

ABSTRAKT

Střevní mikroflóra zásadně ovlivňuje fungování lidského organismu. V okamžiku, kdy je narušena rovnováha v jejím složení, může dojít k indukci nebo prodloužení trvání relapsu již existujících chronických zánětlivých onemocnění, mezi něž patří i idiopatické střevní záněty (IBD). Mechanismus, jímž by bylo možné odlišit prospěšné mikroby od škodlivých, stále není znám. Cílem této práce bylo zkoumat interakce imunitního systému s mikroby, kteří jsou různým způsobem spojeni s patogenezi IBD.

Escherichia coli je převládajícím aerobním mikroorganismem lidského trávicího traktu. Tento druh zahrnuje nejen mikroby zapojené v indukci IBD, ale i ty které napomáhají s jejich léčbou. Pro další experimenty byly vybrány 4 kmeny *E. coli*, které mají různý vztah k patogenezi IBD: *E. coli* Nissle 1917 (EcN; je úspěšně používána při léčbě IBD), *E. coli* kmeny LF82 a p19A (patrně hrají roli při patogenezi IBD), *E. coli* kmen K6 (není používán v léčbě a není známo, že by hrál roli při patogenezi IBD).

K pokusům byly používány jak živé, tak inaktivované bakterie. Různé způsoby inaktivace bakterií (1% formaldehyd, teplo, UV záření) mohou měnit jejich antigenní strukturu, a proto jsme se zaměřili na sledování změn ve schopnosti inaktivovaných mikrobů vyvolat imunitní odpověď.

Nejprve jsme pomocí nepřímé imunoenzymatické metody (ELISA) analyzovali *E. coli*-specifické sérové IgA a IgG u pacientů s IBD a u zdravých kontrol. Různé způsoby inaktivace neměly vliv na protilátkami zprostředkovanou sérovou reaktivitu proti žádnému ze sledovaných kmenů *E. coli*. Taktéž jsme nepozorovali žádné rozdíly v protilátkové odpovědi mezi testovanými skupinami, kromě zvýšení koncentrace IgA protilátek proti patogennímu kmenu *E. coli* p19A u pacientů s IBD.

Dále jsme spolu s inaktivovanými bakteriemi kultivovali splenocyty nebo buňky izolované z mezenteriálních uzlin zdravých myší či myší s akutním střevním zánětem. Následně jsme měřili časnou aktivaci těchto buněk (exprese CD69) průtokovou cytometrií. Také jsme inaktivovanými bakteriemi stimulovali myší makrofágovou buněčnou linii (RAW 264.7) a stanovovali jsme aktivaci těchto buněk pomocí Griessovy reakce (produkce oxidu dusnatého) a průtokové cytometrie (exprese CD40). V žádném ze zmíněných pokusů nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi jednotlivými stimuly.

Vzhledem k tomu, že porušení epiteliální buněčné vrstvy je významnou součástí patogeneze IBD, sledovali jsme pomocí průtokové cytometrie, kolik střevních epitelových buněk (myší MODE-k nebo lidské Caco-2) se uvolní ze souvislé buněčné vrstvy po

čtyřhodinové kultivaci s živými bakteriemi *E. coli*. U obou buněčných linií kmen p19A uvolnil většinu buněk, zatímco kmen EcN souvislou vrstvu vůbec nenarušil. Ve všech případech byly téměř všechny uvolněné buňky buď mrtvé (Hoechst+), nebo ve stavu apoptózy (Annexin V+).

Závěrem lze shrnout, že žádný způsob inaktivace signifikantně nezměnil imunogenicitu bakterií. Vazba protilátek na probiotické i patogenní mikroby byla velice podobná u pacientů s IBD i kontrol, lišila se pouze u p19A. Při sledování buněčné odpovědi na stimulaci různými kmeny *E. coli* jsme nepozorovali žádné významné rozdíly, ovšem oba patobionti *in vitro* poškozovali vrstvu epitelu. K největšímu poškození epiteliální vrstvy během kultivace došlo za přítomnosti kmene p19A. To naznačuje, že by tento mechanismus působení kmene p19A mohl mít zásadní úlohu při vzniku a průběhu IBD.

Klíčová slova: idiopatické střevní záněty (IBD), *E. coli*, inaktivace, imunitní odpověď