPMI 1640. Suspenze byla rozdělena po  $2 \times 10^6$  bb (buněk) do 10 ml zkumavek a doplněna RPMI 1640 do 1 ml. Suspenze byla stimulována PHA (10 µg/ml), LPS (10 µg/ml) ECN ( $2 \times 10^7$  bb), EC O83 ( $2 \times 10^7$  bb).

CBMC byly kultivovány při 37°C v 5% koncentraci CO<sub>2</sub> s maximální vlhkostí po dobu 20 hodin pro účely izolace RNA a pro měření intracelulárních cytokinů pomocí průtokové cytometrie a 3 dny pro stanovení koncentrace cytokinů v supernatantu kultur.

### 3.1.5 Izolace RNA z buněčných kultur

Po 20 hodinové stimulaci CBMC byla z kultur izolována RNA pomocí komerčního kitu „RNeasy mini kit“ (Qiagen) dle návodu výrobce.

Kultury byly centrifugovány při 4°C, 500 g po dobu 10 min. Supernatanty byly odstraněny a pelety resuspendovány v 350 µl lyzačního roztoku (1:10 β- merkaptoethanol

a roztok „RLT“) a lyzovány 5 min při pokojové teplotě. Po lýze bylo k suspenzím přidáno po 350 µl 70% ethanolu a obě fáze byly pečlivě promíchány.

Směsi byly přeneseny do kolonek „RNeasy mini spin column“ na izolaci RNA. Kolonky byly centrifugovány po dobu 15 s, při 20°C a 8000 g. Ze spodní části kolonky byly odstraněny supernatanty a do kolonek bylo přidáno 700 µl pufru RW1 a následně byly centrifugovány po dobu 15 s, při 20°C a 8000 g. Degradace genomické DNA proběhla přidáním DNázy na membránu kolonky s navázanou RNA (a i genomickou DNA), tak že k 10 µl enzymu (DNázy) bylo doplněno 70 µl pufru RDD (tj. 80 µl výsledného roztoku/kolonka), DNáza byla aktivována protřepáním roztoku. Ze spodní části kolonky byly odstraněny supernatanty a směsi s roztokem DNázy byly inkubovány 15 min při pokojové teplotě. Kolonky byly doplněny 500 µl pufru „RPE“ a centrifugovány 15 s, při 20°C a 8000 g. Supernatanty ze spodní části byly odstraněny, do kolonek bylo přidáno 500 µl „RPE“ a kolonky byly znovu centrifugovány. Supernatanty byly odstraněny a kolonky byly umístěny do nových 2 ml mikrozkušavek a centrifugovány 1 min, při 20°C a 8000 g. Kolonky byly přemístěny do 1,5 ml mikrozkušavek. Na membránu kolonky bylo přidáno 20 µl vody bez RNáz a kolonky byly centrifugovány 1 min, při 20°C a 8000 g. U eluované RNA byla změřena koncentrace a čistota a následně byla RNA umístěna do -20°C než byla přepsána do cDNA.

### **3.1.6 Měření koncentrace a čistoty RNA**

Koncentrace RNA byla určena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm pomocí Nanodropu 1000. Absorbance 1,0 při 260 nm odpovídá koncentraci RNA 40 µg/ml.

Čistota izolované RNA byla určena pomocí poměru absorbancí při různých vlnových délkách. Poměrem absorbancí při 260 a 280 nm byla stanovena čistota vzhledem k proteinům. Poměr těchto absorbancí byl vyšší než 2.

### **3.1.7 Reverzní transkripce**

Pro účely této práce byla zvolena metoda obecné reverzní transkripce. Na přepis RNA do cDNA byl použit kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

Do 200 µl mikrozkušavek byl napipetován objem roztoku vyizolované RNA, který odpovídá 0,5 µg RNA. Objem byl doplněn vodou bez RNáz do 10 µl. Do zkušavek bylo přidáno 10 µl premixu připraveného z reagentů z komerčního kitu High Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit v poměru dle **Tabulky 2**. Reverzní transkripce probíhala za režimu: 10 min při 25°C, 120 min při 37°C, 5 min při 85°C a nakonec byl termální cyklér ochlazen na 4°C. Po zchladnutí byly vzorky doplněny 80 µl vodou bez RNáz a uloženy do -20°C.

**Tabulka 2: Poměr reagensií reverzní transkripce pro celkový objem 20 µl reakční směsi**

Reagencie	Množství na 1 vzorek
Pufr RT	2 µl
Mix dNTP	0,8 µl
Směs náhodných primerů	2 µl
Reverzní transkriptáza	1 µl
Inhibitor RNáz	1 µl
Voda bez RNáz	3,2 µl
Vzorek naředěný na správnou koncentraci (0,5 µg na reakci)	10 µl

### 3.1.8 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Pro měření genové exprese vybraných cytokinů, jejichž produkce byla iniciována stimulací CBMC, byla použita metoda qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase, „real time quantitative polymerase chain reaction“). Jako endogenní kontrola, tj. gen se stálou expresí v buňce, jehož exprese není ovlivněna stimulací, byl zvolen β- aktin.

**Tabulka 3: Poměr reagensií qPCR pro celkový objem 25 µl reakční směsi**

Reagencie	Množství na 1 vzorek
Voda bez RNáz	6,25 µl
Specifická sonda s primery	1,25 µl
TaqMan Universal PCR MasterMix	12,5 µl
Vzorek cDNA	5 µl

Na destičku byly nanášeny vzorky v dubletech po 5 µl. Byly připraveny premixy pro jednotlivé sondy (přehled použitých sond v **Tabulce 5** (str. 39)). Složení premixu je uvedeno v **Tabulce 3**. Na destičku bylo napipetováno po 20 µl na jamku. PCR probíhala za termálního režimu 2 min 50°C, 10 min 95°C, 40 cyklů - denaturace 15 s 95°C, elongace 60 s 60°C

### 3.1.9 Intracelulární barvení mononukleárních leukocytů a jejich detekce pomocí průtokové cytometrie

Po 20 hodinách bylo k buněčným kulturám CBMC přidáno po 2  $\mu\text{l}$  LAC („leucocyte activation cocktail, with BD GolgiPlug“). Kultury byly kultivovány při 37°C v 5% koncentraci CO<sub>2</sub> s maximální vlhkostí po dobu 4,5 hodiny.

**Tabulka 4: Složení premixů pro intracelulární barvení buněčných suspenzí**

Premix	Protilátka proti	Množství na vzorek
<b>Th1/Th2</b>	GATA-3	5 $\mu\text{l}$
	T-bet	5 $\mu\text{l}$
	IL-4	5 $\mu\text{l}$
	IL-13	5 $\mu\text{l}$
	IFN- $\gamma$	5 $\mu\text{l}$
	PBS	10 $\mu\text{l}$
<b>Th17/Treg</b>	FoxP3	5 $\mu\text{l}$
	ROR $\gamma\text{t}$	0,5 $\mu\text{l}$
	IL-10	5 $\mu\text{l}$
	IL-17A	5 $\mu\text{l}$
	PBS	10 $\mu\text{l}$

Th - pomocné T buňky („T helpers“), Treg - T regulační buňky, IL - interleukin, IFN-  $\gamma$  - interferon  $\gamma$ , FoxP3 - „forkhead box P3“, ROR $\gamma\text{t}$  - „RAR-related orphan receptor gamma“, T-bet - „T-box transcription factor“, PBS - fosfátem pufrovaný fyziologický roztok chloridu sodného („phosphate buffered saline“)

K suspenzi byly přidány 4  $\mu\text{l}$  značených protilátek proti CD4, promícháno a směs byla inkubována 20 min na ledu a ve tmě. Zkumavky byly centrifugovány 5 min při 4°C a 500 g. Vzorky byly promyty přidáním 2 ml PBS obsahujícího 0,5% BSA (bovinní sérový albumin) a následným centrifugováním 5 min při 4°C a 500 g. K peletě byl přidán 1 ml roztoku „Perm/Fix“ (0,25 ml 4x koncentrovaného „Fix/Perm pufru“ a 0,75 ml ředícího pufru) a suspenze byly permeabilizovány a fixovány po dobu 45 min při 4°C. Vzorky byly dvakrát promyty přidáním 2 ml „Perm/Wash“ roztoku (5x ředěného „Perm/Wash pracovního roztoku“) a centrifugováním 5 min při 4°C a 500 g. Po odstranění supernatantu bylo k suspenzím přidáno 200  $\mu\text{l}$  „Perm/Wash“ a suspenze byla rozdělena do dvou zkumavek pro průtokovou cytometrii. Do jedné sady zkumavek bylo přidáno 35  $\mu\text{l}$  Th1/Th2 premixu obsahujícího protilátky proti transkripčním faktorům a cytokinům charakteristických pro Th1/Th2 a do druhé sady 25,5  $\mu\text{l}$  premixu obsahujícího protilátky proti transkripčním

faktorům a cytokinům charakteristickým pro Th17/Treg dle **Tabulky 4** a suspenze byly inkubovány 45 min ve tmě při 4°C. Suspenze byly dvakrát promyty „Perm/Wash“ roztokem, k peletě bylo přidáno 100 µl PBS obsahujícího 0,5% BSA a vzorky byly ihned změněny na průtokovém cytometru

### **3.1.10 Imunoenzymatické stanovení koncentrace cytokinů (ELISA)**

Metoda ELISA (enzymaticky značená imunisorbentní analýza, „enzyme - linked immunosorbent assay“) byla použita pro stanovení koncentrace cytokinů v supernatantu kultur CBMC stimulovaných po dobu 3 dní. Pro účely této práce byla zvolena přímá sendvičová ELISA. Byly použity sekundární biotinylované protilátky, jako funkční enzym křenová peroxidáza vázaná na streptavidinu a jako substrát peroxidázy byl použit 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB).

Na destičku byla navázána primární monoklonální protilátka anti - human IL-X po 75 µl na jamku, ředěná v PBS dle údajů od výrobce. Destička byla inkubována přes noc při pokojové teplotě.

Druhý den byla destička 3x promyta PBS s 0,05% Tween. Na destičku bylo naneseno 150 µl blokovacího roztoku, případě IL-10 ředícího roztoku, a byla inkubována 1 hod při laboratorní teplotě. Následně byla destička 3x promyta PBS s 0,05% Tween. Byly naředěny vzorky supernatantů buněčných kultur pro nanesení na destičku, 2x ředěné supernatanty v TBS (Trisem pufovaný fyziologický roztok, „Tris buffered saline“)/ ředícím roztoku pro IL-10. Standardy byly naředěny dle údajů od výrobce. Vzorky byly na destičky naneseny v dubletu po 50 µl. Destička byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě a přes noc uložena do lednice.

Následující den byla destička 3x promyta PBS s 0,05% Tween. Na destičku byla nanesena sekundární biotinylovaná protilátka ředěná v TBS/ ředícím roztoku pro IL-10 dle údajů od výrobce. Deska byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě a 3x promyta PBS s 0,05% Tween. Na destičku byl nanesen 1000x ředěný streptavidin značený křenovou peroxidázou v TBS po 50 µl na jamku. Destička byla inkubována 20 min při pokojové teplotě 3x promyta PBS s 0,05% Tween. Vyvolávací roztok byl připraven z 3 ml citrátového pufru, 3 ml roztoku TMB a 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na jednu desku. Na desku bylo naneseno po 50 µl vyvolávacího roztoku. Inkubace probíhala v temnu. Reakce byla zastavena 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Optická denzita byla změřena při 450 nm a pomocí kalibrační křivky byla odečtena koncentrace cytokinů.

## **3.2 Použitý materiál**

### **3.2.1 Použité roztoky**

#### **Blokovací roztok pro ELISA**

5% sacharóza, 1% BSA v PBS

#### **Citrátový pufr**

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

#### **Pufrovaný fyziologický roztok (PBS)**

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

#### **Roztok TMB**

7,96 M tetramethylbenzidin (TMB), 3,5 M dimethylformamid (DMF)

#### **Ředící roztok pro ELISA (TBS)**

20 mM Trisma, 150 mM NaCl v H<sub>2</sub>O, pH 7,3, 0,1% BSA, 0,05% Tween

#### **Ředící roztok pro ELISA (Duoset 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

#### **Suplementace media RPMI 1640 pro buněčné kultury**

2 mM HEPES, 2 mM glutamin, 5% FTS (fetální telecí sérum) Cambrex, 40 mg/ml gentamycin

#### **Türckův roztok**

Komerční směs 5x ředěná v destilované vodě

### **3.2.2 Použité chemikálie**

#### **ArdeyPharm, Německo**

Kmen *Escherichia coli* Nissle 1917

#### **Applied Biosystems, USA**

TaqMan Universal PCR MasterMix, specifické sondy pro PCR TaqMan Gene Expression Assayes

**BD Biosciences, USA**

LAC („Leucocyte activation cocktail“)

**Cambrex, USA**

FTS

**Dyntec spol. s.r.o., Česká republika**

Colinfant Newborn

**Immunotech Inc., USA**

Streptavidin s navázanou křenovou peroxidázou

**Lachema, Česká republika**

Citronan sodný

**Lékárna Všeobecné fakultní nemocnice**

75% ethanol

**Penta, Česká republika**

NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

**Pharmaceuticals dd, Slovinsko**

Gentamycin

**Qiagen, Německo**

RNase free DNase set, RNasy Mini Kit

**R&D System Inc., USA**

Primární monoklonální a sekundární biotinylované protilátky, rekombinantní cytokiny

ELISA

**SERVA, Německo**

BSA, Trisma

**Sigma - Aldrich, USA**

Histopaque ® 1077, Minimum Essential Medium, RPMI 1640, L-glutamin, β- merkaptoe-  
thanol, BSA, Tween, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HCl, TMB, DMF

**SONY Biotechnology Inc., USA**

Protilátky pro průtokovou cytometrii

**Thermo Fisher Scientific Inc., USA**

Protilátky pro průtokovou cytometrii, eBioscience™

**Vakos, Praha**

Türkûv roztok

**Zentiva v. n., Nizozemsko**

Heparin (5000 jednotek/ml)

**3.2.3 Použité komerční kity****Izolace RNA**

RNasy Mini Kit, Qiagen, Německo

**Reverzní transkripce**

High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, USA

**Intracelulární barvení pro průtokovou cytometrii**

Transcription Factor Buffer Set, BD Pharmingen, BD Biosciences, USA

**3.2.4 Použité sondy pro qPCR****Tabulka 5: Přehled sond použitých pro qPCR a jejich katalogových čísel**

Sonda	Výrobce	Katalogové číslo
ACTB		HS 99999903_m1
IFN- $\gamma$		HS 00174143_m1
IL-10	Applied Biosystems	HS 00174086_m1
IL-13		HS 00174379_m1
IL-22		HS 01574154_m1
IL-4		HS 00174122_m1

qPCR - kvalitativní polymerázová řetězová reakce, ACTB - aktin  $\beta$  (house keeping gene), IL - interleukin, IFN -  $\gamma$ - interferon  $\gamma$

### 3.2.5 Použité protilátky pro intracelulární barvení pro průtokovou cytometrii

**Tabulka 6: Přehled protilátek použitých pro intracelulární barvení pro průtokovou cytometrii, jejich výrobců, klonů a konjugátů**

Protilátka proti	Výrobce	Klon	Konjugát
CD4	SONY	OKT4	APC-Cy7
FoxP3	eBiosciences	236A/E7	FITC
GATA-3	SONY	16E10A23	PE
ROR $\gamma$ t	eBiosciences	AFKJS-9	APC
T-bet	SONY	4B10	FITC
IFN- $\gamma$	SONY	4S.B3	PerCP-Cy5.5
IL-10	SONY	JES3-9D7	PE-Cy7
IL-13	SONY	JES10-5A2	APC
IL-17A	eBiosciences	eBio64DEC17	PerCP-Cy5.5
IL-4	SONY	MP4-25D2	PE-Cy7

CD4 - diferenční skupina („cluster of differentiation“), IL - interleukin, IFN-  $\gamma$  - interferon  $\gamma$ , FoxP3 - „forkhead box P3“, ROR $\gamma$ t - „RAR-related orphan receptor gamma“, T-bet - „T-box transcription factor“, APC (allophycocyanin), APC-Cy7 (APC+ cyanin dye7), FITC (fluorescein isothiocyanate), PerCP (peridinin chlorophyll protein), PE (phycoerythrin), PE-Cy7 (PE+ cyanin dye7)

### 3.2.6 Použité protilátky pro ELISA

**Tabulka 7: Přehled protilátek použitých pro metodu ELISA a jejich katalogových čísel**

Cytokín	Výrobce	Katalogové číslo		
		Primární protilátka	Sekundární protilátka	Rekombinantní standard
IFN- $\gamma$	R&D System Inc.	MAB 2852	BAF 285	285-IL
IL-10		DY217B (duoset)		
IL-17A		DY317-05(duoset)		
IL-4		MAB 604	BAF 204	204-IL
IL-5		MAB 405	BAF 6051	205-IL
IL-6		MAB 206	BAF 206	206-IL
TGF- $\beta$		MAB 240	BAF 240	240-IL

IL - interleukin, IFN -  $\gamma$ - interferon  $\gamma$

### 3.2.7 Použitý spotřební materiál

#### ELISA destičky

F96 Maxisorp, Nunc<sup>TM</sup>, Sigma - Aldrich, USA

### **PCR destičky**

96 well Reaction Plates, Optical adhesive covers, Applied Biosystems, USA

### **Eppendorfky na reverzní transkripci**

Optical Tubes, Applied Biosystems, USA

### **Zkumavky pro průtokovou cytometrii**

FALCON 5 ml (12 x 75 mm), BD Pharmingen™ Biosciences, USA

### **3.2.8 Použité přístroje**

#### **Analytické váhy**

AB204 Mettler Toledo, Švýcarsko

#### **Automatické pipety**

Finnipette, Thermo Fischer Scientific, USA

Pipetman Classic, Concept, Gilson Inc., USA

#### **Box pro molekulární biologii**

MSC Advantage, Thermo Scientific, USA

#### **Box s laminárním prouděním**

Sentinel Gold, ESCO, Singapur

HOTTE MSC.12 STD GAZ, Jouan, Francie

#### **Centrifuga**

Micro 22R, Universal 30 RF, Universal 320R, Hettich, Německo

#### **Denzitometr**

McFarland denzitometr DEN-1, Biosan Ltd., Lotyšsko

#### **Fotometr mikrotitračních destiček**

Sunrise - Basic Tecan, Tecan Austria, GmbH, Švýcarsko

#### **Inkubátor**

ESCO CellCulture Inkubator CO<sub>2</sub>, Singapur

#### **Magnetická míchačka**

Are, VELP Scientifica, Itálie

### **Nanodrop**

NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA

### **pH metr**

pH/mV/Temp Meter PL - 600, EZDO, Taiwan

### **Promývačka**

MRW (AM 60), DYNEX Technologies, Inc., USA

### **Průtokový cytometr**

BD FACS Canto™ II Flow Cytometer, BD Biosciences, USA

### **Předvážky**

EK - 400H, A&D Company, Limited, Japonsko

### **Termální cyklér pro PCR**

7300 Realtime PCR System, Applied Biosystems, Singapur

### **Termální cyklér pro reverzní transkripci**

Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research, Inc., USA

### **Třepačka s vodní lázní**

Water bath shaker type 357, Elpan, Polsko

### **Vícekanálová pipeta**

Finnipette, Thermo Fischer Scientific, USA

### **Vortex**

Vortex Genie K – 550 - GE, Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., USA

### **3.2.9 Použitý software**

#### **Vyhodnocení hodnot výsledků ELISA**

KIM Immunochemical Processing, Daniel Kittrich, Česká republika

#### **Vyhodnocení výsledků měření koncentrace RNA**

Nanodrop 1000 V3.30, Thermo Scientific, USA

#### **Vyhodnocení výsledků PCR**

7300 System SDS Software, Applied Biosystems, Singapur

### **Vyhodnocení výsledků z průtokového cytometru**

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

FlowJo 7.6.5, FlowJo LLC, USA

### **Grafické a statistické zpracování dat**

GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., USA

## 4 Výsledky

### 4.1 Stanovení genové exprese cytokinů CBMC dětí alergických a nealergických matek metodou kvantitativní real – time PCR

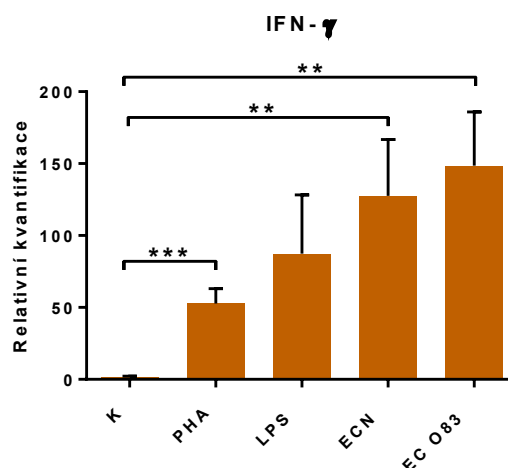
Pomocí metody qPCR byla stanovena exprese cytokinů charakteristických pro jednotlivé subpopulace T lymfocytů- Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-13), Th17 (IL-22) a Treg (IL-10). Exprese těchto genů byla normalizována pomocí  $\beta$ - aktinu (jako endogenní kontroly) a následně porovnávána exprese mezi nestimulovanou kontrolou a kulturami stimulovanými polyklonálními aktivátory (PHA, LPS) a probiotickými kmeny (ECN, EC O83). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny t- testem.

Stimulace CBMC vedla ke zvýšení exprese IFN- $\gamma$  bez ohledu na alergický stav matky. Po stimulaci PHA, ECN a EC O83 došlo k signifikantnímu zvýšení. Zvýšení exprese IFN- $\gamma$  v důsledku stimulace CBMC nespecifickým stimulem LPS signifikantní nebylo (**Obrázek 5**). U CBMC dětí zdravých matek došlo k signifikantnímu zvýšení po stimulaci buněk PHA, ECN a EC O83 a u alergických po stimulaci PHA a EC O83. Po stimulaci PHA byla signifikantně vyšší exprese IFN- $\gamma$  u dětí alergických matek (**Obrázek 6**).

Stimulace PHA, LPS, ECN i EC O83 nevedla k prakticky žádným změnám exprese IL-4 (**Obrázek 7a**). Naopak exprese IL-13 se signifikantně zvýšila po stimulaci polyklonálními stimulem (PHA, LPS) i probiotickými kmeny (**Obrázek 7b**). Obojí bez ohledu na alergický stav matek. U exprese IL-4 a IL-13 nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi dětmi zdravých a alergických matek. U buněk dětí zdravých matek došlo po stimulaci ke snížení exprese IL-4, k signifikantnímu po stimulaci buněk PHA a ECN. U CBMC dětí alergických matek došlo k velmi mírnému zvýšení exprese po stimulaci (**Obrázek 8a**). Exprese IL-13 se zvýšila, signifikantně po stimulaci PHA a ECN buněk dětí zdravých matek a u buněk dětí alergických matek po stimulaci PHA, LPS, ECN i EC O83 (**Obrázek 8b**).

Po jakékoliv stimulaci bylo pozorováno signifikantní zvýšení exprese IL-22 bez ohledu na alergický stav matky (**Obrázek 9**). Nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi IL-22 mezi CBMC dětí zdravých a alergických matek. U buněk dětí zdravých matek došlo k signifikantnímu zvýšení exprese IL-22 po stimulaci buněk PHA a ECN a u buněk dětí alergických matek navíc i po stimulaci EC O83 (**Obrázek 10**).

Bez ohledu na alergický stav matky vedla stimulace ECN a EC O83 k signifikantnímu zvýšení exprese IL-10, u LPS bylo pozorováno nesignifikantní zvýšení a stimulace PHA expresi IL-10 nezměnila (**Obrázek 11**). U CBMC dětí alergických matek bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení exprese IL-10 po stimulaci EC O83 a tato exprese byla signifikantně vyšší oproti CBMC dětí zdravých matek. U buněk dětí zdravých matek došlo k signifikantnímu zvýšení exprese IL-10 po stimulaci buněk ECN a EC O83 (**Obrázek 12**).



**Obrázek 5: Obrázek 5: Genová exprese IFN-γ u CBMC.**

Genová exprese IFN-γ byla stanovena u 59 CBMC dětí bez ohledu na alergický stav matky (expresi IFN-γ CBMC stimulovaných LPS byla stanovena pouze u 9 dětí) pomocí qPCR

**K – PHA:**  $p < 0,0001$ ; **K – ECN:**  $p = 0,0024$ ; **K – EC O83:**  $p = 0,0036$

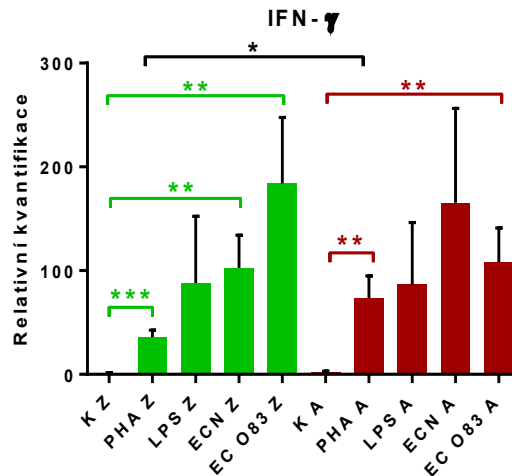
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 6: Relativní kvantifikace exprese IFN- $\gamma$  u CBMC dětí zdravých a alergických matek**

Expres byla stanovena u 32 CBMC dětí zdravých matek a 27 CBMC dětí alergických matek

**PHA Z – PHA A:**  $p = 0,0344$

**K Z – PHA Z:**  $p < 0,0001$ ; **K Z – ECN Z:**  $p = 0,0025$ ; **K Z – EC O83 Z:**  $p = 0,0036$

**K A – PHA A:**  $p = 0,0016$ ; **K A – EC O83 A:**  $p = 0,0016$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

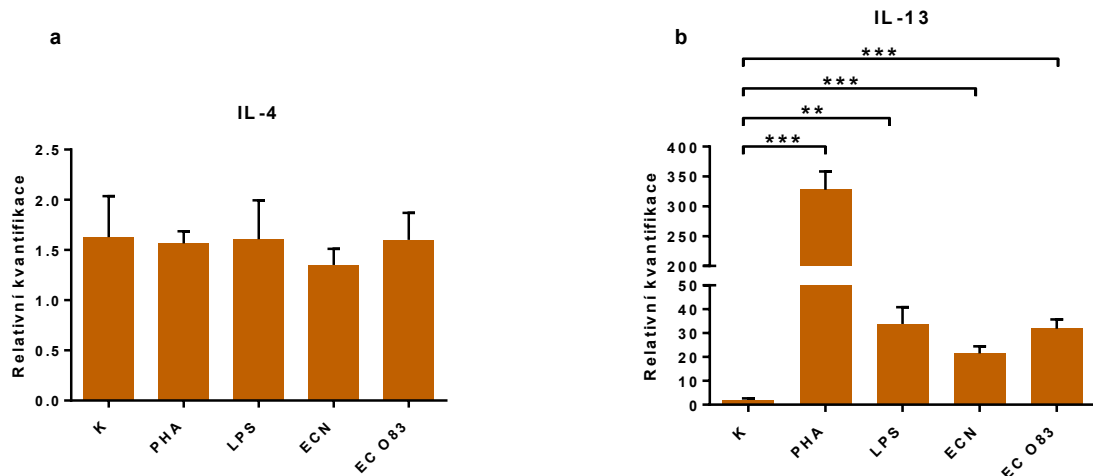
LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



### Obrázek 7: Genová exprese IL-4 a IL-13 u CBMC.

Genová exprese IL-4 byla stanovena u 57 CBMC dětí bez ohledu na alergický stav matky (exprese IL-4 CBMC stimulovaných LPS byla stanovena pouze u 9 dětí) a genová exprese IL-13 byla stanovena u 42 CBMC dětí bez ohledu na alergický stav matky (exprese IL-13 CBMC stimulovaných LPS byla stanovena pouze u 9 dětí) pomocí qPCR

#### IL-13

**K – PHA:**  $p < 0,0001$ ; **K – LPS:**  $p = 0,0013$ ; **K – ECN:**  $p < 0,0001$ ; **K – EC O83:**  $p < 0,0001$

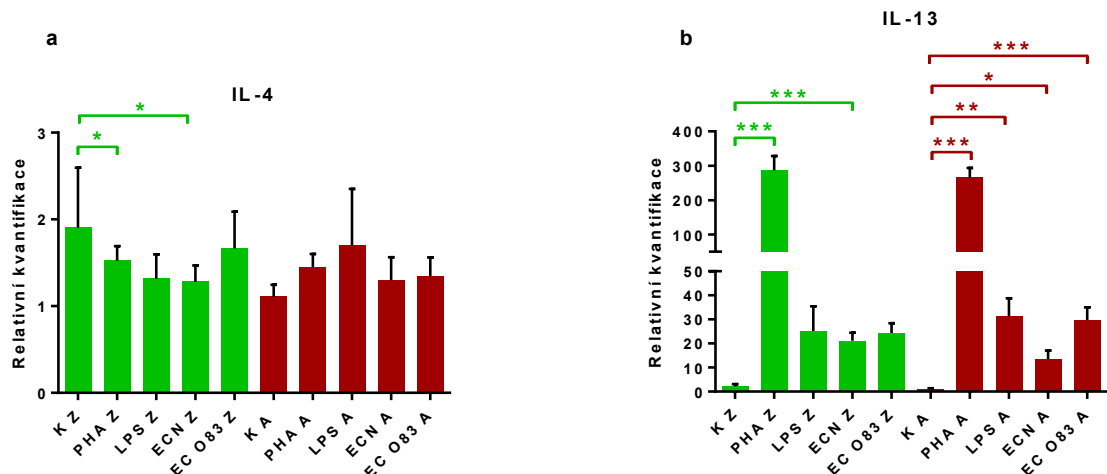
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 8: Relativní kvantifikace exprese IL-4 (a) a IL-13 (b) u CBMC dětí zdravých a alergických matek**

Expres IL-4 byla stanovena u 32 CBMC dětí zdravých matek a 25 CBMC dětí alergických matek a genová exprese IL-13 byla stanovena u 26 CBMC dětí zdravých matek a 17 CBMC dětí alergických matek pomocí qPCR

#### IL-4

K Z – PHA Z:  $p = 0,0277$ ; K Z – ECN Z:  $p = 0,0134$

#### IL-13

K Z – PHA Z:  $p < 0,0001$ ; K Z – ECN Z:  $p < 0,0001$

K A – PHA A:  $p = 0,0004$ ; K A – LPS A:  $p = 0,0049$ ; K A – ECN A:  $p = 0,0463$ ;

K A – EC O83 A:  $p < 0,0001$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

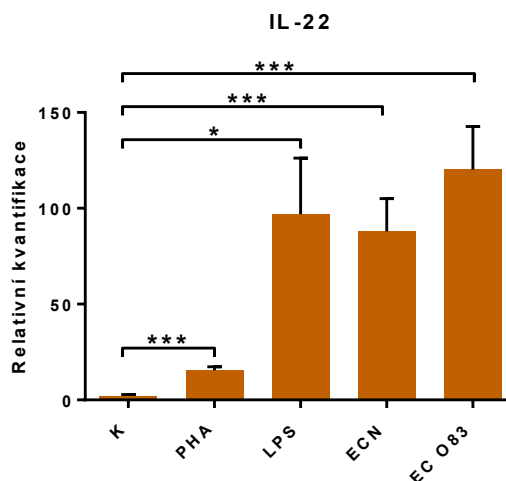
LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



### Obrázek 9: Genová exprese IL-22 u CBMC

Genová exprese IL-22 byla stanovena u 42 CBMC dětí bez ohledu na alergický stav matky (exprese IL-22 CBMC stimulovaných LPS byla stanovena pouze u 9 dětí) pomocí qPCR

**K – PHA:**  $p < 0,0001$ ; **K – LPS:**  $p = 0,0124$ ; **K – ECN:**  $p < 0,0001$ ; **K – EC O83:**  $p < 0,0001$

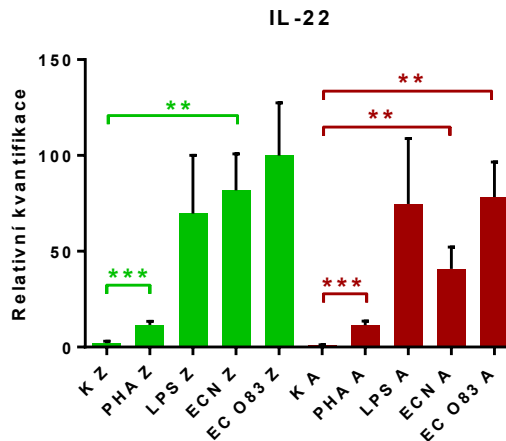
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 10: Relativní kvantifikace exprese IL-22 u CBMC dětí zdravých a alergických matek**

Expres byla stanovena u 26 CBMC dětí zdravých matek a 17 CBMC dětí alergických matek

**K Z – PHA Z:**  $p= 0,0008$ ; **K Z – ECN Z:**  $p= 0,0036$

**K A – PHA A:**  $p= 0,0004$ ; **K A – EC O83 A:**  $p= 0,0063$ ; **K A – EC O83 A:**  $p= 0,0024$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

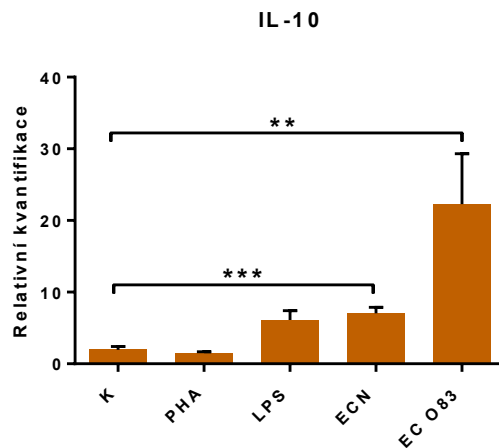
LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 11: Genová exprese IL-10 u CBMC**

Genová exprese IL-10 byla stanovena u 52 CBMC dětí bez ohledu na alergický stav matky (exprese IL-10 CBMC stimulovaných LPS byla stanovena pouze u 9 dětí) pomocí qPCR

**K – ECN:**  $p < 0,0001$ ; **K – EC O83:**  $p = 0,0021$

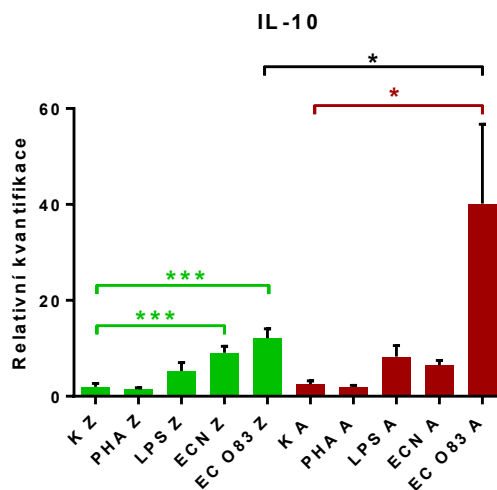
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 12: Relativní kvantifikace exprese IL-10 u CBMC dětí zdravých a alergických matek**

Expres byla stanovena u 30 CBMC dětí zdravých matek a 22 CBMC dětí alergických matek.

EC O83 Z – EC O83 A:  $p = 0,0410$

K Z – ECN Z:  $p < 0,0001$ ; K Z – EC O83 Z:  $p < 0,0001$

K A – EC O83 A:  $p = 0,0236$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## 4.2 Detekce produkce cytokinů mononukleárními buňkami pupečnickové krve dětí alergických a nealergických matek po stimulaci *in vitro* metodou průtokové cytometrie

Pomocí intracelulárního barvení a následného měření na průtokovém cytometru byly detekovány cytokiny a transkripční faktory charakteristické pro jednotlivé subpopulace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů - Th1 (IFN- $\gamma$ , T-bet), Th2 (IL-4, IL-13, GATA-3), Th17 (IL-17A, ROR $\gamma$ t) a Treg (IL-10, FoxP3). Mezi nestimulovanou kontrolou a stimulovanými kulturami bylo porovnáváno procento buněk z celé populace CD4 pozitivních (CD4<sup>+</sup>) T lymfocytů tvořících příslušný cytokin nebo transkripční faktor. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny t- testem.

Z 20 hod stimulovaných a následně intracelulárně barvených kultur byla podle **Obrázků 13 a 14** vybrána populace tvořící daný cytokin a určeno její procentuální zastoupení.

Po polyklonální stimulaci PHA došlo k signifikantnímu zvýšení produkce IFN- $\gamma$  CD4<sup>+</sup> buňkami bez ohledu na alergický stav matky. Po stimulaci probiotickými kmeny došlo k minimálním změnám zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk produkujících IFN- $\gamma$  (viz **Obrázek 15a**). Podobný trend byl pozorován i u T-bet, ale změny nejsou signifikantní (viz **Obrázek 15b**). Mezi CBMC dětí alergických a zdravých matek nebyla pozorována v případě IFN- $\gamma$  ani T-bet k žádná signifikantní změna (viz **Obrázek 16**). U dětí zdravých matek došlo k signifikantnímu zvýšení zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk produkujících IFN- $\gamma$  po stimulaci buněk PHA a ECN (**Obrázek 16a**) a k signifikantnímu zvýšení u T-bet po stimulaci EC O83. Zvýšení zastoupení buněk dětí zdravých matek tvořících Tbet po stimulaci PHA nebylo signifikantní kvůli vysoké variabilitě mezi vzorky (**Obrázek 16b**). U buněk dětí alergických matek byly pozorovány stejné trendy pro IFN- $\gamma$  i T-bet jako na **Obrázku 15**, ale bez signifikantních změn (**Obrázek 16**).

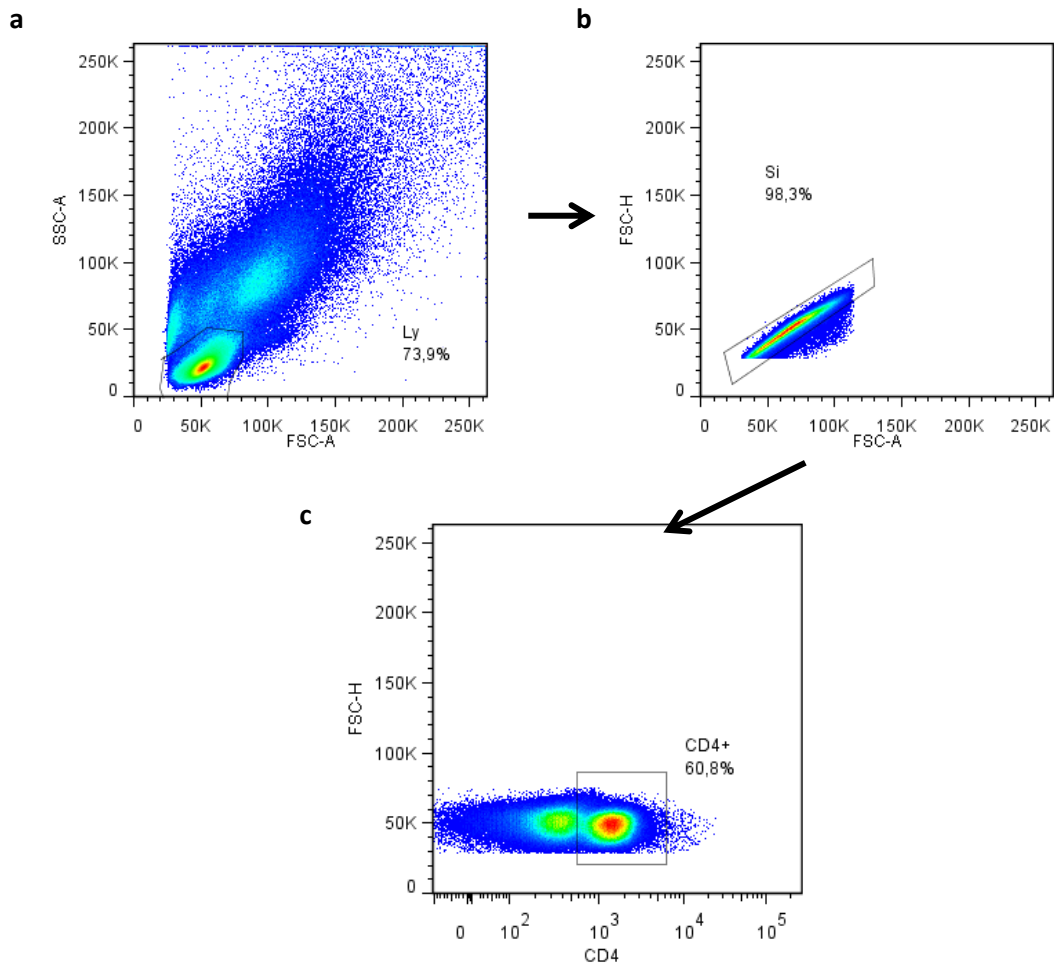
Po polyklonální stimulaci PHA došlo k signifikantnímu zvýšení produkce IL-4 CD4 pozitivními buňkami bez ohledu na alergický stav matky. Po stimulaci probiotickými kmeny došlo pouze k minimálním změnám zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk produkujících IL-4 (viz **Obrázek 17a**). Podobný trend byl pozorován i u IL-13 s tím rozdílem, že stimulace ECN vedla k mírnému snížení zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk produkujících IL-13, ale změny nejsou signifikantní (viz **Obrázek 17b**). U GATA-3 došlo k signifikantnímu zvýšení po stimulaci PHA a signifikantnímu snížení po stimulaci EC O83 (**Obrázek 17c**). Mezi CBMC dětí alergických a zdravých matek nebyly pozorovány v případě IL-4, IL-13

ani GATA-3 k žádné signifikantní změny (viz **Obrázek 18**). U dětí zdravých matek došlo k signifikantnímu zvýšení zastoupení CD4+ buněk produkujících IL-4 po stimulaci buněk PHA (**Obrázek 18a**), podobně u IL-13 ale bez signifikance (**Obrázek 18b**) a k signifikantnímu snížení u GATA-3 po stimulaci EC O83 (**Obrázek 18c**), po stimulaci probiotickými kmeny nedošlo k žádným zásadním změnám ani v jednom případě. U dětí alergických matek bylo pozorováno zvýšení zastoupení CD4+ buněk produkujících IL-4 po stimulaci PHA a ECN (**Obrázek 18a**). U GATA-3 došlo ke zvýšení po stimulaci PHA a ke snížení po stimulaci probiotickými kmeny (**Obrázek 18c**). Žádná z těchto změn ale nebyla signifikantní. U dětí alergických matek nedošlo po stimulaci ke změně zastoupení CD4+ buněk produkujících IL-13, s výjimkou stimulace buněk PHA (**Obrázek 18b**).

Po polyklonální stimulaci PHA došlo k signifikantnímu zvýšení produkce IL-10 i FoxP3 CD4+ buňkami. Po stimulaci probiotickými kmeny nedošlo ani v jednom případě skoro k žádné změně bez ohledu na alergický stav matky (viz **Obrázek 19**). Mezi CBMC dětí alergických a zdravých matek nebyla v případě IL-10 pozorována žádná signifikantní změna (viz **Obrázek 20a**). V případě FoxP3 bylo signifikantně vyšší zastoupení buněk tvořících tento transkripční faktor po stimulaci probiotickým kmenem ECN u CBMC dětí alergických matek (**Obrázek 20b**). U CBMC dětí zdravých matek nedošlo po stimulaci s výjimkou PHA k signifikantním změnám u IL-10 ani FoxP3, ve skupině dětí alergických matek se zastoupení CD4+ buněk produkujících IL-10, stejně jako buněk exprimujících FoxP3 zvýšilo. U CBMC dětí alergických matek došlo k signifikantnímu zvýšení u IL-10 i FoxP3 po stimulaci PHA. Po stimulaci buněk PHA došlo k signifikantnímu zvýšení u IL-10 i FoxP3 i u buněk dětí zdravých matek. Stimulace probiotickými kmeny u nich ale nevedla k signifikantním změnám oproti příslušným nestimulovaným kontrolám (**Obrázek 20**).

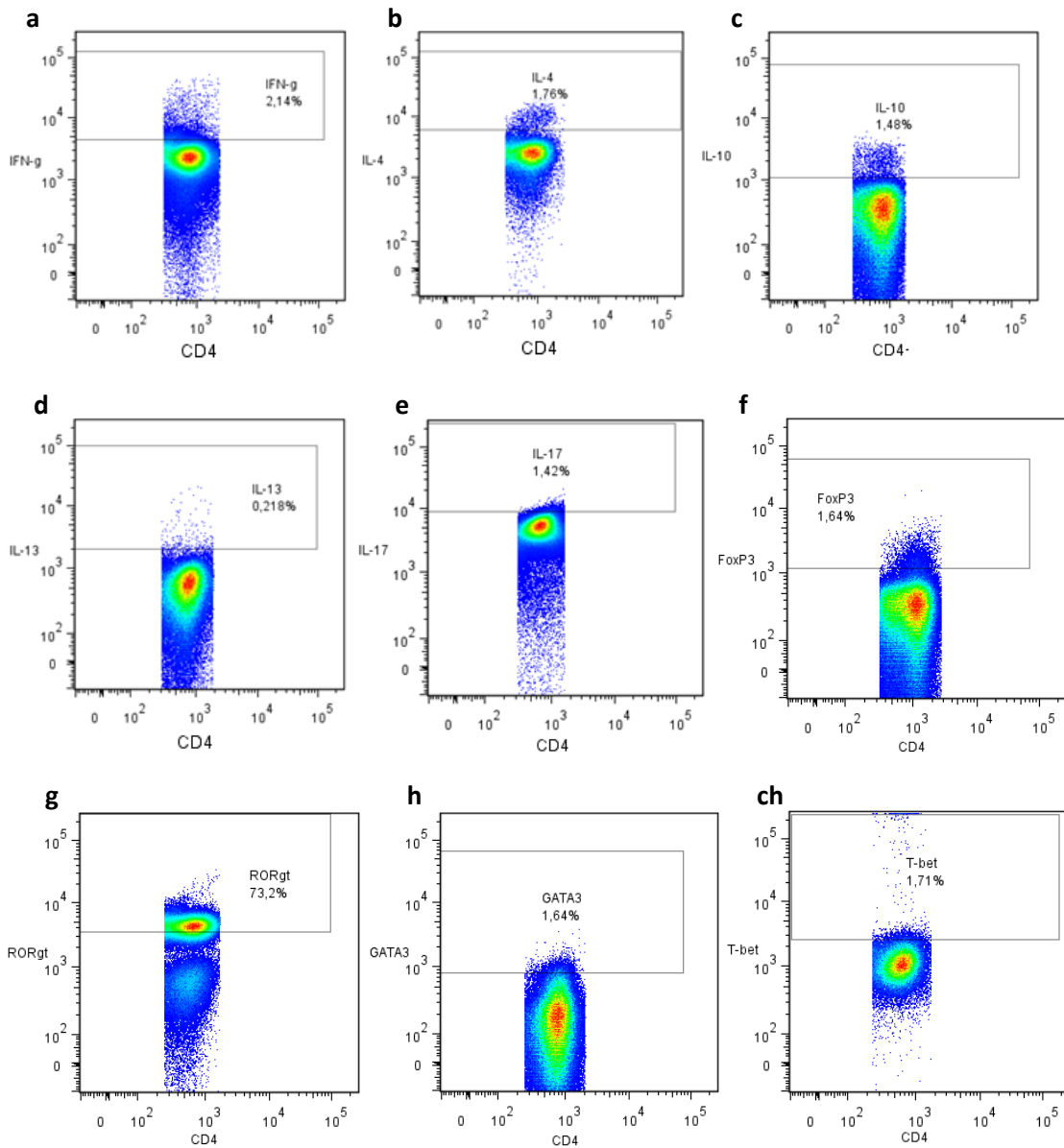
Po polyklonální stimulaci PHA došlo k signifikantnímu zvýšení zastoupení CD4+ buněk produkujících IL-17A i buněk exprimujících ROR $\gamma$ t (**Obrázek 21**). Po stimulaci probiotickými kmeny nedošlo skoro k žádné změně v případě IL-17A (viz **Obrázek 21a**) a v případě ROR $\gamma$ t vedla stimulace EC O83 k signifikantnímu snížení zastoupení CD4+ buněk exprimujících tento transkripční faktor (**Obrázek 21b**). Obojí bez ohledu na alergický stav matky. Po stimulaci ECN bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení zastoupení CD4+ buněk produkujících IL-17A u dětí alergických matek. U buněk dětí zdravých matek došlo po stimulaci ke zvýšení produkce IL-17A, ale bez signifikance. U dětí alergických

matek došlo ke zvýšení po stimulaci PHA a snížení po stimulaci EC O83. ECN neměl na IL-17A žádný efekt (viz **Obrázek 22a**). V zastoupení buněk exprimujících ROR $\gamma$ t nebyl mezi alergickou a nealergickou skupinou pozorován signifikantní rozdíl. U dětí zdravých matek došlo ke snížení zastoupení CD4<sup>+</sup> buněk exprimujících ROR $\gamma$ t. Po stimulaci buněk EC O83 bylo snížení signifikantní. U alergických došlo po stimulaci PHA k signifikantnímu zvýšení, probiotické kmeny neměly na ROR $\gamma$ t vliv (**Obrázek 22b**).



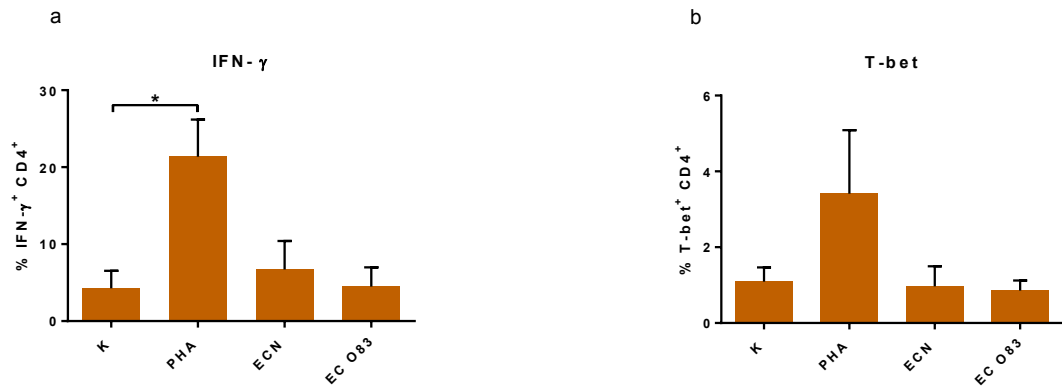
**Obrázek 13: Ilustrativní ukázka výběru CD4 pozitivní populace lymfocytů z CBMC**

Z CBMC byly vybrány lymfocyty (ly) podle velikosti (FSC-A) a podle komplexity/ granularity (SSC-A) (**a**), dále byly vybrány pouze singlety (si) (**b**) a ze singletů byla vybrána frakce CD4 pozitivních lymfocytů (CD4+) (**c**)



**Obrázek 14: Ilustrativní ukázka výběru CD4 pozitivních subpopulací lymfocytů tvořících daný cytokin nebo transkripční faktor**

Z CD4 pozitivní populace lymfocytů (vybrané podle **Obrázku 13**) byly vybírány konkrétní subpopulace tvořící daný cytokin. Byly nalezeny subpopulace CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (**a**), CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> (**b**), CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> (**c**), CD4<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> (**d**), CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> (**e**), CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (**f**), CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> (**g**), CD4<sup>+</sup>GATA-3<sup>+</sup> (**h**) a CD4<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> (**ch**)



**Obrázek 15: Procentuální zastoupení CD4 pozitivních buněk tvořících IFN- $\gamma$  (a), T-bet (b)**  
 Procentuální zastoupení obou populací bylo určeno u 9 CBMC dětí matek bez ohledu na alergický stav matky metodou průtokové cytometrie

#### IFN- $\gamma$

K – PHA:  $p = 0,0025$

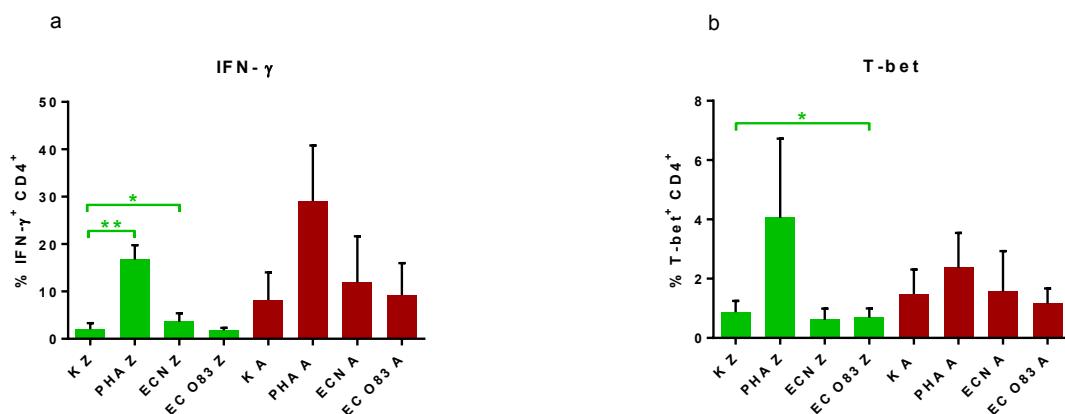
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*  $p < 0,05$



**Obrázek 16: Procentuální zastoupení CD4 pozitivních buněk tvořících IFN- $\gamma$  (a), T-bet (b)**  
 Procentuální zastoupení obou populací bylo určeno u 5 CBMC dětí zdravých matek a 4 CBMC dětí alergických matek

#### IFN- $\gamma$

K Z – PHA Z:  $p=0,0089$ ; K Z – ECN Z:  $p=0,0178$

#### T-bet

K Z – EC O83 Z:  $p=0,0271$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

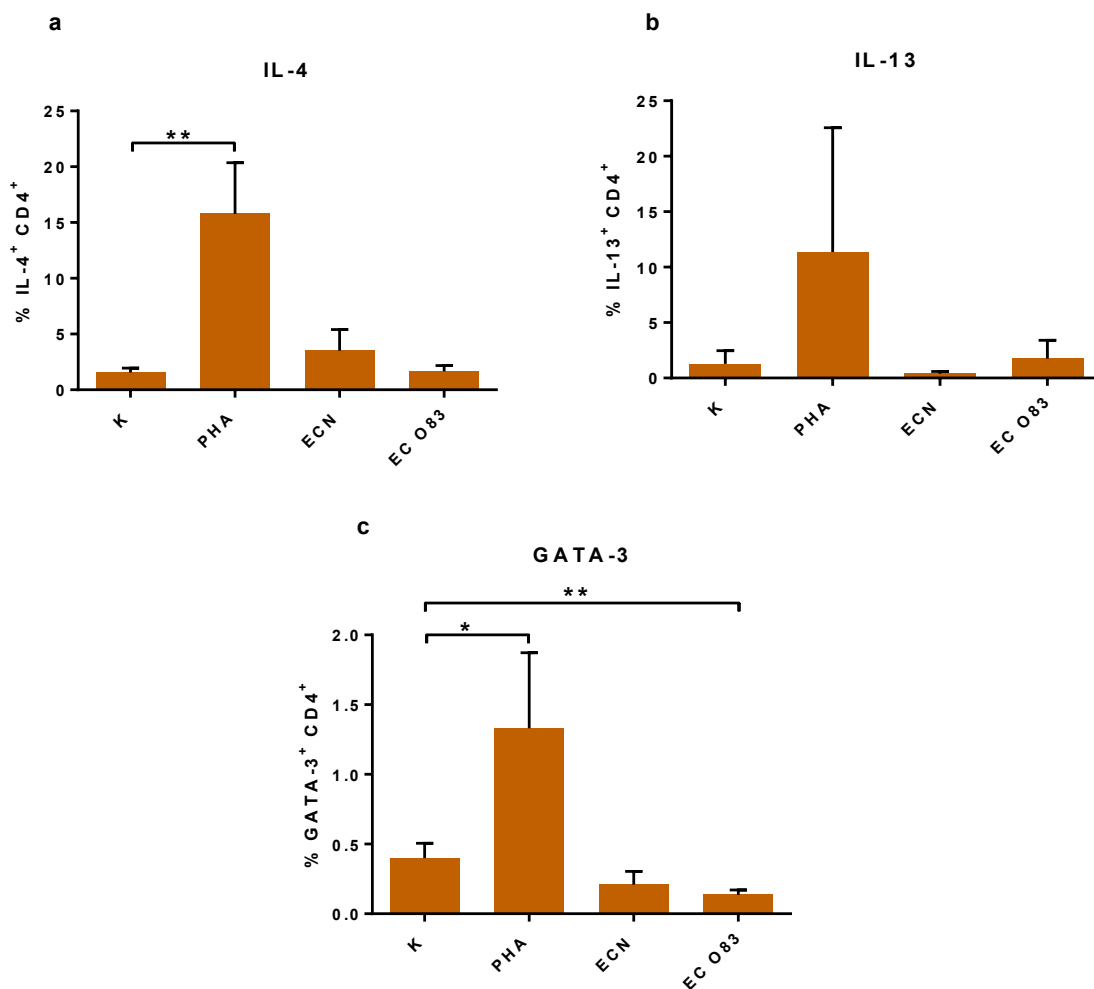
LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$



**Obrázek 17: Procentuální zastoupení CD4 pozitivních buněk tvořících IL-4 (a), IL-13 (b) a GATA-3 (c)**

Procentuální zastoupení všech tří populací bylo určeno u 9 CBMC dětí matek bez ohledu na alergický stav metodou průtokové cytometrie

#### IL-4

K – PHA:  $p = 0,0078$

#### GATA-3

K – PHA:  $p = 0,0452$ ; K – EC O83:  $p = 0,0059$

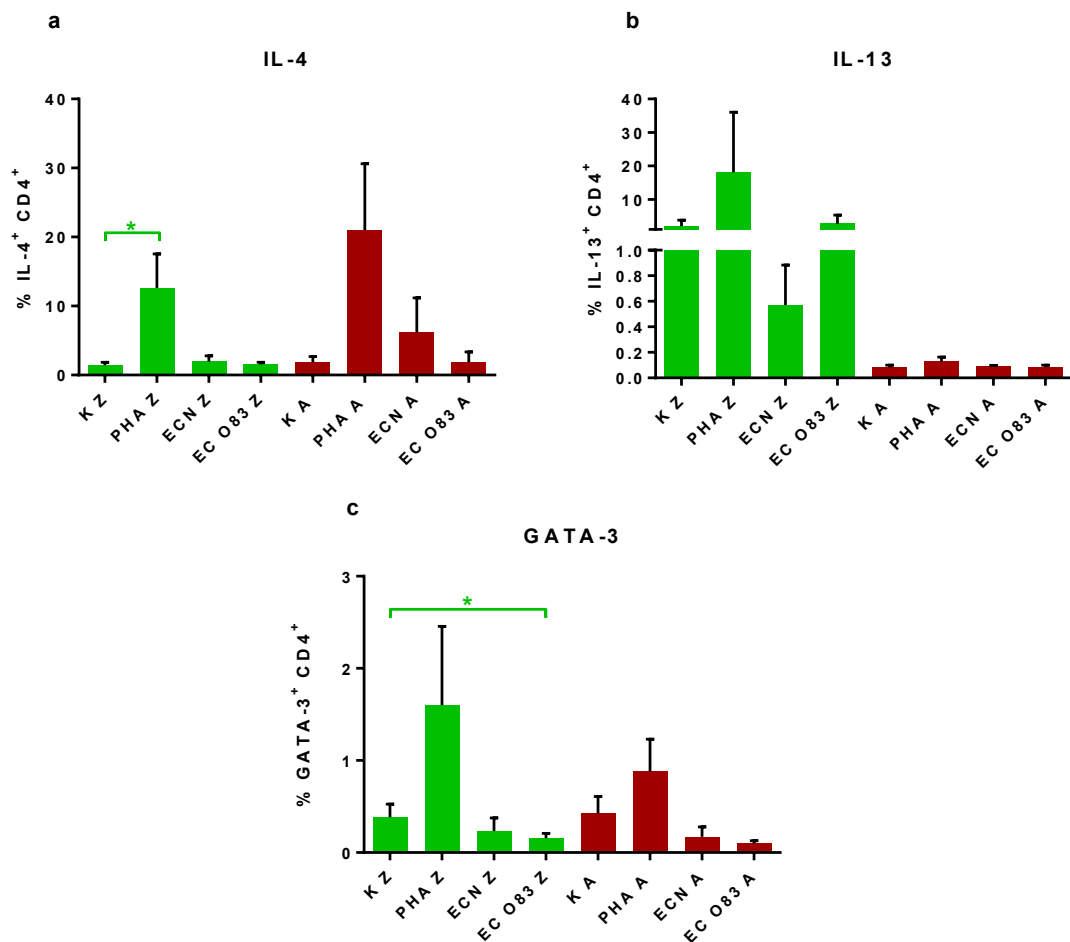
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$



**Obrázek 18: Procentuální zastoupení CD4 pozitivních buněk tvořících IL-4 (a), IL-13 (b) a GATA-3 (c)**

Procentuální zastoupení všech tří populací bylo určeno u 5 CBMC dětí zdravých matek a 4 CBMC dětí alergických matek

#### IL-4

**K Z – PHA Z:**  $p=0,0417$ ;

#### GATA-3

**K Z – EC O83 Z:**  $p=0,0388$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

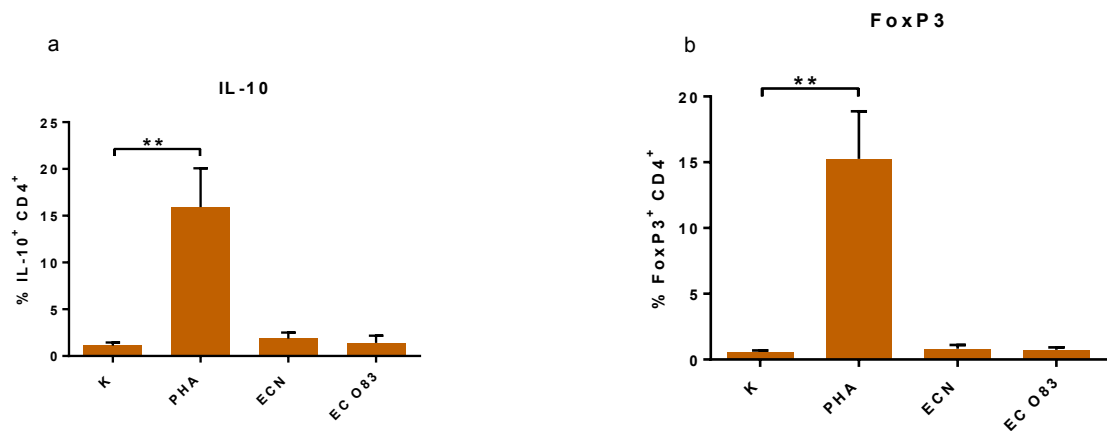
K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31  
 CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve  
 \*  $p < 0,05$



**Obrázek 19: Procentuální zastoupení CD4 pozitivních buněk tvořících IL-10 (a), FoxP3 (b)**  
 Procentuální zastoupení obou populací bylo určeno u 9 CBMC dětí matek bez ohledu na alergický stav metodou průtokové cytometrie

#### IL-10

K – PHA:  $p = 0,0039$

#### FoxP3

K – PHA:  $p = 0,0020$

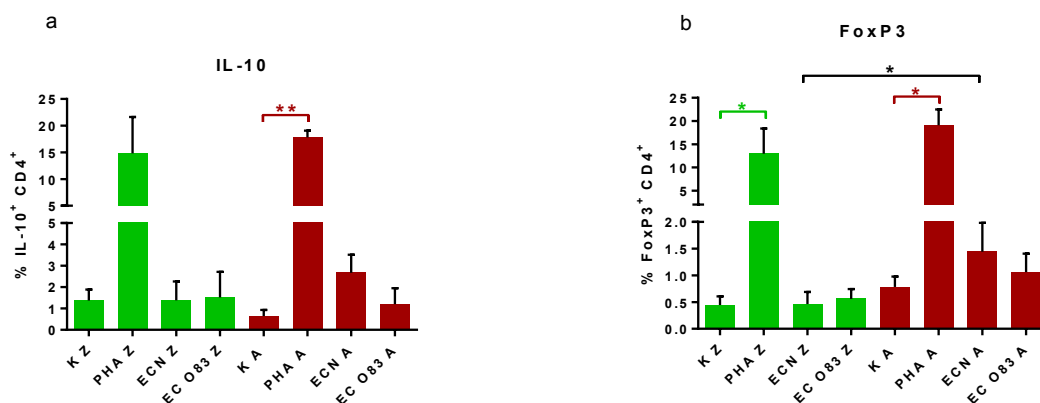
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*\*  $p < 0,01$



**Obrázek 20: Procentuální zastoupení CD4 pozitivních buněk tvořících IL-10 (a), FoxP3 (b)**  
 Procentuální zastoupení obou populací bylo určeno u 5 CBMC dětí zdravých matek a 4 CBMC dětí alergických matek

#### IL-10

**K A – PHA A:**  $p = 0,0021$

#### FoxP3

**ECN Z – ECN A:**  $p = 0,0481$

**K Z – PHA Z:**  $p = 0,0387$

**K A – PHA A:**  $p = 0,0147$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

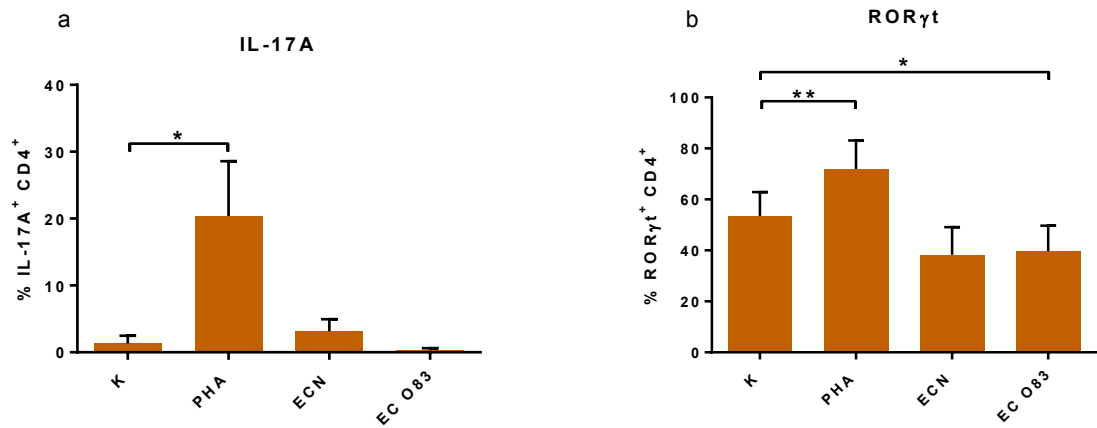
LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$



**Obrázek 21: Procentuální zastoupení CD4 pozitivních buněk tvořících IL-17A (a), RORγt (b)**

Procentuální zastoupení obou populací bylo určeno u 9 CBMC dětí matek bez ohledu na alergický stav metodou průtokové cytometrie

#### IL-17

K – PHA:  $p = 0,0179$

#### RORγt

K – PHA:  $p = 0,0029$ ; K – EC O83:  $p = 0,0389$

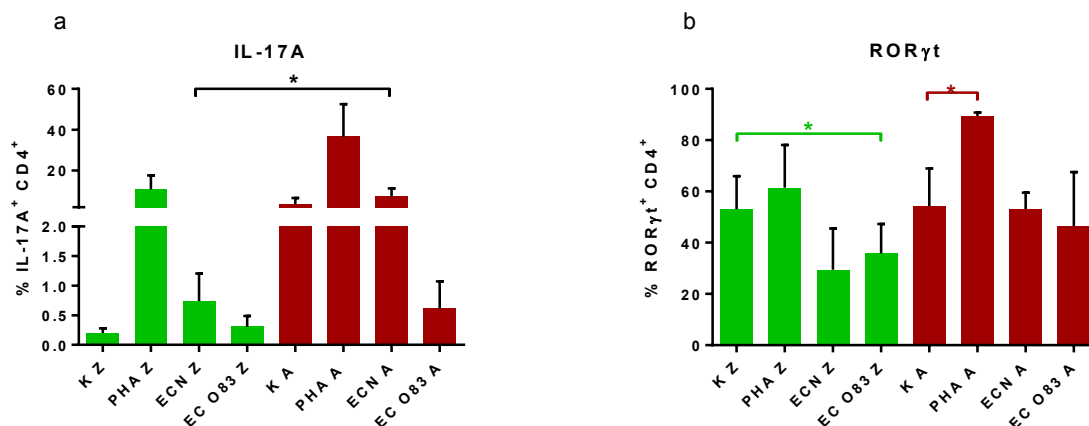
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$



**Obrázek 22: Procentuální zastoupení CD4 pozitivních buněk tvořících IL-17A (a), RORγt (b)**

Procentuální zastoupení obou populací bylo určeno u 5 CBMC dětí zdravých matek a 4 CBMC dětí alergických matek

#### IL-17A

ECN Z – ECN A:  $p = 0,0405$

#### RORγt

K Z – EC O83 Z:  $p = 0,0336$

K A – PHA A:  $p = 0,0111$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

\*  $p < 0,05$

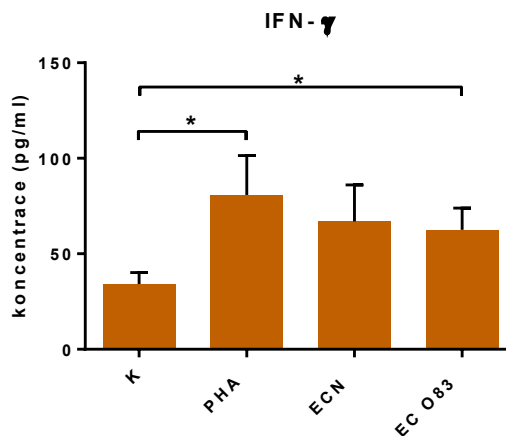
### 4.3 Měření koncentrace cytokinů v supernatantech kultur CBMC dětí alergických a nealergických matek po stimulaci *in vitro* metodou ELISA

Pomocí imunoenzymatické metody ELISA byly stanoveny koncentrace cytokinů produkovaných do supernatantu kultur. Byly vybrány cytokiny charakteristické pro jednotlivé subpopulace CD4+ T lymfocytů - Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5) a Treg (IL-10). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny Mann - Whitneyovým testem.

Po stimulaci PHA a EC O83 se signifikantně zvýšila sekrece IFN- $\gamma$  bez ohledu na alergický stav matky, stimulace ECN vedla k nesignifikantnímu zvýšení (**Obrázek 23**). Koncentrace IFN- $\gamma$  byla celkově vyšší u buněk dětí zdravých matek, po stimulaci PHA signifikantně. U CBMC dětí alergických matek jsme detekovali signifikantní zvýšení sekrece po stimulaci EC O83(**Obrázek 24**).

Po stimulaci CBMC došlo jen k mírnému, nesignifikantnímu zvýšení koncentrace IL-4 (**Obrázek 25a**), naopak koncentrace IL-5 byla po stimulaci PHA, ECN i EC O83 signifikantně zvýšena proti nestimulované kontrole (**Obrázek 25b**). Obojí bez ohledu na alergii matky. Koncentrace IL-4 byla signifikantně vyšší u CBMC dětí alergických matek. U obou skupin došlo po stimulaci jen k mírnému, nesignifikantnímu zvýšení koncentrace (**Obrázek 26a**). U IL-5 se koncentrace signifikantně mezi skupinami nelišila. U buněk dětí zdravých matek došlo k signifikantnímu zvýšení po stimulaci PHA, ECN i EC O83, u alergických po stimulaci PHA a EC O83 (**Obrázek 26b**).

Po stimulaci PHA, ECN i EC O83 se signifikantně zvýšila koncentrace IL-10 bez ohledu na alergii matky (**Obrázek 27**). Po stimulaci ECN a EC O83 byla signifikantně vyšší koncentrace IL-10 v supernatantech CBMC dětí alergických matek ve srovnání se zdravými. U obou skupin, jak CBMC dětí zdravých, tak alergických matek vedla stimulace PHA, ECN i EC O83 k signifikantnímu zvýšení koncentrace IL-10 (**Obrázek 28**).



**Obrázek 23: Koncentrace IFN- $\gamma$  v supernatantu kultur CBMC**

Koncentrace byla stanovena u 34 CBMC dětí matek bez ohledu na alergický stav metodou ELISA

**K – PHA:**  $p = 0,0426$ ; **K – EC O83:**  $p = 0,0358$

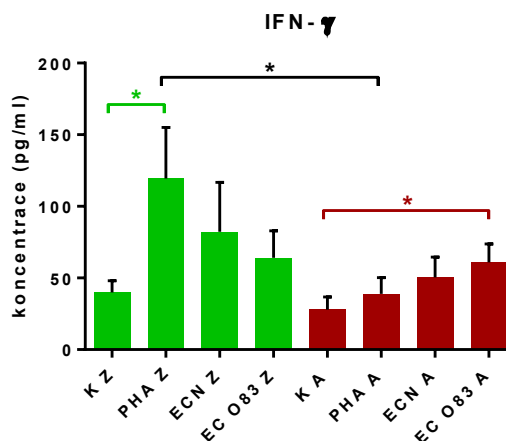
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*  $p < 0,05$



**Obrázek 24: Koncentrace IFN- $\gamma$  v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek**

Koncentrace byla stanovena u 19 CBMC dětí zdravých matek a 15 CBMC dětí alergických matek

PHA Z – PHA A:  $p= 0,0163$

K Z – PHA Z:  $p= 0,0330$

K A – EC O83 A:  $p= 0,0350$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

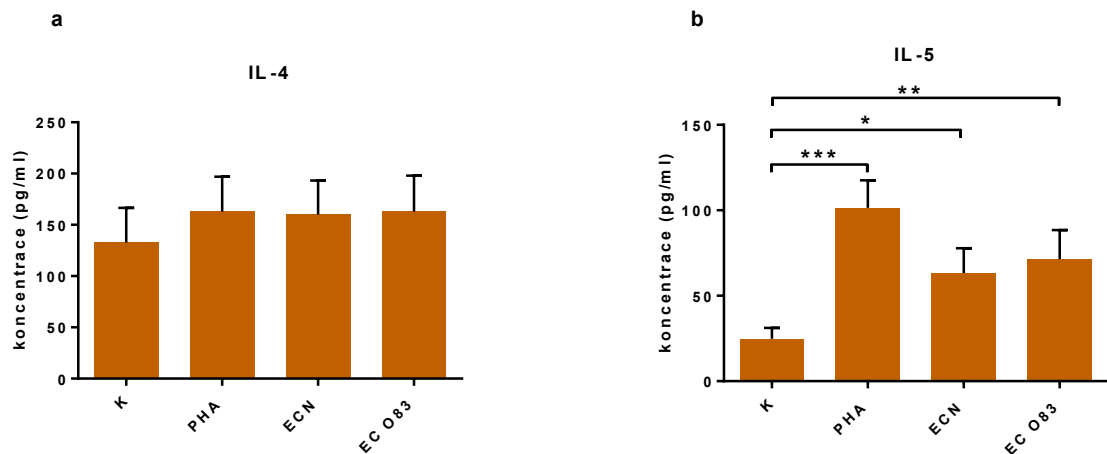
LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečníkové krve

\*  $p < 0,05$



### Obrázek 25: Koncentrace IL-4 (a) a IL-5 (b) v supernatantu kultur CBMC

Koncentrace byla stanovena u 34 CBMC dětí matek bez ohledu na alergický stav metodou ELISA

#### IL-4

K – PHA:  $p < 0,0001$ ; K – ECN:  $p = 0,0129$ ; K – EC O83:  $p = 0,0043$

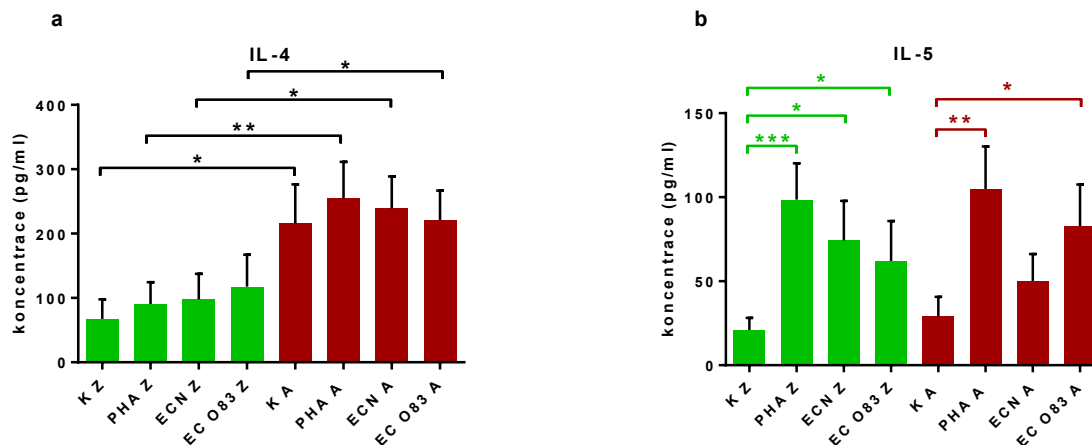
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 26: Koncentrace IL-4 (a) a IL-5 (b) v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek**

Koncentrace byla stanovena u 19 CBMC dětí zdravých matek a 15 CBMC dětí alergických matek

#### IL-4

**K Z – K A:**  $p = 0,0124$ ; **PHA Z – PHA A:**  $p = 0,0090$ ; **ECN Z – ECN A:**  $p = 0,0128$ ;

**EC O83 Z – EC O83 A:**  $p = 0,0131$

#### IL-5

**K Z – PHA Z:**  $p < 0,0001$ ; **K Z – ECN Z:**  $p = 0,0183$ ; **K Z – EC O83 Z:**  $p = 0,0225$

**K A – PHA A:**  $p = 0,0040$ ; **K A – EC O83 A:**  $p = 0,0461$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutininem (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

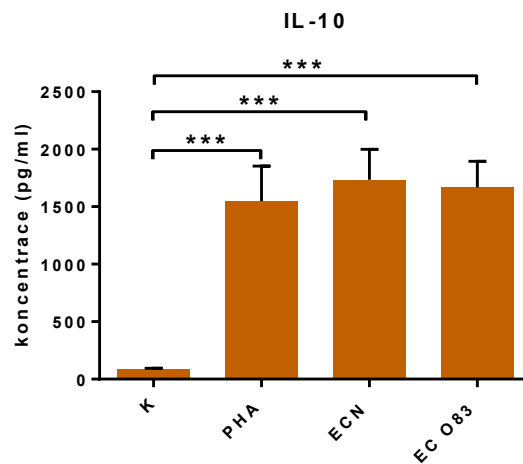
LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 27: Koncentrace IL-10 v supernatantu kultur CBMC**

Koncentrace byla stanovena u 34 CBMC dětí matek bez ohledu na alergický stav metodou ELISA

**K – PHA:**  $p < 0,0001$ ; **K – ECN:**  $p < 0,0001$ ; **K – EC O83:**  $p < 0,0001$

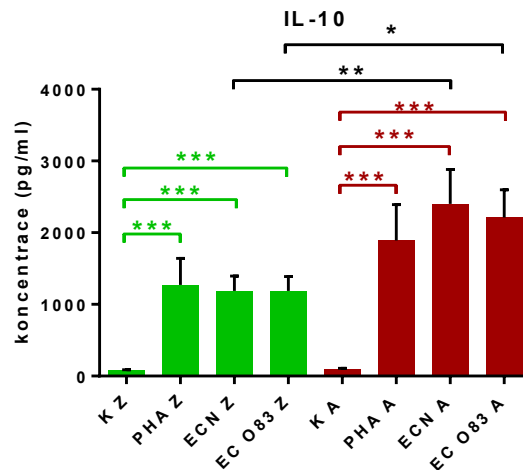
K- kontrola

PHA- phytohemagglutinin

ECN- *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83- *Escherichia coli* O83:K24:H31

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



**Obrázek 28: Koncentrace IL-10 v supernatantu kultur CBMC dětí zdravých a alergických matek**

Koncentrace byla stanovena u 19 CBMC dětí zdravých matek a 15 CBMC dětí alergických matek

ECN Z – ECN A:  $p = 0,0020$ ; EC O83 Z – EC O83 A:  $p = 0,0152$

K Z – PHA Z:  $p < 0,0001$ ; K Z – ECN Z:  $p < 0,0001$ ; K Z – EC O83 Z:  $p < 0,0001$

K A – PHA A:  $p < 0,0001$ ; K A – ECN A:  $p < 0,0001$ ; K A – EC O83 A:  $p < 0,0001$

K Z- nestimulované CBMC dětí zdravých matek

PHA Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované fytohemaglutinen (PHA)

LPS Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované lipopolysacharidem (LPS)

ECN Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN)

EC O83 Z - CBMC dětí zdravých matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EC O83)

K A - nestimulované CBMC dětí alergických matek

PHA A - CBMC dětí alergických matek stimulované fytohemaglutininem

LPS A - CBMC dětí alergických matek stimulované lipopolysacharidem

ECN A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* Nissle 1917

EC O83 A - CBMC dětí alergických matek stimulované *Escherichia coli* O83:K24:H31

CBMC – mononukleární buňky pupečnickové krve

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## 5 Diskuze

Při testování schopnosti probiotického kmene EC O83 ovlivnit genovou expresi cytokinů jsme pozorovali po stimulaci signifikantní zvýšení exprese IFN- $\gamma$  u buněk pupečníkové krve. Polyklonální stimulace PHA indukovala tvorbu IFN- $\gamma$  v CBMC, která byla vyšší u dětí alergických matek ve srovnání s dětmi zdravých matek. Rovněž EC O83 iniciuje expresi IL-10 u CBMC dětí zdravých a alergických matek. Stimulace CBMC EC O83 má pouze minimální efekt na sekreci IL-4, kdežto produkce IL-5 a IL-13 je mírně indukována. U Th2 cytokinů nejsou pozorovány rozdíly v odpovědi buněk dětí zdravých a alergických matek a efekt ECN i EC O83 je srovnatelný. Vliv stimulace EC O83 nemá signifikantní účinek na imunitní odpověď Th17. Je pozorován trend k vyšší reaktivitě buněk dětí alergických matek. Po stimulaci EC O83 se zvyšuje produkce IL-22, více u buněk dětí zdravých matek.

Efekt EC O83 na nezralý novorozenecký systém byl testován na buňkách pupečníkové krve dětí zdravých a alergických matek *in vitro*, stejně jako v případě Ghadimiho nebo Koppa, kteří pozorovali efekt gram pozitivních probiotických bakterií na CBMC (Ghadimi et al. 2008; Kopp, Goldstein, et al. 2008). Pomocí qPCR jsme byli schopni detekovat změnu genové exprese znaků charakteristických pro jednotlivé subpopulace T lymfocytů, pomocí průtokové cytometrie jsme charakterizovali tvorbu cytokinů a přítomnost transkripčních faktorů u jednotlivých subpopulací a pomocí metody ELISA byla měřena koncentrace cytokinů uvolněných po stimulaci CBMC do kultivačního media. Výsledky získané pomocí různých metod spolu v některých příkladech ne zcela korelují. Existuje mnoho post-transkripčních mechanismů, které se podílejí na přeložení mRNA na protein. Proteiny se také mohou významně lišit ve svých *in vivo* poločasech (Greenbaum et al. 2003). Příčinou odlišných trendů může být odlišná citlivost jednotlivých metod, resp. jejich princip tak i odlišné časové intervaly, zvolené tak abychom dosáhli detekce daných znaků v okamžiku jejich nejvyšší tvorby. Rozdíly v produkci cytokinů v závislosti na zvoleném intervalu nalezla ve své práci Marschan (Marschan 2007). Rovněž je třeba zdůraznit, že qPCR sleduje cytokin na úrovni mRNA a jedná se o nejcitlivější metodu. Odráží tedy časovou reakci buňky na stimulaci, ale na druhou stranu nelze prokázat, zda daná mRNA pro určitý cytokin bude následně skutečně přeložena do proteinu, který vykonává vlastní biologickou funkci. Charakterizace přítomnosti intracelulárních cytokinů a transkripčních faktorů pomocí průtokové cytometrie můžeme využít pro určení toho, jaká buňka, resp. jaká subpopulace T buněk tvoří daný cytokin. Pomocí metody ELISA získáváme informaci

o koncentraci uvolněného do supernatantu kultury. Některé znaky nebyly detekovatelné současně všemi zvolenými metodami. Adéla Dusilová ve své diplomové práci také nedosáhla jednotných výsledků, ve svém případě stimulovala CBMC alergeny (Dusilová 2013). V naší práci byly pozorovány značně odlišné výsledky získané pomocí průtokové cytometrie v porovnání s výsledky dosaženými zbylými metodami. Intracelulární produkce cytokinů byla sledována pouze v CD4+ buňkách, kdežto metodami qPCR a ELISA byly sledovány cytokiny tvořené všemi buňkami mononukleární frakce pupečnickové krve. Výsledek mohl být dále ovlivněn dodatečnou stimulací LAC, který obsahuje estery forbolu, vápenatý ionofor a inhibitor transportu bílkovin Brefeldin A (BD Pharmingen 1995).

Pomocí průtokové cytometrie nebyl pozorován žádný efekt stimulace ECN ani EC O83 na změnu proporčního zastoupení cytokinů a transkripčních faktorů charakteristických pro jednotlivé subpopulace CD4 T lymfocytů. Po 18 hod stimulaci PBMC ionomycinem, PHA i protilátkami proti CD3 a CD28 byly pomocí průtokové cytometrie zjištěny minimální změny produkce cytokinů IL-4 a IL-10 v případě práce Rostainga (Rostaing et al. 1999). Naopak Peoples po stimulaci buněk pupečnickové krve bakteriálními kmenem *E. coli* (bohužel neuvádí konkrétní použitý kmen) detekoval vyšší zastoupení CD4+ buněk tvořících IFN- $\gamma$  nebo IL-10. Ale na rozdíl od naší a Rostaingovy práce použil celou pupečnickovou krev (Peoples et al. 2009). V naší práci se trend u IL-13 lišil od výsledků ostatních cytokinů a transkripčních faktorů u CBMC dětí zdravých matek, což je v rozporu s prací Spinozziho, který pomocí průtokové cytometrie zjistil zhruba dvojnásobnou produkci IL-13 u CBMC dětí alergických matek v porovnání se zdravými po stimulaci pouze LAC (Spinozzi et al. 2001). Pokud je mi známo, není žádná práce, která by pozorovala stejný trend nebo nabízela vysvětlení, proč mohla nastat tato situace. V naší práci bylo detekováno poměrně vysoké zastoupení buněk tvořících ROR $\gamma$ t (přibližně v rozmezí 40 – 80%) v porovnání se zastoupením CD4+ buněk tvořících IL-17A (přibližně 1 – 20%). Stoppelenburg popisuje, že CBMC jsou slabý producent IL-17A, což je podle něj způsobeno nízkou expresí ROR $\gamma$ t (Stoppelenburg et al. 2014). To se liší od výsledků naší práce. V naší laboratoři bylo v rámci souběžného diplomového projektu Lenky Súkeníkové detekováno zhruba poloviční zastoupení buněk tvořících ROR $\gamma$ t v porovnání s výsledky naší práce. Pro zmíněný experiment byly použity stejné CBMC, s tím rozdílem, že výsledky jsou získané z CD4+ buněk kokultivovaných s DC připravenými *in vitro* a pro intracelulární barvení ROR $\gamma$ t byla použita jiná protilátka proti tomuto transkripčnímu faktoru

(Súkeníková et al. 2017). Je uváděno, že novorozenci mají sníženou schopnost Th17 odpovědi (de Roock et al. 2017), jiné práce tvrdí že novorozenci jsou schopni tvořit Th17 odpověď (Hygino et al. 2011).

Je velmi obtížné srovnávat účinky různých bakterií, protože jejich účinky se liší nejen v závislosti na druhu, ale i u různých kmenů jednoho druhu (van den Nieuwboer et al. 2014; Yao et al. 2010). Probiotické působení závisí na kmeni bakterie (viz **Tabulka 1**, str. 28). Proto nemohou různé výsledky různých autorů zpochybňovat naše výsledky.

IFN- $\gamma$  suprimuje Th2 populaci buněk a podporuje expanzi Th1, redukuje množství IL-4 a IL-5 a blokuje izotypový přesmyk protilátek do IgE (Teixeira et al. 2005). U atopických jedinců je množství IFN- $\gamma$  redukováno (Chung 2001; Teixeira et al. 2005). Na úrovni mRNA působí EC O83 i ECN na IFN- $\gamma$  stimulačně, efekt obou kmenů je srovnatelný. Signifikantní rozdíl mezi zdravou a alergickou skupinou je v naší práci pozorován pouze po stimulaci PHA. Na úrovni proteinu má efekt EC O83 mezi skupinami dětí alergických a zdravých matek srovnatelný, na úrovni mRNA je produkce značně stimulována u CBMC dětí zdravých matek. Stejně tak je srovnatelný efekt obou kmenů- ECN i EC O83 na produkci IFN- $\gamma$ . Kopp s Goldsteinem sledovali vliv prenatálního a postnatálního podávání probiotického kmene *Lactobacillus rhamnosus*. Vakcína byla podávána těhotným před porodem, při porodu jim byla odebrána krev a jejich novorozencům byla při porodu odebrána pupečnicková krev. Po stimulaci CBMC (novorozenců matek, kterým byl podáván probiotický kmen) a PBMC (matek) tímto kmenem pozorovali zhruba 10ti-násobný nárůst koncentrace IFN- $\gamma$  (Kopp, Goldstein, et al. 2008). Ghadimi a Pochard, kteří porovnávali kmeny bakterií mléčného kvašení a *E. coli* TG1 došli vzájemně k podobným výsledkům. Zjistili, že kmen *E. coli* TG1 indukuje u PBMC zdravých i alergických jedinců tvorbu IFN- $\gamma$ . Stejně jako v naší práci pozorovali vyšší koncentrace IFN- $\gamma$  po stimulaci buněk zdravých jedinců (Ghadimi et al. 2008; Pochard et al. 2002). Islander nepozorovala rozdíly mezi kontrolními vzorky a PBMC stimulovanými 72 hod bakteriemi *E. coli* inaktivovanými UV zářením (Islander et al. 2010). Geiger pozorovala po 3-denní stimulaci CBMC bakteriemi *E. coli* BL21 DE3 pouze nesignifikantní zvýšení produkce IFN- $\gamma$  (Geiger 2008). Nitsche, který studoval rozdílnou odpověď CBMC a PBMC po stimulaci ionomycinem a protilátkami proti CD3 a CD28 v časových intervalech od 0 do 100 hod popisuje defektní expresi T-bet u CBMC, potvrzující sníženou schopnost novorozeneckého imunitního systému indukovat Th1 odpověď (Nitsche et al. 2007). Marschan a Kukkonen nepozorují roz-

díl mezi CBMC dětí zdravých a alergických matek po 3-denní stimulaci PHA. V jejich práci nebyla uvedena informace o způsobu porodu, což by mohlo mít vliv na výsledek. V Lyho studii pozorovali odlišnou odpověď na stimulaci v závislosti na způsobu porodu (Ly et al. 2006; Marschan et al. 2008). Nízké hladiny IFN- $\gamma$  produkované po stimulaci CBMC nebo PBMC dětí s pozitivní rodinnou anamnézou byly čteně popisovány a to pravděpodobně vysvětluje, proč jsou hladiny IFN- $\gamma$  nižší u dětí alergických matek (Marschan 2007; Rinas, Horneff, a Wahn 1993; Warner et al. 2000). Novorozenci mají převahu Th2 a proto je důležité časně postnatálně indukovat Th1, kterou podporuje stimulace právě EC O83. Opožděné vyžívání imunitního systému spojené s delší predominancí Th2 vede ke snazšímu rozvoji alergických onemocnění (S. L. Prescott 2003).

IL-4 podporuje diferenciaci, proliferaci a přežívání Th2 buněk. Vyvolává izotypový přesmyk k IgE a jeho sekreci a zvyšuje expresi Fc $\epsilon$ RI i II (Steinke a Borish 2001). Indukuje hypersekreci hlenu, migraci do míst zánětu a napomáhá remodelaci tkáně (Gour a Wills - Karp 2015; Steinke a Borish 2001). IL-5 navozuje konečnou fázi diferenciaci B buněk a podporuje sekreci protilátek. Zajišťuje proliferaci a diferenciaci eosinofilů (Greenfeder et al. 2001; Kouro a Takatsu 2009). IL-13 je „centrálním mediátorem alergie“. Zprostředkovává efektorovou fázi a zahajuje manifestaci alergie- tvorbu hlenu, subepiteliální fibrózu a změny hladké svaloviny. Podporuje migraci eosinofilů, aktivaci makrofágů a zvýšení permeability tkáně (Gour a Wills - Karp 2015; Ingram a Kraft 2017). V naší práci byla produkce IL-4 na úrovni mRNA mírně inhibována u stimulovaných CBMC. Efekt ECN i EC O83 je srovnatelný. Podle Nitscheho studie, který sledoval cytokiny pomocí PCR, měly Th2 cytokiny stimulované protilátkami proti CD3 a CD28 vrchol produkce po 2 – 6 hod a IL-4 byl produkován ve velmi nízkých hladinách (Nitsche et al. 2007). Na úrovni proteinu byl IL-4 mírně indukován bez rozdílu mezi ECN a EC O83. U dětí alergických matek byla pozorována signifikantně vyšší reaktivita, což se shoduje s předchozími pracemi naší laboratoře, kdy byly zjištěny vyšší IL-4 v séru pupečnickové krve i u nestimulovaných CBMC dětí alergických matek (Hrdý et al. 2010; Prokešová et al. 2006; Žižka et al. 2007). Produkce IL-5 a IL-13 byla v naší práci srovnatelná po stimulaci EC O83 i ECN a v obou případech bez rozdílu mezi dětmi zdravých a alergických matek. Stejně jako v předchozí práci naší laboratoře bylo po stimulaci PHA v CBMC detekováno obrovské zvýšení produkce IL-13, avšak bez rozdílu mezi dětmi alergických a zdravých matek (Hrdý et al. 2017). Dle Spinozziho, který stimuloval CBMC 8 hod, z toho 3 hod

s LAC, a další práce z naší laboratoře, kdy bylo použito sérum pupečnickové krve, byla hladina IL-13 vyšší u dětí alergických matek (Hrdý et al. 2010; Spinozzi et al. 2001). Ve studii Koppa a Goldsteina, nebyl pozorován žádný efekt stimulace PBMC i CBMC kmenem *Lactobacillus rhamnosus* na produkci IL-13 (Kopp, Goldstein, et al. 2008). Svensson popisuje, že po stimulaci CBMC bakteriemi (*E. coli* izolované ze stolic švédských dětí) po dobu 48 hod nedošlo k inhibici produkce IL-13 CD4+ buňkami (Svensson et al. 2012). Dle studie Schauba a Höpplera se produkce IL-5 po 3-denní stimulaci PHA nelišila mezi alergickými a nealergickými (Schaub et al. 2009). Naopak Marschan a Kukkonen pozorovali, že po 3-denní stimulaci PHA byly IL-5, IL-13 i GATA-3 exprimované více u pro alergii predisponovaných dětí (Marschan et al. 2008). Při porovnání stimulace PBMC kmeny *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *E. coli* TG1, došlo ve všech třech případech ke srovnatelné, mírné indukci IL-5 (Ghadimi et al. 2008). V práci Geigerové došlo po stimulaci CBMC *E. coli* BL21 DE3 k mnohanásobnému zvýšení produkce IL-5, vyššímu v porovnání s gram pozitivními kmeny bakterií (Geiger 2008). Marschan a Kukkonen ve své práci uvádějí, že ektopická exprese GATA-3 je dostačující pro expresi IL-5, ale nikoliv pro IL-4. Ve své práci nepozorují korelaci mezi IL-4 s ostatními cytokiny, naopak popisují pozitivní korelaci mezi expresí IL-5 a IL-13 s expresí GATA-3. Toto tvrzení se tedy nabízí jako vysvětlení rozdílných výsledků pro jednotlivé Th2 cytokiny (Marschan et al. 2008). V naší práci byla produkce GATA-3 stimulací EC O83 i ECN inhibována na rozdíl od IL-13 a IL-5, ale efekt nelze zcela porovnat, protože GATA-3 byla sledována pouze pomocí průtokové cytometrie, protože předběžná (nepublikovaná) data neukazovaly rozdílnou expresi GATA-3 po stimulaci probiotickými kmeny. Stimulace buněk bakteriemi EC O83 zásadním způsobem neovlivňuje Th2 odpověď a tím pravděpodobně nepodporuje další posílení Th2 reaktivity.

IL-17A spolu s IL-22 je produkován Th17 buňkami. Ve střevě může IL-22 podobně jako IL-10 napomáhat přežívání epiteliálních buněk a podporovat tak střevní homeostázu (Nikoopour, Bellemore, a Singh 2015). Role IL-17A i IL-22 v patologii alergie není zcela jasná. U astmatiků se pozoruje zvýšené množství mRNA pro IL-17A, působení IL-17A potencuje alergický zánět a jeho množství koreluje se závažností astmatu. Není ale zjištěno, zda je IL-17A produkován v důsledku alergické reaktivity jedince. IL-22 má roli spíše protektivní a podporuje regeneraci a pravděpodobně má na kůži a ve střevě jiný efekt, protože se zjistilo, že množství IL-22 koreluje se závažností (Oboki et al. 2008; Souwer et al.

2010; Wang a Liu 2008). V naší práci stimulace EC O83 indukuje IL-22. EC O83 stimuluje lépe než ECN a CBMC dětí zdravých matek jsou celkově reaktivnější než dětí matek alergických. Farfariello porovnával hladiny mRNA izolované z nestimulovaných PBMC alergických a zdravých jedinců. U alergických jedinců pozoroval signifikantně vyšší hladiny mRNA pro IL-22, množství korelovalo se závažností onemocnění. U astmatických jedinců nebyli schopni detekovat mRNA pro IL-17A, ale pozorovali mírně zvýšenou expresi ROR $\gamma$ t u alergických jedinců (Farfariello et al. 2011). Lenka Súkeníková ve své diplomové práci viděla signifikantně vyšší reaktivitu CBMC dětí alergických matek a mírné zvýšení produkce IL-22 CD4<sup>+</sup> buňkami kokultivovanými s DC připravenými *in vitro* (Súkeníková et al. 2017). IL-22 byl studován také v souvislosti s pre-eklampsií (Bersani et al. 2015). Tím, že je indukována produkce IL-22, mohla by stimulace EC O83 posilovat střevní homeostázu.

Treg a jimi produkovaný IL-10 chrání organismus před rozvojem alergie (IL-10 působí imunosupresivně, inducibilní Treg nesou na svém povrchu inhibiční receptory (Taylor et al. 2006)), ale při rozvinuté alergii je jejich funkce narušena. Během specifické alergenové terapie indukuje IL-10 aktivaci Treg a tím specifickou anergii buněk rozeznávajících daný alergen (Hawrylowicz 2005; Chung 2001). V naší práci EC O83 indukuje IL-10, v porovnání s ECN je na úrovni mRNA silnějším induktorem, na úrovni proteinů srovnatelným. Pomocí PCR bylo zjištěno, že se reaktivita CBMC liší mezi dětmi zdravých a alergických pouze v reakci na stimulaci EC O83, kdy je vyšší u CBMC dětí alergických matek, což poukazuje na vyšší reaktivitu CBMC dětí alergických matek. Pomocí ELISA byla potvrzena celkově vyšší reaktivita CBMC dětí alergických matek. Meng pozoroval Treg buňky z PBMC a CBMC zdravých a alergických jedinců po 3-denní stimulaci s peptidoglykanem nebo lipopolysacharidem A. Množství IL-10 i FoxP3 je u alergických jedinců nebo jedinců s pozitivní rodinou anamnézou redukováno (Meng et al. 2016). V naší laboratoři bylo naopak pozorováno vyšší množství IL-10 v séru pupečnickové krvi u dětí alergických matek a tento výsledek si vysvětlujeme jako možný kompenzační mechanismus jedinců, u kterých hrozí rozvoj alergie (Žižka et al. 2007), ale je třeba vzít v úvahu, že IL-10 může být maternálního původu. V Donkorově práci stimulovala *E. coli* nižší hladiny IL-10 než gram pozitivní bakterie. Po stimulaci buněk došlo ke zvýšení počtu FoxP3 pozitivních buněk (Donkor et al. 2012). Geiger naopak zjistila, že po stimulaci CBMC bakteriálními kmeny došlo k 8-násobnému zvýšení koncentrace IL-10 a *E. coli* stimulovala lépe

než gram pozitivní bakterie (Geiger 2008). Vliv jednotlivých kmenů se navzájem liší. Ashraf při studování působení bakterií mléčného kvašení a probiotických kmenů na PBMC, pozoroval po stimulaci PBMC gram pozitivními bakteriemi až 500-násobné zvýšení koncentrace, efekt jednotlivých kmenů byl ale odlišný (Ashraf et al. 2014). Kopp a Goldstein pozorovali zvýšenou produkci IL-10 po stimulaci CBMC kmenem *Lactobacillus rhamnosus* (Kopp, Goldstein, et al. 2008). Pokud bychom vycházeli z toho předpokladu, je možné, že by stimulace buněk mohla tento kompenzační mechanismus ještě posilovat.

EC O83 podporuje Th1 (IFN- $\gamma$ ) imunitní odpověď, čímž přispívá k vyžívání imunitního systému novorozenců. Obecně se dá říci, že CBMC dětí alergických matek jsou reaktivnější a po stimulaci exprimují vyšší hodnoty všech námi sledovaných znaků. Velmi zajímavým zjištěním je schopnost EC O83 podporovat tvorbu imunoregulačního cytokinu IL-10, který by mohl potlačovat nepřiměřenou odpověď imunitního systému novorozence po setkání s alergenem.

## 6 Závěr

Probiotický kmen *Escherichia coli* O83:K24:H31 indukuje v mononukleárních buňkách pupečnickové krve produkci IFN- $\gamma$ , cytokinu charakteristického pro Th1 imunitní odpověď. Tato schopnost EC O83 podporovat Th1 imunitní odpověď je důležitá ze zejména v kontextu nezralého novorozeneckého systému s převahou Th2, kde by tedy časné postnatální podávání probiotické vakcíny obsahující EC O83 přispívalo k vyhrávkování IS a vytvoření rovnováhy mezi Th1 a Th2 imunitní odpovědí a tím by snižovalo riziko pozdějšího vzniku alergie u predisponovaných jedinců.

Schopnost EC O83 zvyšovat tvorbu IL-22 může přispívat k udržování střevní homeostáze a potlačení prozánětlivého prostředí.

Imunoregulační cytokin IL-10 byl zvýšen u buněk pupečnickové krve kokultivovaných s EC O83, což ukazuje, že EC O83 podporuje supresivní mechanismy.

U buněk dětí zdravých matek jsou po stimulaci tímto probiotickým kmenem produkovány vyšší hladiny prozánětlivých cytokinů v porovnání s buňkami dětí matek alergických. U buněk dětí alergických matek dochází po stimulaci tímto kmenem k silnější indukci regulačních cytokinů v porovnání s dětmi zdravých matek.

Efekt kmene *Escherichia coli* O83:K24:H31 na mononukleární buňky pupečnickové krve je velmi podobný s probiotickým kmenem *Escherichia coli* Nissle 1917

## 7 Literatura

- Abrahamsson, T. R. et al. 2007. "Probiotics in Prevention of IgE-Associated Eczema: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119: 1174–80.
- Agostoni, C et al. 2004. "Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition." *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 39(April): 465–73.
- Asher, Innes et al. 2004. "World Allergy Organization Guidelines for Prevention of Allergy and Allergic Asthma: Condensed Version." *International Archives of Allergy and Immunology* 135: 83–92.
- Ashraf, R. et al. 2014. "Lactic Acid Bacteria and Probiotic Organisms Induce Different Cytokine Profile and Regulatory T Cells Mechanisms." *Journal of Functional Foods* 6(January): 395–409.
- Bersani, I et al. 2015. "Interleukin-22: Biomarker of Maternal and Fetal Inflammation?" *Immunologic Research* 61(1): 4–10.
- Bettelheim, K A et al. 1974. "Spread of Escherichia Coli Colonizing Newborn Babies and Their Mothers." *The Journal of hygiene (73)*: 383–87.
- Beutler, B., and E. T. Rietschel. 2003. "Innate Immune Sensing and Its Roots: The Story of Endotoxin." *Nature reviews. Immunology* 3(February): 169–76.
- Björkstén, B. 1999. "The Intrauterine and Postnatal Environments." *The Journal of allergy and clinical immunology* 104(Table I): 1119–27.
- Blum, G, J Hacker, and R Marre. 1995. "Properties of Escherichia Coli Strains of Serotype O6." *Infection* 23(4): 234–36.
- Bradding, P. et al. 1994. "Treatment Strategies for Allergy and Asthma." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 10(march): 471–80.
- Braun - Fahrländer, C. et al. 2002. "Environmental Exposure To Endotoxin and Its Relation to Asthma in School-Age Children." *English Journal* 347(12): 869–77.
- Broide, D H., F Finkelman, B S. Bochner, and M E. Rothenberg. 2011. "Advances in Mechanisms of Asthma, Allergy, and Immunology in 2010." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127(3): 689–95.
- Çalışkan, M et al. 2013. "Rhinovirus Wheezing Illness and Genetic Risk of Childhood-Onset Asthma." *New England Journal of Medicine* 368(15): 1398–1407.

- Carroll, K N et al. 2017. "Respiratory Syncytial Virus Immunoprophylaxis in High-Risk Infants and Development of Childhood Asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139(1): 66–71.e3.
- Coca, A F., and R A. Cooke. 1923. "On the Classification of the Phenomena of Hypersensitiveness." *The Journal of Immunology* 8(3): 163–82.
- "Colinfant Newborn - DYNTEC." 2016. <http://www.dyntec.cz/katalog-vyrobku/humannileciva/colinfant-new-born>.
- "Colinfant Newborn - SÚKL." 2015. <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0053494&tab=texts>.
- D'Arena, G et al. 1998. "Flow Cytometric Characterization of Human Umbilical Cord Blood Lymphocytes: Immunophenotypic Features." *Haematologica* 83: 197–203.
- Dimitriou, H et al. 1998. "Phenotypic Characteristics of Cord Blood Hemopoietic Cells." *Leukemia research* 22: 755–58.
- Donkor, O. N. et al. 2012. "Cytokine Profile and Induction of T Helper Type 17 and Regulatory T Cells by Human Peripheral Mononuclear Cells after Microbial Exposure." *Clinical and Experimental Immunology* 167: 282–95.
- Dusilová, A. 2013. "Porovnání Tvorby Cytokinů Novorozeneckými Leukocyty Děti Zdravých a Alergických Matek."
- Fanaro, S, R Chierici, P Guerrini, and V Vigi. 2003. "Intestinal Microflora in Early Infancy: Composition and Development." *Acta paediatr Suppl* 92(1): 48–55.
- Farfariello, V et al. 2011. "IL-22 mRNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Allergic Rhinitic and Asthmatic Pediatric Patients." *Pediatric Allergy and Immunology* 22: 419–23.
- Fiocchi, A et al. 2015. "World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics." *The World Allergy Organization journal* 8: 4.
- Fuller, R, and G R. Gibson. 1998. "Probiotics and Prebiotics: Microflora Management for Improved Gut Health." *Clinical Microbiology and Infection* 4: 477–80.
- Geiger, Ch. 2008. "Effects of Allergens and Bacterial Strains on Cord Blood Mononuclear Cells -."
- Gerrard, JW et al. 1976. "Serum IgE Levels in White and Metis Communities in Saskatchewan." *Annals of Allergy* 37(2): 91–100.
- Ghadimi, D et al. 2008. "Effects of Probiotic Bacteria and Their Genomic DNA on TH1/TH2-Cytokine Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) of Healthy and Allergic Subjects." *Immunobiology* 213: 677–92.

- Gour, N, and M Wills - Karp. 2015. "IL-4 and IL-13 Signaling in Allergic Airway Disease." *Cytokine* 75(1): 68–78.
- Greenbaum, D, Ch Colangelo, K Williams, and M Gerstein. 2003. 4 Genome biology *Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing Protein Abundance and mRNA Expression Levels on a Genomic Scale. Genome Biol* 4: 117.
- Greenfeder, S et al. 2001. "Th2 Cytokines and Asthma — The Role of Interleukin-5 in Allergic Eosinophilic Disease." *Respiratory Research* 2(2): 71–79.
- Hawrylowicz, C M. 2005. "Regulatory T Cells and IL-10 in Allergic Inflammation." *The Journal of Experimental Medicine* 202(11): 1459–63.
- Hejnova, J et al. 2005. "Characterization of the Flexible Genome Complement of the Commensal Escherichia Coli Strain A0 34/86 (O83:K24:H31)." *Microbiology* 151(2005): 385–98.
- Hooper, L V, and A J Macpherson. 2010. "Immune Adaptations That Maintain Homeostasis with the Intestinal Microbiota." *Nature reviews. Immunology* 10 (March 2010): 159–69.
- Hopkins, M. J., R. Sharp, and G. T. Macfarlane. 2002. "Variation in Human Intestinal Microbiota with Age." *Digestive and Liver Disease* 34: S12–18.
- Hrdý, J, O Novotná, I Kocourková, and L Prokešová. 2017. "The Effect of the Colostral Cells on Gene Expression of Cytokines in Cord Blood Cells." *Folia Microbiologica*: 6–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28349416>.
- Hrdý, J. et al. 2010. "Cytokine Expression in Cord Blood Cells of Children of Healthy and Allergic Mothers." *Folia Microbiologica* 55(October 2005): 515–19.
- Huurre, A et al. 2008. "Impact of Maternal Atopy and Probiotic Supplementation during Pregnancy on Infant Sensitization: A Double-Blind Placebo-Controlled Study." *Clinical and Experimental Allergy* 38: 1342–48.
- Hygino, J et al. 2011. "Enhanced Th17 Phenotype in Uninfected Neonates Born from Viremic HIV-1-Infected Pregnant Women." *Journal of Clinical Immunology* 31(2): 186–94.
- Chung, F. 2001. "Anti-Inflammatory Cytokines in Asthma and Allergy: Interleukin-10, Interleukin-12, Interferon-Gamma." *Mediators of Inflammation* 10(2): 51–59.
- Incorvaia, C, G G Riario-Sforza, S Incorvaia, and F Frati. 2010. "Sublingual Immunotherapy in Allergic Asthma: Current Evidence and Needs to Meet." *Annals of Thoracic Medicine* 5(3): 128–32.
- Ingram, J L, and Monica Kraft. 2017. "IL-13 in Asthma and Allergic Disease: Asthma Phenotypes and Targeted Therapies." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130(4): 829–42.

- Islander, U et al. 2010. "Superantigenic Staphylococcus Aureus Stimulates Production of Interleukin-17 from Memory but Not Naive T Cells." *Infection and Immunity* 78(1): 381–86.
- Isolauri, E et al. 2000. "Probiotics in the Management of Atopic Eczema." *Clinical and Experimental Allergy* 30: 1604–10.
- Johansson, S G et al. 2001. "A Revised Nomenclature for Allergy. An EAACI Position Statement from the EAACI Nomenclature Task Force." *Allergy* 56(January): 813–24.
- Joint FAO/WHO Working Group. 2001. "Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria." (October): 1–34.
- . 2002. "Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food." : 1–11.
- Kalliomäki, M et al. 2001. "Probiotics in Primary Prevention of Atopic Disease: A Randomised Placebo-Controlled Trial." *The Lancet* 357: 1076–79.
- . 2003. "Probiotics and Prevention of Atopic Disease: 4-Year Follow-up of a Randomised Placebo-Controlled Trial." *Lancet* 361: 1869–71.
- Kocourková, I., R. Lodinová - Žádníková, J. Žižka, and V. Rosová. 2007. "Effect of Oral Application of a Probiotic E. Coli Strain on the Intestinal Microflora of Children of Allergic Mothers during the First Year of Life." *Folia Microbiologica* 52(2): 189–93.
- Kopp, M V, I Hennemuth, A Heinzmann, and R Urbanek. 2008. "Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Probiotics for Primary Prevention: No Clinical Effects of Lactobacillus GG Supplementation." *Pediatrics* 121: e850–56.
- Kopp, M. V., M. Goldstein, et al. 2008. "Lactobacillus GG Has in Vitro Effects on Enhanced Interleukin-10 and Interferon-?? Release of Mononuclear Cells but No in Vivo Effects in Supplemented Mothers and Their Neonates." *Clinical and Experimental Allergy* 38: 602–10.
- Kouro, T, and K Takatsu. 2009. "IL-5- and Eosinophil-Mediated Inflammation: From Discovery to Therapy." *International Immunology* 21(12): 1303–9.
- Kovarik, J, and C A Siegrist. 1998. "Immunity in Early Life." *Immunology Today* 19(4): 150–52.
- Kozáková, H et al. 2006. "Effect of Bacterial Monoassociation on Brush-Border Enzyme Activities in Ex-Germ-Free Piglets: Comparison of Commensal and Pathogenic Escherichia Coli Strains." *Microbes and Infection* 8(11): 2629–39.
- Kratěnová, J. 2016. "Systém Monitorování Zdravotního Stavů Obyvatelstva ČR ve Vztahu K Životnímu Prostředí a 15 Let Sledování Alergických Onemocnění U Děti." *Alergie* 18: 89–92.

- Kratěnová, J, K Zejglicová, M Maly, and V Filipová. 2007. "Prevalence and Risk Factors of Poor Posture in School Children in the Czech Republic." *Journal of School Health* 77(3): 131–38.
- Krejsek, J. 2004. *Klinická Imunologie*. 1. ed. Hradec Králové: Nukleus HK.
- Krejsek, J., J. Novosad, and O. Kopecký. 2003. "Microorganisms and Humans - Mutual Relationship | Společenství Mikroorganismů a Člověka." *Alergie* 5.
- Kukkonen, K et al. 2007. "Probiotics and Prebiotic Galacto-Oligosaccharides in the Prevention of Allergic Diseases: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119: 192–98.
- . 2010. "High Intestinal IgA Associated with Teduced Risk of IgE- Associated Allergic Disease." *Pediatric Allergy and Immunology* 21: 67–73.
- Lannerö, E, Magnus Wickman, Goran Pershagen, and Lennart Nordvall. 2006. "Maternal Smoking during Pregnancy Increases the Risk of Recurrent Wheezing during the First Years of Life (BAMSE)." *Respiratory Research* 7(1): 3.
- Liška, J et al. 2014. "Effect of Early Treatment of Newborns by Peroral Colonization Using Non-Pathogenic E. Coli on the Development of Their Immuno- Allergic System." *Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs* 1(2): 111–21.
- Lodinová - Žádníková, R. et al. 1991. "The Antibody Response in Breast-Fed and Non-Breast-Fed Infants after Artificial Colonization of the Intestine with Escherichia Coli O83." *Pediatric research* 29(4): 396–99.
- . 2002. "Probiotika v Pediatrii : Snížení Rizika Nosokomiálních Infekcí Perorálním Osídlením Probiotickým Kmenem E . Coli Po Narození a Jeho Vliv Na Frekvenci Opakovaných Infekcí a Alergií Po 10 a 20 Letech." *Alergie* (4): 10–14.
- . 2010. "Prevention of Allergy in Infants of Allergic Mothers by Probiotic Escherichia Coli." *International Archives of Allergy and Immunology* 153: 201–6.
- Lodinová - Žádníková, R., B Cukrowska, and H Tlaskalová-Hogenová. 2003. "Oral Administration of Probiotic Escherichia Coli after Birth Reduces Frequency of Allergies and Repeated Infections Later in Life (after 10 and 20 Years)." *International Archives of Allergy and Immunology* 131: 209–11.
- Lodinová - Žádníková, R., V Jouja, and V Wagner. 1973. "Serum Immunoglobulins and Coproantibody Formation in Infants after Artificial Intestinal Colonization with Escherichia Coli 083 and Oral Lysozyme Administration." *Pediatr Res* 7: 659–69.
- Lodinová - Žádníková, R., U Sonnenborn, and H Tlaskalová. 1998. "Probiotics and E.coli Infections in Man." *The Veterinary quarterly* 20(November): 78–81.
- Lukáš. 2008. "Synergická Modulace." *MediNews* 9: 23.

- Ly, N P et al. 2006. "Mode of Delivery and Cord Blood Cytokines: A Birth Cohort Study." *Clinical and molecular allergy : CMA* 4: 13.
- MacDonald, T T, and A Di Sabatino. 2009. "The Immunologic Basis for Gastrointestinal Food Allergy." *Current Opinion in Gastroenterology* 25(6).
- Macfarlane, S., G. T. Macfarlane, and J. H. Cummings. 2006. "Review Article: Prebiotics in the Gastrointestinal Tract." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 24(June): 701–14.
- Mañé, J. et al. 2011. "A Mixture of *Lactobacillus Plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 Enhances Systemic Immunity in Elderly Subjects. A Dose-Response, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Pilot Trial." *Nutricion Hospitalaria* 26(1): 228–35.
- Maródi, L. 2002. "Down-Regulation of Th1 Responses in Human Neonates." *Clinical and Experimental Immunology* 128: 1–2.
- Marschan, E. 2007. *Public Health Immunological Effects of Probiotic Bacteria in Prevention and Treatment of Allergic Diseases in Children*.
- . 2008. "Increased Activation of GATA-3, IL-2 and IL-5 of Cord Blood Mononuclear Cells in Infants with IgE Sensitization." *Pediatric Allergy and Immunology* 19(8): 132–39.
- Maynard, C L, Ch O Elson, Robin D Hatton, and Casey T Weaver. 2012. "Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System." *Nature* 489: 231–41.
- Mazmanian, S K., Hua Liu Cui, Arthur O. Tzianabos, and Dennis L. Kasper. 2005. "An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System." *Cell* 122: 107–18.
- Meng, S et al. 2016. "Maternal Allergic Disease History Affects Childhood Allergy Development through Impairment of Neonatal Regulatory T-Cells." *Respiratory Research* 17(218): 114.
- "Merck- BION3." 2016. <http://www.bion3.cz/img/fck/file/letak/pribalovy-letak-bion3-protect.pdf>.
- Metchnikoff, E, and P Ch Mitchell. 1907. *The Prolongation of Life: Optimistic Studies... The English Translation Edited by P. Chalmers Mitchell*. London.
- Murphy, K P. 2011. *Janeway's Immunology*. 8. ed. New York: Garland Science.
- "Mutaflor - SD Pharma." 2014. <https://www.sdpharma.cz/doc/2014/mutaflor-spc.pdf>.
- Von Mutius, E et al. 2000. "Exposure to Endotoxin or Other Bacterial Components Might Protect against the Development of Atopy." *Clinical and Experimental Allergy* 30: 1230–34.

- Neu, J. 2016. "The Microbiome during Pregnancy and Early Postnatal Life." *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 21(6): 373–79.
- Van den Nieuwboer, M. et al. 2014. "Probiotic and Synbiotic Safety in Infants under Two Years of Age." *Beneficial Microbes* 5(March): 45–60.
- Nikoopour, E, S M Bellemore, and B Singh. 2015. "IL-22, Cell Regeneration and Autoimmunity." *Cytokine* 74(1): 35–42.
- Nitsche, A et al. 2007. "Cytokine Profiles of Cord and Adult Blood Leukocytes: Differences in Expression Are due to Differences in Expression and Activation of Transcription Factors." *BMC immunology* 8: 18.
- Nolta, J A, and G M Crooks. 2005. "Hematopoietic Stem Cells." *Journal of Clinical Investigation*: 1–6.
- Novák, J. 2006. "Je Možné Zabránit Vzniku Alergického Onemocnění U Dítěte ?" *Alergie* 3: 225–30.
- Nurmatov, U, G Devereux, and A Sheikh. 2011. "Nutrients and Foods for the Primary Prevention of Asthma and Allergy: Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127(3): 724–33.
- Oboki, K, T Ohno, H Saito, and S Nakae. 2008. "Th17 and Allergy." *Allergology International* 57(2): 121–34.
- Palmer, C et al. 2007. "Development of the Human Infant Intestinal Microbiota." *PLoS Biology* 5(7): 1556–73.
- Panzner, P, and V Špičák. 2004. *Alergologie*. 1. ed. Praha: Galén.
- Pearlman, D S. 1999. "Pathophysiology of the Inflammatory Response." *The Journal of allergy and clinical immunology* 104: S132–37.
- Peña, J A, and J Versalovic. 2003. "Lactobacillus Rhamnosus GG Decreases TNF- $\alpha$  Production in Lipopolysaccharide-Activated Murine Macrophages by a Contact-Independent Mechanism." *Cellular Microbiology* 5(4): 277–85.
- Peoples, J D et al. 2009. "Neonatal Cord Blood Subsets and Cytokine Response to Bacterial Antigens." 1: 647–57.
- Petrů, V. 2012. *Dětská Alergologie*. 1. ed. Praha: Mladá fronta.
- BD Pharmingen. 1995. "Technical Data Sheet Leukocyte Activation Cocktail , with BD GolgiPlug™." *Journal Of Immunology* 188(1): 1–2.
- Van Pirquet, C. 1906. "Allergies." *Meenchen Med. Archi* 53(1457): 1934.

- Pochard, P et al. 2002. "Lactic Acid Bacteria Inhibit TH2 Cytokine Production by Mononuclear Cells from Allergic Patients." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110(4): 617–23.
- Prescott, S L. 2003. "Early Origins of Allergic Disease: A Review of Processes and Influences during Early Immune Development." *Current opinion in allergy and clinical immunology* 3: 125–32.
- Prescott, S L., and D J Martino. 2010. "Silent Mysteries: Epigenetic Paradigms Could Hold the Key to Conquering the Epidemic of Allergy and Immune Disease." *Allergy* 65: 7–15.
- Prescott, S, and R Saffery. 2011. "The Role of Epigenetic Dysregulation in the Epidemic of Allergic Disease." *Clinical Epigenetics* 2: 223–32.
- "PROBIOTICS PROVITA, S.r.o. - Bio Kult." 2017. <http://bio-kult.cz/o-bio-kultu/bio-kult/>.
- Prokešová, Ludmila et al. 2006. "Cytokine Levels in Healthy and Allergic Mothers and Their Children during the First Year of Life." *Pediatric Allergy and Immunology* 17: 175–83.
- Rautava, S, H Arvilommi, and E Isolauri. 2006. "Specific Probiotics in Enhancing Maturation of IgA Responses in Formula-Fed Infants." *Pediatric Research* 60(2): 221–24.
- Rinas, U., G. Horneff, and V. Wahn. 1993. "Interferon-  $\Gamma$  Production by Cord-Blood Mononuclear Cells Is Reduced in Newborns with a Family History of Atopic Disease and Is Independent from Cord Blood IgE levels." *Pediatric Allergy and Immunology* 4: 60–64.
- Romeo, J. et al. 2010. "Immunomodulatory Effect of Fibres, Probiotics and Synbiotics in Different Life-Stages." *Nutricion Hospitalaria* 25(3): 341–49.
- De Roock, S et al. 2017. "Defective TH17 Development in Human Neonatal T Cells Involves Reduced RORC2 mRNA Content." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132(3): 754–56.e3.
- Rostaing, L et al. 1999. "Kinetics of Intracytoplasmic Th1 and Th2 Cytokine Production Assessed by Flow Cytometry Following In Vitro Activation of Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103: 318–28.
- Sacks, G, I Sargent, and Ch Redman. 1999. "An Innate View of Human Pregnancy." *Immunology Today* 20(3): 114–19.
- Schaub, B et al. 2009. "Maternal Farm Exposure Modulates Neonatal Immune Mechanisms through Regulatory T Cells." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123.

- Sicherer, S H., and D Y M Leung. 2015. "Advances in Allergic Skin Disease, Anaphylaxis, and Hypersensitivity Reactions to Foods, Drugs, and Insects in 2014." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135(2): 357–67.
- Sinn, J. 2013. "Mechanisms of Asthma and Allergic Disease-1075. Probiotics in Infants for Prevention of Allergic Disease and Food Hypersensitivity." *World Allergy Organization Journal* 6(1): P72.
- Sonnenborn, U, and J Schulze. 2009. "The Non-Pathogenic Escherichia Coli Strain Nissle 1917 – Features of a Versatile Probiotic." *Microbial Ecology in Health and Disease* 21(June): 122–58.
- Souwer, Y, K Szegedi, M L Kapsenberg, and E C de Jong. 2010. "IL-17 and IL-22 in Atopic Allergic Disease." *Current Opinion in Immunology* 22(6): 821–26.
- Spinozzi, F et al. 2001. "CD4+IL13+ T Lymphocytes at Birth and the Development of Wheezing And/or Asthma during the 1st Year of Life." *International Archives of Allergy and Immunology* 124: 497–501.
- Stanghellini, V et al. 2010. "Gut Microbiota and Related Diseases: Clinical Features." *Internal and Emergency Medicine* 5: 57–63.
- Steinke, J W, and L Borish. 2001. "Th2 Cytokines and Asthma — Interleukin-4: Its Role in the Pathogenesis of Asthma, and Targeting It for Asthma Treatment with Interleukin-4 Receptor Antagonists." *Respiratory Research* 2(2): 66–70.
- Stoppelenburg, A J et al. 2014. "Elevated Th17 Response in Infants Undergoing Respiratory Viral Infection." *The American Journal of Pathology* 184(5): 1274–79.
- Strachan, D P. 1989. "Hay Fever, Hygiene and Household Size." *BMJ: British Medical Journal* 299(November): 1259–60.
- Strobel, S, and A M Mowat. 2006. "Oral Tolerance and Allergic Responses to Food Proteins." *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 6(3).
- Stříž, I. 2014. "Cytokiny Alergického Zánětu a Jejich Terapeutická Modulace." *Alergie* 2: 86–92.
- Súkeníková, L et al. 2017. "Different Capacity of in Vitro Generated Myeloid Dendritic Cells of Newborns of Healthy and Allergic Mothers to Respond to Probiotic Strain E. Coli O83:K24:H31." *Immunology Letters*.
- Svensson, A et al. 2012. "Enveloped Virus but Not Bacteria Block IL-13 Responses in Human Cord Blood T Cells In Vitro." *Scandinavian Journal of Immunology* 75(4): 409–18. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02676.x>.
- Špičák, V. 2006. "Prevenec Alergie." *Alergie* 3: 219–21.

- Tamburini, S, N Shen, Han Chih Wu, and Jose C Clemente. 2016. "The Microbiome in Early Life: Implications for Health Outcomes." *Nat Med* 22(7): 713–22.
- Tang, M L K, S J Lahtinen, and R J Boyle. 2010. "Probiotics and Prebiotics: Clinical Effects in Allergic Disease." *Current opinion in pediatrics* 22: 626–34.
- Taylor et al. 2006. "Mechanisms of Immune Suppression by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor-B: The Role of T Regulatory Cells." *Immunology* 117(4): 433–42.
- Taylor, A L., J A. Dunstan, and S L. Prescott. 2007. "Probiotic Supplementation for the First 6 Months of Life Fails to Reduce the Risk of Atopic Dermatitis and Increases the Risk of Allergen Sensitization in High-Risk Children: A Randomized Controlled Trial." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119: 184–91.
- Teixeira, L K, B P F Fonseca, BA Barboza, and J P B Viola. 2005. "The Role of Interferon-G on Immune and Allergic Responses." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 137–44.
- Tlaskalová - Hogenová, H., and J Městecký. 2012. "Účast Slizničního Imunitního Systému a Komensálních Bakterií V Alergii." *Alergie* 14: 124–33.
- Velilla, P A, M T Rugeles, and C A Chougnat. 2006. "Defective Antigen-Presenting Cell Function in Human Neonates." *Clin Immunol* 121(3): 251–59.
- Vince, G S., and P M. Johnson. 1996. "Is There a Th2 Bias in Human Pregnancy?" *Journal of Reproductive Immunology* 32: 101–4.
- "VSL Pharmaceuticals, Inc. - VSL#3." 2016. <https://vsl3.com/about-vsl/>.
- Wang, Y, and Y Liu. 2008. "The IL-17 Cytokine Family and Their Role in Allergic Inflammation." *Current opinion in immunology* 20(6): 697–702.
- Warner, J A, C A Jones, A C Jones, and J O Warner. 2000. "Prenatal Origins of Allergic Disease." *The Journal of allergy and clinical immunology* 105(Fig 1): S493–98.
- Wickens, K et al. 2008. "A Differential Effect of 2 Probiotics in the Prevention of Eczema and Atopy: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122: 788–94.
- Wills - Karp, M, J Santeliz, and C L Karp. 2001. "The Germless Theory of Allergic Disease: Revisiting the Hygiene Hypothesis." *Nature reviews. Immunology* 1(October): 69–75.
- Yao, T Ch, Ch J Chang, Y H Hsu, and Jing Long Huang. 2010. "Probiotics for Allergic Diseases: Realities and Myths." *Pediatric Allergy and Immunology* 21: 900–919.

- Zheng, T, J Yu, M H Oh, and Zhou Zhu. 2011. "The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma." *Allergy, Asthma and Immunology Research* 3(2): 67–73.
- Žižka, J. et al. 2007. "Perinatal Period Cytokines Related to Increased Risk of Future Allergy Development." *Folia Microbiologica* 52(5): 549–55.

Vypůjčení Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka