

Abstrakt

Bezmikróbne organizmy sú používané k štúdiu vplyvov mikrobioty po niekoľko desaťročí. Počas tohto času bolo hlásených mnoho odlišností od tzv. specific-pathogen-free (SPF) zvierat (neobsahujúcich špecifické patogény), vrátane absolútnych počtov alebo percent rôznych imunitných populácií, obrovsky zväčšeného céka takmer žiadnych germinálnych centier. Avšak mnoho kľúčových informácií o štruktúrnych a funkčných rozdieloch v ich druhotných lymfatických orgánoch je stále neobjavených. Pomocou nových mikroskopických prístupov, ako light sheet fluorescenčná mikroskopia, umožňujúca 3D vizualizáciu celých vzoriek bez nutnosti ich spracovania na sériu rezových preparátov, a mnohofarebnou cytometriou, umožňujúca vysoko kvantitatívnu charakterizáciu množstva bunkových populácií za niekoľko sekúnd, odkrytie podstatných rozdielov vyzerať byť konečne na dosah.

MHC II-EGFP *knock-in* myši model prináša výhodu fluorescenčného proteínu exprimovaného vo fyziologických historických kontextoch do oboch oblastí. Lymfatické a iné tkanivá môžu byť vizualizované mikroskopicky bez nutnosti farbenia (aj *in vivo*). Informácia o expresii MHC II na plazmatickej membráne i intracelulárne z rôznych tkanív môže byť okamžite získaná. Kombináciou MHC II-EGFP *knock-in* myšieho modelu s gnotobiologickým prístupom sa stáva vizualizácia akéhokoľvek vplyvu a jej kvantifikácia jednoduchá, vrátane precíznej identifikácie a prípravy lymfatických orgánov.

V tejto práci bol MHC II-EGFP *knock-in* myši model optimalizovaný na použitie v light sheet fluorescenčnej mikroskopii i v multiparametrickej prietokovej cytometrii. Detailná pitva rôznych tkanív umožnila analýzu jednotlivých mezenterických uzlín a Peyerových plátov v poradí, ako za sebou postupujú. Sekundárne lymfatické orgány boli porovnané medzi specific-pathogen-free a bezmikróbnymi zvieratami s použitím mikroskopických i cytometrických prístupov, pričom sa získala vizuálna aj kvantitatívna informácia o biológii bezmikróbných zvierat. Ďalšia práca bude potrebná na kvantifikáciu výsledkov z light sheet fluorescenčnej mikroskopie s pomocou analýzy na bázi neuronálnej siete. Za účelom vyhnutia sa akýmkoľvek subjektívnym chybám, nesupervizovaný algoritmus bol použitý na analýzu výsledkov z prietokovej cytometrie. Znížené absolútne počty buniek boli zistené v Peyerových plátoch, cékanom a kolickom pláte. Aj relatívne počty γ T lymfocytov boli u GF myši znížené vo všetkých pozorovaných tkanivách. Frekvencie B buniek boli relatívne zvýšené v slezine a mezenterických lymfatických uzlinách, zatiaľčo frekvencie pomocných a cytotoxických T lymfocytov boli znížené. Signifikantný nárast percenta NK buniek bol pozorovaný u plátu z céka a kolon bezmikróbných zvierat. Ďalšie bunkové typy sa taktiež významne líšili medzi bezmikróbnymi a klasickými zvieratami a/alebo pozdĺž mezenterického gradientu alebo gradientu peyerových plátov.

Táto práca je prípravou na použitie MHC II-EGFP *knock-in* modelu na detailný výskum enteromammárnej cesty prenosu baktérií s použitím gnotobiologického monokolonizovaného MHC II-EGFP myšieho modelu.

Kľúčové slová:

MHC II, Peyerov plát, mezenteriálna lymfatická uzlina, mnohoparametrica prietoková cytometria,
light sheet mikroskopia