

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



**Imunitná odpoveď jednotlivých subpopulácií
dendritických buniek na probiotický kmeň
E. coli O83:K24:H31**

**Immune response of different subpopulations of
dendritic cells to probiotic strain of *E. coli* O83:K24:H31**

Bc. Miroslava Gorelová

Diplomová práce

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

Praha, 2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Jiřího Hrdého, Ph.D. a že jsem uvedla veškeré použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.4.2018

.....
Miroslava Gorelová

POĎAKOVANIE

V prvom rade by som sa chcela poďakovať RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za trpezlivosť, cenné rady a obetavú pomoc. Ďalej by som sa chcela poďakovať kolektívu imunologického laboratória na 1. lekárskej fakulte UK , kde som vypracovávala svoju diplomovú prácu; za ich veľkú pomoc so spracovávaním vzoriek a pri metódach analýzy ELISA testom. Ďalej by som sa chcela poďakovať i kolegom v práci, Mgr. Michalovi Ratajovi a RNDr. Danielovi Smržovi, PhD., za ich rady a obrovskú pomoc ohľadne analýzy a výsledkov. Moje veľké ďakujem ďalej patrí RNDr. Dominikovi Filippovi, CSc. za pomoc a konzultácie nie len výsledkov ale aj s úpravou práce. A i ďalším ľuďom, ktorý mi svojimi radami pomohli túto prácu dokončiť. Veľmi veľké ďakujem patrí mojej rodine a snúbencovi, ktorí mi boli nesmiernou oporou po celú dobu štúdia a opätovnom vzniku tejto práce.

Táto práca bola podporovaná grantom Ministerstva zdravotníctva Českej Republiky, grant číslo AZV ČR 15-26877A, grantami Univerzity Karlovej (výskumné programy PRVOUK P25/LF1/2, Progres Q25/LF1, grant UNCE 204017 a SVV 260 369).

ABSTRAKT

Alergia, ako jedna z celosvetovo najčastejších patológií, patrí k ochoreniam s neustále sa zvyšujúcim výskytom aj u malých detí. K rozvoju dochádza u geneticky predisponovaných jedincov, ktorých dendritické bunky (DC, Dendritic Cell) sú schopné po kontakte s alergénom polarizovať imunitný systém predominantne smerom k Th2 imunitnej odpovedi, pričom dochádza k potlačeniu Th1 odpovede. Jedným z možných preventívnych opatrení zamedzujúcich rozvoju alergických ochorení môže byť skoré postnatálne podávanie vybraných probiotických bakteriálnych kmeňov, či ich zmesných kultúr. Jedným z nich je pomerne dobre charakterizovaný kmeň *Escherichia coli* O83:K24:H31 (*E. coli* O83). Podávanie tejto probiotickej vakcíny, nazývanej Colinfant Newborn, sa ukazuje ako efektívne profylaktikum na zníženie incidencie alergií u detí s predispozíciou k ich vzniku.

Hlavným cieľom mojej diplomovej práce bolo experimentálne overiť schopnosť *E. coli* O83 podporiť maturáciu dvoch hlavných subpopulácií novorodeneckých DC dostupných z pupočníkovej krvi novorodencov: myeloidných dendritických buniek – mDC a plazmacytoidných dendritických buniek – pDC. Tieto DC subpopulácie sa izolovali z pupočníkovej krvi detí, ktoré sa narodili buď zdravým (nealergickým) matkám a predstavovali relatívne nízke riziko vzniku alergie, alebo alergickým matkám so zvýšeným rizikom vzniku alergie. Následne, po kokultivácii mDC, alebo pDC s naivnými CD4⁺ bunkami, ich spoločnej stimulácii *E. coli* O83, sa pomocou prietokovej cytometrie stanovili úrovne produkcie cytokínov a transkripčných faktorov charakteristických pre diferenciáciu CD4⁺ T-lymfocytov na Th1, Th2, Th17 subpopulácie, ako aj na regulačné T bunky (Regulatory T Cell; Treg).

Naše výsledky ukázali štatisticky významné zvýšenie prítomnosti aktivačného markeru CD83 na mDC po stimulácii *E. coli* O83 u detí alergických matiek v porovnaní s deťmi matiek zdravých. U pDC neboli zistené žiadne významné rozdiely medzi zdravou a alergickou skupinou. Po kokultivácii mDC s CD4⁺, bez stimulácie s *E. coli* O83, došlo k zvýšeniu produkcie IL-4 u CD4⁺ T buniek u detí zdravých matiek v porovnaní s CD4⁺ T bunkami detí alergických matiek. Môžeme povedať, že *E. coli* O83 indukuje maturáciu DC a produkciu IL-4 u CD4⁺ T buniek kokultivovaných s mDC. U pDC sme nezaznamenali žiadne rozdiely medzi zdravou a alergickou skupinou, ani po kokultivácii s CD4⁺ T bunkami.

Kľúčové slová: alergia, myeloidné dendritické bunky, plazmacytoidné dendritické bunky, dendritické bunky, pupočníková krv, *E. coli* O83, deti zdravých matiek, deti alergických matiek.

ABSTRACT

Allergy as one of the most frequent pathologies worldwide belongs to illnesses with constantly increasing incidence even amongst young children. It develops in genetically predisposed individuals whose dendritic cells (DC) are, after contact with allergen, able to polarize the immune response predominantly to Th2, while Th1 response is suppressed. One of the possible preventive measures to avoid an allergic disease development could be an early postnatal supplementation of chosen probiotic bacterial strains or their mixtures. One of them is a well characterized strain *Escherichia coli* O83:K24:H31 (*E. coli* O83). Administering of this probiotic vaccine called Colifant Newborn is showing to be an effective prophylaxis to decrease the incidence of allergies in children with predisposition to their development.

The aim of my diploma thesis was to experimentally confirm the capacity of *E. coli* O83 to support maturation of two main subpopulations of newborn DC available from cord blood: myeloid dendritic cells – mDC and plasmacytoid dendritic cells – pDC. These DC subpopulations were isolated from cord blood of children born to healthy (non-allergic) mothers who had a low risk of allergy development or from children of allergic mothers who had an increased risk of allergy development. Subsequently, after co-cultivation of mDC or pDC with naive CD4⁺ cells and their co-stimulation with the *E. coli* O83, the levels of cytokine production and transcriptional factors typical for differentiation of CD4⁺ T-lymphocytes to Th1, Th2, Th17 subpopulations as well as to regulatory T-cells (Treg) were set by means of flow cytometry.

Our results have shown a significantly increased presence of activation marker CD83 on mDC after the stimulation with the *E. coli* O83 in children of allergic mothers when compared to children of healthy mothers.

In pDC there were no significant differences detected between healthy and allergic group. After co-cultivation of mDC with CD4⁺ without the stimulation by *E. coli* O83, an increase production of IL-4 in CD4⁺ T-cells in the children of healthy mothers occurred when compared to CD4⁺ T-cells in the children of allergic mothers. We can say, that the *E. coli* O83 induces the maturation of DC and the production of IL-4 in CD4⁺ T-cells co-cultivated with mDC. We did not detect any differences between healthy and allergic group in pDC, not even after co-cultivation with CD4⁺ T cells.

Keywords: allergy, myeloid dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, dendritic cells, cord blood, *E. coli* O83, children of healthy mothers, children of allergic mothers.

ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK

- Obr. 1. Črevné mikroprostredie
- Obr. 2. Vývoj hematopoetickej kmeňovej bunky do dvoch línií – lymfoidnej a myeloidnej
- Obr. 3. Signály nevyhnutné pri rozpoznávaní T buniek
- Obr. 4. Cesty diferenciácie, expresia transkripčných faktorov a cytokínový profil rôznych subpopulácií CD4⁺ T-lymfocytov
- Obr. 5. Získaná frakcia mononukleárných leukocytov po centrifugácii
- Obr. 6. Bürkerová komôrka.
- Obr. 7. Ohraničenie populácie buniek mDC po 24 hod stimulácii *E. coli* O83 meraná na prietokovom cytometri porovnaním s nestimulovanou populáciou
- Obr. 8. Ohraničenie populácie buniek pDC po 24 hod stimulácii *E. coli* O83 meraná na prietokovom cytometri porovnaním s nestimulovanou populáciou.
- Obr. 9. Porovnanie mDC a pDC detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83 s nestimulovanou kontrolou
- Obr. 10. Meranie transkripčných faktorov a cytokínov charakteristických pre jednotlivé subpopulácie CD4⁺ T-lymfocytov kokultivovaných mDC/pDC stimulovanými *E. coli* O83
- Obr. 11. Vplyv stimulácie mDC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na indukciu Th1, Th2, Th17 a Treg imunitnej reakcie
- Obr. 12. Vplyv stimulácie pDC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na indukciu Th1, Th2, Th17 a Treg imunitnej reakcie
- Obr. 13. Produkcia cytokínov dendritickými bunkami u detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83 v porovnaní s kontrolou
-
- Tab. 1. Zoznam použitých prístrojov
- Tab. 2. Zoznam použitých chemikálií, stimulantov a komerčných súprav
- Tab. 3 – 5. Protilátky použité pri analýze na prietokovom cytometri
- Tab. 6. Riedenia vzoriek použité pri ELISA
- Tab. 7. Cytokíny použité pri ELISA

ZOZNAM SKRATIEK

A	Alergický/-é/-ých (deti alergických matiek)
ADCC	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytolysis – bunkami sprostredkovaná cytotoxicita závislá od protilátky
APC	Antigen-Presenting Cell – bunky prezentujúce antigén
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen – znak charakteristický pre DC
CBMC	Cord Blood Mononuclear Cells – mononukleárne bunky pupočníkovej krvi
CD	Cluster of Differentiation
CpG DNA	Úseky v reťazci bakteriálnej DNA, kde v lineárnej sekvencii DNA sa cytozín (C) nachádza vedľa guanínu (G)
CSF	Colony Stimulating Factor – rastový faktor leukocytov
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CD152) – cytotoxický antigén asociovaný s T-lymfocytmi
DC	Dendritic Cells – dendritické bunky
dsRNA	Double-Stranded RNA – dvojvláknová RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECF	Eosinophil Chemotactic Factor – eozinofilný chemotaktický faktor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Flt3L	Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand
FMO	Fluorescence Minus One
GIT	Gastrointestinálny trakt
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor – faktor stimulujúci kolónie granulocytov/kolónie makrofágov
IBD	Inflammatory Bowel Disease – zápalové ochorenia čriev
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule – intracelulárna adhezívna molekula z imunoglobulínovej rodiny
ICOS	Inducible T cell Co-stimulator – kostimulačná molekula
IFN- γ	Interferón γ
IL	Interleukín
INCs	Internal Negative Controls
IRF	Interferon Regulatory Factor
JAM	Junctional Adhesion Molecules
LAC	Leukocyte Activation Cocktail

LFA	Lymphocyte-Function-Associated Antigen
LPS	Lipopolysacharid
mDC	Myeloid Dendritic Cells – myeloidné dendritické bunky
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue – slizničné lymfatické tkanivo
ME	β - Merkptoethanol
MHC	Major Histocompatibility Complex – hlavný histokompatibilný komplex
MIIC	MHC-II. Rich Compartments
NCF	Neutrophil Chemotactic Factor – neutrofilný chemotaktický faktor
NK	Natural Killer Cells – tzv. „prirodzený zabíjač“
NLR	NOD-Like Receptors
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
OVA	Ovalbumin
PAF	Platelet-Activating Factor – faktor aktivujúci trombocyty
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cells – plazmacytoidné dendritické bunky
p/MHC	komplex peptid-MHC
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell – periférne mononukleárne bunky
PD-L	Programmed Death-Ligand
Poly I:C	Polyinosinic:Polycytidylic Acid
PRR	Pattern-Recognition Receptor
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RIG-I	Retinoic Acid-Inducible Gene I.
RLR	RIG-I-Like Receptor
SR	Scavenger Receptor
TAP	Transporter Associated With Antigen Processing
Tc	Cytotoxic T Cells – cytotoxické T bunky
TCR	T-cell Receptor – T bunkový receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor β – transformujúci rastový faktor β
Th	T helper Cells – pomocné T bunky
TJ	Tight Junction – tesné spoje
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α – faktor nádorovej nekrózy α
Treg	Regulatory T Cell – T regulačné lymfocyty
Z	Zdravý/-é/-ých (deti zdravých matiek)
ZO-1	Zonula Occludens

OBSAH

1	ALERGIA A MIKROBIOTA U ČLOVEKA	16
1.1	Alergia.....	16
1.1.1	Prejavy alergie, anafylaxia, atopia	16
1.2	Molekulárny mechanizmus vzniku alergie	18
1.3	Slizničný imunitný systém	20
1.4	Mikrobiota.....	23
1.5	Probiotiká a ich charakteristika	24
1.5.1	Prebiotiká	24
1.5.2	Probiotická vakcína „ <i>Colinfant Newborn</i> “	25
2	DENDRITICKÉ BUNKY	26
2.1	Vývoj dendritických buniek	26
2.2	Úloha DC v imunitnom systéme	27
2.2.1	Schopnosť rozoznávať patogény - Pattern-recognition receptors PRR	30
2.2.2	Pohlcovanie a spracovanie antigénu	30
2.2.3	Morfológia dendritických buniek	32
2.2.4	Migrácia dendritických buniek	32
2.2.5	Expresia kostimulačných molekúl	33
2.2.6	Produkcia cytokínov	34
2.3	Subpopulácie dendritických buniek	35
2.3.1	Myeloidné dendritické bunky (mDC).....	35
2.3.2	Plazmacytoïdné dendritické bunky (pDC).....	36
2.4	Subpopulácie naivných CD4 ⁺ T-lymfocytov	38
2.4.1	Th1 lymfocyty.....	38
2.4.2	Th2 lymfocyty.....	39
2.4.3	Th17 lymfocyty.....	40

2.4.4	T regulačné lymfocyty – Tregs	41
3	MATERIÁLY A METÓDY	42
3.1	Prístroje	42
3.2	Roztoky, chemikálie a komerčné súpravy	43
3.2.1	Roztoky používané pri intracelulárnom farbení buniek	44
3.2.2	Roztoky používané pri detekcii cytokínov ELISA testom	45
3.2.3	Médiá a roztoky pre tkanivové kultúry	46
3.3	Protilátky	47
3.4	Použité programy	47
3.5	Metodika	48
3.5.1	Príprava bakteriálnej suspenzie pre stimuláciu <i>in vitro</i>	48
3.5.2	Získavanie a izolácia mononukleárnych buniek z pupočníkovej krvi (CBMC).....	48
3.5.3	Počítanie buniek.....	49
3.5.4	Separácia mDC pomocou magnetických guľičiek	50
3.5.5	Separácia CD34 ⁺ pomocou magnetických guľičiek.....	51
3.5.6	Separácia CD4 ⁺ pomocou magnetických guľičiek.....	53
3.5.7	Intracelulárne farbenie buniek	54
3.5.8	ELISA	55
4	CIELE PRÁCE.....	58
5	VÝSLEDKY.....	59
5.1	<i>E. coli</i> O83 indukuje maturáciu mDC, ale nie pDC.....	59
5.2	Kokultivácia mDC a pDC stimulovaných <i>E. coli</i> O83 s naivnými CD4 ⁺ T bunkami	62
5.2.1	Transkripčné faktory a cytokíny charakteristické pre dané subpopulácie	63
5.3	Stimulácia probiotickým kmeňom <i>E. coli</i> O83 zvyšuje koncentráciu cytokínov v supernatante kultúr mDC	69
6	DISKUSIA	71

ZÁVER	84
PRÍLOHA 1	85
PRÍLOHA 2	87
PRÍLOHA 3	88
PRÍLOHA 4	89
PRÍLOHA 5	93
PRÍLOHA 6	94
PRÍLOHA 7	95
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	96

ÚVOD

Dendritické bunky predstavujú veľmi dôležitú súčasť imunitného systému. Jedná sa o bunky prezentujúce antigén (Antigen-Presenting Cell; APC). APC predstavujú prepojenie medzi mechanizmami antigénne nešpecifickej (prirodzenej, vrodenej) a antigénne špecifickej (adaptívnej, získanej) imunity. Ich schopnosťou je aktivovať naivné, efektorové či pamäťové T-lymfocyty a tým spustiť efektívnu imunitnú odpoveď proti patogénnym organizmom; taktiež bola popísaná ich úloha v protinádorovej odpovedi, u autoimunitných ochorení či alergiách, z čoho vyplýva ich dôležitá rola v indukcii tolerancie [1,2].

V prípade porušenej funkcie DC sa môžu v priebehu niektorých ochorení podieľať na ich patogenéze a ovplyvniť tak klinický stav pacienta. Nadmerná reakcia DC môže viesť k rozvoju autoimunitných procesov a ich znížená funkcia naproti tomu zase môže prispievať k nádorovému bujneniu a býva príčinou opakovaných infekcií. U alergií je jedným z mechanizmov ich vzniku a rozvoja disregulácia DC. V prípade, že sa podarí objasniť úlohu DC pri imunopatologických stavoch je možné toto poznanie využiť pri navrhovaní vhodnej terapie [1,2].

Existuje možnosť v pozitívnom zmysle ovplyvňovať rozvoj a priebeh alergických ochorení pomocou probiotických bakteriálnych kmeňov. Veľmi dobrým príkladom je *E. coli* O83. Pri perorálnom podaní probiotickej vakcíny s obsahom *E. coli* O83 krátko po narodení ostala dôležitou zložkou mikrobioty dieťaťa po dobu niekoľkých mesiacov. Podľa výsledkov štúdií daný kmeň *E. coli* O83 poskytuje dlhodobú ochranu pred vznikom alergických ochorení [3]

Predkladaná diplomová práca vychádza zo započatých štúdií, ktorých snahou je objasnenie molekulárneho a bunkového mechanizmu účinku *E. coli* O83 na imunitný systém jedinca. V našej práci išlo konkrétne o skúmanie efektu pridávania probiotického kmeňa *E. coli* O83 ku DC získaných z pupočníkovej krvi novorodencov zdravých a alergických matiek a ich následnej kultivácii *in vitro* a akým spôsobom *E. coli* O83 môže modifikovať polarizáciu imunitnej odpovede týchto DC kokultivovanými s naivným T-lymfocytmi na rôzne typy efektorových T lymfocytov.

Práca je členená do šiestich kapitol a navyše obsahuje sedem príloh. Úvodná kapitola sa venuje alergiám a črevnému imunitnému systému, ktorý sa začína vyvíjať hneď po narodení jedinca. Kapitola druhá sa zaoberá dôležitosťou DC v imunitnom systéme, ich vlastnosťami a populačnou heterogenitou. Použitý materiál, zloženie roztokov a médií pre

bunkové kultúry a metódy sú uvedené v tretej kapitole. Výsledkami experimentov a analýz z prietokovej cytometrie sa venuje piata kapitola. Diskusiu, ktorá sa venuje analýzou týchto výsledkov a ich porovnávaním s inými prácami sa venuje posledná, šiesta kapitola.

1 ALERGIA A MIKROBIOTA U ČLOVEKA

1.1 Alergia

Hypersenzitívny stav, pri ktorom imunitný systém reaguje na neškodné antigény (alergény) v prostredí, sa odborné označuje ako alergická reakcia (alergia). Medzi najčastejšie alergény zaraďujeme roztoče, plesne, srst', peľ, hmyz či široké spektrum potravín. Prvé príznaky ochorenia sa začínajú objavovať už v skorom rannom veku, pričom samotný rozvoj ochorenia trvá približne 3 až 5 rokov [4].

Presná príčina vzniku alergie nie je známa, ale medzi rizikové faktory, ktoré sa výrazne na jej vzniku podieľajú sú prostredie a miera jeho znečistenia, zloženie stravy, pohlavie, rasa, stres a hlavne alergický status rodičov.

Bohužiaľ aktuálne neexistuje účinná liečba alergie, ale pomocou bežne dostupných medikamentov dokážeme efektívne eliminovať jej nepríjemné prejavy. Najčastejšie sa na tieto účely používajú antihistaminiká a steroidy, avšak najúčinnnejšou liečbou stále zostáva úplné vyhýbanie sa alergénu [4].

1.1.1 Prejavy alergie, anafylaxia, atopia

Medzi najčastejšie alergické príznaky patrí kýchanie, slzenie, začervenanie očí a pokožky, svrbenie či bolesti žalúdka. Avšak stretávame sa aj so závažnejšími alergickými reakciami, ktoré sú život ohrozujúce a po kontakte s alergénom môžu viesť k smrti pacienta. Takouto reakciou je anafylaxia, vedúca ku vzniku anafylaktického šoku, ktorý je charakteristický akútnym vznikom závažných až potenciálne smrteľných symptómov, postihujúcich rôzne orgány (koža, dýchací a zažívacie trakt, kardiovaskulárny a urogenitálny systém). Tieto príznaky sa môžu rozvinúť v jednom, alebo všetkých spomenutých systémoch v priebehu minút až hodín od kontaktu s alergénom. Najčastejšími alergénmi vyvolávajúcimi anafylaxiu sú hmyzí či hadí jed, latex, potraviny (napríklad orechy, mlieko, vajce, atď.) ale aj toxíny medúz. Nebezpečné môžu byť aj niektoré lieky, predovšetkým β -laktámové a antitetanické antibiotiká, inzulín, vazopresín (ADH, antidiuretický hormón), a iné. Rozvoj príznakov a stupeň ich závažnosti taktiež závisí od veku postihnutej osoby a horšia prognóza je taktiež u ľudí s pľúcnymi ochoreniami.

Molekulárny mechanizmus alergickej reakcie je sprostredkovaný protilátkami izotypu IgE, ktoré sú zachytávané Fc ϵ receptormi I typu a spúšťajú signalizačnú kaskádu vedúcu k rýchlej degranulácii žírnych buniek a bazofilov, ktorá vedie k uvoľneniu ich

mediátorov do extracelulárneho priestoru. V prípade anafylaxie, uvoľnené mediátory (napr. vysoké množstvo TNF- α) spôsobujú bronchokonstrikciu, laryngeálny edém, kontrakciu hladkej svaloviny, zvýšenú permeabilitu ciev a vazodilatáciu. Dochádza k poklesu krvného tlaku s následným edémom pľúc a multiorgánovému zlyhaniu.

Anafylaxiu rozdeľujeme na IgE, IgG a imunokomplexami mediovanú, súhrnne označovanú ako alergickú; a potom nealergickú, vyvolanú chladom, námahou, alebo liekmi. Podrobnosti tohto rozdelenia sú však nad rámec tejto práce, a preto nepopisujem [5,6]¹.

Základnou liečbou anafylaxie je intravenózne podanie adrenalínu, prípadne antagonistov histamínových receptorov H1 a H2, β 2 mimetík, glukagónu a glukokortikoidov. Podávanie kyslíku, tekutín a stabilizácia obehových funkcií je dopĺňujúcou terapiou.

Atopia sa definuje ako tendencia organizmu produkovať špecifické IgE protilátky voči bežným alergénom prostredia, čo vedie k alergickej reakcii na ne. Kontakt s týmito alergénmi býva cez neporušenú sliznicu. Príčinou je genetická predispozícia avšak dôležité sú aj faktory prostredia (znečistenie, infekcie dýchacích ciest, ...). Gény pre atopiu boli objavené na prekrývajúcej sa oblasti 3p25.3-q24 a tiež 17p12-q25 u alergikov s pozitívnym SPT (Skin Prick Test), na 5q23-q33 pre kvantitatívne meranie SPT a na 5q11.2-q14.3 a 6pter-6p22.3 pre IgE [7].

IgE odpoveď a alergický zápal sú sprostredkované hlavne Th2 bunkami, ktoré saúčastnia aj imunitnej odpovede proti parazitom. Naproti tomu, pri astme, Th1 bunky indukujú apoptózu bronchiálneho epitelu a buniek hladkej svaloviny bronchov, pri atopickej dermatitíde apoptózu keratinocytov. Regulácia imunitného systému zahŕňa už okrem spomínaných Th1 a Th2 buniek aj prozápalové Th9 či Th17 bunky [6].

V súvislosti s atopiou sa spomína aj termín „*atopic march*“. Tento termín popisuje postupný rozvoj ochorení súvisiacich s alergickým ochorením od atopickej dermatitídy cez alergickú rinitídu až po alergickú astmu. Nie vždy však dôjde až k rozvoju posledného štádia, teda astmy [8,9].

¹ KREJSEK. J., et al. 2016.

1.2 Molekulárny mechanizmus vzniku alergie

Na rozvoji alergie sa v prvom rade podieľa genetická predispozícia jedinca [9] a následne faktory prostredia, ktoré oslabujú mechanickú bariéru epitelovej vrstvy (znečistené ovzdušie, infekcia). Ide o komplexnú reakciu, v ktorej zohráva svoju úlohu alergén, prostredie a jedinec vystavený alergénu.

Alergickú reakciu môžeme rozdeliť na skorú (senzitivácia), ktorá nastupuje do 20 minút a podrobnejšie je popísaná v podkapitole 1.2., a neskorú fázu. Neskorá reakcia (LPR; Late Phase Reaction), ako napríklad perzistujúci zápal a chronické symptómy alergií sú spôsobené neskorou bunkovou odpoveďou, za ktorú sú zodpovedné alergén-špecifické T-lymfocyty aktivované kontinuálnym vystavením alergénu. Táto fáza imunopatologickej reakcie začína približne po 24 hodinách, a to v dôsledku migrácie T-lymfocytov na miesto zápalu pôsobením cytokínov produkovaných lymfocytmi, makrofágmi [10].

Alergén špecifické Th2 bunky pôsobia cez IL-4 a IL-13, ktoré indukujú izotypový prešmyk na IgE a vedú ku klonálnej expanzii pamäťových B buniek [6].

Rozlišujeme dva typy Fc receptorov pre IgE. Prvý, tetramérický FcεRI (zložený z α , β a dvoch γ reťazcov), je exprimovaný na mastocytoch a bazofiloch, predstavuje vysokoafinitný receptor imunoglobulínovej superrodiny. Druhý receptor pre IgE, FcεRII, nazývaný aj ako CD23 viaže IgE s nízkou afinitou. Je prítomný prevažne na B bunkách, aktivovaných T bunkách, monocytoch, eozinofiloch či folikulárných dendritických bunkách. Bol považovaný za rozhodujúci pre reguláciu hladiny IgE. Myšie modely, v ktorých gén pre CD23 bol inaktivovaný, stále vykazovali relatívne normálnu polyklonálnu, sprostredkovanú IgE odpoveď [6,11]².

Mediátory alergickej reakcie môžeme rozdeliť na primárne a sekundárne podľa časovej následnosti akou sa uvoľňujú a pôsobia. Primárne sú prítomné v granulách bazofilov, mastocytov a eozinofilov, ktoré už sú lokalizované v mieste zápalu a patria medzi ne histamín, proteázy, ECF (Eosinophil Chemotactic Factor – eozinofilný chemotaktický faktor), NCF (Neutrophil Chemotactic Factor – neutrofilný chemotaktický faktor) a heparín. Sekundárne sú syntetizované a uvoľňované až po aktivácii buniek

² MURPHY, K., WEAVER, C. 2017.

a počas degranulácie. Patrí medzi ne PAF (Platelet-Activating Factor), leukotriény, prostaglandíny, bradykiníny a rozličné cytokíny a chemokíny³.

V roku 1989 bola prvýkrát vyslovená hygienická hypotéza, ktorá sa zakladá na tvrdení, že vystavenie dieťaťa infekčným antigénom v skorých štádiách vývoja má protektívny efekt pre rozvoj alergických ochorení. Infekcie spôsobujú zvýšenú produkciu cytokínov IL-10 a TGF- β , ktoré potláčajú tak Th1 ako aj Th2 odpoveď; IL-10 potláča Th17 imunitnú odpoveď [11,12]. U novorodencov po pôrode prevláda Th2 odpoveď, ktorá rozvoj alergie podporuje. Dôvodom je, že pokiaľ nemá dôjsť k odpovedi imunitného systému matky na antigény plodu, Th1 odpoveď u matky je nutné potlačiť. Súčasná hygienická hypotéza hovorí o tom, že znížené vystavenia sa bežným mikrobiálnym patogénom v rannom veku robí organizmus menej schopným indukovať Treg a tým sa zvyšuje riziko alergickej odpovede na bežné antigény. Opakovaná antibiotická liečba v skorom detstve vedie k zvýšenému riziku rozvoja astmy [11,12]⁴.

U alergikoch hovoríme o hypersenzitívnej reakcii sprostredkovej Th2 lymfocytmi a ich cytokínmi, ktorá prevláda nad Th1 odpoveďou.

Hypersenzitívne reakcie

Imunopatologické reakcie môžeme podľa Coombsa a Gella rozdeliť do 4 typov na základe mechanizmu:

- ❖ Reakcia I. typu: Alergén indukuje imunitnú odpoveď, pri ktorej vznikajú protilátky typu IgE. Svojím Fc-fragmentom sa viažu na svoj vysokoafinitný receptor (Fc ϵ RI) v membránach mastocytov a bazofilov. Keď sa senzibilizovaný jedinec dostane do kontaktu s alergénom, dochádza k interakcii alergénu s naviazanými protilátkami, čo spôsobí degranuláciu buniek a uvoľneniu biologických látok, pričom najdôležitejší je histamín, ktorý v okolí spôsobuje vazodilatáciu a zvyšuje permeabilitu ciev. Jedná sa o reakciu žírnych buniek (mastocytov), ktoré sú aktivované naviazaním alergénu na IgE.

Príkladom tohto typu je alergická rinitída.

³ OWEN, J.A., *et al.* 2013.

⁴ MURPHY, K., WEAVER, C. 2017.

- ❖ Reakcia II. typu: Ide o cytotoxickú reakciu, ktorú sprostredkujú protilátky IgG a IgM. Je charakterizovaná antigén-protilátkovou interakciou (rovnako tak i reakcia I. a III. typu), čo vyúsťuje do lokálnej produkcie anafylatoxínu (C5a), uvoľnenie chemotaxínov pre polymorfonukleárne leukocyty. Protilátky reagujú s antigénmi, ktoré sú prítomné v membráne cieľových buniek, alebo sú na ne naviazané. Následná aktivácia komplementového systému alebo tzv. „K-buniek“⁵ spôsobia ich lýzu. Dochádza k poškodeniu tkaniva na základe uvoľnenia hydrolytických enzýmov z neutrofilov po ich autolýze. Príkladom je hemolytická anémia.
- ❖ Reakcia III. typu: K reakcii dochádza na základe vzniku antigén-protilátkových komplexov, ktoré sa v organizme ukladajú najčastejšie v bazálnych membránach glomerulov a pľúc. Za normálnych okolností dochádza k eliminácii týchto imunokomplexov retikuloendoteliálnym systémom. Problematické sú pomaly eliminovateľné imunokomplexy, ktoré v tkanivách tvoria depozity a následne dochádza k tvorbe zápalu. Príkladom typického imunokomplexového ochorenia je glomerulonefritída.
- ❖ Reakcia IV. typu: Od predchádzajúcich typov sa odlišuje tým, že rozhodujúcu úlohu majú bunky (najmä lymfocyty) a nie protilátky. T-lymfocyty vplyvom antigénu začnú produkovať cytokíny, ktoré vedú k zapojeniu ďalších buniek hlavne makrofágov a monocytov. Typickým príkladom je tuberkulínová reakcia, kedy infiltráciou tkaniva týmito bunkami dochádza k indurácii⁶ erytému a edému [13].

1.3 Slizničný imunitný systém

Slizničné povrchy a pokožka sprostredkovávajú každodenný kontakt medzi organizmom a vonkajším prostredím [14].

Slizničné povrchy (zažívací, respiračný, urogenitálny a ďalšie) sú zväčša pokryté jednovrstvovým epitelom, ktorý tvorí plochu približne 300 m². Najväčší epitelový povrch (okolo 200 m²) pokrýva črevo [14]. Preto sú mukózne povrchy chránené komplexom

⁵ K-bunky (Killer Cells) – označenie buniek, ktoré sa zúčastňujú na bunkami sprostredkovanej cytotoxicite závislej od protilátky (tzv. ADCC-reakcii). Patria sem: neutrofil, eozinofil, makrofág a NK-bunky. BUC, M. 2012.

⁶ Indurácia – zatvrdnutie, stvrdnutie

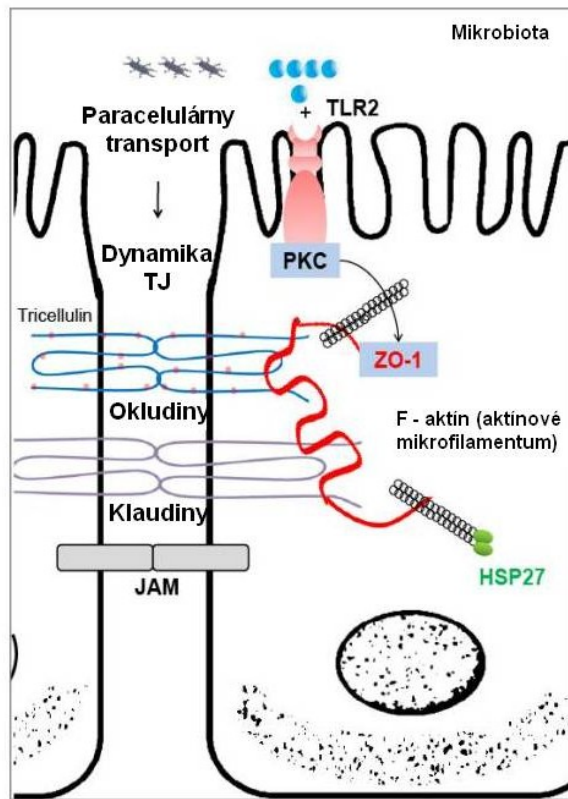
mechanizmov, vďaka ktorým sa organizmus bráni pred rôznorodým agens. Jedným z nich je MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue), vysoko špecializovaný imunitný systém tvorený rôznymi typmi buniek z ktorých približne 80% sú imunologicky aktívne. Väčšina týchto buniek sa nachádza v tkanive GIT (gastrointestinálneho traktu), kde býva najvyššia prevalencia imunogénnych stimulov z potravy a zložiek mikrobioty. Najhojnejšia mikrobiota sa nachádza v distálnych častiach čreva; väčšina črevných baktérií predstavuje Gram negatívne baktérie [14,15].

Základná úloha slizničného imunitného systému spočíva v ochrane proti vstupu patogénnych mikroorganizmov do vnútorného prostredia organizmu (funkcia bariéry), schopnosť rozlišovať medzi prospešnými a nebezpečnými mikroorganizmami a zároveň nereagovať na neškodné potravinové antigény. Zabezpečenie týchto funkcií vyžaduje prítomnosť tolerančných mechanizmov, kde veľmi dôležitú úlohu majú Treg, produkcia IL-10 a TGF- β , preferenčná indukcia Th2 odpovedi, ale aj IgA a IgM protilátok a mnohé ďalšie mechanizmy, ktoré zabezpečujú udržanie homeostázy slizničnej imunity [16,17]. Napriek tomu môže byť slizničná rovnováha narušená inváziou mikrobiálnych patogénov či ich toxínov ako aj nedostatočnou funkciou zložiek imunitného systému, ktoré môžu spôsobiť infekčné, či zápalové ochorenia, alergie, zlyhanie orgánov, a dokonca aj rozvoj niektorých autoimunitných ochorení (reumatoidná artritída, diabetes typu 1,...) [14,18].

Výrazne obmedzená priepustnosť látok cez jednovrstvový črevný epitel je esenciálnou vlastnosťou pre správne fungovanie čreva. Bunky epitelu tvoria bariéru vďaka existencii tesných spojov medzi sebou, ktoré sú sprostredkované špeciálnymi spojovacími proteínmi. Expresia týchto proteínov v čreve (occludin, claudin, JAM (Junctional Adhesion Molecules) a tricellulin) je striktné regulovaná a závisí od črevného kompartmentu, lokalizácie klkov a krýpt, špecifite bunkovej membrány a fosforylácie (Obr. 1) [19]. Zmenená expresia alebo lokalizácia proteínov tesných spojov (Tight Junction; TJ) a dysfunkcia črevnej bariéry je považovaná za kľúčovú pri predispozícii a exacerbácii⁷ mnohých autoimunitných a zápalových stavov vrátane zápalových ochorení čriev (Inflammatory Bowel Disease; IBD), potravinovej alergie, celiakie a diabetu. Napríklad, cytokíny TNF- α a IFN- γ , hlavné mediátory črevných zápalových ochorení, podporujú reorganizáciu alebo rozrušenie niekoľkých tesných spojov ako sú ZO-1, JAM-A, occludin, claudin-1 a claudin-4 prostredníctvom deregulovanej expresie týchto proteínov [20,21]. Zatiaľ čo stimulácia epitelových buniek hrubého čreva pomocou

⁷ Exacerbácia – zhoršenie alebo nové, opätovné prepuknutie choroby

cytokínov Th2 imunitnej odpovede (IL-4 alebo IL-13) indukuje zvýšenie črevnej permeability, ukázalo sa, že protizápalový cytokín IL-10 má ochrannú funkciu v črevnej bariére [21,22].



Obr. 1: **Črevné mikroprostredie.** Črevné epiteliálne bunky tvoria jednu vrstvu buniek, ktorá je utesená tesnými spojmi (TJ) a preto oddeľuje vnútorné tkanivo od vonkajšieho prostredia. (Prevzaté a upravené podľa Liu, *et al.*) [22].

TJ (Tight Junction) – tesné spoje; PKC – Proteínkináza C; ZO-1 – Zonula Occludens; TLR2 – Toll-Like Receptor; JAM – Junctional Adhesion Molecules; HSP27 (Heat Shock Protein) – proteín teplotného šoku.

Niektoré enterické patogény (ako sú *Vibrio cholerae*, enteropatogénne *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* a iné) vyvinuli mechanizmy rozrušujúce TJ epiteliálnych buniek na prekonanie epiteliálnej bariéry alebo pre získanie živín. Môžu sa viazať priamo na molekuly bunkových povrchov a indukovať zmeny v expresii proteínov TJ alebo vytvárať toxíny a proteázy, ktoré spôsobujú bunkové poškodenie a apoptózu, menia transport iónov a narúšajú TJ a tým aj ich cytoskelet [23]. Na rozdiel od enterických patogénov, niektoré komenzálne a probiotické baktérie posilňujú funkciu bariéry a chránia ju pred narušením patogénmi [24]. Štúdie skúmajúce účinky probiotík na proteínoch TJ ukázali, že živé *Streptococcus thermophilus* (ATCC19258) a *Lactobacillus acidophilus* (ATCC4356) menia fosforyláciu niekoľkých príbuzných proteínov TJ [25], zatiaľ čo živá

Escherichia coli Nissle 1917 preukázala zvýšenú produkciu ZO-2 [26]. Zvýšenie integrity epiteliálnej bariéry kmeňmi laktobacilov alebo bifidobaktérií bolo pozorované v modeloch *in vitro* a *in vivo* [27,28] ako aj v biopsiách zo zdravých ľudí [29].

1.4 Mikrobiota

Vývoj mikrobiálneho systému (ďalej zvanom ako mikrobiota) a kože u novorodenca je postupný a závisí od viacerých faktorov. Ľudia majú rozmanitý systém pozostávajúci z množstva vírusov, baktérií, ktorý predstavuje približne 1-3 % telesnej hmotnosti. Mikroorganizmy kolonizujú všetky povrchy tela, ktoré sú vystavené životnému prostrediu. Samozrejme, odlišné mikrobiálne druhy sa nachádzajú na koži, v pošve, respiračnom trakte a pozdĺž celého gastrointestinálneho traktu (GIT-u) – od úst až po konečník.

Mikrobiota u zdravých jedincov je vo všeobecnosti relatívne stála v priebehu času. Jej zloženie môže byť ovplyvnené rôznymi faktormi, ako sú zmena stravy, urbanizácia, cestovanie a najmä používanie širokospektrálnych antibiotík. Spektrum osídľujúcich mikrobiálnych taxónov sa líši medzi jednotlivcami. Netreba zanedbávať fakt, že črevná mikrobiota sa podieľa na mnohých chemických procesoch, ktorých odpadové látky môžu byť zdrojom zápalu, alebo rozvoja nádoru. Zloženie našej črevnej mikrobioty ovplyvňovať aj telesnú hmotnosť [30,31].

Črevná mikrobiota sa u človeka začína vyvíjať hneď po pôrode, kedy je GIT novorodenca prakticky sterilný, ďalej prechádza veľkými zmenami pri prechode z materského mlieka na pevnú stravu a na mikrobiotu dospelého človeka sa začína podobať približne v dvoch rokoch života jedinca [22].

Črevná mikrobiota je komplexný ekosystém dôležitý pre hostiteľa. Väčšina baktérií, ktoré kolonizujú črevný systém, sú striktne anaeróbne a nad aeróbnymi a fakultatívne anaeróbnymi baktériami prevládajú v pomere 1000:1. Vývoj tohto vnútorného ekosystému u novorodenca prebieha postupne a závisí od vonkajších a vnútorných faktorov. Počas pôrodu a po ňom prichádza dieťa do styku hlavne s baktériami vo vaginálnom a perianálnom prostredí matky. Ako prvé osídľujú GIT u dojčených detí aeróbne baktérie, pričom u nedojčených býva nižší počet bifidobaktérií a u detí porodených cisárskym rezom prevládajú fakultatívne anaeróbne baktérie. Ďalším exogénnym faktorom je úroveň hygieny a podávanie antibiotík novorodencom a samozrejme aj geografické rozdiely medzi jednotlivými krajinami. Špecifická bakteriálna mikrobiota detského intestinálneho traktu ovplyvňuje rozvoj slizničnej a systémovej

imunity dieťaťa. Rovnako významnú úlohu hrá kolonizácia baktériami aj v rozvoji alergických ochorení. V postnatálnom období prevláda podpora buniek Th1 imunitnej odpovede, TGF- β potlačuje bunky Th2 odpovede typické pre fetálne (plodové) obdobie a dochádza k indukcii orálnej tolerancie. Veľmi pomaly stúpa aj produkcia sekrečného IgA (sIgA) ako základného imunoglobulínu slizničnej imunity [3].

1.5 Probiotiká a ich charakteristika

„Probiotiká sú živé mikroorganizmy, ktoré pri podaní v dostatočnom množstve vyvolávajú zlepšenie zdravotného stavu hostiteľa.“⁸

Probiotiká sú nepatogénne mikroorganizmy, ktoré po užití majú schopnosť kolonizovať črevo, zlepšujú jeho mikrobiálnu rovnováhu a pôsobia prospešne na zdravie a fyziologické pochody hostiteľa. Prvé probiotikum (*Lactobacillus bulgaricus*) izoloval roku 1905 ruský mikrobiológ Il'ja Mečnikov. Termín – Probiotiká – zaviedli ako prvý Lilly a Stillwell v roku 1965 v článku uverejnenom v časopise *Science* [32]. V dnešnom zmysle ho použil v roku 1974 Parker, ktorý probiotiká charakterizoval ako organizmy a substancie prispievajúce k mikrobiálnej rovnováhe v črevách⁹.

Probiotické organizmy sú obsiahnuté prevažne v mliečnych produktoch avšak nájdeme ich aj v produktoch nemliečnych (napr. kyslá kapusta, fermentované obilniny a iné potraviny na rastlinnom podklade), ktoré obsahujú živé probiotické mikroorganizmy – napríklad *Escherichia coli* [33].

1.5.1 Prebiotiká

Jedná sa o látky, ktoré sú nerozložiteľné enzymatickým systémom eukaryotických buniek a sú zdrojom energie a substrátov pre prokaryotické probiotické baktérie. Z veľkej časti sa jedná o oligosacharidy, xylany, pektíny a celulózu. Produkty vzniknuté pôsobením bakteriálnych enzymatických systémov môžu okrem výživy pre probiotickú mikrobiotu slúžiť aj ako zdroj energie a antioxidantov pre sliznicu čreva [34,35].

Za probiotické môžeme považovať bakteriálne kmene, ktoré sú termostabilné a vo vhodnej liekovej forme sú schopné prežiť skladovanie a prechod GIT-om, kde synergicky pôsobia proti enteropatogénom a ich pozitívny vplyv prevažuje nad možnými negatívnymi

⁸ Definícia probiotík podľa WHO (Svetová Zdravotnícka Organizácia)

⁹ TOURNUT, J. 1989.

účinkami. Terapeutická dávka probiotík je približne $10^7 - 10^9$ baktérií [36]. Navyše výskum Nieuwboera *et al.* [36] dokázal, že neexistuje zdravotné riziko spojené s preventívnym použitím probiotík v snahe predísť rozvoju alergie.

1.5.2 Probiotická vakcína „*Colinfant Newborn*“

Bakteriálna kolonizácia čreva alebo perorálne podávanie usmrtených baktérií bola testovaná ako prevencia proti enterickým infekciám a ako stimulácia lokálneho imunitného systému u zvierat, dospelých a tiež dojčiat [37]. Antigénna štruktúra kmeňa *E. coli* O83 bola popísaná roku 1978 Medzinárodným centrom *Escherichia* a *Klebsiella* v Kodani ako O83:K:H31 a o niečo neskôr bol antigén K identifikovaný ako K24 [241]. Kmeň *E. coli* O83:K24:H31 sa u človeka vyskytuje veľmi zriedkavo, je citlivý na väčšinu antibiotík a neobsahuje plazmidy [37,38].

Probiotická vakcína pod názvom „*Colinfant Newborn*“ obsahuje lyofilizovanú suspenziu živých buniek *E. coli* O83¹⁰. Kolonizácia komenzálnym kmeňom *E. coli* O83 sa ukázala ako bezpečná a účinná v prevencii a liečbe nozokomiálnych infekcií novorodencov a kojencov do 1 roku a pre nedonosené deti, zvlášť nekojené, u ktorých ešte nedošlo k úplnému vývinu imunitného systému a vyváženej črevnej mikrobioty [39]. Používa sa predovšetkým k prevencii nemocničných nákaz, žalúdočných a črevných ochorení rôzneho pôvodu, poruchách zloženia črevnej mikrobioty. Veľmi dobre osídľuje črevný trakt a jeho dlhodobá prítomnosť v čreve stimuluje tvorbu špecifických a nešpecifických protilátok [38].

V starších pozorovaných štúdiách bolo preukázané že hladina IgA u detí alergických matiek, ktorým bola podávaná probiotická vakcína *E. coli* O83 je vyššia než u kontrolných skupín detí alergických matiek bez podanej probiotickej vakcíny a je porovnateľná prípadne aj vyššia ako u detí nealergických matiek. Rovnako sledovaným parametrom bola i hodnota zápalových interleukínov, ktorá bola zvýšená v skupine detí alergických matiek bez podanej probiotickej vakcíny [40]. Neskoršie osídľovanie čriev probiotickou vakcínou spôsobuje zníženú stimuláciu polysacharidmi a teda spomalenie zrenia imunitného systému¹¹.

¹⁰ HÁJKOVÁ, A. 2013.

¹¹ ŽÁDNÍKOVÁ, R. *et al.* 2006.

2 DENDRITICKÉ BUNKY

2.1 Vývoj dendritických buniek

Bunky imunitného systému sa v tele jedinca obnovujú kontinuálne. Väčšina buniek, ktoré sú zapojené do imunitných odpovedí, vzniká z nediferencovaných hematopoetických kmeňových buniek (Hematopoetic Stem Cells; HSC). Pluripotentná kmeňová bunka (CD34⁺) je schopná seba obnovovania a pod vplyvom faktorov mikroprostredia, ako sú cytokíny a medzibunkové interakcie, sa môže diferencovať do dvoch hlavných vývojových línií, lymfoidnej a myeloidnej (Obr. 2). Z lymfoidnej vývojovej línie vznikajú T bunky, B bunky a NK bunky; myeloidná línia dáva vznik erytrocytom, megakaryocytom, monocytom a granulocytom. Imunitné bunky jednotlivých vývojových línií sú adaptované na vykonávanie špecializovaných funkcií v rámci imunitných reakcií. Bunky myeloidnej línie zabezpečujú predovšetkým nešpecifické obranné mechanizmy (zápal, fagocytóza, homeostáza), naopak bunky lymfoidného pôvodu sú kľúčové pri odpovedi špecifickej imunity (produkcia protilátok, cytotoxicita)¹².

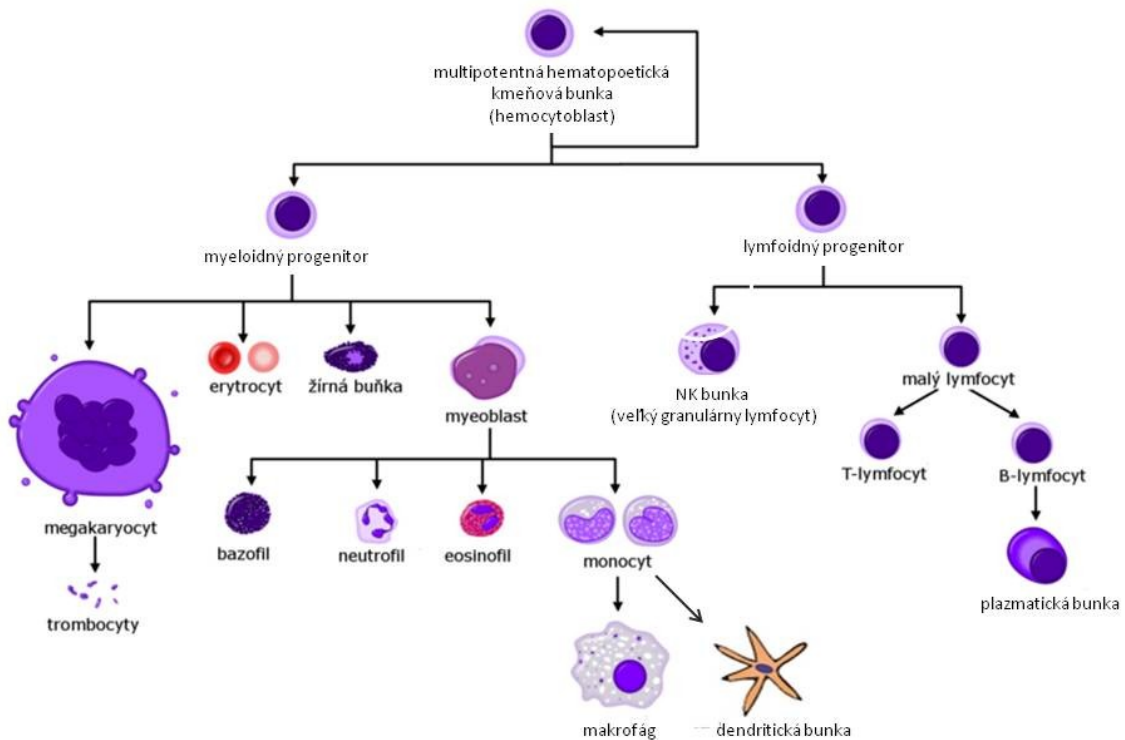
V roku 1973 bola Cohnom a Steinmanom objavená nová populácia buniek, a to dendritické bunky [2].

Význam DC spočíva v tom, že internalizujú exogénne antigény a spolu s endogénnymi, sú ich schopné intracelulárne enzymaticky fragmentovať a vystaviť na svojom povrchu v kontexte MHC-molekúl. Keď rozoznajú a pohlta antigén mikrobiálneho pôvodu, ktorý je schopný ich aktivovať, prestávajú fagocytovať, zvýšia expresiu kostimulačných molekúl CD80 a CD86 a migrujú pod vplyvom chemokínových gradientov, ako sú CCL19 či CCL21, do sekundárnych lymfatických tkanív, ako je slezina a lymfatické uzliny. Tam prezentáciou komplexov MHC-antigén na svojom povrchu interagujú a stimulujú T bunky, ktoré svojim TCR sú schopné špecificky rozpoznávať tieto komplexy a tým sa indukuje T bunková imunitná odpoveď. Ak DC neobdržia signál z aktivovaných T buniek cez interakciu CD40-CD40L, apoptoticky umierajú [41].

K diferenciacii kmeňových buniek a progenitorov DC *in vivo* bol u ľudí využívaný Flt3L (Fms-like Tyrosine Kinase 3 Ligand). *In vitro* je možné DC získať z krvných prekursorov za použitia rôznych rastových faktorov, ako sú GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), CSF (Colony Stimulating Factor), TGF-β

¹² BUREŠ, J. *et al.*, 2015.

(Transforming Growth Factor- β), TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), IL-4, IL-3 a ďalšie [42].



Obr. 2: Vývoj hematopoetickej kmeňovej bunky do dvoch línií – lymfoidnej a myeloidnej. (Prevzaté a upravené z internetu - <https://cs.wikipedia.org/wiki/Krvetvorba>). NK (Natural Killer Cells) – tzv. „prirodzený zabíjač“.

2.2 Úloha DC v imunitnom systéme

Imunitný systém predstavuje súbor buniek a orgánov, ktorých hlavnou úlohou je obrana organizmu proti infekcii. Tento systém sa vyskytuje už u najjednoduchších mnohobunkových organizmov v primitívnej forme. Čo sa týka stavovcov, hovoríme o veľmi zložitom systéme tvorenom dvoma základnými zložkami, systémom antigénne nešpecifickou (vrodenou, prirodzenou) a špecifickou (adaptívnou) imunitou [41,42].

Zložky nešpecifickej imunity sú evolučne staršou časťou imunitného systému, ktoré sú schopné reagovať na prítomnosť patogénov v organizme. Sú aktivované signálom nebezpečia, čo následne vedie k spusteniu efektorových mechanizmov a eliminácii patogénnych organizmov [43]. Význam antigénne nešpecifickej imunity je podložený štúdiou vrodených defektov imunity ako u ľudí tak aj u myši [44,45]. Takýto organizmus

je náchyľnejší na infekciu a to aj vtedy, keď sú zložky antigénne špecifickej, adaptívnej imunity intaktné [46].

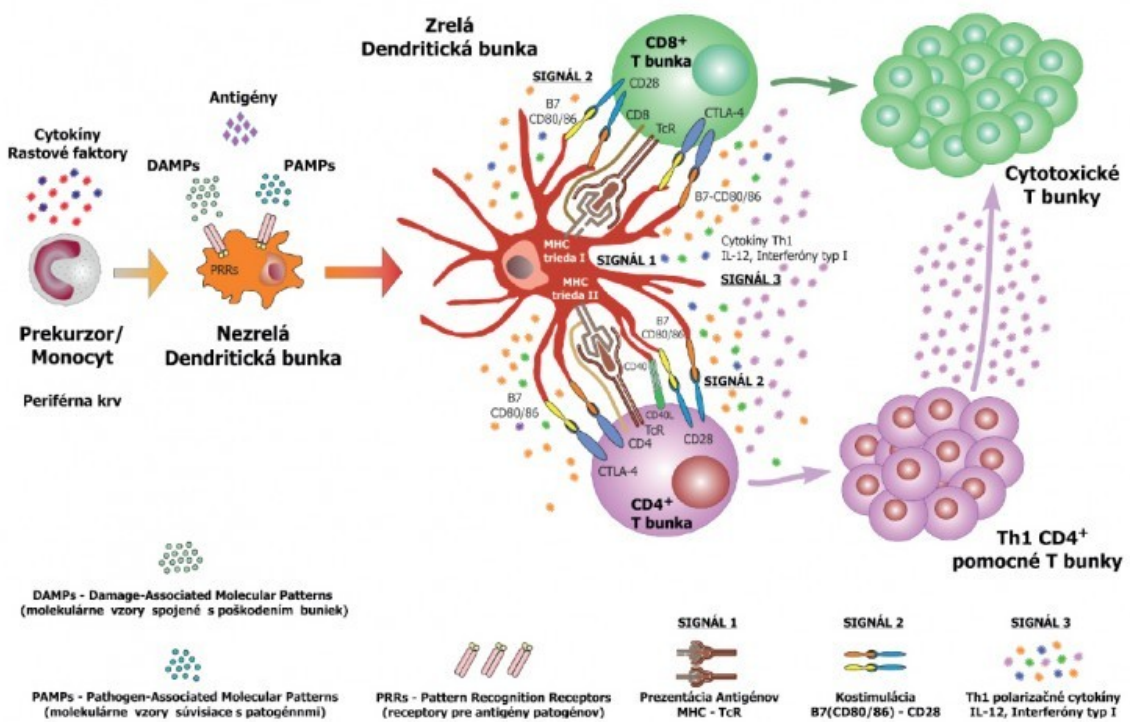
Základ adaptívnej imunity spočíva v existencii obrovského množstva lymfocytárných receptorov so štruktúrne definovanou antigénnou špecificitou, čo poukazuje na fakt, že takmer pre každý antigén v organizme existuje špecifický lymfocyt [46]. Frekvencia lymfocytov, ktoré sú špecifické pre konkrétny antigén sa odhaduje na približne 10^5 . Takýto malý počet lymfocytov nie je schopný eliminovať patogény a preto dochádza po rozpoznaní antigénu a aktivácii T-lymfocyту k jeho klonálnej expanzii a vytvoreniu dostatočne veľkej populácie efektorových buniek. Tento proces trvá približne 4 – 7 dní, pričom obranu organizmu v tomto období zaisťuje nešpecifická imunita. Rozpoznanie antigénu a zahájenie klonálnej expanzie predstavuje zložitý proces, ktorého sa zúčastňujú mnohé ďalšie bunky imunitného systému – tým sa znižuje riziko chybnjej aktivácie lymfocytov a potenciálne možných neadekvátnych imunitných odpovedí (autoimunita a alergie). Pre účinnú aktiváciu musí byť antigén lymfocytom prezentovaný prostredníctvom APC a zároveň musí lymfocyt od týchto buniek obdržať kostimulačný signál. Komplexy peptid-MHC (p/MHC) sú rozpoznávané pomocou T bunkového receptora (TCR); ďalšie signály poskytujúce impulz pre diferenciáciu a kostimuláciu lymfocytov sú kostimulačné molekuly a cytokíny. Medzi najefektívnejšie prezentujúce APC zaraďujeme dendritické bunky, makrofágy, B lymfocyty a epiteliálne bunky, u ktorých je expresia MHC molekúl II. triedy indukovaná až po ich aktivácii.

DC majú medzi APC významné postavenie a to tým, že sú schopné stimulovať naivné T-lymfocyty a tým zahájiť primárnu imunitnú odpoveď [47,48].

Po rozpoznaní signálu nebezpečia DC prechádzajú procesom maturácie, kde sa výrazne zvýši expresia MHC molekúl, kostimulačných molekúl CD80 a CD86, produkcia cytokínov a chemokínových receptorov potrebných pre ich navigáciu do sekundárných lymfatických orgánov [49]. Po svojej relokácii do sekundárných lymfoidných orgánov, maturované DC interagujú s antigén špecifickými T-lymfocytmi a aktivujú ich [48]. Interakcia MHC molekúl nesúcich antigén s T bunkovým receptorom (T-cell Receptor; TCR) predstavuje prvý signál, ktorý lymfocyt obdrží. Druhý signál spočíva v interakcii kostimulačných molekúl CD80 a CD86 s ich partnermi na povrchu lymfocytov, CD28. Prostredníctvom cytokínov, ktoré maturovaná DC produkuje, obdrží lymfocyt tretí signál (Obr. 3). Cytokínové prostredie ovplyvňuje rovnako aj polarizáciu T bunkovej odpovedi [50–52]. Pre polarizáciu do Th1 je dôležitým predovšetkým cytokín IL-12 [48], v polarizácii Th2 má dôležitú úlohu IL-4 a neprítomnosť IL-12 [48,53]. Populáciu Th17

lymfocytov charakterizuje prítomnosť IL-6 spolu s TGF- β . Vznik Treg sa indukuje prostredníctvom TGF- β spolu s IL-10 [54,55].

Mazmanian spolu s ďalšími výskumníkmi z Harvardskej univerzity popísali, že DC sú schopné prezentovať T bunkám i fragmenty polysacharidov, hoci dovtedy sa predpokladalo, že sú schopné prezentovať len peptidové fragmenty proteínov. Významnú úlohu zohráva črevná mikrobiota, ktorá produkciou určitých typov polysacharidov môže stimulovať Th1 imunitnú odpoveď. Ako náhle je nedostatok týchto polysacharidových stimulov, pri odpovedi na rôzne podnety (prach, peľové zrnká) prevládajú bunky Th2 subpopulácie. Tie podporujú vznik protilátok izotypu IgE zodpovedných práve za alergické reakcie [56]¹³.



Obr. 3: **Signály nevyhnutné pri rozpoznávaní T buniek** (Prevzaté z internetu www.alphamedical.sk/casopis-invivo/chemoimunoterapia-kardinalny-restart-protinadorovej-imunity). CD – Cluster of Differentiation; MHC (Major Histocompatibility Complex) - hlavný histokompatibilný komplex; TcR (T-cell Receptor) – T bunkový receptor; CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4) – cytotoxický antigén asociovaný s T-lymfocytmi.

¹³ OWEN, J.A., *et al.* 2013.

2.2.1 Schopnosť rozoznávať patogény - Pattern-recognition receptors PRR

Nie len všetky subpopulácie DC, ale aj ďalšie bunky prezentujúce antigén, bunky vrodenej i adaptívnej imunity a dokonca tiež bunky, ktoré na prvý pohľad nesúvisia s imunitným systémom, ako napríklad epitelové, endotelové bunky či fibroblasty, sú vybavené špeciálnymi tzv. vzorkovými receptormi PRR, ktoré dokážu detegovať typické molekulárne vzory prítomných mikroorganizmov alebo nebezpečné endogénne signály a spustiť imunitnú odpoveď. Tieto PRR sú exprimované nie len na bunkovom povrchu ale aj vo vnútri bunky, vyznačujú sa rozmanitosťou a detegujú široké spektrum molekulárnych druhov vrátane proteínov, sacharidov, lipidov a nukleových kyselín [57].

Najviac študovanou skupinou PRR na DC sú receptory podobné TLR. Po objave Toll-like receptorov sa začali objavovať ďalšie receptory, ktoré majú takisto úlohu pri rozpoznávaní patogénu. Na povrchu dendritických buniek sú exprimované lektínové receptory C-typu (CLR) a scavengerové receptory (SR), naopak v cytoplazme nájdeme NOD-like receptory (Nucleotide Oligomerization Domain-Like Receptor; NLR) a RIG-like receptory (RLR) [58]. Objav TLR objasnil úlohu DC a ich význam pri obrane proti infekcii. Signalizácia cez TLR na DC sa považuje za kľúčovú pre ich funkciu, pretože dochádza k zvýšeniu expície kostimulačných molekúl a produkcie cytokínov, potrebných pre indukciu vhodnej imunitnej reakcie [58]. Keďže PRR nie sú súčasťou tejto práce, nebudeme sa nimi bližšie zaoberať.

2.2.2 Pohlcovanie a spracovanie antigénu

Exogénne antigény sú po pohltení degradované pomocou lyzozomálnych enzýmov na peptidy, ktoré sa vzápätí viažu na MHC-I. triedy. Endogénne antigény sú degradované v proteazóme pomocou proteáz, transportované pomocou TAP transportérov (Transporter Associated With Antigen Processing), TAP1 a TAP2, do endoplazmatického retikula (ER), kde sa viažu na MHC-I molekuly [59]. V niektorých prípadoch dochádza k tomu, že sa exogénny peptid alebo proteín z fagozómu dostáva do cytosólu¹⁴, kde sa spracuje podobne ako endogénne exprimovaný proteín → je štiepený proteazómom. Vzniknuté fragmenty sú následne prenesené prostredníctvom TAP transportérov do ER a naviazané na MHC-I molekuly. Tento proces sa nazýva „cross-presentation“, čo je veľmi dôležitá schopnosť DC uplatňujúca sa najmä pri vírusových ochoreniach či pri boji proti nádorom. Na vzniku

¹⁴ Cytosól = základná plazma = matrix: označuje gélové vnútorné prostredie bunky.

komplexu p/MHC sa podieľajú ďalšie proteíny tvoriace tzv. PLC (Peptide-Loading Complex), medzi ktoré zaradíme calreticulin, calnexin, tapasin a ERp57. Iba v prípade naviazania peptidu na molekulu MHC putuje celý komplex na povrch bunky [60,61].

Druhá cesta nezávisí od TAP transportérov a k väzbe antigénu na molekulu MHC dochádza v endozóme. Endocytovaný antigén je transportovaný do špecializovaných včasných endozómov, zvaných ako MIIC kompartmenty (MHC-II. Rich Compartments). Optimálne štiepenie proteínu zaisťujú proteázy prítomné v endozóme; najmä cysteínové (katepsíny B, L a H) a aspartátové (katepsíny D a E) [61,62].

Antigény prezentované na MHC-I sú rozoznávané TCR na povrchu cytotoxických CD8 T-lymfocytov, naopak antigény prezentované na MHC-II, interagujú prostredníctvom TCR na povrchu pomocných CD4 T-lymfocytov [60,62].

V priebehu maturácie dochádza tak isto k zmenám v spracovávaní a prezentácii antigénu. Expresia molekúl MHC-I a MHC-II sa na povrchu DC zvyšuje [63]. V prípade MHC-I. molekúl je tento nárast spôsobený zvýšením syntézy týchto molekúl [61]; ďalej zvýšenou expresiou aktivátoru proteazomu PA28, čo spôsobí vzostup počtu peptidov produkovaných proteazómom. Rovnako stúpa aj expresia TAP transportérov [60,64].

V prípade MHC-II. molekúl sa pôvodne predpokladalo, že zvýšená povrchová expresia je rovnako výsledkom zvýšenej transkripcie MHC génov, lenže výsledky z expresného profilovania však ukázali, že k zvýšeniu transkripcie týchto génov nedochádza [65,66]. Pravdepodobne sa jedná o ochranný mechanizmus, aby pri zvýšenej syntéze *de novo* nenastalo rýchle nahradenie MHC s pohltým a spracovaným peptidom novými molekulami MHC, ktorý by samozrejme niesli iný antigén [67,68]. Zvýšená povrchová expresia u MHC-II. triedy je výsledkom niekoľkých javov. Po maturácii DC sa v lyzozómoch aktivuje vakuolárna protónová pumpa, čím sa zníži pH v lyzozómoch a podporí štiepenie proteínov a peptidov na fragmenty, ktoré budú viazané na MHC [69]. Významnejšie je však predĺženie doby expozície molekúl MHC-II. triedy na povrchu bunky. U nezrelých DC sú MHC II. triedy rýchlo internalizované, zatiaľ čo na povrchu maturovaných DC zostávajú v stabilnej forme aj niekoľko dní [70]. Predĺženie času, počas ktorého sa p/MHC exprimuje na povrchu DC, je výsledkom potlačenej endocytózy týchto komplexov v maturovaných DC. Endocytóza MHC komplexov sa riadi pomocou ubiquitinylácie. Keď sa na β reťazci MHC komplexu nachádza molekula ubiquitínu, je určená k endocytóze a degradácii. Za proces ubiquitinylácie zodpovedá MARCH-1 ligáza, ktorej aktivita sa v priebehu maturácie znižuje, čo vedie k zníženej endocytóze MHC komplexu a tým k predĺženiu doby exprese molekúl MHC-II. triedy na povrchu

DC [71,72]. Ďalším mechanizmom vedúcim k zvýšenej expresii bolo považované zadržovanie novo syntetizovaných MHC molekúl v endozómoch. Predpokladalo sa, že potom čo bunka obdrží maturačný signál, dôjde k väzbe peptidu na nahromadené molekuly MHC a následne k uvoľneniu komplexov p/MHC z endozomálneho kompartmentu a ich vystaveniu na povrchu bunky [73]. O niečo neskôr ďalšie výskumy túto teóriu vyvrátili a tvrdia, že najväčšia dôležitosť je prikladaná predĺženej expresii MHC molekulám II. triedy na povrchu DC [61,74].

2.2.3 Morfológia dendritických buniek

Počas maturácie dochádza v DC k reorganizácii aktínovej časti cytoskeletárneho aparátu, čím DC získavajú charakteristický tvar s výbežkami nazývanými dendrity. Tento ich typický tvar zabezpečuje lepšiu pohyblivosť a schopnosť migrácie, zároveň zväčšuje plochu, ktorá môže byť využitá pre kontakt DC s T-lymfocytom. Kontrolným článkom v remodelácii cytoskeletonu je proteín fascín¹⁵ [75,76]. V promotórovej oblasti fascínu boli identifikované regulačné miesta, na ktoré sa môžu viazať transkripčné faktory zahrnuté v signalizačných kaskádach niektorých PRR (Pattern-Recognition Receptors) [77]. Ďalším proteínom, ktorého expresia sa výrazne zvyšuje po maturácii DC a podieľa sa na organizácii aktínu, je cofilín, ktorý podporuje disociáciu aktínových monomérov z aktínového vlákna [78,79].

2.2.4 Migrácia dendritických buniek

Väčšina DC cirkuluje v tele v „nezrele“ stave, v ktorom nedokážu indukovať imunitnú odpoveď. Nezrelé bunky sú však schopné intenzívnej fagocytózy. DC sa nachádzajú najmä na miestach, ktoré predstavujú najväčšie riziko pre vstup mikroorganizmov do tela. Tak isto sú umiestnené v rôznych lymfatických cievach, ktoré umožňujú presun buniek z periférnych tkanív do lymfatických orgánov. Tam dochádza ku stretnutiu s lymfocytmi. V tomto bode sa spustí imunitná odpoveď. Lymfocyty začnú proliferovať a produkovať produkty, ktoré budú slúžiť na odstránenie infekcie a iné zdroje antigénov [80,81].

¹⁵ Fascín – proteín viažúci aktín, ktorá sa nachádza prevažne v mezenchymálnom tkanive, nervovom systéme a tkanivách sietnice; zvyšuje motilitu buniek v rôznych transformovaných bunkách.

2.2.5 Expresia kostimulačných molekúl

DC po maturácii exprimujú veľké množstvo kostimulačných molekúl CD80 (B7.1) a CD86 (B7.2). Tieto dve molekuly sú nesmierne dôležité v indukcii imunitnej odpovedi. Ich väzbovými partnermi sú molekuly na povrchu T-lymfocytov aktivačný CD28 a inhibičný CTLA-4 [82]. Boli popísané aj ďalšie molekuly z rodiny B7 molekúl, konkrétne B7-H1 (PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), CD274) , B7-DC (PD-L2, CD273) a B7-H2 (ICOSLG, GL50, B7RP1, CD275, ICOSL, LICOS); ich ligandom je PD-1 na povrchu T-lymfocytov. PD-L1 sa exprimuje na nezrelých DC a jeho expresia sa po aktivácii zvyšuje, zatiaľ čo PD-L2 na povrchu nezrelých DC prítomný nie je a k jeho expresii dochádza až po aktivácii DC [83,84]. Na rozdiel od CD80/CD86 a PDL sa expresia ďalšej molekuly z rodiny B7, ICOSL v interakcii s lymfocytmi v priebehu maturácie DC nemení [84]. Okrem kostimulačných molekúl z rodiny B7 sa na povrchu DC vyskytuje kostimulačná molekula CD40. Jej expresia narastá pri aktivácii DC a má dôležitú úlohu pri interakcii s T-lymfocytmi. Prostredníctvom CD40 DC obdrží signál ku stimulácii cytotoxických T-lymfocytov (Cytotoxic T Cells; Tc) [85].

V priebehu maturácie DC dochádza k expresii molekuly CD83, ktorej úloha spočíva v regulácii T- aj B-lymfocytárnej odpovedi [86]. Špecifická expresia tejto molekuly v maturovaných DC poukazuje na vhodný znak pre identifikáciu populácie DC [87,88]. Molekula CD83 je transmembránový glykoproteín, ktorý patrí k proteínom podobným imunoglobulínom (immunoglobulin-like proteins). CD83 je silne up-regulovaná spoločne s kostimulačnými molekulami, ako sú CD80 a CD86 počas maturácie DC. To naznačuje, že hrá dôležitú úlohu pri indukcii imunitných odpovedí. V roku 1992 bola táto molekula prvýkrát popísaná a nazvaná HB-15 [89,90]. Neskôr bol tento názov zmenený na nomenklatúrne označenie CD83. Je jedným z hlavných znakov zrelých DC a tiež sa exprimuje na aktivovaných B a T bunkách [91].

Maturované DC exprimujú viacero adhezívnych molekúl podieľajúcich sa na vytvorení synapsie s interagujúcim T-lymfocytom. Jedná sa o LFA-1 (CD11a) (Lymphocyte-Function-Associated Antigen, LFA), ICAM-1 (CD54) (Intercellular Adhesion Molecule; ICAM) a LFA-3 (CD58); na interakcii s T-lymfocytmi sa taktiež podieľajú LFA-2 (CD2), ICAM-2 (CD50), ICAM-3 (CD102) a α/β integríny, ktorých expresia sa v priebehu maturácie výrazne nemení. [87].

2.2.6 Produkcia cytokínov

Zrelé DC produkujú rôzne cytokíny ovplyvňujúce charakter a rozvoj imunitnej odpovedi. Jedná sa o prozápalové cytokíny IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, ktoré fungujú ako lokálne aj systémové mediátory zápalu [92]. Ďalšiu veľkú skupinu tvoria imunoregulačné cytokíny (IL-10, IL-35, TGF- β) [93], ktoré ovplyvňujú niektoré komponenty imunitného systému a podieľajú sa tak na modulácii imunitnej odpovede. IL-12, IFN- γ polarizujú imunitnú odpoveď smerom k Th1 [94]. Vývoj Th2 subpopulácie je determinovaný IL-4 [95]. IL-23 spolu s TGF- β a IL-6 podporuje vývoj prozápalovej Th17 subpopulácie lymfocytov [96]. IL-10 indukuje vznik Tr1 (regulačných) lymfocytov [97]. Aktivitu NK buniek podporujú IL-12, IL-15, IL-18 a IFN- α [98]. IL-6, ako pleiotropný cytokín, ktorého úlohou je napomáhať diferenciacii B-lymfocytov, pôsobí ako prozápalový faktor indukujúci produkciu proteínov akútnej fázy v pečeni [99]. Ukazuje sa, že IL-6 dokáže zvrátiť imunosupresívne pôsobenie FoxP3⁺ Treg [100]. Maturované DC produkujú ešte aj IL-2, čím priamo ovplyvňujú klonálnu expanziu lymfocytov [101].

DC, u ktorých došlo k stimulácii prozápalovými faktormi, exprimujú veľké množstvo MHC-II, kostimulačných molekúl a prozápalových cytokínov, avšak IL-12 schopné produkovať nie sú [102]. Rozpoznanie niektorých patogénov, ako sú baktérie rodu *Klebsiela*, *Citrobacter* a kvasinky rodu *Candida* nepovedie k produkcii IL-12 ale dôjde k produkcii cytokínov potrebných pre polarizáciu Th17 odpovede [102].

Výsledkom interakcie medzi DC a T-lymfocytom môže byť indukcia tolerancie alebo samotná imunitná reakcia. DC bývajú z tohto dôvodu rozdeľované na tolerogénne nezrelé DC a imunogénne zrelé DC. Ďalšími pokusmi bolo ukázané, že tolerancia býva navodená čiastočne maturovanými alebo polo-maturovanými DC, zatiaľ čo navodenie imunitnej reakcie spôsobujú výlučne maturované DC. DC môžeme teda rozdeliť na tri typy podľa následnej imunitnej odpovede a to na nematurované, polomaturované a maturované DC. Tolerogénne DC môžeme pripraviť aj *in vitro* pomocou kortikoidov a vitamínu D [103,104].

Antigény odvodené od bielkovín a lipidov môžu slúžiť ako vakcína na báze DC pri liečbe rôznych infekčných ochorení, či nádoroch [105]. U alergií, autoimunitných ochorení a transplantácií, DC podnecujú nechcené prirodzené a adaptívne reakcie, ktoré prispievajú k rozvoju choroby, ale takisto majú kapacitu tieto stavy potlačiť, pretože DC vedia nasmerovať prirodzenú a adaptívnu imunitnú odpoveď, preto sú ohniskom záujmu pri štúdiu mnohých imunologických ochorení [106].

2.3 Subpopulácie dendritických buniek

Vývojové štúdie naznačujú, že DC sa vyvíjajú nezávisle od monocytov a tkanivových makrofágov. Odlišné subpopulácie DC majú vnútorné rozdiely, ktoré vedú k funkčnej špecializácii vo vytváraní imunity [107].

DC nepredstavujú homogénnu populáciu leukocytov, ale jedná sa o niekoľko rôznych subpopulácií buniek, ktoré sa navzájom odlišujú lokalizáciou, morfológiou a expresiou povrchových molekúl. Nomenklatúra jednotlivých subpopulácií nie je jednotná, odlišuje sa u ľudí a myši [108].

Táto diplomová práca sa zaoberá porovnaním dvoch populácií DC získaných z ľudskej pupečníkovej krvi, a to:

- Konvenčné (myeloidné) dendritické bunky → cDC (mDC), DC1
- Plazmacytoidné dendritické bunky → pDC, DC2.

pDC je možné identifikovať podľa expresie CD123 (receptoru pre IL-3) a druhú populáciu, mDC detegujeme podľa znaku CD11c u ľudí. IL-3 je dôležitým rastovým faktorom pDC.

U ľudí všetky DC exprimujú vysoké hladiny MHC-II molekúl (HLA-DR) a chýbajú typické línie CD3 znakov (T bunka), CD19/CD20 (B bunka) a CD56 (NK bunka) [109].

2.3.1 Myeloidné dendritické bunky (mDC)

Charakteristické znaky mDC sú odlišné u ľudí a myši. Prvý náznak toho, že ľudské DC môžu mať podobnú distribúciu subpopulácií s myšami pochádza zo štúdie, kde sa zaoberali DC týmusu u ľudí [110]. U myši bolo doposiaľ objavených a popísaných 5 subpopulácií, ktoré sa vzájomne odlišujú expresiou znakov CD4, CD8 α , CD11b a CD205. Naopak ľudské mDC sú charakteristické expresiou CD11c. V periférnej krvi ľudí rozlišujeme dve populácie mDC, ktoré predstavujú 50% a 5-10% z celkovej populácie periférnych DC. Prvú populáciu CD11c⁺CD1a⁺BDCA-1⁺ (znak charakteristický pre DC; Blood Dendritic Cell Antigen; BDCA) predstavuje menej než 1 % periférnych mononukleárných buniek (Peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMC) a je prekursorom Langerhansových buniek [111].

Druhú populáciu predstavuje $CD11c^+CD1a^-BDCA-3^+$ tvoriaca len 0,05% PBMC a je prekursorom intersticiálnych DC [111,112]. Bolo zistené, že v CBMC (Cord Blood Mononuclear Cell; pupočníkovej krvi) sa nachádza viac mDC oproti PBMC či kostnej drene [113]. Separácia konvenčných (myeloidných) DC u ľudí založená na expresii CD11b, odhalila subpopuláciu DC konkrétne $CD11b^{low}$ s vlastnosťami podobnými myšim $CD8^+ CD11b^{low}$ vrátane vysokej produkcie IL-12p70 [114,115].

mDC exprimujú typické antigény CD11c, CD13, CD33 a CD11b odpovedajúce myšim $CD11c^+$ konvenčným DC. U ľudí mDC a monocyty exprimujú CD11c, ale nie CD16 a môžu sa rozdeliť na $CD1c^+$ a $CD141^+$, ktoré sú homologické s myšimi klasickými DC exprimujúcimi CD11b ($CD1c^+$) alebo CD8/CD103 ($CD141^+$) [116]. Oboje, ľudské aj myšie mDC exprimujú CD13 a CD33 a CD32, imunitný inhibičný Fc receptor [117].

Ľudské $CD141^+$ ($BDCA-3^+$) mDC exprimujú TLR3 (Toll-Like Receptor; TLR) a uvoľňujú množstvo IL-12 a IFN- β v odpovedi na aktiváciu s poly I:C (Polyinosinic:Polycytidylic Acid; poly I:C), dsRNA, čo je ligand pre TLR3 [116,118]. Rovnako ako myšie $CD8a^+$ mDC, tak aj ľudské $CD141^+$ neexprimujú transkripčný faktor IRF4 (Interferon-Regulatory Factor), ďalej CD11b a TLR7 [119]. Ľudské hematopoetické progenitorové bunky sa diferencujú na $CD141^+$ v prítomnosti Flt3L, kľúčového regulátora pre vývoj DC [120]. Ľudské tkanivové $CD1c^+$ DC sa zdajú byť viac aktivované z hľadiska expresie daných znakov - CD80, CD83, CD86 a CD40 oproti ich krvným ekvivalentom [121,122].

2.3.2 Plazmacytoidné dendritické bunky (pDC)

pDC boli pomenované podľa morfológie pripomínajúcej plazmatické bunky [123]. Patria medzi bunky vrodenej imunity, ktoré cirkulujú v krvi a nachádzajú sa v periférnych lymfoidných orgánoch. Vyvinuli sa z hematopoetických kmeňových buniek kostnej drene a tvoria menej než 0,4 % PBMC [124]. Množstvo pDC v CBMC je o niečo málo vyššie než v PBMC, avšak najvyššie počty sú prítomné v kostnej dreni [113]. pDC neexprimujú typické myeloidné antigény, ako sú CD14, CD16 a CD11c [125], naopak sú charakterizované expresiou CD123, CD303 a CD304 [116]. Majú dôležitú úlohu v obrane proti vírusovým infekciám, čo znamená, že rozpoznávajú vírusové nukleové kyseliny

prostredníctvom TLR7 a TLR9 a v odpovedi na ne produkujú IFN- α a IFN- β . Na svojom povrchu nesú receptor pre IL-3 (CD123) a navyše BDCA-2 a BDCA-4 u ľudí ¹⁶ [124,125].

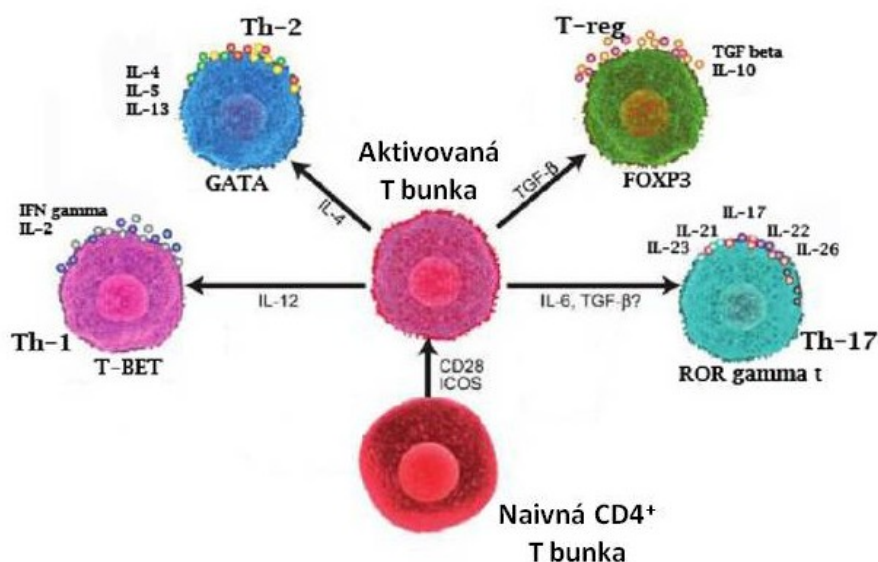
Indukcia IFN I. triedy extracelulárnymi baktériami sa pozorovala len u *Escherichia coli* a u *Staphylococcus aureus* [126].

Aktivácia pDC je sprostredkovaná skupinou patogénnych senzorov PRR obsahujúcich TLRs a RIG-I-like receptory (Retinoic Acid-Inducible Gene I-Like Receptor; RLRs) a iné, čo následne vedie k produkcii prozápalových cytokínov a IFN typu I. [127]. pDC exprimujú vysoké hladiny TLR7 a TLR9, ktoré prenášajú signály z detekcie vírusových a vlastných nukleových kyselín, predovšetkým CpG DNA baktérií [128]. Čerstvo vyizolované pDC z krvi neindukujú naivné T bunky efektívne a tiež nie sú schopné takej aktivácie ako mDC [129]. Všeobecne sa pDC považujú za bunky schopné preferenčne polarizovať T-lymfocytárnu imunitnú odpoveď Th2 smerom [130].

¹⁶ Myšie pDC exprimujú CD11c^{low}, CD8a, B220, BST-2/Tetherin (mPDCA) a Siglec-H a sú negatívne na CD11b [116,207].

2.4 Subpopulácie naivných CD4⁺ T-lymfocytov

K diferenciácii naivných T-lymfocytov do jedného subtypu efektorových buniek Th1, Th2, Th17 alebo Tregs dochádza behom niekoľkých dní kontaktu s APC (Obr. 4) [131]. Faktorov zodpovedných za vznik určitého typu efektorového T-lymfocytu je viacero: povaha a afinita antigénu, druh koreceptorových signálov, cytokínové prostredie, typ TCR signalizácie. Vo vývoji jednotlivého typu T buniek sú zapojené molekulárne mechanizmy, ktoré sú v prípade alergických reakcií ovplyvnené základnou reaktivitou alergika a odpovedajúcimi poruchami v regulácii imunitnej odpovedi.



Obr. 4: Cesty diferenciácie, expresia transkripčných faktorov a cytokínový profil rôznych subpopulácií CD4⁺ T-lymfocytov (Prevzaté z internetu www.researchgate.net).

IL – Interleukín; TGF- β (Transforming Growth Factor β) – transformujúci rastový faktor β ; Treg (Regulatory T Cell) – T regulačný lymfocyt; ICOS (Inducible T cell Co-stimulator) – kostimulačná molekula.

2.4.1 Th1 lymfocyty

Th1 lymfocyty sú subpopuláciou Th lymfocytov, ktoré sa diferencujú z naivných CD4⁺ lymfocytov pod vplyvom IL-12 a APC stimulovaných mikrobiálnymi antigénmi. Diferencované Th1 lymfocyty produkujú IFN- γ , ktorý vedie k intracelulárnej deštrukcii fagocytovaných mikróbov tým, že aktivuje makrofágy. Z najrôznejších štúdií posledných dvoch dekád vyplýva vzájomná negatívna interakcia medzi Th1 a Th2 subpopuláciou.

IFN- γ produkovaný Th1 lymfocytmi potláča rozvoj Th2 imunitnej odpovede, naopak IL-4 produkovaný Th2 inhibuje produkciu IFN- γ Th1 lymfocytmi a tým aj vývoj Th1 imunitnej odpovede [132,133]. Najrôznejšie štúdie dokazujú vzťah medzi zníženou hladinou IFN- γ alebo zníženou schopnosťou produkcie tohto cytokínu v *in vitro* pokusoch v novorodeneckom a kojeneckom období detí, u ktorých sa neskôr vyvinuli alergické ochorenia (napr. astma, atopická dermatitída) [134]. Táto Th1/Th2 disbalancia je jedným z najdôležitejších mechanizmov imunoregulácie u Treg. V prípade alergických ochorení tvorí patogenetický podklad už spomínaná hygienická hypotéza. Hlavnú úlohu v polarizácii imunitnej reakcie do určitej Th odpovede (Th1, Th2, Th17 a Tregs) zohrávajú DC a stimulácia pomocou mikrobiálneho antigénu, prípadne alergénom cez ich rôzne povrchové TLR.

Štúdie posledných rokov však poukazujú na fakt, že alergické ochorenia nie je možné vysvetliť iba mechanizmom posunu rovnováhy v prospech Th2. Do patogenézy alergických ochorení sú hlavne v chronických fázach zapojené aj ďalšie subpopulácie T-lymfocytov (Th1, Th17 a Tregs). Pri ľahších formách astmy a skorých štádiách atopickej dermatitídy je dominantná Th2 polarizácia, avšak s postupom ochorenia sa do popredia dostávajú Th1 bunky produkujúce IFN- γ a CD8⁺ cytotoxické T-lymfocyty [135,136]. Teóriu o vplyvu Th1 na alergický zápal podporili taktiež pokusy na myších experimentálnych modeloch, [137].

2.4.2 Th2 lymfocyty

Th2 lymfocyty hrajú dôležitú úlohu v alergickej reakcii [95,138]. Experimenty na myších modeloch ukázali, že cytokínové prostredie hrá veľmi dôležitú úlohu v regulácii diferenciácie T-lymfocytov. Rovnako tak sa môžu uplatniť i ďalšie faktory, ako je koncentrácia antigénu alebo expresia kostimulačných molekúl [132,139].

Diferenciácia Th2 lymfocytov prebieha po odpovedi APC na okolité antigény predovšetkým pod vplyvom IL-4 [95]. IL-4 sa viaže na svoje dva povrchové receptorové komplexy – jeden reťazec je zložený z IL-4R α a spoločného γ receptorového reťazca (γ c); druhý reťazec tvoria IL-4R α a IL-13R α reťazce. Väzbou na tieto reťazce IL-4 indukuje produkciu transkripčného faktora STAT6 v naivných T-lymfocytoch a ďalšie signalizačné dráhy [140]. STAT6 následne aktivuje expresiu hlavného diferenciačného transkripčného faktora Th2 lymfocytov, GATA-3. GATA-3 a T-bet (transkripčný faktor Th1 lymfocytov)

majú antagonistický účinok. Pokiaľ je zvýšená expresia IL-4 a GATA-3, dôjde k zníženému uvoľňovaniu T-bet, naopak pokiaľ je zvýšená hladina IFN- γ , IL-12 a T-bet, produkcia GATA-3 je utlmená [133]. Pokusy na experimentálnych myších modeloch ukázali, že keď dôjde k utlmeniu génov pre GATA-3, dochádza k vymiznutiu hlavných prejavov astmy, eozinofílie v dýchacích cestách, produkcie hlienu a syntézy IgE [141].

Alergén-špecifické Th2 lymfocyty boli identifikované v periférnej krvi i v postihnutých tkanivách u alergických pacientov [142]. Cytokíny Th2 imunitnej odpovede (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) produkované Th2 lymfocytmi majú vplyv na mnohé patofyziologické mechanizmy u alergických pacientov. Tieto cytokíny vedú k produkcii alergén-špecifických IgE B-lymfocytmi (IL-4 a IL-13), majú vplyv na zhlukovanie žirných buniek (IL-4, IL-9 a IL-13) a na maturáciu eozinofilov (IL-3, IL-5 a GM-CSF) a bazofilov (IL-3 a IL-4) [143]. Zvýšená Th2 cytokínová odpoveď bola detegovaná v periférnej krvi i v mieste alergického zápalu, napr. v dýchacích cestách u alergických pacientov [135]. Hlavná úloha Th2-lymfocytov i nimi produkovaných cytokínov v alergickej reakcii je týmto jednoznačne potvrdená.

2.4.3 Th17 lymfocyty

Th1/Th2 rovnováha nie je sama o sebe schopná vysvetliť mechanizmy vedúce k vzniku imunopatologických stavov. Do imunopatologických reakcií a rovnako tak aj do patogenézy autoimunitných a alergických ochorení zasahujú i ďalšie subpopulácie T-lymfocytov, ako napríklad Th17 a Tregs [144,145].

T-lymfocyty schopné produkovať IL-17 sú pomenované podľa tohto cytokínu ako „Th17 lymfocyty“. Boli popísané v roku 2000 na ľudských a myšiacich modeloch [146]. Ako kľúčový diferenciačný faktor je popísaný ROR γ t (RAR-related Orphan Nuclear Receptor (ROR) Family) [147]. Pre svoju diferenciáciu potrebujú Th17 kombináciu cytokínov odlišnú od tej, ktorá je dôležitá pre diferencovanie Th1 a Th2 buniek a to IL-1 β a IL-23, alebo IL-1 β s IL-6, a to buď *in vivo* alebo *in vitro* [148].

2.4.4 T regulačné lymfocyty – Tregs

Tregs ($CD4^+CD25^+$) patria k ďalšej subpopulácii T-lymfocytov, ktorá zohráva úlohu v rozvoji alergie. Majú schopnosť suprimovať vznik Th1 a Th2 alergickej odpovede. Vďaka tomu sú dôležitým regulačným prvkom v reakciách imunitného systému na alergény a tiež v patogenéze alergických ochorení [149]. Ich množstvo v periférnej krvi je približne 5 - 10 % z $CD4^+$ [150].

$CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ tvoria podtyp Tregs – prirodzené Tregs (nTregs) vznikajúce v týmuse. Druhým podtypom sú indukované Tregs (iTregs) vznikajúce na periférii efektorových T buniek, ktoré sú vystavené antigénom. Táto populácia je charakteristická tým, že produkuje cytokíny, ktoré negatívne regulujú imunitnú reakciu: IL-10 a TGF- β [151,152].

Pôsobením Tregs môže dochádzať k inhibícii expresie cytokínov Th2 v odpovedi na alergén u zdravých nealergických jedincov [153].

Dôležité je podotknúť nejednotnosť charakterizácie Tregs, ktorá sa v jednotlivých článkoch často krát odlišuje.

3 MATERIÁLY A METÓDY

3.1 Prístroje

Tab. 1: Zoznam použitých prístrojov

Prístroj	Výrobca
Automatické pipety	Pipetman Concept, Gilson, USA
Multikanálové pipety	Finnipette, Thermo Fischer Scientific, USA
Box pre molekulárnu biológiu	MSC Advantage, Thermo Scientific, USA
Box s laminárnym prúdením	Sentinel Gold, ESCO, Singapur
Box s laminárnym prúdením	HOTTE MSC.12 STD GAZ, Jouan, Francúzsko
Centrifúga	Universal 30 RF, Hettich, Nemecko
Centrifúga	Universal 320R, Hettich, Nemecko
Centrifúga	Micro 22R, Hettich, Nemecko
CO ₂ inkubátor	ESCO CellCulture Incubator CO ₂ , Singapur
Mikroskop	Olympus BX 41, Japonsko
Prietokový cytometer	BD FACS Canto™ II Flow Cytometer, BD Biosciences, USA
Fotometer mikrotitračných doštičiek	Sunrise- Basic Tecan, Tecan Austria, GmbH, Švajčiarsko
Premývačka mikrotitračných doštičiek MRW (AM60)	Dynex Technologies, USA
Magnetická miešačka	Arex, VELP Scientifica, Európa
Analytické váhy	AB204 Mettler Toledo, Švajčiarsko
Predvážky	EK-400H, A&D Company, Limited, Japonsko
Vortex	Vortex Genie K-550-GE, Scientific Industries Inc., USA
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., USA

Pri práci bolo použité veľké množstvo laboratórneho plastu a skla – špičky, ependorfky, skúmavky, Pasteurove pipety, mikrotitračné doštičky (24-, 96-jamkové), kadičky,...

Ďalej boli pri práci použité aj chladničky, v ktorých boli uchovávané kity pre magnetickú separáciu a aj pripravované roztoky či protilátky, a mraziaci box, kde boli uchovávané a zmrazované supernatanty bunkových kultúr a stimulátory.

3.2 Roztoky, chemikálie a komerčné súpravy

Tab. 2: Zoznam použitých chemikálií, stimulantov a komerčných súprav

Chemikálie	Výrobca
FTS – fetálne teľacie sérum (používané pre tkanivové kultúry)	Cambrex, USA
FTS (používané pre ELISA)	Gibco, USA
Türkov roztok	Vakos, Praha
Heparin	Zentiva v.n., Nizozemsko
Gentamycín	Pharmaceuticals dd, Slovinsko
L-glutamin	Sigma-Aldrich, USA
Histopaque® 1077	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 Lonza (médium pre DC)	BioWhittaker, Belgicko
RPMI-1640 Sigma (médium pre kokultivácie)	Sigma-Aldrich, USA
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich, USA
Leukocyte Activation Cocktail (LAC), with BD GolgiPlug™	BD Biosciences, USA
Citronan sodný	Lachema, Česká republika
NaOH	Lachema, Česká republika
Sacharóza	Penta, Česká republika
H ₂ SO ₄	Lachema, Česká republika
HCl	Lachema, Česká republika
NaCl	Penta, Česká republika
KCl	Penta, Česká republika
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	Penta, Česká republika
KH ₂ PO ₄	Penta, Česká republika
Kyselina citrónová	Lachema, Česká republika
Bovine albumine serum (BSA), Trisma	Sigma- Aldrich, USA
75% etanol	Lekáreň Všeobecnej fakultnej nemocnice
N,N-dimethylformamid (DMF)	Merck, Nemecko
β- merkaptoethanol (ME)	Sigma-Aldrich, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, USA
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, USA
2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl) ethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma-Aldrich, USA

3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, USA
Trizma® hydrochloride buffer solution; Tris (hydroxymetyl)-aminomethan	SONY Biotechnology, USA
Streptavidin s naviazanou chrenovou peroxidázou	Immunotech Inc., USA
Primárne monoklonálne a sekundárne biotinylované protilátky	R&D System Inc., USA
Rekombinantné cytokíny ELISA	R&D System Inc., USA
autoMACS Rinsing Solution; MACS Solution	MACS, Miltenyi Biotec, Nemecko
Diluent Buffer	BD Biosciences, USA
Fix/Perm Buffer	BD Biosciences, USA
TF Perm/Wash Buffer	BD Biosciences, USA
Stimulanty	Výrobca
<i>E. coli</i> O83:K24:H31 (vakcína Colinfant Newborn)	Dyntec spol. s.r.o., Česká republika
Komerčné súpravy	Výrobca
Myeloid Dendritic Cell Isolation Kit Human	MACS Miltenyi Biotec, Nemecko
CD34 MicroBead Kit Human	MACS Miltenyi Biotec, Nemecko
CD4+ Tcell Isolation Kit	MACS Miltenyi Biotec, Nemecko
Human IL-10 DuoSet	RD Systems, USA

❖ Türkov roztok

- 5-krát riedený v destilovanej vode (dH₂O)

3.2.1 Roztoky používané pri intracelulárnom farbení buniek

0,5 % roztok BSA

- do 100 ml fyziologického roztoku, bolo pridané 0,5 g BSA

Fix/Perm Buffer – fixačný a permeabilizačný roztok

- roztok bol pripravený v pomere 3:1
- 3 ml riediaceho roztoku + 1 ml fixačného a permeabilizačného roztoku

Perm/Wash Buffer – premývací roztok

- roztok bol pripravený v pomere 1:4
- 4 ml deionizovanej vody + 1 ml premývacieho roztoku

3.2.2 Roztoky používané pri detekcii cytokínov ELISA testom

PBS = fyziologický roztok

- NaCl (9 g)
- Na₂HPO₄·12H₂O (1,2 g)
- NaH₂PO₄·2H₂O (0,2 g)
- Doplnené do 1 litra dH₂O

PBS pre IL-10

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 8,1 mM Na₂HPO₄
- 1,5 mM KH₂PO₄
- upravené pH na 7,2 – 7,4

Blokovací roztok

- 5 % sacharóza (5 g)
- 0,05 % NaN₃ (0,05 g)
- 1 % BSA v PBS

Riediaci roztok (TBS)

- 20 mM Trizma (tris báza) (0,2423 g)
- 150 mM NaCl (0,876 g)
- doplnené do 100 ml dH₂O a upravené pH pomocou HCl na 7,3
- 0,1 % BSA
- 0,05 % Tween

Premývací roztok

- PBS + 0,05 % Tween (na 0,9995 l PBS bolo pridané 500 µl Tweenu)

Vyvolávací roztok (substrát) – na jednu doštičku

- TMB (3 ml)
- citrátový pufor (3 ml)
- H₂O₂ (1 µl)

TMB (3,3,5,5-tetramethylbenzidin)

- 200 mg (TMB) v 135 ml dimethylformamidu (DMF)
- doplnené do 500 ml dH₂O a uchovávané v tmavej fľaši v chladničke

Citrátový pufor

- 0,1 M citrónan sodný (2,94 g do 100 ml dH₂O)
- Upravené pH na 4,2 nasýteným roztokom kyseliny citrónovej

2M H₂SO₄ – zastavenie reakcie

- H₂SO₄ (20 ml)
- H₂O (80 ml)

3.2.3 Médiá a roztoky pre tkanivové kultúry

Médium pre mDC – celkový objem 100 ml

- RPMI 1640 LONZA 88,79 ml
- HEPES 0,002 M 0,2 ml
- Glutamin 1 ml
- Gentamycín 40 mg/l 0,1 ml
- FTS Cambrex 10 ml

Médium RPMI Sigma (pre ostatné bunkové kultúry) – celkový objem 100 ml

- RPMI 1640 Sigma 88,79 ml
- HEPES 0,002 M 0,2 ml
- Glutamin 1 ml
- Gentamycin 40 mg/l 0,1 ml
- FTS 10 ml

Médium pre pDC

- RPMI Sigma suplementované (vid' prípravu média RPMI Sigma)
- Flt3L 100 ng/ml
- IL-3 20 ng/ml
- ME (β - Merkptoethanol) 50 μ M/ml

3.3 Protílátky

Tab. 3 – 5: Protílátky použité pri analýze na prietokovom cytometri

Protílátky použité pri meraní mDC	Fluorochróm	Výrobca
CD83 anti-human	PE	Exbio, a. s.
CD11c anti-human	PE-Cy7	Exbio, a. s.

Protílátky použité pri meraní pDC	Fluorochróm	Výrobca
CD83 anti-human	PE	Exbio, a. s.
CD123 anti-human	FITC	BD Biosciences; Exbio, a. s.

Protílátky použité pri intracelulárnom farbení	Fluorochróm	Výrobca
CD4 anti-human	APC-Cy7	Exbio, a. s.
T-bet anti-human (Th1/Th2)	FITC	BD Bioscience; SONY
GATA3 anti-human (Th1/Th2)	PE	BioLegend; SONY
IL-4 anti-human (Th1/Th2)	PE-Cy7	BioLegend; SONY
IL-13 anti-human (Th1/Th2)	APC	BioLegend; SONY
IFN- γ anti-human (Th1/Th2)	PerCP-Cy5.5	BD Bioscience; SONY
ROR γ t anti-human (Th17/Treg)	FITC	BD Bioscience
FoxP3 anti-human (Th17/Treg)	APC	Exbio, a. s.; eBioscience
IL-22 anti-human (Th17/Treg)	PE	BioLegend; SONY
IL-17A anti-human (Th17/Treg)	PerCP-Cy5.5	BD Bioscience; SONY
IL-10 anti-human (Th17/Treg)	PE-Cy7	BioLegend; SONY

3.4 Použité programy

- Software Diva 6.1.2. (Becton&Dickinson, Franklin Lakes, NJ)
- Software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA)
- Software FlowJo 7.2.2. (TreeStar, Ashland, OR)

3.5 Metodika

Práca s bunkovými kultúrami

Celá práca s bunkovými kultúrami bola vykonávaná v laminárnom boxe za použitia sterilných roztokov, pipiet, špičiek, pipetovacích nastavcov a laboratórneho plastu (skúmavky, doštičky,...). Bunky boli kultivované v inkubátore pri 37 °C a v atmosfére 5 % CO₂.

3.5.1 Príprava bakteriálnej suspenzie pre stimuláciu *in vitro*

Bakteriálna suspenzia *E. coli* O83 používaná v tejto práci a iných prácach v našom laboratóriu bola pripravovaná nasledujúcim spôsobom:

- na platňu bola naočkovaná suspenzia *E. coli* O83 pochádzajúca z probiotickej vakcíny Colinfant Newborn (Dyntec, s.r.o.),
- jedna reprezentatívna kolónia bola prenesená do 10 ml kultivačného média (Luri Bretani, LB), kultivácia prebiehala cez noc (cca 16 hod) pri 37 °C za stáleho miešania,
- na ďalší deň bola zmes pridaná do PBS s 25 % glycerolom, následne bola nameraná optická hustota (denzita) na 3 MF (McFarland);
- táto koncentrácia predpokladá, že v 1 ml je obsiahnutej 2×10^9 CFU/ml (Colony Forming Unit, jednotka tvoriaca kolóniu) *E. coli* O83,
- baktéria bola rozpipetovaná do ependorfiek a zamrazená pri -80 °C,
- aby sa daná koncentrácia overila, táto suspenzia bola riedená 10-krát 10-ťkovým riedením a následne vysiata na platne.

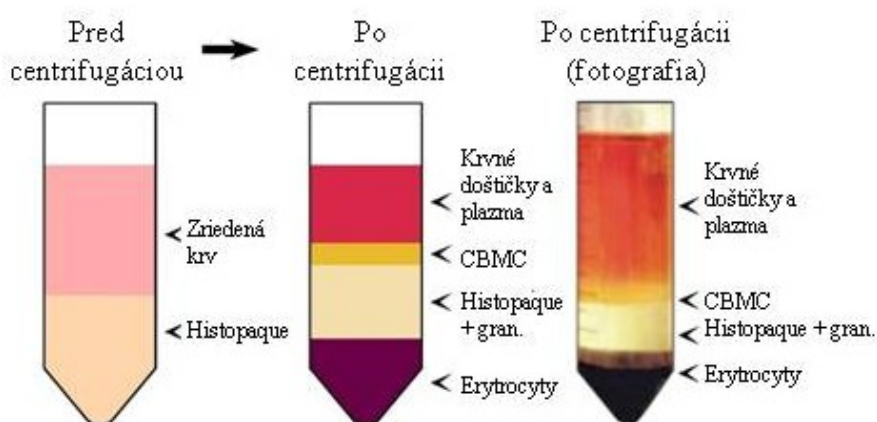
Celý vyššie popísaný postup prípravy bol vykonaný pracovníkmi laboratória.

3.5.2 Získavanie a izolácia mononukleárných buniek z pupočníkovej krvi (CBMC)

Bunky boli získavané z pupočníkovej krvi, ktorá bola odoberaná po podpísaní písomného informovaného súhlasu na jej odobranie v Ústave pro péči o matku a dieťa v Podolí. Bolo odoberané 30 ml krvi do sterilnej uzatvárateľnej sklenenej banky, ktorá obsahovala 300 µl Heparínu (300 J) (100-krát nariadený; 10 J heparínu/ml)¹⁷.

¹⁷ 10 J = 10 jednotiek

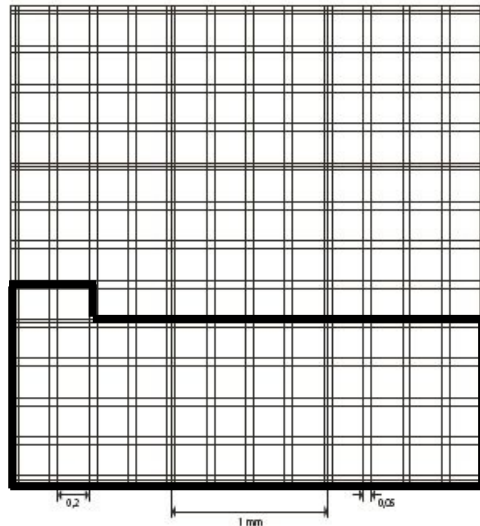
- Získaná krv bola zriedená v pomere 1:1 s MEM-om a následne navrstvená do 6-8 ml skúmaviek (podľa objemu krvi) na 3 ml Histopaque,
- po 30 minútovej centrifugácii pri 20 °C a 400 g bola získaná frakcia CBMC (Obr. 5),
- prstenec leukocytov bol následne pomocou pasturovej pipety odobraný do nových skúmaviek, doplnený fyziologickým roztokom a v ďalšom kroku prebehla centrifugácia 10 min pri 20 °C a 250 g,
- supernatant bol zliaty a bunky ešte dvakrát premyté fyziologickým roztokom,
- nakoniec bolo k bunkám pridaných 5 ml MEM-u, čím boli pripravené na počítanie.



Obr. 5: Získaná frakcia mononukleárných leukocytov po centrifugácii (Prevzaté z internetu <http://textbookhaematology4medical-scientist.blogspot.cz>).
CBMC (Cord Blood Mononuclear Cells) – mononukleárne bunky pupočnikovej krvi.

3.5.3 Počítanie buniek

Získané bunky boli rozsuspendované v MEM-u (vid' postup vyššie) a uložené na ľade. Z tohto objemu bolo odobraté 50 µl média, ku ktorému bolo pridaných 950 µl Türkovho roztoku. Bunky boli následne spočítané v Bürkerovej komôrke pod svetelným mikroskopom. Komôrka, ktorá je rozdelená trojitými čiarami na 9 väčších štvorcov, obsahuje v jednom tomto štvorci ešte 16 menších štvorcov. Z plochy komôrky boli spočítané bunky vnútri 50 menších štvorcov a rovnako aj tie, ktoré sa dotýkali dvoch z jeho štyroch strán (počítanie do „L“) (Obr. 6). Získaný výsledok odpovedal koncentrácii buniek na 1ml.



Obr. 6: **Bürkerová komôrka.** Vyznačená je oblasť 50 počítaných štvorcov (Prevzaté z internetu <http://www.thermofisher.cz>).

3.5.4 Separácia mDC pomocou magnetických guličiek

Po celú dobu separácie bolo dôležité pracovať sterilne, rýchlo, a bunky udržiavať v chlade pri teplote 2-8 °C. Práca prebiehala s fixným množstvom buniek 2×10^7 , ktoré boli získané izoláciou na hustotnom gradiente s použitím Histopaque.

Postup prípravy buniek pred separáciou (magnetické značenie – značenie pomocou protilátok s naviazanými magnetickými guličkami) prebiehal podľa protokolu:

1. Bolo odobrané potrebné množstvo buniek do skúmavky a následne bola suspenzia scentrifugovaná pri 250 g, 4 °C, 10 minút;
2. supernatant bol zliaty a paletka buniek rozsuspendovaná v 300 μ l AutoMacs roztoku;
3. následne bolo do skúmavky pridané 100 μ l FcR Blocking Reagent a 100 μ l Non-Myeloid Dendritic cell antibody-Biotin cocktail;
4. suspenzia buniek bola dôkladne premiešaná (prípadne zvortexovaná) a inkubovaná 10 minút v chladničke (pri teplote 2-8 °C),
5. po inkubácii boli bunky premyté v 5 ml AutoMacs roztoku a opäť scentrifované; supernatant bol zliaty a bunky premyté druhýkrát,
6. potom bola paletka buniek rozsuspendovaná v 400 μ l AutoMacs roztoku a bolo pridaných 100 μ l Anti-Biotin MicroBeads;
7. bunky boli opäť dôkladne premiešané a inkubované 15 minút v chladničke;
8. nakoniec boli bunky poslednýkrát premyté v 5 ml roztoku a scentrifugované;

9. po zliatí supernatantu bola paletka buniek rozsuspendovaná vo finálnom objeme 500 μ l AutoMacs roztoku, čím boli bunky pripravené na magnetickú separáciu.

Postup magnetickej separácie:

1. Pre separáciu bolo dôležité si pripraviť magnet a kolónky veľkosti MS;
2. kolónka bola umiestnená do magnetu a premytá minimálne 2 ml AutoMacs roztoku;
3. po premytí kolónky bola do kolónky napipetovaná pripravená bunková suspenzia, ktorá bola najskôr zbavená zhlukov pomocou filtrácie (filter 100 μ m);
4. po prekvapkaní suspenzie bola kolónka premytá 2 ml roztoku.

Po separácii bola získaná suspenzia buniek scentrifugovaná a následne bol spočítaný počet buniek v Bürkerovej komôrke. Separáciou boli získané mDC, ktoré sa následne stimulovali 24 hodín s *E. coli* O83 v médiu pre dendritické bunky (mDC médium) v pomere 1:10 v inkubátore.

Po 24 hodinách prebehlo počítanie buniek a ich nasadenie do 24-jamkovej doštičky spolu s CD4⁺ bunkami získanými separáciou pomocou magnetických guličiek (viď kap 3.5.6) z izolovaných buniek pupečníkovej krvi pomocou histopaque. Nasadených do doštičky bolo 100 000 mDC a na kokultiváciu k nim bolo pridaných 1×10^6 CD4⁺ buniek a doplnené do 1,5 ml médiom RPMI Sigma (namiešaný roztok s FTS, Hepes, Gentamycín) a doštička bola vložená do termostatu na 6 dní. Zvyšné bunky sa ešte v ten deň ofarbili pomocou CD11c a CD83 a následne sa zmerali na prietokovom cytometri. Merané a porovnávané boli stimulované vzorky s kontrolou, ktorá *E. coli* O83 neobsahovala.

Po šiestich dňoch boli k suspenzii buniek v 24-jamkovej doštičke pridané protilátky CD3 a CD28 vo finálnej koncentrácii 1 μ g/ml, takisto bolo pridané aj 500 μ l média RPMI Sigma. Po ďalších troch dňoch bol k bunkám v doštičke pridaný LAC (Leukocyte Activation Cocktail) a približne po 5 hodinách boli bunky intracelulárne zafarbené, pričom v postupe práce bol dodržiavaný protokol od výrobcu (viď kap. 3.5.7).

3.5.5 Separácia CD34⁺ pomocou magnetických guličiek

Rovnako ako pri príprave buniek na separáciu mDC, ktorá je popísaná vyššie, tak aj pri separácii CD34 bolo dôležité celú dobu pracovať sterilne, rýchlo, a bunky udržiavať v chlade pri teplote 2-8 °C. Aj v tomto prípade bolo potrebné pracovať s fixným

množstvom buniek 2×10^7 , ktoré boli získané izoláciou na hustotnom gradiente s použitím Histopaque.

Postup prípravy buniek pred separáciou (magnetické značenie – značenie pomocou protilátok s naviazanými magnetickými guľičkami):

1. Bolo odobrané potrebné množstvo buniek do skúmavky a následne bola suspenzia scentrifugovaná pri 250 g, 4 °C, 10 minút;
2. supernatant bol zliaty a paletka buniek rozsuspendovaná v 300 μ l AutoMacs roztoku;
3. následne bolo do skúmavky pridané 100 μ l FcR Blocking Reagent a 100 μ l CD34 MicroBeads;
4. suspenzia buniek bola dôkladne premiešaná (prípadne zvortexovaná) a inkubovaná 30 minút v chladničke (pri teplote 2-8 °C);
5. po inkubácii boli bunky premyté v 5 ml AutoMacs roztoku a opäť scentrifované;
6. supernatant bol zliaty a následne bola paletka buniek rozsuspendovaná vo finálnom objeme 500 μ l AutoMacs roztoku, čím boli bunky pripravené na magnetickú separáciu.

Postup magnetickej separácie:

1. Pre separáciu bolo dôležité si pripraviť magnet a kolónky veľkosti MS;
2. kolónka bola umiestnená do magnetu a premyli ju aspoň 2 ml AutoMacs roztoku;
3. po premytí kolónky bola do kolónky napipetovaná pripravená bunková suspenzia ktorá bola najskôr zbavená zhlukov pomocou filtrácie (filter 100 μ m);
4. po prekvapkaní suspenzie bola kolónka premytá 1 ml roztoku;
5. bunky ostali naviazané na magnete a boli získané pomocou piestu, spôsobom, že kolónka bola odobraná z magnetu a vložená do novo pripravenej skúmavky; do kolónky bolo pridané dvakrát po 1 ml AutoMacs roztoku a pomocou piestu boli bunky vytlačené do skúmavky = CD34 pozitívna selekcia.

Separáciou bola získaná frakcia CD34⁺ buniek, ktoré boli následne stimulované 6 dní pomocou Flt3L, IL-3, a β -merkaptotanolu (ME). Stimulácia mala za účel pomnoženie populácie buniek a vznik pDC, pre ktoré sú dané stimulatory dôležité. Stimulatory boli k bunkám pridávané v konštantných koncentráciách každý tretí deň: Flt3L – koncentrácia 100 ng/ml, koncentrácia IL-3 20 ng/ml a koncentrácia ME bola 50 μ M/ml. Po šiestich dňoch boli bunky spočítané a nastimulované *E. coli* O83, pričom boli

porovnávané s bunkami nestimulovanými. Ďalší deň boli bunky opäť spočítané a nasadené do 24-jamkovej doštičky spolu s CD4⁺ bunkami, ktoré boli získané separáciou pomocou magnetických guľičiek (viď kap 3.5.6) z izolovaných buniek pupočníkovej krvi pomocou Histopaque. Rovnako ako u mDC (viď kap 3.5.4) tak aj u pDC bolo nasadzovaných 100 000 pDC a na kokultiváciu k nim bolo pridaných 1 x 10⁶ CD4⁺ buniek a doplnené do 1,5 ml médiom RPMI Sigma (namiešaný roztok s FTS, Heps, Gentamycín) a doštička bola vložená do termostatu na ďalšie 4 dni. Po uplynutí štyroch dní boli k suspenzii buniek v 24-jamkovej doštičke pridané protilátky CD3 a CD28 vo finálnej koncentrácii 1 µg/ml, takisto bolo pridané aj 500 µl média RPMI Sigma. Po ďalších troch dňoch bol k bunkám v doštičke pridaný LAC a približne po 5 hodinách boli bunky intracelulárne zafarbené, pričom v postupe práce bol dodržovaný protokol od výrobcu (viď kap 3.5.7).

3.5.6 Separácia CD4⁺ pomocou magnetických guľičiek

Rovnako ako pri predošlých dvoch separáciách, aj tu bolo podstatné celú dobu pracovať sterilne, rýchlo, a bunky udržiavať v chlade pri teplote 2-8 °C.

Postup prípravy buniek pred separáciou (magnetické značenie – značenie pomocou protilátok s naviazanými magnetickými guľičkami) prebiehal podľa protokolu:

1. Po 1 hodinovej inkubácii buniek v MEM-u, bola do 50 ml skúmavky odobraná neadherovaná frakcia buniek, ktorá bola dôkladne prepláchnutá fyziologickým roztokom a následne bola suspenzia scentrifugovaná pri 250 g, 4 °C, 10 minút;
2. supernatant bol zliaty a paletka buniek rozsuspendovaná v 40 µl AutoMacs roztoku (platí pre množstvo 10⁷ buniek);
3. následne bolo do skúmavky pridané 10 µl CD4⁺ T Cell Biotin-antibody cocktail;
4. suspenzia buniek bola dôkladne premiešaná (prípadne zvortexovaná) a inkubovaná 5 minút v chladničke (pri teplote 2-8 °C),
5. po inkubácii bolo k bunkám pridaných 30 µl AutoMacs roztoku a 20 µl CD4⁺ T Cell MicroBead Cocktail (platí pre množstvo 10⁷ buniek);
6. bunky boli opäť dôkladne premiešané a inkubované 10 minút v chladničke;
7. nakoniec po inkubácii bola paletka buniek rozsuspendovaná vo finálnom objeme 2 ml AutoMacs roztoku, čím boli bunky pripravené na magnetickú separáciu .

Postup magnetickej separácie:

1. Pre separáciu bolo dôležité si pripraviť magnet a kolónky veľkosti MS;

2. kolónka bola umiestnená do magnetu a premytá minimálne 2 ml AutoMacs roztoku;
3. po premytí kolónky bola do kolónky napipetovaná pripravená bunková suspenzia ktorá bola najskôr zbavená zhlukov pomocou filtrácie (filter 100 μm);
4. po prekvapnutí suspenzie bola kolónka premytá 2 ml roztoku.

Separáciou boli získané naivné CD4^+ T-lymfocyty, ktoré sa pridávali na kokultiváciu k mDC (viď kap 3.5.4) a rovnako tak aj k pDC (viď kap. 3.5.5).

3.5.7 Intracelulárne farbenie buniek

Počas celého protokolu práca prebiehala s bunkami uloženými na ľade.

Postup práce pri intracelulárnom farbení CD4^+ ako u mDC, tak aj pDC:

1. Z 24-jamkovej mikrotitračnej doštičky boli odobrané bunky (kontrola (K) a *E. coli* O83) do skúmaviek a scentrifugované pri 250 g, 5 minút, 4 °C;
2. supernatant kultúr bol odobraný do 2 ml ependorfky pre následné stanovenie cytokínov metódou ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), supernatanty boli následne zamrazené pri -20 °C;
3. k bunkám v skúmavkách bolo pridané po 100 μl 0,5 % roztoku BSA a 4 μl monoklonálnej protilátky (mAb) CD4^+ a boli inkubované 30 minút v chlade a tme;
4. medzitým bol pripravený fixačný a permeabilizačný roztok („Fix/Perm Buffer“);
5. po inkubácii bolo k bunkám pridané po 2 ml 0,5 % BSA, skúmavky boli zvortexované a scentrifugované;
6. supernatant bol zliaty, skúmavky zvortexované a bolo pridané po 1 ml fixačného roztoku, ktorý bol pripravený vopred a inkubované 45 minút v chlade a tme;
7. počas inkubácie bol pripravený premývací roztok („Perm/Wash Buffer“);
8. takisto bola do ependorfiek pripravená zmes mAb pre intracelulárne farbenie jednotlivých subpopulácií buniek, a to: Th1/Th2 a Th17/Treg; bolo pridávané po 5 μl z každej mAb na skúmavku (mAb boli udržiavané na ľade a v tme);
9. po 45 minútovej inkubácii bolo do skúmaviek pridané po 1 ml pripraveného premývacieho roztoku a boli scentrifugované;
10. bunky boli premyté 2 ml premývacieho roztoku;
11. supernatant bol zliaty a bolo pridaé po 200 μl premývacieho roztoku do každej skúmavky, dôkladne rozsuspendované a 100 μl z jednej skúmavky bolo

- prenesených do ďalšej skúmavky → jedna dvojica skúmaviek pre farbenie populácie Th1/Th2, druhá dvojica pre Th17/Treg;
12. následne bolo pridané po 25 μ l z pripravenej zmesi mAb na jednu skúmavku a boli inkubované 45 minút v chlade a tme;
 13. nakoniec bola suspenzia dvakrát premytá 2 ml premývacieho roztoku a scentrifugovaná; supernatant bol zliaty a pridaný finálny objem 300 μ l 0,5 % BSA, čím boli vzorky pripravené na meranie prietokovým cytometrom.

3.5.8 ELISA

ELISA je jednou z najpoužívanejších imunochemických metód slúžiacich k detekcii rôznych analytov (protilátok alebo antigénov). Ku značeniu protilátky sa využíva enzým – najčastejšie chrenová peroxidáza – naviazaný na Fc fragment protilátky. Reakcia enzýmu so substrátom sa prejaví vznikom farebného produktu. Výsledná detekcia intenzity farebného produktu sa stanovuje spektrofotometricky.

Postup práce

Daný postup práce bol použitý pre všetky cytokíny okrem IL-10, ktorý bol odlišný.

1. Deň

V prvý deň boli naviazané primárne monoklonálne protilátky (mAb), ktoré boli rozriedené v PBS podľa údajov u jednotlivých zamrazených alikvót (7,45 ml PBS + 50 μ l mAb). Následne boli mAb napipetované do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky NUNC po 75 μ l/jamka a inkubované pri laboratórnej teplote do druhého dňa. Tak isto boli pripravené aj potrebné roztoky: premývací, blokovací a riediaci roztok, ktoré boli uchovávané v chladničke pri 5 °C.

2. Deň

Na začiatku druhého dňa boli všetky jamky 3x premyté 200 μ l premývacieho roztoku. Po premytí bolo do doštičky nasadených 150 μ l riediaceho roztoku a doštička bola inkubovaná 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Po hodine bola doštička opäť premytá a bolo nanesené po 50 μ l/jamku štandardov a vzoriek, vždy v dubletoch. Pre prípravu jednotlivých vzoriek boli použité rôzne riedenia, v závislosti od typu vzorky (Tab. 6). Doštička bola inkubovaná 2 hodiny pri

laboratórnej teplote a následne prikrytá a uložená do chladničky do ďalšieho dňa.

3. Deň

Posledný, tretí deň bolo po premytí doštičky nasadených po 50 μ l biotinylovanej protilátky opäť riedenej v riediacom roztoku podľa údajov u rozmrazených alikvót. Doštička bola inkubovaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Po premytí doštičky bol pridaný do jamiek streptavidín riedený v pomere 1: 1000 v riediacom roztoku (TBS) po 50 μ l na jamku a doštička bola inkubovaná 20 minút pri laboratórnej teplote na tmavom mieste. Po poslednom premytí doštičky, bol pridaný vyvolávací roztok (substrát) po 50 μ l na jamku a nechal sa inkubovať približne 5-10 minút. Reakcia bola zastavená 50 μ l/jamku 2M H₂SO₄. Výsledok bol zmeraný spektrofotometricky.

Postup práce pre IL-10

1. Deň

V prvý deň boli naviazané mAb, ktoré boli rozriedené v koncentrovanom PBS bez nosičového proteínu. Následne boli mAb napipetované do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky NUNC po 75 μ l/jamka a inkubované pri laboratórnej teplote do druhého dňa. Tak isto boli pripravené aj potrebné roztoky: premývací, blokovací a riediaci roztok, ktoré boli uchovávané v chladničke pri 5 °C.

2. Deň

Na začiatku druhého dňa boli všetky jamky 3x premyté 400 μ l premývacieho roztoku. Po premytí bolo do doštičky nasadených 150 μ l riediaceho roztoku a doštička bola inkubovaná 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Po hodine bola doštička opäť premytá a bolo nanosených po 50 μ l na jamku štandardov a vzoriek, vždy v dubletoch. Pre prípravu jednotlivých vzoriek boli použité rôzne riedenia, v závislosti od typu vzorky a boli inkubované 2 hodiny pri laboratórnej teplote (Tab. 8). Po uplynutí časového intervalu 2 hodín, boli jamky opäť premyté premývacím roztokom a bolo pridaných 50 μ l detekčnej (biotinylovanej) protilátky riedenej v riediacom roztoku do každej jamky a následne bola doštička inkubovaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Po premytí doštičky bol pridaný do jamiek streptavidín riedený v pomere 1: 1000

v riediacom roztoku (TBS) po 50 μ l na jamku a doštička bola inkubovaná 20 minút pri laboratórnej teplote na tmavom mieste. Po poslednom premytí doštičky, bol pridaný vyvolávací roztok (substrát) po 50 μ l na jamku a nechal sa inkubovať približne 5-10 minút. Reakcia bola zastavená 50 μ l/jamku 2M H_2SO_4 . Výsledok bol zmeraný spektrofotometricky.

Tab. 6: Riedenia vzoriek použité pri ELISA

Vzorky	riedenie
mDC po 24 hod	dvakrát
mDC z kokultivácií	neriedené
pDC z kokultivácií	neriedené

4 CIELE PRÁCE

- Vplyv vakcíny *E. coli* O83:K24:H31 na maturáciu mDC/pDC novorodencov zdravých a alergických matiek;
- porovnanie produkcie cytokínov po stimulácii *E. coli* O83 u mDC novorodencov zdravých a alergických matiek;
- rozdiel v indukcii subpopulácií (Th1, Th2, Th17 a Treg) po kokultivácii naivných CD4⁺ T-lymfocytov s mDC/pDC stimulovaných *E. coli* O83 novorodencov zdravých a alergických matiek.

5 VÝSLEDKY

V rámci vypracovania tejto práce boli do štúdie zahrnuté zdravé a alergické matky bez vážnejších komplikácií počas tehotenstva, ktoré porodili cisárskym rezom alebo prirodzenou cestou v riadnom termíne v „Ústavu péče o matku a dieťa“ v Podolí v Prahe od októbra 2015 do apríla 2017 po podpísaní písomného súhlasu. Štúdiu tvorili matky prevažne z Prahy či jej okolitých miest. Vek medzi nealergickými zdravými (Z) a alergickými (A) matkami sa významne neodlišoval (Z: $31,5 \pm 5$ rokov; A: $31,8 \pm 4,3$ rokov). Medzi faktory, ktoré môžu ovplyvniť reaktivitu CBMC, radíme dĺžku tehotenstva, ale aj fajčenie či stravovacie návyky, ktoré takisto nepreukázali významnú odlišnosť medzi skupinami. Alergia u matiek bola stanovovaná na klinickom prejave pretrvávajúcom dlhšie ako 1 rok, pričom matka bola sledovaná alergológom, mala pozitívne kožné testy (tzv. skin prick tests) alebo pozitívne špecifické protilátky IgE.

Pôsobenie probiotickej vakcíny *E. coli* O83 na indukciu maturácie a produkciu cytokínov u mDC bolo testované u detí zdravých matiek (deti s relatívne nízkym rizikom vývoja vzniku alergie) a detí alergických matiek (deti s pomerne vysokým rizikom vzniku alergie).

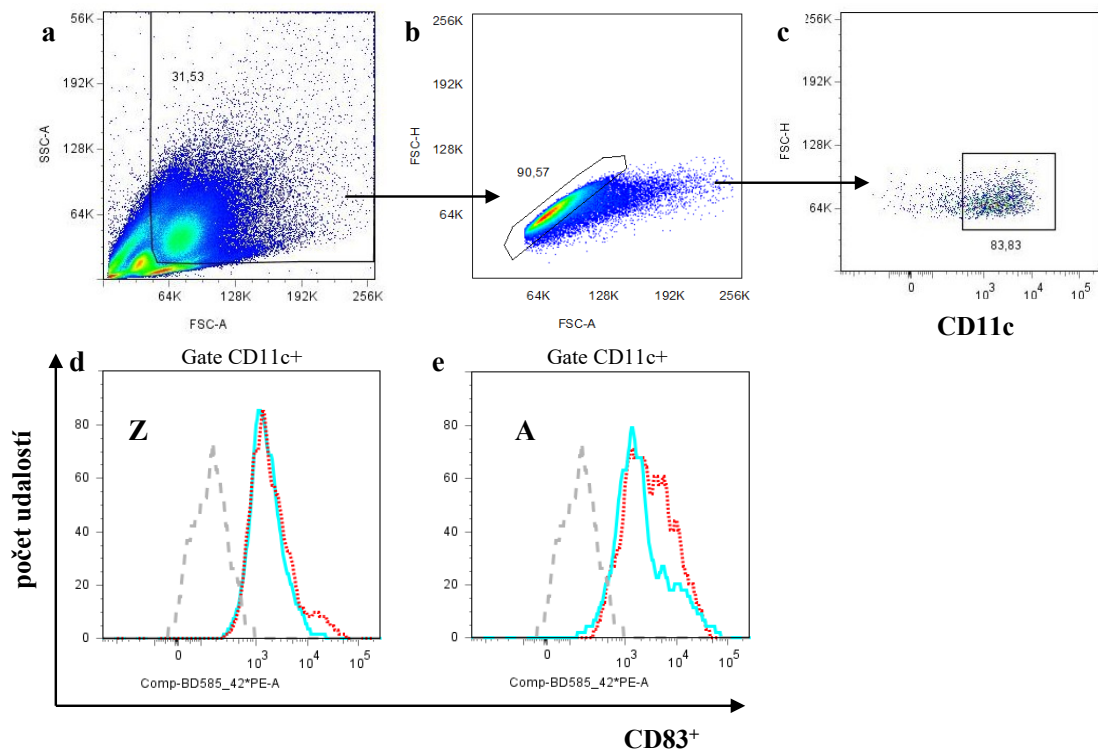
5.1 *E. coli* O83 indukuje maturáciu mDC, ale nie pDC

Účinok *E. coli* O83 na indukciu maturácie čerstvo izolovaných mDC bol testovaný u detí zdravých matiek (Z O83) a u detí matiek s alergiou (A O83). Tento efekt bol porovnaný s ich nestimulovanými kontrolami z mDC a pDC (ZK a AK). V rámci pozorovania bolo u mDC porovnávaných 44 detí, konkrétne 26 detí zdravých matiek a 18 detí alergických matiek. Analyzované vzorky boli merané na prietokovom cytometri a ďalej spracované programom FlowJo (spôsob vyhodnotenia výsledkov je ukázaný na Obr. 7). Rovnaký postup analýzy bol použitý aj u druhej skupiny DC – u pDC (Obr. 8), avšak s rozdielnymi protilátkami (použitá CD123⁺). U pDC bolo pozorovaných spolu 20 detí, a to 9 detí zdravých matiek s 11 deťmi alergických matiek. Štatisticky boli vyhodnotené použitím t-testu a graficky prezentované ako priemer so strednou chybou priemeru (Obr. 9).

Cytometrická analýza u mDC zahrňovala výber celej populácie buniek (Obr. 7a), z ktorých boli vylúčené doublety (Obr. 7b) a následne ohraničenie populácie pre CD11c⁺ populáciu mDC (Obr. 7c). Na základe toho bola oddelená nami skúmaná skupina CD83⁺

(PE) populácie z CD11c⁺ (PE-Cy7) populácie buniek použitím FMO (Fluorescence-Minus-One) kontrol pre znak CD11c⁺ u mDC. Rovnako ako u mDC, tak aj v prípade pDC bol použitý rovnaký spôsob výberu populácie buniek oddeľujúci CD83⁺ (PE) populáciu z CD123⁺ (FITC) populácie buniek použitím FMO kontrol pre znak CD123⁺ (Obr. 8a, b, c).

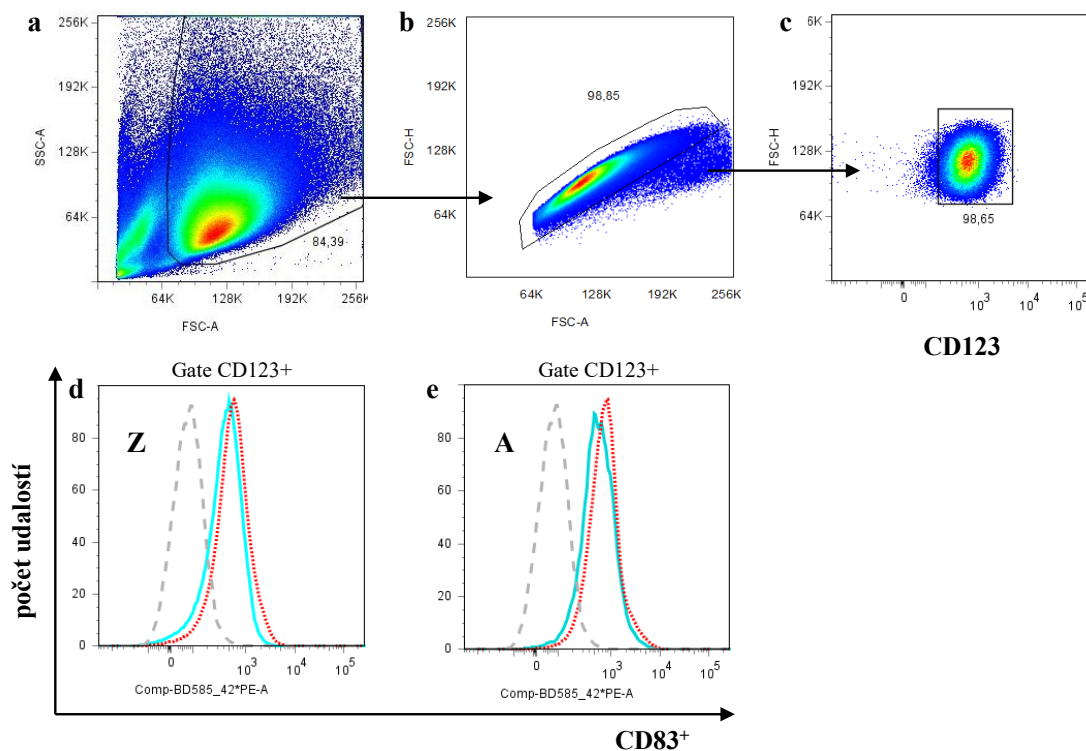
Po stimulácii *E. coli* O83 u oboch skúmaných skupín sme pozorovali nárast CD83 pozitívnej populácie (CD83⁺) CD11c pozitívnych mDC (CD11c⁺). Signifikantne vyššia prítomnosť znaku CD83⁺ na mDC bola detegovaná u detí zdravých ($p = 0,0047$) a aj alergických matiek ($p = 0,0097$) po stimulácii *E. coli* O83 (u Z O83 a A O83) v porovnaní s nestimulovanou kontrolou (ZK, AK) (Obr. 9).



Obr. 7: Ohraničenie populácie buniek mDC po 24 hod stimulácii *E. coli* O83 meraná na prietokovom cytometri porovnaním s nestimulovanou populáciou.

- Dot plot znázorňujúci všetky zmerané udalosti a výber (gate) bunkovej populácie podľa veľkosti (FSC) a komplexity (SSC);
 - vylúčenie doubletov (= výber singletov);
 - výber populácie buniek pozitívnych pre CD11c (znak v PE-Cy7);
 - reprezentatívny histogram prítomnosti CD83 na mDC detí zdravých matiek (Z);
 - reprezentatívny histogram prítomnosti CD83 na mDC detí alergických matiek (A).
- d), e) Z CD11c⁺ buniek sú zobrazené histogramy porovnávajúce nestimulovné mDC (modrá čiara) so vzorkami stimulovanými *E. coli* O83 (červená prerušovaná čiara) u detí zdravých (Z) a alergických (A) matiek a šedá prerušovaná čiara zobrazuje FMO kontrolu.

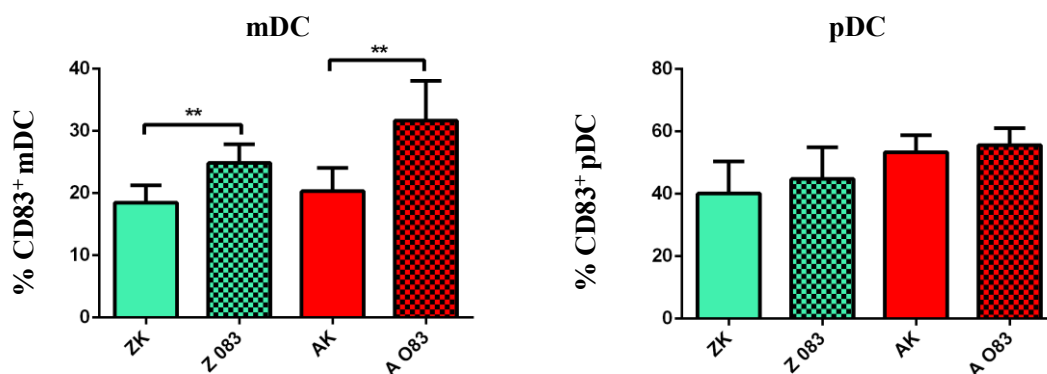
Bunky neznačené CD11c protilátkou sú zobrazené v Prílohe 2.



Obr. 8: Ohraničenie populácie buniek pDC po 24 hod stimúlácii *E. coli* O83 meraná na prietokovom cytometri porovnaním s nestimulovanou populáciou.

- a) Dot plot znázorňujúci všetky zmerané udalosti a výber (gate) bunkovej populácie podľa veľkosti (FSC) a komplexity (SSC);
 - b) vylúčenie doubletov (= výber singletov);
 - c) výber populácie buniek pozitívnych pre CD123 (znak vo FITC);
 - d) reprezentatívny histogram prítomnosti CD83 na pDC detí zdravých matiek (Z);
 - e) reprezentatívny histogram prítomnosti CD83 na pDC detí alergických matiek (A).
- d), e) Z CD123⁺ buniek sú zobrazené histogramy porovnávajúce nestimulované pDC (modrá čiara) so vzorkami stimulovanými *E. coli* O83 (červená prerušovaná čiara) u detí zdravých (Z) a alergických (A) matiek a šedá prerušovaná čiara zobrazuje FMO kontrolu.

Bunky neznačené CD123 protilátkou sú zobrazené v Prílohe 2.



Obr. 9: Porovnanie mDC a pDC detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83 s nestimulovanou kontrolou.

A) Povrchová expresia znaku CD83 pozitívnych mDC kultivovaných bez a s *E. coli* O83; n = 44; Z(26) a A(18).

B) Povrchová expresia znaku CD83 pozitívnych pDC kultivovaných bez a s *E. coli* O83; n = 20; Z (9) a A (11).

Dáta boli štatisticky vyhodnotené použitím t-testu a graficky prezentované ako priemer so strednou chybou priemeru.

ZK – nestimulované mDC detí zdravých matiek (zelený stĺpec bez výplne);

Z O83 – mDC (ZK) stimulované *E. coli* O83 (zelený stĺpec s výplňou, textúrou);

AK – nestimulované mDC detí alergických matiek (červený stĺpec bez výplne);

A O83 – mDC (AK) stimulované *E. coli* O83 (červený stĺpec s výplňou, textúrou).

**p ≤ 0.01

5.2 Kokultivácia mDC a pDC stimulovaných *E. coli* O83 s naivnými CD4⁺ T bunkami

Po stanovení vplyvu *E. coli* O83 na maturáciu mDC a pDC smer sa zamerali na štúdium vplyvu *E. coli* O83 stimulovaných DC na polarizáciu T-lymfocytov. Boli použité dva panely protilátok zamerané na rovnováhu polarizácie medzi: a.) Th1 a Th2; b.) Th17 a Tregs.

Merané boli transkripčné faktory a cytokíny typické pre Th1 (T-bet, IFN- γ), Th2 (GATA3, IL-4, IL-13), Th17 (ROR γ t, IL-17A, IL-22) a Treg (FoxP3, IL-10). Bolo analyzovaných 29 mDC vzoriek kokultivovaných s CD4⁺ T-lymfocytmi, z toho 16 detí zdravých a 13 detí alergických matiek. V prípade kokultivácie CD4⁺ T-lymfocytov s pDC bolo porovnaných 16 jedincov – 7 detí zdravých a 9 detí alergických matiek.

Bunky boli opäť zmerané pomocou prietokového cytometra a dáta boli spracované pomocou analyzačného softvéru FlowJo (Obr.10) a štatistického programu GraphPad Prism, ktorý nám umožnil graficky vizualizovať dosiahnuté výsledky (Obr. 11, 12).

Následne boli dáta štatisticky vyhodnotené použitím Mann-Whitney U testu a graficky prezentované ako priemer so strednou chybou priemeru.

5.2.1 Transkripčné faktory a cytokíny charakteristické pre dané subpopulácie

Cytometrická analýza mDC, rovnako tak aj pDC kokultivácií zahŕňala výber celej populácie buniek, z ktorej boli vylúčené doublety a následne zacielenie na populáciu CD4⁺ (APC-Cy7) buniek (Obr. 10A). Z CD4⁺ sme následne zacieleni populácie buniek pre jednotlivé transkripčné faktory a príslušné cytokíny Th1/Th2 (Obr. 10B), ako aj Th17/Treg imunitnej odpovede (Obr. 10C). Všetky cytokíny a transkripčné faktory boli zacielené použitím nestimulovanej kontroly. Porovnanie rôznych typov kontrol je zobrazený v Prílohe 4.

CD4⁺ lymfocyty kokultivované s mDC

Bolo pozorované zvýšené percentuálne zastúpenie IL-4, cytokínu charakteristického pre Th2 imunitnú odpoveď u CD4⁺ T buniek kokultivovaných s kontrolnými mDC detí zdravých matiek v porovnaní s deťmi alergických matiek (IL-4⁺ CD4⁺; $p = 0,0178$) (Obr. 11A). Po stimulácii *E. coli* O83 sme štatistickú signifikanciu nezaznamenali.

V prípade druhého cytokínu Th2 imunitnej odpovede, IL-13, výsledky poukazujú na približne rovnaké hodnoty či už u zdravých alebo alergických jedincov. Štatistická významnosť v rámci skupín sa nepotvrdila. U transkripčného faktora GATA3 tomu nie je inak. Pozorujeme, že po stimulácii *E. coli* O83 je mierne zvýšené percentuálne zastúpenie buniek tvoriacich GATA3⁺, no nesignifikantne.

U charakteristického Th1 transkripčného faktora T-bet, bolo pozorované vyššie percentuálne zastúpenie u mDC v rámci Z skupiny, či už stimulovanej alebo nestimulovanej, avšak bez štatistickej významnosti medzi oboma skupinami (Obr. 11A).

Štatistickej významnosti sme nedosiahli ani v prípade IFN- γ . Nebol pozorovaný žiadny efekt stimulácie mDC pomocou *E. coli* O83 na rozdiel v indukcii ako Th1 imunitnej odpovede (T-bet, IFN- γ) tak Th2 (GATA3, IL-4, IL-13) imunitnej odpovede.

Pri hodnotení prítomnosti transkripčného faktora ROR γ t, ktorý je charakteristický pre Th17 imunitnú odpoveď, bol zaznamenaný mierny vzostup expresie u T-lymfocytov kokultivovaných s mDC po stimulácii *E. coli* O83 u oboch skúmaných skupín (Obr. 11B).

U cytokínov charakteristických pre Th17 imunitnú odpoveď (IL-17A, IL-22) nebola pozorovaná žiadna zmena v produkcii týchto cytokínov T-lymfocytmi, ktoré boli kokultivované s kontrolnými a probiotikom stimulovanými mDC. Výsledky poukazujú na to, že produkcia IL-17A aj IL-22 T-lymfocytmi nie je ovplyvnená alergickým stavom matky (dieťaťa) a ani stimuláciou mDC probiotickou baktériou *E. coli* O83. U obidvoch skupín, Z aj A, dosahujeme približne rovnaké výsledky (Obr. 11B).

U FoxP3, transkripčného faktora charakterizujúceho T regulačné bunky (Treg) a im prislúchajúceho typického cytokínu IL-10, sme nepozorovali žiadny rozdiel medzi Z a A skupinou a to ani po kokultivácii CD4⁺ buniek s mDC stimulovanými *E. coli* O83. Mierne zvýšené hodnoty transkripčného faktora FoxP3 môžeme vidieť po stimulácii u Z jedincov. Je však nutné povedať, že tieto rozdiely sú nesignifikantné (Obr. 11B).

Ani u Th17 (ROR γ t, IL-17A, IL-22) alebo Treg (FoxP3, IL-10) nepozorujeme žiadny efekt stimulácie *E. coli* O83 v indukcii imunitnej odpovede. U mDC nie sú viditeľné žiadne signifikantné rozdiely medzi Z a A skupinou a to ani medzi stimulovanými a nestimulovanými vzorkami.

CD4⁺ lymfocyty kokultivované s pDC

U intracelulárneho cytokínu IL-4 charakteristického pre Th2 imunitnú odpoveď sme v produkcii T-lymfocytmi medzi Z a A skupinou po stimulácii *E. coli* O83 nezaznamenali žiadnu signifikanciu (Obr. 12A). U druhého cytokínu Th2 imunitnej odpovede, IL-13, sme nedosiahli žiadnu štatistickú významnosť u CD4⁺ T buniek kokultivovaných s nestimulovanými pDC v rámci Z a A skupiny.

Nesignifikantne znížené percento GATA3⁺CD4⁺ Th2 T-lymfocytov u nestimulovaných pDC by mohlo poukazovať na zníženú predominciu Th2 imunitnej odpovedi u detí s predispozíciou k rozvoju alergie (čiže deti alergických matiek) v porovnaní s deťmi zdravých matiek (Obr. 12A).

Nebol zaznamenaný žiadny efekt stimulácie pDC *E. coli* O83 na rozdiel v indukcii Th1 imunitnej odpovede (T-bet, IFN- γ). U zdravých jedincov pozorujeme nižšie percentuálne zastúpenie IFN- γ oproti alergickým, avšak bez signifikancie.

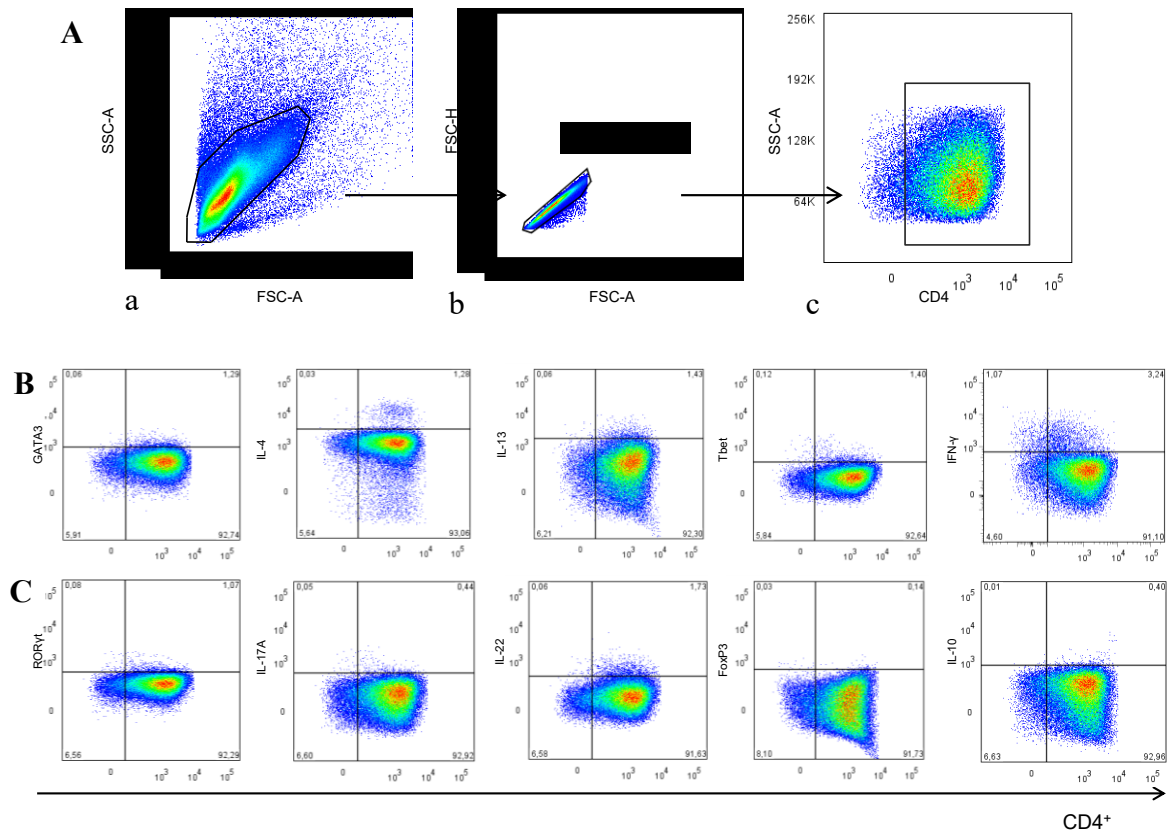
Pri hodnotení prítomnosti transkripčných faktorov v druhom paneli (Th17/Treg) sa nepozoroval žiadny rozdiel u ROR γ t medzi Z a A skupinou a to ani po kokultivácii CD4⁺ buniek s pDC stimulovanými *E. coli* O83 (Obr. 12B). Rovnaký prípad nastal aj u druhého transkripčného faktora FoxP3, kde malý viditeľný rozdiel nastal u detí zdravých matiek po

kokultivácii CD4⁺ buniek s pDC stimulovanými *E. coli* O83 (Obr. 12B). Tento rozdiel však nedosahuje štatistickej významnosti.

U cytokínov charakteristických pre Th17 imunitnú odpoveď (IL-17A, IL-22) pozorujeme rovnaké výsledky ako u mDC. Výsledky nezaznamenávajú žiadny nárast produkcie cytokínov T-lymfocytmi, ktoré boli po kokultivácii ako s kontrolnými, tak stimulovanými pDC. V rámci zdravých jedincov pozorujeme nesignifikantné, ale o pár jednotiek menšie percentuálne zastúpenie buniek tvoriacich IL-17A. Podobná situácia bola zaznamenaná aj v prípade regulačného cytokínu IL-10. Nepozorujeme tak žiadny efekt stimulácie *E. coli* O83 v indukcii imunitnej odpovede.

Kompenzácia všetkých analyzovaných vzoriek je zobrazená v Prílohe 3.

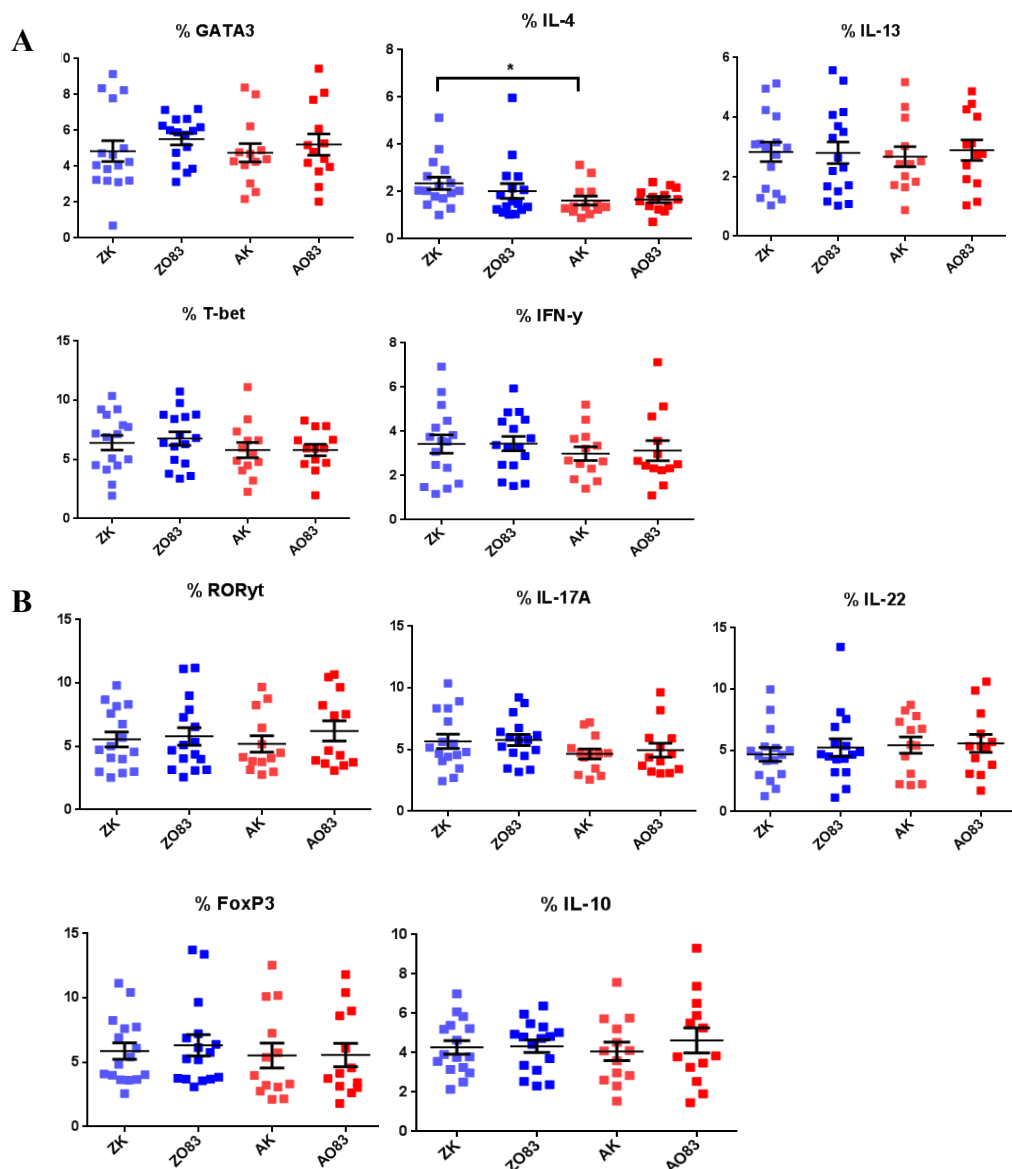
Namerané dáta jasne poukazujú, že probiotická baktéria *E. coli* O83 nemá účinok na Th2 imunitnú odpoveď. Toto tvrdenie je v rozpore s našou pôvodnou hypotézou, kde sme predpokladali u nezrelého imunitného systému novorodencov zníženie množstva Th2 cytokínov, čo by malo za následok zníženie rozvoja vzniku alergie a tým rýchlejšiu maturáciu novorodeneckého imunitného systému.



Obr. 10: Meranie transkripčných faktorov a cytokínov charakteristických pre jednotlivé subpopulácie $CD4^+$ T-lymfocytov kokultivovaných s mDC/pDC stimulovanými *E. coli* O83.

A. Na prvých troch obrázkoch je vidieť ohraničenie populácie buniek použitej pre kokultivácie lymfocytov s mDC, rovnako aj u pDC. Najprv bola vybraná celá populácia buniek podľa veľkosti a komplexity (a), z nich singlety (b) a nakoniec populácia $CD4$ (APC-Cy7) pozitívnych buniek (c).

B., C. Populácie $CD4$ pozitívnych buniek pre jednotlivé transkripčné faktory a príslušné cytokíny Th1/Th2 imunitnej odpovede (**B**) rovnako aj u Th17/Treg imunitnej odpovede (**C**). V prípade subpopulácii buniek Th1/Th2 imunitnej odpovede (**B**) je vidieť, že $CD4^+$ a $GATA3^+$ (PE) populáciu tvorí 1,29%; $CD4^+$ a $IL-4^+$ (PE-Cy7) populáciu tvorí 1,28%; $CD4^+$ a $IL-13^+$ (APC) populáciu tvorí 1,43%; $CD4^+$ a $Tbet^+$ (FITC) populáciu tvorí 1,40%; $CD4^+$ a $IFN-\gamma^+$ (PerCP-Cy5.5) populáciu tvorí 3,24%. V prípade subpopulácii buniek Th17/Treg imunitnej odpovede (**C**) je vidieť, že $CD4^+$ a $ROR\gamma t^+$ (FITC) populáciu tvorí 1,07%; $CD4^+$ a $IL-17^+$ (PerCP-Cy5.5) populáciu tvorí 0,44%; $CD4^+$ a $IL-22^+$ (PE) populáciu mDC tvorí 1,73%; $CD4^+$ a $FoxP3^+$ (APC) populáciu tvorí 0,14%; $CD4^+$ a $IL-10^+$ (PE-Cy7) populáciu tvorí 0,40%.



Obr. 11: Vplyv stimulácie mDC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na indukciu Th1, Th2, Th17 a Treg imunitnej reakcie. Nestimulované a stimulované mDC boli kultivované s naivnými CD4⁺ bunkami, ku ktorým boli pridané CD3 a CD28, protilátky na stimuláciu. Následne bol k bunkám pridaný LAC (Leukocyte Activation Cocktail) a detegovaná prítomnosť transkripčných faktorov a intracelulárnych cytokínov prietokovým cytometrom.

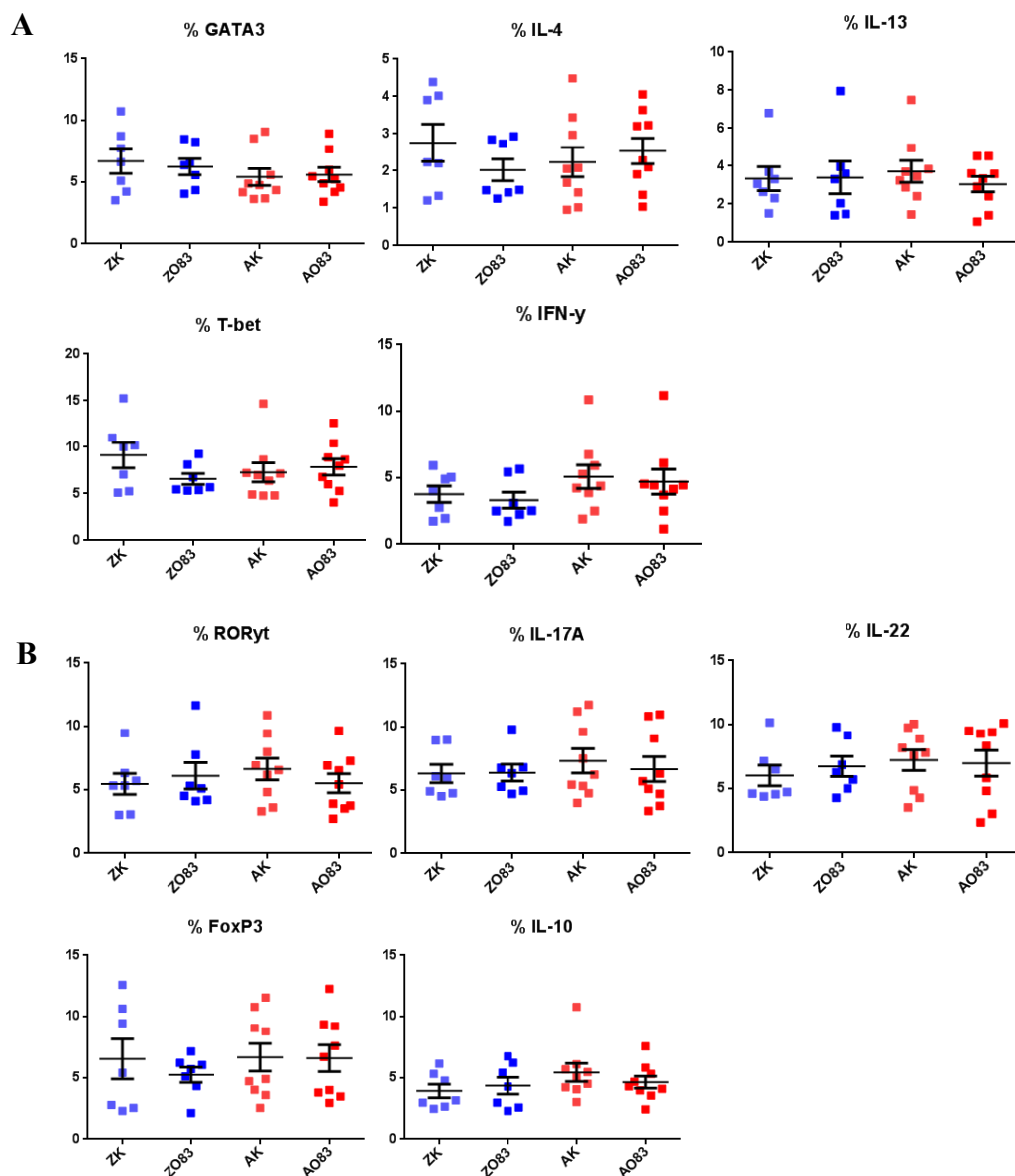
Rozdiely medzi skupinami boli štatisticky vyhodnotené pomocou Mann-Whitney U testu.

A) Percento Tbet⁺CD4⁺ Th1 buniek; Percento IFN-γ⁺CD4⁺ Th1 buniek; Percento GATA3⁺CD4⁺ Th2 buniek; Percento IL-4⁺CD4⁺ Th2 buniek; Percento IL-13⁺CD4⁺ Th2 buniek;

B) Percento FoxP3⁺CD4⁺ Treg buniek; Percento IL-10⁺CD4⁺ Treg; Percento RORγt⁺CD4⁺ Th17 buniek; Percento IL-17A⁺CD4⁺ Th17 buniek; Percento IL-22⁺CD4⁺ Th17 buniek.

ZK – nestimulované mDC detí zdravých matiek kokultivovaných s CD4⁺; Z O83 – *E. coli* O83 stimulované mDC detí zdravých matiek kokultivované s CD4⁺; AK – nestimulované mDC detí alergických matiek kokultivované s CD4⁺; A O83 – *E. coli* O83 stimulované mDC detí alergických matiek kokultivované s CD4⁺.

*p ≤ 0,05



Obr. 12: Vplyv stimulácie pDC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 na indukciu Th1, Th2, Th17 a Treg imunitnej reakcie. Nestimulované a stimulované pDC boli kultivované s naivnými CD4⁺ bunkami, ku ktorým boli pridané CD3 a CD28, protilátky na stimuláciu. Následne bol k bunkám pridaný LAC (Leukocyte Activation Cocktail) a detegovaná prítomnosť transkripčných faktorov a intracelulárnych cytokínov prietokovým cytometrom.

Rozdiely medzi skupinami boli štatisticky vyhodnotené pomocou Mann-Whitney U testu.

A) Percento Tbet⁺CD4⁺ Th1 buniek; Percento IFN-γ⁺CD4⁺ Th1 buniek; Percento GATA3⁺CD4⁺ Th2 buniek; Percento IL-4⁺CD4⁺ Th2 buniek; Percento IL-13⁺CD4⁺ Th2 buniek;

B) Percento FoxP3⁺CD4⁺ Treg buniek; Percento IL-10⁺CD4⁺ Treg; Percento RORγt⁺CD4⁺ Th17 buniek; Percento IL-17A⁺CD4⁺ Th17 buniek; Percento IL-22⁺CD4⁺ Th17 buniek po kokultivácii pDC.

ZK – nestimulované pDC detí zdravých matiek kokultivovaných s CD4⁺; ZO83 – *E. coli* O83 stimulované pDC detí zdravých matiek kokultivované s CD4⁺; AK – nestimulované pDC detí alergických matiek kokultivované s CD4⁺; AO83 – *E. coli* O83 stimulované pDC detí alergických matiek kokultivované s CD4⁺.

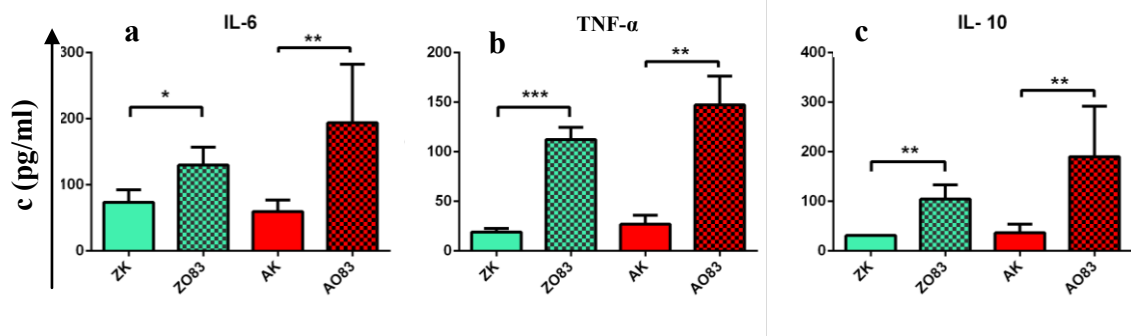
*p ≤ 0,05; ***p ≤ 0,001

5.3 Stimulácia probiotickým kmeňom *E. coli* O83 zvyšuje koncentráciu cytokínov v supernatante kultúr mDC

Pre hodnotenie koncentrácie cytokínov (TNF- α , IL-6 a IL-10) u subpopulácie mDC bola použitá metóda ELISA. Detegovalo sa ich množstvo v supernatante kultúr po 24 hodinách kultivácie s *E. coli* O83. V supernatante sa stanovila prítomnosť cytokínov vo vzorkách nestimulovaných a stimulovaných kmeňom *E. coli* O83. U mDC bola nameraná prítomnosť prozápalových IL-6, TNF- α a supresorového cytokínu IL-10. Stimulácia *E. coli* O83 spôsobila signifikantný nárast produkcie všetkých spomínaných cytokínov u mDC izolovaných z pupočníkovej krvi detí zdravých aj alergických matiek. Produkcia týchto cytokínov bola vyššia po stimulácii *E. coli* O83 u subpopulácie mDC alergických matiek, aj keď štatisticky nesignifikantná (Obr. 13).

Z grafu vidíme, že po stimulácii *E. coli* O83 ako u Z (ZK a ZO83; $p = 0,0396$) tak u A skupiny (AK a AO83; $p = 0,0049$) bola detegovaná produkcia IL-6 v mDC ako signifikantná (Obr. 13a). Schopnosť *E. coli* O83 indukovať tvorbu TNF- α bola podobná ako v prípade IL-6. U Z jedincov vidíme výrazný signifikantný rozdiel v produkcii TNF- α medzi kontrolnými a stimulovanými mDC (ZK a ZO83; $p = 0,0002$). K ešte väčšej produkcii po stimulácii *E. coli* O83 došlo porovnaním kontrolných a stimulovaných vzoriek v skupine A jedincov (AK a AO83; $p = 0,0079$) (Obr. 13b). Hoci opäť možno pozorovať trend vyšších hodnôt IL-6 u mDC stimulovaných *E. coli* O83 A skupiny, nie je toto zvýšenie štatisticky významné v porovnaní s mDC Z. U posledného analyzovaného cytokínu, regulačného IL-10, vidíme signifikantne vyššiu produkciu po stimulácii *E. coli* O83 u Z jedincov porovnaním kontroly a stimulovanej vzorky (ZK a ZO83; $p = 0,0024$). Rovnaký trend bol pozorovaný aj v druhej, A skupine (AK a AO83; $p = 0,0013$) avšak s viditeľne vyšším rozdielom po stimulácii *E. coli* O83 (Obr. 13c). Namerané dáta boli štatisticky vyhodnotené použitím t-testu a prezentované ako priemer so strednou chybou priemeru (Obr. 13).

Koncentrácie ďalších sledovaných cytokínov (IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-22 a IFN- γ) v supernatante kultúr DC s CD4⁺, bohužiaľ, nebolo možné štatisticky vyhodnotiť, pretože ich hodnoty sa nachádzali pod detekčným limitom metódy ELISA.



Obr. 13: **Produkcia cytokínov dendritickými bunkami u detí zdravých a alergických matiek po stimulácii *E. coli* O83 v porovnaní s kontrolou.**

Získané výsledky sú prezentované formou stĺpcových diagramov s priemerom a strednou chybou priemeru. Rozdiely medzi skupinami boli štatisticky vyhodnotené pomocou t-testu.

- a) Sekrécia IL-6 u mDC stimulovaných *E. coli* 24 hod.; n = 13; Z (8) a A (5);
- b) Sekrécia expresia TNF- α u mDC stimulovaných *E. coli* 24 hod.; n = 13 Z (8) a A (5);
- c) Sekrécia IL-10 u mDC stimulovaných *E. coli* 24 hod.; n = 27; Z (16) a A (11).

ZK – nestimulované mDC detí zdravých matiek; Z O83 – stimulované mDC *E. coli* O83 detí zdravých matiek; AK – nestimulované mDC detí alergických matiek; A O83 – stimulované mDC *E. coli* O83 detí alergických matiek; c – koncentrácia v pg/ml.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

6 DISKUSIA

Vo výsledkoch diplomovej práce pozorujeme signifikantne vyššiu prítomnosť znaku CD83 na povrchu mDC po stimulácii probiotikom *E. coli* O83 v rámci zdravej a alergickej skupiny. Naopak v druhej sledovanej skupine DC, pDC, nie je viditeľný vplyv stimulácie probiotikom na aktiváciu týchto buniek. Po kokultivácii CD4⁺ T-lymfocytov s mDC pozorujeme zvýšené percentuálne zastúpenie IL-4 medzi zdravou a alergickou nestimulovanou kontrolou. Bohužiaľ v prípade ostatných testovaných cytokínov a transkripčných faktorov sme nezaznamenali žiadnu ďalšiu štatistickú významnosť. Veľmi podobnú situáciu sme pozorovali aj v prípade pDC, kde nedošlo k žiadnym signifikantným zmenám ani u jedného sledovaného znaku. Metódou ELISA bola detegovaná koncentrácia cytokínov u mDC v supernatante kultúr, kde po stimulácii *E. coli* O83 u detí zdravých aj alergických matiek dochádza k zvýšenej produkcii TNF- α , IL-6 a IL-10. Zároveň ale nepozorujeme výrazný vplyv probiotika *E. coli* O83 na polarizáciu imunitnej odpovede.

V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na probiotický kmeň *E. coli* O83 a mechanizmus jeho účinku, čím nadväzujeme na štúdie Lodinovej-Žádníkovej, ktorá má pozitívne výsledky s použitím tohto kmeňa [38,154]. V rámci prebiehajúceho projektu, ktorý je zameraný na objasnenie mechanizmu účinku pôsobenia tejto probiotickej vakcíny pri prevencii vzniku alergie, sme sa sústredili na jedinečnú populáciu APC – DC.

Vzorky použité v rámci celej diplomovej práce boli získané z pupočníkovej krvi. Je známe, že bunky obsiahnuté v pupočníkovej krvi neobsahujú iba bunky dieťaťa, ale aj bunky matky. Tými sme sa však v našej práci nezaoberali. Práce Halla *et al.* [155] Dawea *et al.* [156] a Stevensa *et al.* [157] hovoria o zastúpení materských buniek v pupočníkovej krvi dieťaťa. Zistenia poukazujú na fakt, že bunky matky tvoria minoritnú populáciu, a to 0,02 – 5 % buniek.

CBMC sa nezaoberala iba táto práca, ale rovnako tak aj predchádzajúce práce v našom laboratóriu [3,40,158–163] či práce ďalších iných laboratórií [164,165].

Pokusy prevedené a prezentované v diplomovej práci sú založené na umelom modele prevedenom *in vitro*, ktorý sa mal pokúsiť napodobniť možné mechanizmy pôsobenia *E. coli* O83 *in vivo*, kde je novorodencom včasne postnatálne (48 hod po pôrode v použitých štúdiách [154,158]) podaná *E. coli* O83. V našom prípade sa jedná o umelú

situáciu prevedenia stimulácie a restimulácie, ktorá neodpovedá prostrediu *in vivo*. Navyše *E. coli* O83 je podaná orálne a práve preto predpokladáme, že pôsobí na imunitný systém predovšetkým prostredníctvom črevnej sliznice. V predchádzajúcich pokusoch Lodinovej-Žádnikovej *et al.* [154] bol popisovaný dlhodobý účinok po podaní probiotickej vakcíny *E. coli* O83, kde skúmala vplyv a prítomnosť tejto baktérie po 10-tich a 20-tich rokoch. Prítomnosť nepatogénneho kmeňa v črevnom systéme znížila prítomnosť patogénnych baktérií, frekvenciu infekcií či potrebu antibiotickej terapie u nedonosených novorodencov. Po 10-tich rokoch u predčasne narodených detí od podania *E. coli* O83 bol znížený počet opakovaných infekcií. Po 10 a 20 rokoch bol nižší aj počet vzniku alergií v porovnaní s kontrolnou skupinou detí (12 % vs. 33 %). Táto štúdia publikovaná roku 2003 [154], viedla k iniciácii štúdie, v ktorej sme sledovali vybrané imunologické charakteristiky [38,162].

V inej štúdií publikovanej roku 2007 [3] sledovali alergický stav matky, vďaka čomu sa dalo predpovedať, ktoré deti sú v zvýšenom riziku vzniku vývoja alergie v neskoršom veku. Deti boli náhodne rozdelené do dvoch skupín a to na tie, ktoré budú alebo nebudú kolonizované probiotikom. Novorodencom bola podaná *E. coli* O83 do 48 hodín po narodení a potom pravidelne trikrát za týždeň v priebehu obdobia 4 týždňov. V stolici bola testovaná prítomnosť probiotickej baktérie v pravidelných intervaloch – 3. deň po narodení a potom 3, 6 a 12 mesiac. Dosiahli pozitívnych výsledkov, čo naznačuje veľmi dobré vlastnosti adhézie a kolonizácie tohto probiotika. Po 12 mesiacoch alergická diagnostika potvrdila to, že u osídlených detí je menší predpoklad vzniku alergie než u detí, ktoré osídlené neboli [3].

Schopnosť probiotickej vakcíny *E. coli* O83 indukovať Th1 imunitnú odpoveď je dôležitá z dôvodu nezrelosti imunitného systému novorodencov, ktorý majú prevahu Th2 odpovede. Avšak potlačená Th1 odpoveď spolu s dozrievaním imunitného systému novorodencov by mohla viesť k vzniku alergie. Toto by mohol byť možný mechanizmus ako *E. coli* O83 môže zabrániť rozvoju alergií a tak podporiť vyzrievanie imunitného systému novorodenca. [166]. Z vyššie uvedených dôvodov sa ako vhodná probiotická vakcína javí použitie kmeňa *E. coli* O83, ktorý vykazuje pozitívne účinky na maturáciu imunitného systému novorodencov *in vitro* [38,154].

V niektorých klinických štúdiách boli použité aj iné probiotické kmene (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) s pozitívnym výsledkom pri podávaní prenatálne aj postnatálne [167]. Efekt gram pozitívnych probiotických baktérií u CBMC na už

spomínaný nezrelý imunitný systém novorodenca pozoroval aj Kopp *et al.* [165]. Zistenia v uvedenej štúdií naznačujú, že stimulácia LGG u alergikov nemá *in vivo* žiadny efekt v oboch skúmaných skupinách. *In vitro* však dochádza u stimulovanej aj placebo skupiny k nárastu produkcie IL-10, IL-13 a IFN- γ . Nejednotnosť výsledkov (zníženie vzniku alergie po podaní probiotík) prítomných v použitej literatúre môže byť spôsobená použitím rôznych probiotických kmeňov v iných časových obdobiach, rovnako tak aj nejednotnosť skúmaných parametrov a vyšetrovacích metód. Avšak pozitívneho účinku sa docielilo u probiotického kmeňa Colinfant Newborn (*E. coli* O83), ktorého mechanizmus účinku ešte nie je dostatočne objasnený [3,154,168]. Porovnávať účinky rôznych probiotických baktérií je veľmi zložitá, pretože ich účinky sa líšia v závislosti nie len od druhu, ale navyše aj rôznych kmeňov daného druhu [36].

Na objasnenie schopnosti *E. coli* O83 indukovať maturáciu DC sme použili DC získané *in vitro* po frakcii mononukleárných buniek pupočníkovej krvi [161,162]. Predchádzajúce merania v laboratóriu naznačujú, že najcitlivejším a najvhodnejším markerom poukazujúcim na maturáciu DC je molekula CD83. Podobných výsledkov docielili aj Ebrahimi *et al.* či Aerts-Toegaert *et al.* [91,167]. Množstvo laboratórií, ktoré skúmali molekulu CD83 zistili, že hrá nepostrádateľnú úlohu pri aktivácii buniek na periférii a rovnako tak je potrebná na správne vyzretie CD4 T-lymfocytov [91,168,169] alebo B buniek *in vivo* [170]. Na základe výsledkov, nie len našich ale aj s inými laboratóriami, považujeme molekulu CD83 za najlepší marker zrania DC medzi ostatnými testovanými.

Stimulácia probiotickým kmeňom *E. coli* O83 podporovala indukciu maturácie mDC detí zdravých a alergických matiek. Táto stimulácia bola vyššia u alergickej skupiny v porovnaní s kontrolnou skupinou. Stimulácia probiotickými bakteriálnymi kmeňmi pozitívne ovplyvňuje aktivitu imunitného systému a znižuje riziko rozvoja alergií na základe podpory vyzrievania Th1 imunitnej odpovede [166]. Rovnakého výsledku docielili aj v predchádzajúcich štúdiách v našom laboratóriu, ktoré opisujú zvýšenú reaktivitu buniek pupočníkovej krvi novorodencov alergických matiek v porovnaní s matkami zdravými [158,160,161]. Vplyv *E. coli* O83 na indukciu maturácie bol výraznejší u CD83⁺ CD11c⁺ mDC a to dokonca signifikantne oproti CD83⁺ CD123⁺ pDC [166]. *E. coli* obsahuje ako súčasť bunkovej steny LPS a je rozpoznávaný pomocou TLR4 a ten majú na sebe aj mDC, naopak pDC rozpoznávajú iné TLR. [169]. Pravdepodobne preto sú mDC stimulované baktériou lepšie ako pDC.

***E. coli* O83 zvyšuje percento CD83⁺ mDC**

U mDC je vidieť, že dochádza k signifikantnému zvýšeniu CD83⁺ u A skupiny po stimulácii *E. coli* O83 (Obr. 9) čo koreluje s výsledkami práce Súkeníkovej *et al.*, ktorá sa venovala populácii mDC získaných *in vitro* z prekursorových buniek pupočníkovej krvi [159]. V jej práci bola rovnako ako v tejto práci spracovávaná pupočníková krv a použitý rovnaký probiotický kmeň *E. coli* O83. Po stimulácii *E. coli* O83 dochádza u A jedincov oproti Z k výraznejšej aktivácii stimulovaných buniek. Stúpa marker DC CD83⁺, čo značí aktivovanejšie a zrelšie DC.

Dendritické bunky majú široké uplatnenie, predovšetkým patria medzi najdôležitejšie APC, takisto určujú imunitné reakcie na široké spektrum antigénov vrátane alergénov a mikrobiálnych stimulov. Podľa zistení Jiaoa *et al.* je pre DC zaujímavý práve vplyv probiotík v kontexte s alergénmi a mikrobiálnymi stimulmi a to tým, že expozícia novorodenca mikrobiálnymi zložkami je inhibičná pre vývoj alergických reakcií v dospelosti; ďalej to vedie k zmenám vo fenotype a funkcii DC v dospelosti [170]. Dôležité je spomenúť, že ich výskum prebiehal na myšiach, kde im išlo o skúmanie účinku alergických reakcií po vystavení novonarodených myší usmrtenou baktériou *Chlamydia muridarum* krátko po ich narodení (5.-6. deň).

Diplomová práca porovnávala rovnako vplyv expozície probiotickej baktérie na procesy zúčastňujúce sa v rozvoji alergickej reakcie, nie však na myšiach, ako vo vyššie spomenutej práci, ale s použitím pupočníkovej krvi detí zdravých a alergických matiek.

V predchádzajúcej kapitole výsledky (viz kap. 5) bola popísaná zvýšená prítomnosť CD83 na mDC po stimulácii *E. coli* O83; mierne zvýšená bola aj u pDC, avšak nesignifikantne. Detekcia zvýšenej prítomnosti CD83 na mDC detí alergických matiek v porovnaní so zdravými, je v súlade s predchádzajúcimi pozorovaniami zvýšenej reaktivity CBMC u Žižky *et al.* [160] a génovou expresiou u mDC podľa Hrdého *et al.* [161]. Práca Hrdého skúmala pôsobenie *in vitro* za použitia moDC (Monocyte Derived Dendritic Cells) detí zdravých a alergických matiek, avšak k stimulácii používala nie *E. coli* O83, ale LPS (Lipopolysacharid). V rámci tejto diplomovej práce nebolo LPS použité ako ďalší stimulant kvôli nedostatočnému počtu buniek (vyizolovaných mDC) z pupočníkovej krvi. V ich prípade bola použitá väčšia skupina jedincov, a to viac ako 50 z oboch pozorovaných skupín. Dáta sú porovnateľné, pretože rovnako ako v tejto práci boli merané metódou prietokovej cytometrie, za použitia rovnakých médií.

Molekula CD80 sa nenachádza na nezrelých DC [171] u predčasne narodených detí, ale mala by byť prítomná na bunkovom povrchu DC u detí narodených v termíne po stimulácii LPS [172]. Toto pozorovanie nemôžeme preukázať, pretože v diplomovej práci bola použitá iba molekula CD83, ako najvhodnejší marker na indukciu maturácie DC.

Kokultivácia mDC a pDC stimulovaných *E. coli* O83 s naivnými CD4⁺ T bunkami

Kokultivácie buniek sme pripravovali podľa všeobecného a bežne používaného protokolu [175].

V tejto práci sme na stimuláciu buniek používali LAC, ktorý obsahuje phorbol ester PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), ionomycín a proteínový transportný inhibítor Golgi plug (Brefeldin A) ¹⁸, ktorý zabraňuje fúzii Golgiho váčkov s membránou; zabraňuje extracelulárnemu transportu intracelulárnych cytokínov. Autori viacerých dostupných štúdií [173–176] používajú jednotlivé zložky potrebné na stimuláciu buniek, nie ich zmesi. Je známe, že po stimulácii PMA dochádza k internalizácii molekuly CD4. Preto bunky strácajú CD4 (stráca sa z povrchu buniek) a javia sa ako menej pozitívne pre znak CD4, čím je výber populácie ťažšie odlíšiť [177,178]. Viacerí autori vo svojich pokusoch bunky po inkubácii fixujú 2% formaldehydom z dôvodu internalizácie CD4 po stimulácii PMA s ionomycínom [146,176].

Tri dni pred analýzou vzoriek prietokovým cytometrom sme k bunkám pridávali protilátky proti CD3 a CD28, ktoré sa rutinne používajú, a sú dôležité na aktiváciu buniek [176,179]. Bez ich použitia boli pozorované len marginálne hodnoty. Ich pridanie mohlo spôsobiť, že rozdiel medzi stimulovanou a kontrolnou vzorkou zmizol.

Existuje niekoľko typov kontrol, podľa ktorých vieme označiť skúmané populácie buniek – FMO (Florescence Minus One), INCs (Internal Negative Controls), nestimulovaná kontrola a izotypová kontrola. Používajú sa na identifikáciu populácie, ktorá je nie len predmetom záujmu, ale tiež rozhodujúca pre zlepšenie procesu analýzy a konzistencie dát ¹⁹. Podľa článku Maeckera a Trottera uverejnenom v *Cytometry* [180], je najlepšia nestimulovaná kontrola. To je dôvod, prečo sme sa rozhodli týmto spôsobom ohraničiť populácie buniek aj v tejto práci. Uvádza sa, že je presnejšia pre určenie pozitívnych a negatívnych populácií. Vo väčšine prípadov je oveľa dôležitejšou oproti

¹⁸ BD Pharmingen. 2015.

¹⁹ BUSHNELL, T. 2015.

FMO a izotypovej kontrole (Príloha 5). Koncepcia izotypovej kontroly spočíva v tom, že sa jedná o bunkovú suspenziu značených irelevantnou protilátkou s rovnakým izotypom ako je cieľová protilátka a farbená rovnakým fluorochrómom. Tým je umožnená identifikácia väzby určenej špecifickým izotypom protilátky. Okrem nestimulovaných kontrol sú dôležité aj pozitívne biologické porovnávacie kontroly. Vo funkčných testoch môžu byť vzorky stimulované mitogénom, napríklad PMA + ionomycín, alebo skupinou peptidov s vysokou reaktivitou medzi širokým spektrom jedincov [181].

Pre správny výber populácií buniek použitých pri analýze, sme spravili dodatočný experiment pre túto prácu (na jednej vzorke), kde sme porovnávali ako nestimulovanú kontrolu, tak stimulované vzorky. Jednu skupinu buniek sme stimulovali LAC, čiže klasickým spôsobom, ktorý bol použitý v celej práci. Potom sme sa pokúsili spraviť test bez použitia LAC. V tomto prípade sme použili Golgi plug, ktorý inhibuje sekréciu cytokínov (Príloha 4). Je zrejmé, že najlepších výsledkov dosiahneme použitím nestimulovanej kontroly [179,180]. V našom prípade by pri použití FMO kontrol došlo k useknutiu jednotlivých populácií. Bohužiaľ nenašli sme žiadnu ucelenú prácu, ktorá by zobrazovala rozdielnosť po použití odlišnej stimulácie (použitím CD3, CD28, LAC, Golgi plug ako v našom prípade) na jednom type buniek.

Charakterizáciu prítomnosti intracelulárnych cytokínov a transkripčných faktorov pomocou prietokovej cytometrie môžeme využiť na určenie toho, aká bunka, respektívne aká subpopulácia T-buniek daný cytokín tvorí. Metóda ELISA nám naopak umožňuje získať informácie o koncentrácii cytokínu, ktorý je uvoľnený do supernatantu kultúry. Nie všetky znaky však bolo možné detegovať súčasne všetkými zvolenými metódami. Rovnako tak Dusilová²⁰ vo svojej diplomovej práci, kde stimulovala CBMC alergénmi nedosiahla rovnakých výsledkov (napríklad použitie rôznych metód, nie je nameraná rovnaká hodnota). V tejto práci boli pozorované rozdielne výsledky získané pomocou prietokovej cytometrie v porovnaní s metódou ELISA. Intracelulárna produkcia cytokínov bola sledovaná len v CD4⁺ T-bunkách, avšak ELISA sledovala cytokíny tvorené všetkými bunkami.

Analýza transkripčných faktorov a intracelulárnych cytokínov charakteristických pre rôzne subpopulácie CD4⁺ T-lymfocytov kokultivovaných s probiotickou baktériou

²⁰ DUSILOVÁ, A. 2012.

stimulovaných DC spočívala v porovnaní miery ich expresie (**Th1** – T-bet, IFN- γ ; **Th2** – GATA3, IL-4, IL-13; **Th17** – ROR γ t, IL-17A, IL-22; **Treg** – FoxP3, IL-10).

Metódou prietokovej cytometrie sme nepozorovali žiadny efekt po stimulácii *E. coli* O83 na zmenu proporčného zastúpenia transkripčných faktorov a ich cytokínov charakteristických pre jednotlivé subpopulácie CD4⁺ T-lymfocytov. Po niekoľko hodinovej stimulácii LAC a protilátkami proti CD3 a CD28 sme detegovali nízke hodnoty transkripčných faktorov a príslušných cytokínov (maximálne do 15%) u oboch skúmaných subpopulácií. Práca Peoples *et al.* [182] popisuje stimuláciu buniek pupočníkovej krvi bakteriálnym kmeňom *E. coli* (ale aj kmeňmi *Streptococcus* skupiny B - GBS, *Staphylococcus epidermidis* a *Lactobacillus plantarum*), kde detegovali vyššie zastúpenie CD4⁺ T-buniek tvoriacich ako IL-10, tak IFN- γ práve po ich stimulácii. Rozdiel medzi touto a ich prácou spočíval v použití plnej CBMC [182]. Nízke hladiny IFN- γ produkované po stimulácii PBMC alebo CBMC u detí s anamnézou alergií v rodine pravdepodobne vysvetľujú prečo je u detí alergických matiek hladina IFN- γ znížená [182]. Nízkych hodnôt sme dosiahli aj v našej práci, avšak nie sú signifikantne znížené u A skupiny (Obr. 11A)²¹. Nízke hodnoty IFN- γ namerali aj Boix *et al.* pri pokuse s plnou periférnou krvou²².

Práce Contrerasa *et al.* [134] a Prescottovej *et al.* [166] popisujú nízku expresiu IFN- γ u alergickej skupiny stimulovanej i nestimulovanej. Deťom v štúdiu Contrerasa *et al.* bola odobraná PBMC a následne stimulovaná PHA alebo bežnými alergénmi (prach, mačka). V supernatante po stimulácii alergénom detegovali hladinu IFN- γ po 60 hodinách. Práca Farkasa *et al.* popisuje mierne zvýšenú produkciu IFN- γ po stimulácii alergénom u DC všeobecne, avšak vyššia produkcia bola prítomná u pDC, než u mDC. Výsledky tejto práce poukazujú, že stimulácia nemala žiadny efekt na skúmaný cytokín [183]. Zaujímavé zistenie nám ponúka práca Danisa *et al.*, ktorá popisuje nie len hladinu IFN- γ v CBMC, ale porovnáva ju aj s hladinou tohto cytokínu u dospelých jedincov [184]. Zistili, že hladina tohto dôležitého cytokínu je u novorodencov veľmi nízka, v podstate priam nulová. Toto zistenie porovnávali aj ELISA testom a výsledky boli totožné, avšak iba so 6 vzorkami.

Signifikantne vyššiu expresiu T-bet u Z jedincov popísali v práci Vale-Pereira *et al.*, kde u alergických jedincov (astmatikov) bola jeho expresia nízka [185]. Naopak mierne zvýšenú expresiu tohto transkripčného faktora u A popisuje práca Súkeníkovej *et al.* [159] tak isto nesignifikantne, ako tomu bolo aj v prípade tejto práce u pDC. Naopak u mDC sme rovnakých výsledkov nedosiahli.

²¹ MARSCHAN, E., 2007.

²² BOIX, F. *et al.*, 2018.

Nitsche *et al.* pozorovali rozdielnú odpoveď po stimulácii ionomycínom a protilátkami proti CD3 a CD28 u CBMC a PBMC v rôznych časových intervaloch (0 - 100 hod). U CBMC popisujú defektnú expresiu transkripčného faktora T-bet, čím potvrdzujú neschopnosť imunitného systému novorodencov pri indukcii adekvátnej odpovede Th1 [186]. Niektoré práce CBMC neuvádzajú informáciu o spôsobe pôrodu, čo by mohlo mať vplyv na výsledok [187].

Expresia GATA-3 je dostačujúca pre expresiu IL-5, ale pre IL-4 nepostačuje, popisuje Marschan *et al.*. Medzi IL-4 a ostatnými cytokínmi nepozorujú žiadnu koreláciu. Popisujú ju však medzi expresiou IL-5 a IL-13 s expresiou GATA-3 [187]. Ich práca je možným vysvetlením pre odlišnosť jednotlivých Th2 cytokínov. V diplomovej práci nie je rozdiel v zastúpení buniek po stimulácii probiotikom *E. coli* O83 u oboch skúmaných skupín.

Spinozzi *et al.* pomocou prietokovej cytometrie detegoval približne dvojnásobnú produkciu IL-13 u CBMC detí alergických matiek oproti zdravým matkám po stimulácii PMA s ionomycínom a následne Brefeldínom A (5 hod PMA + ionomycín a 3 hod Brefeldín A). Pri analýze sme tento trend zaznamenali iba v málo prípadoch, ale vo všeobecnosti podľa štatistiky vieme povedať, že sa daný výsledok odlišuje u obidvoch skúmaných subpopulácií DC (Obr. 11 a 12), čo je v rozpore s prácou Spinozziho *et al.* [173]. Olssonová *et al.* [188] popisuje, že u IL-13 nepozorovali žiadny nárast po stimulácii alergénom, čo sa zhoduje s výsledkami tejto práce. Jej práca bola vykonávaná nie s pupočníkovou, ale s periférnou krvou u pacientov s alergiou, pričom kontrolu tvorila kohorta 5 pacientov bez alergie. Zbierali supernatant po 5 dňovej stimulácii alergénom, kde detegovali hladinu cytokínov. Iných výsledkov docielil Tulic *et al.* [189], kde porovnával DC v rámci Z a A detí. Ich výsledky poukazujú, že IL-13 bol signifikantne vyšší v rámci A skupiny. Rovnako tak práca Hrdého *et al.* [163] popisuje zvýšenie produkcie IL-13 u CBMC detí alergických matiek v porovnaní so zdravými matkami po stimulácii PHA (Phytohemaglutinine). Vzhľadom k použitiu inej bunkovej populácie, stimulantu a odlišným podmienkam kokultivácie, sa tieto výsledky dajú len čiastočne porovnať s tými, ktoré sú uvedené v diplomovej práci.

U kontrolných vzoriek detí zdravých a alergických matiek bola pozorovaná signifikantne vyššia produkcia IL-4 v rámci zdravej skupiny, čo je v súlade s predchádzajúcim výsledkom nášho laboratória [158]. Prescott *et al.* [190] ako aj Hrdý *et al.* [158] popísali v svojich prácach signifikantne nižšiu produkciu IL-4 u alergickej

skupiny. Vo svojich prácach detegovali hladiny cytokínov z mononukleárných buniek pomocou qRT-PCR (quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) a ich výsledok detekcie IL-4 bol signifikantne nižší u detí alergických matiek v porovnaní so zdravými.

Prescott *et al.* hovorí, že v novorodeneckom imunitnom systéme prevažuje Th2 odpoveď a je teda dôležité postnatálne stimulovať Th1, aby sa zabránilo oneskorenému vyzrievaniu imunity a dlhodobej dominancii Th2 a predísť tak vývoju alergických ochorení [191]. K podobným záverom dospela aj štúdia Basha *et al.* [192].

Vale-Pereira *et al.* [185] pozoroval expresiu transkripčného faktora FoxP3 nie v pupečníkovej, ale v periférnej krvi, a porovnávali ju s astmatikmi a zdravými kontrolami. Zistili, že FoxP3 je signifikantne zvýšený u zdravých jedincov v porovnaní s astmatikmi.

Imunosupresívne vlastnosti IL-10, ktorý je produkovaný Treg bunkami, napomáhajú k ochrane pred rozvojom alergie, avšak pri rozvinutom alergickom ochorení dochádza k poruche ich funkcie [193]. Farkas *et al.* [183] popisuje, že po stimulácii alergénom bola produkcia IL-10 u CD4⁺ T buniek kokultivovaných s pDC zvýšená u zdravých jedincov, čo nie je v súlade s našou prácou, kde sledujeme nesignifikantné zníženie u zdravých jedincov oproti alergickým. Matta *et al.* vo svojej práci píše o tom, že produkcia IL-10 bunkami kokultivovanými s pDC nesúvisí s alergiou [194]. Funkcia IL-10 sa okrem alergie prejavuje predovšetkým u tolerogénnych mechanizmov v transplantácii, autoimunita a u malignít [194]. Kassianos *et al.* popisuje v rámci Z skupiny po stimulácii kmeňom *E. coli* (kmeň XL1-Blue, Invitrogen) výrazne zvýšenú hladinu protizápalového IL-10 v porovnaní s kontrolami u mDC indukovaných Treg-ov, zatiaľ čo v diplomovej práci nepozorujeme rozdiel v stimulácii *E. coli* O83 [195]. Amoudruz *et al.* [196], Ismail *et al.* [197] a Hrdý *et al.* [162] vo svojich prácach publikovali signifikantne nižšiu expresiu IL-10 u A skupiny. V práci Ismaila *et al.* boli pozorované nízke hladiny IL-10 po stimulácii CBMC novorodencov alergických matiek inaktivovaným kmeňom *Lactobacillus rhamnosus*.

Vplyv probiotickej baktérie na indukciu regulačného cytokínu IL-10 bol popísaný viacerými autormi, konkrétne Contrerasom *et al.* [134], Niersom *et al.* [176], Yu *et al.* [244], Hrdým *et al.* [162].

Mengom *et al.* a Hrdým *et al.* bola preukázaná znížená sekrécia IL-10 Treg bunkami u detí alergických matiek [162,198].

Th17 a Treg sú dôležité počas infekcie na udržiavanie zápalovej odpovede a rovnako tak sú dôležité pri patogenéze alergických autoimunitných ochorení. de Roock *et*

al. vo svojej štúdií skúmal odlišnú odpoveď novorodeneckého a dospelého imunitného systému. Zo skúmaných znakov IL-17 a FoxP3 sa ukázalo, že novorodenecké T bunky produkovali výrazne vyššie hodnoty CD4⁺FoxP3⁺ [199]. Naše výsledky poukazujú na približne rovnaké výsledky u IL-17A a FoxP3, čo je v rozpore s touto prácou.

Transkripčný faktor Th17 imunitnej odpovede ROR γ t a jeho prislúchajúci cytokín IL-17A sme detegovali v pomerne nízkych hladinách. Ešte nižšie percentuálne zastúpenie IL-17 (okolo 3%) namerali Boix *et al.* vo svojej štúdií ²³. Ďalej detegovali aj IL-10, u ktorého namerané hodnoty boli nízke. Ako môžeme vidieť na obrázku v prílohe 6, pri ohraničení populácie u IL-10 dochádza k useknutiu pozitívnej populácie. V štúdií však nie je uvedené aký typ kontroly a prečo dané ohraničenie (gateovaciu stratégiu) použili ²³. Rovnako aj v práci Stoppelenburga *et al.* [174] popisujú, že CBMC produkujú málo IL-17A čo môže byť spôsobené nízkou expresiou ROR γ t. Výsledok je v súlade s našou prácou, ako aj s predchádzajúcimi publikovanými výsledkami [199,200], kde krv novorodencov obsahovala menej Th17 buniek v porovnaní s dospelými jedincami.

²³ BOIX, F. *et al.*, 2018.

Stimulácia DC probiotickým kmeňom *E. coli* O83 zvyšuje produkciu cytokínov

Metódou ELISA bola stanovovaná produkcia TNF- α , IL-6 a IL-10 v supernatante kultúr po 24 hod stimulácii mDC probiotickou *E. coli* O 83.

E. coli O83 stimuluje produkciu IL-10 ako u Z, tak A detí (Obr. 13). IL-10 ako dôležitý imunoregulačný cytokín podporuje vznik Treg. Zvýšená hladina IL-10 v alergickej skupine by mohla predstavovať kompenzačný mechanizmus v skupine so zvýšeným rizikom, avšak stále bez alergickej manifestácie, k čomu vo svojej práci dospel aj Žižka *et al.* [40]. Kopp *et al.* vo svojej práci sledoval vplyv ako prenatálneho, tak postnatálneho podávania probiotického kmeňa *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). Vakcínu podávali matkám pred pôrodom a počas pôrodu im bola odobraná krv. Rovnako tak bola postnatálne odobraná aj pupočníková krv. U nestimulovaných kontrol (u CBMC) nepozorovali žiadny efekt medzi LGG a tzv. „placebo skupinou“ naopak po *in vitro* stimulácii týmto kmeňom pozorovali výrazné uvoľnenie IL-10 ako u CBMC, tak aj PBMC [165]. Niers *et al.* [176] pozorovali, že T-bunky stimulované pomocou *Bifidobacterium bifidum* u maturovaných DC produkovali signifikantne väčšie množstvo IL-10 oproti DC, na ktoré pôsobil len maturačný faktor. Daná práca vyzdvihuje prínos bakteriálneho kmeňa rodu *Bifidobacterium* u DC novorodencov pri stimulácii imunitného systému a prevencii alergických ochorení pri pokuse *in vitro*. Daná baktéria najviac stimulovala produkciu cytokínov IL-6 a TNF- α [176].

Metódou ELISA sa potvrdila zvýšená reaktivita CBMC u detí, ktorých matky trpia alergiou. Štúdia Meng *et al.* sa zaoberala bunkovou populáciou Treg z CBMC a PBMC u jedincov s alergiou a bez alergie. Vykonali 3 dňovú stimuláciu pomocou peptidoglykán, alebo lipopolysacharidu A a následnými meraniami zistili znížené množstvo IL-10 a FoxP3 u alergikov a u jedincov s pozitívnou rodinnou anamnézou [201]. Výsledky nášho laboratória ukázali naopak nárast množstva IL-10 v sére z pupočníkovej krvi u detí matiek s alergiou [40]. Tento jav je možné vysvetliť ako snahu organizmu o kompenzáciu u jedincov, pri ktorých hrozí rozvoj alergie. Ďalšia práca [202] porovnávala stimuláciu pomocou *E. coli* a G+ baktérií, pričom stimulácia *E. coli* mala za následok nižšie hladiny IL-10 než G+ bakteriálna stimulácia. Ďalším výsledkom tejto práce je zvýšenie hladiny FoxP3 pozitívnych buniek po stimulácii [202]. Celkovo je však vplyv rôznych bakteriálnych kmeňov rôznych, čo potvrdili aj iné štúdie pri stimulácii PBMC G+ baktériami, kedy dochádzalo až k 500 násobnému zvýšeniu koncentrácie [203]. Stimulácia kmeňom *Lactobacillus rhamnosus* v pokusoch spôsobila nárast produkcie IL-10 [165].

U IL-6 a TNF- α dochádza k nešpecifickej aktivácii LPS vďaka *E. coli* a to z toho dôvodu, že *E. coli* má väčšinu LPS exprimovaných na vonkajšej membráne [169]. Zvýšené hladiny TNF- α , a IL-6 po stimulácii alergénom u alergikov boli pozorované rovnako aj v práci Olssona *et. al.* [188], kde však ich analýza bola robená s použitím periférnej krvi.

Ďalšie možnosti napredovania výskumu

Veľká časť výskumu tejto práce nie je úplne najvhodnejšia, a preto ani jej výsledky nie sú použiteľné pre prípadné nadväzovanie. Aby sme mohli jednoznačne vyvodit' záver, prípadne pokračovať v ďalšej analýze, chcelo by to ďalšie merania a kontroly pre zlepšenie konečného výsledku.

Som si vedomá toho, že po separácii DC sme získavali veľmi nízke množstvá buniek, s ktorými sa dalo pracovať, ale i napriek tomu by stálo za vyskúšanie použiť aj iné znaky ako CD83 a následne výsledky porovnať s ostatnými prácami, nie len z nášho laboratória. Ako ďalšie vhodné znaky na meranie by mohli byť CD80, prípadne MHC-II.

DC sme stimulovali probiotickou baktériou *E. coli* O83. Aj v tomto prípade by bolo dobré porovnanie tohto kmeňa s iným kmeňom, napr. *E. coli* Nissle a vplyv jeho stimulácie na DC. Ako pozitívnu kontrolu by sme použili LPS. Bohužiaľ, ani toto nebolo možné uskutočniť v rámci tejto diplomovej práce z dôvodu malého množstva buniek, keďže bunky pochádzali priamo z CBMC.

V rámci ELISA metódy vidím dobrý potenciál na ďalšiu prácu v tom, že by sa dali sledovať hladiny jednotlivých cytokínov v CBMC, pričom by sa porovnávali s PBMC získanou od matky.

Ak by sme mali možnosť robiť experimentálnu časť z kokultivácií buniek znovu, bolo by dobré spraviť zopár zmien. Pre lepšiu čistotu a istotu toho, že sme získali CD4⁺ populáciu buniek vidím nepostačujúce iba použitie jednej protilátky (CD4). Pre získanie CD4 populácie sa často používa CD3, CD45 prípadne aj CD8 protilátka [204–206]. Rovnaký postup s využitím nie len CD4, ale aj CD3, CD8 a CD45 sa používa rutinne v klinických laboratóriách (Príloha 7).

Medzi ďalšie opatrenia pre lepšie ošetrenie experimentu by bolo dobré doplniť viacero kontrol. V danom pokuse, kde sa na intracelulárne farbenie používa veľa znakov je veľmi dobrá izotypová kontrola, aby sme zistili, či je dané značenie špecifické alebo nie.

Lepšie výsledky by mohol priniesť pokus blokovať bunky proteínom. Na blokáciu Fc receptorov sa najčastejšie používa albumín, FTS, prípadne myšie sérum.

Ak už na začiatku vidíme, že dochádza k nešpecifickému značeniu protilátkou, pokúsiť sa bunky lepšie a viackrát premývať.

CD4 protilátku sme pridávali na začiatku protokolu o intracelulárnom farbení. Mohlo by sa vyskúšať pridať anti-CD4 spolu s ostatnými protilátkami s konjugovanými fluorochrómami po fixácii a permeabilizácii.

V našom experimente sme používali LAC na 5 hodín pred začiatkom farbenia. Ako ďalšie porovnanie by slúžila kontrola, kde by nebol prítomný Brefeldín A. V LAC je obsiahnutý práve Golgi plug (Brefeldín A), ktorý je v porovnaní s Golgi stop (monensin) viac toxickejší.

Je všeobecne známe, že každý cytokín potrebuje iný čas pre svoju stimuláciu. V našom pokuse sa všetky cytokíny stimulovali rovnaký čas. To je tiež možnosť, prečo sme ich dokázali detegovať tak málo.

Keďže každý pacient je vždy iný a nevieme vopred určiť, ako sa budú jeho bunky správať (každý jedinec môže mať inú nešpecifickú väzbu protilátky), bolo by vhodné mať od každého urobenú nestimulovanú kontrolu, ako ďalšiu kontrolu.

Všetky tieto veci ako by sa dala práca optimalizovať sú na veľmi dlhý a náročný výskum. V rámci diplomovej práce to však nie je možné uskutočniť a v konečnom dôsledku by to neumožňovala ani finančná náročnosť.

ZÁVER

Cieľom práce bolo uskutočniť analýzu vplyvu *E. coli* O83 na produkciu cytokínov a transkripčných faktorov v subpopulácií DC po ich získaní izoláciou *in vitro*. Bol porovnaný vplyv stimulácie DC medzi deťmi zdravých a alergických matiek a taktiež bola pozorovaná produkcia cytokínov metódou ELISA.

Naše výsledky ukázali štatisticky významné zvýšenie prítomnosti aktivačného znaku CD83 na mDC po stimulácii *E. coli* O83 u detí alergických matiek v porovnaní s deťmi matiek zdravých. Naopak u pDC neboli zistené žiadne významné rozdiely medzi zdravou a alergickou skupinou, čo potvrdzuje, že pDC nedokážu zachytávať bakteriálny LPS s takou efektívnosťou, s akou to robia mDC.

Po kokultivácii mDC s CD4⁺, bez stimulácie s *E. coli* O83, došlo k zvýšeniu produkcie IL-4 u CD4⁺ T buniek u detí zdravých matiek v porovnaní s CD4⁺ T bunkami detí alergických matiek. Môžeme povedať, že *E. coli* O83 indukuje maturáciu DC a produkciu IL-4 u CD4⁺ T buniek kokultivovaných s mDC. U pDC sme nezaznamenali žiadne rozdiely medzi zdravou a alergickou skupinou, ani po kokultivácii s CD4⁺ T bunkami.

V supernatante kultúr mDC po 24 hodinovej stimulácii *E. coli* O83 sme pozorovali signifikantne zvýšené koncentrácie cytokínov TNF- α , IL-6 a IL-10 v porovnaní s kontrolami. U alergickej skupiny bola detekcia po stimulácii *E. coli* O83 štatisticky významná pri všetkých skúmaných cytokínoch v porovnaní s kontrolami.

Naše výsledky poukazujú na signifikantne vyššiu reaktivitu nestimulovaných buniek pupočníkovej krvi zdravej skupiny oproti alergickej. Táto vyššia reaktivita by mohla vysvetľovať neadekvátnu imunitnú odpoveď po stretnutí s prípadným alergénom.

Z výsledkov uvedených v diplomovej práci nie je možné jednoznačne uzavrieť celú problematiku. Na jej objasnenie by sme potrebovali väčšiu kohortu pacientov – ako detí zdravých, tak alergických matiek. Rovnako by bolo dobré rozšíriť metodickú časť, napríklad aj o výsledky z qRT-PCR. Preto by experimenty objasňujúce účinok pôsobenia probiotickej vakcíny *E. coli* O83 mali naďalej pokračovať.

PRÍLOHA 1

Zoznam katalógových čísel protilátok, niektorých roztokov a reagensíí

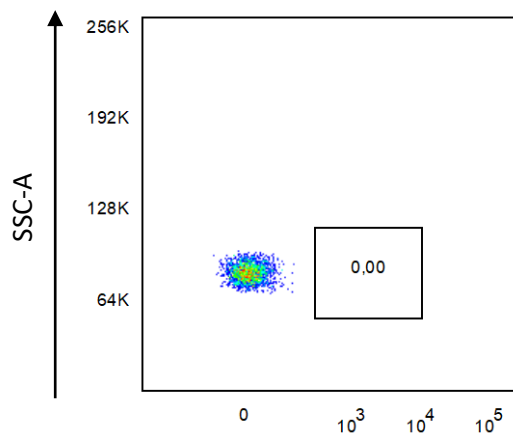
- CD83 anti-human	PE	1P-677-T100	(Exbio, a. s.)
- CD11c anti-human	PE-Cy7	T7-529-T100	(Exbio, a. s.)
- CD123 anti-human	FITC	1F-700-T100	(Exbio, a. s.)
- CD4 anti-human	APC-Cy7	T4-359-T100	(Exbio, a. s.)
- T-bet anti-human	FITC	561266	(BD Bioscience)
- T-bet anti-human	FITC	3824055	(SONY)
- GATA3 anti-human	PE	653804	(BioLegend)
- GATA3 anti human	PE	3869015	(SONY)
- IL-4 anti-human	PE-Cy7	500824	(BioLegend)
- IL-4 anti human	PE-Cy7	3104115	(SONY)
- IL-13 anti-human	APC	501907	(BioLegend)
- IL-13 anti human	APC	3109540	(SONY)
- IFN- γ anti-human	PerCP-Cy5.5	560704	(BD Bioscience)
- IFN- γ anti human	PerCP-Cy5.5	3112625	(SONY)
- ROR γ t anti-human	FITC	563621	(BD Bioscience)
- FoxP3 anti-human	APC	1A-601-C100	(Exbio)
- IL-22 anti-human	PE	366704	(BioLegend)
- IL-22 anti-human	PE	3176515	(SONY)
- IL-17A anti-human	PerCP-Cy5.5	560799	(BD Bioscience)
- IL-17A anti-human	PE-Cy7	3107095	(SONY)
- IL-10 anti-human	PE-Cy7	501420	(BioLegend)
- IL-10 anti-human	PE-Cy7	3107095	(SONY)
- Leukocyte Activation Cocktail (LAC)		550583	(BD Bioscience)
- CD3 (na stimuláciu buniek)		16-0037-85	(eBioscience)
- CD28 (na stimuláciu buniek)		16-0289-85	(eBioscience)
- Histopaque		10771-100ML	(Sigma- Aldrich)
- RPMI Medium 1640 Lonza		BE12-167F	(BioWhittaker)
- RPMI-1640 Sigma		R8758-500ML	(Sigma- Aldrich)
- Diluent Buffer		51-9008101	(BD Bioscience)

- Fix/Perm Buffer 51-9008100 (BD Bioscience)
- Transcription Factor Perm (Wash Buffer) 51-9008102 (BD Bioscience)
- BSA A7030-100G (Sigma- Aldrich)
- Tween 27-434-8 (Sigma- Aldrich)
- Myeloid Dendritic Cell Isolation Kit; human 130-094-487 (Miltenyi Biotec)
- CD34 MicroBead Kit; human 130-046-703 (Miltenyi Biotec)
- CD4⁺ Tcell Isolation Kit; human 130-096-533 (Miltenyi Biotec)
- MACS Buffer 130-091-222 (Miltenyi Biotec)
- MACS Separation Columns 130-042-201 (Miltenyi Biotec)
- Cytokíny pre stavovenie ELISA testom – všetky od firmy R&D Systems (tab. 10)

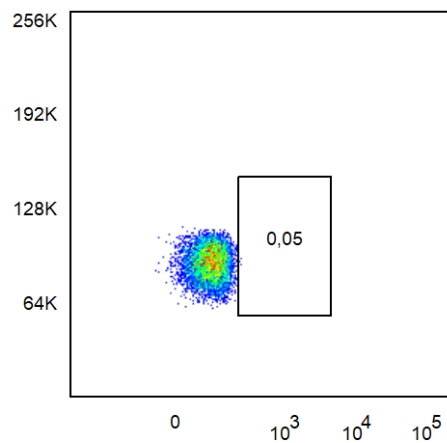
Tab. 7: Cytokíny použité pri ELISA

Cytokíny	Monoklonálne protilátky	Rekombinantné protilátky	Biotinylované protilátky
IL-4	MAB204	204-IL-010	BAF204
IL-5	MAB405	205-IL	BAM6051
IL-6	MAB206	206-IL	BAF206
IFN-γ	MAB2852	285-IF-100	BAF285
TGF-β	MAB240	240-B	BAF240
TNF-α	MAB610	210-TA	BAF210

PRÍLOHA 2



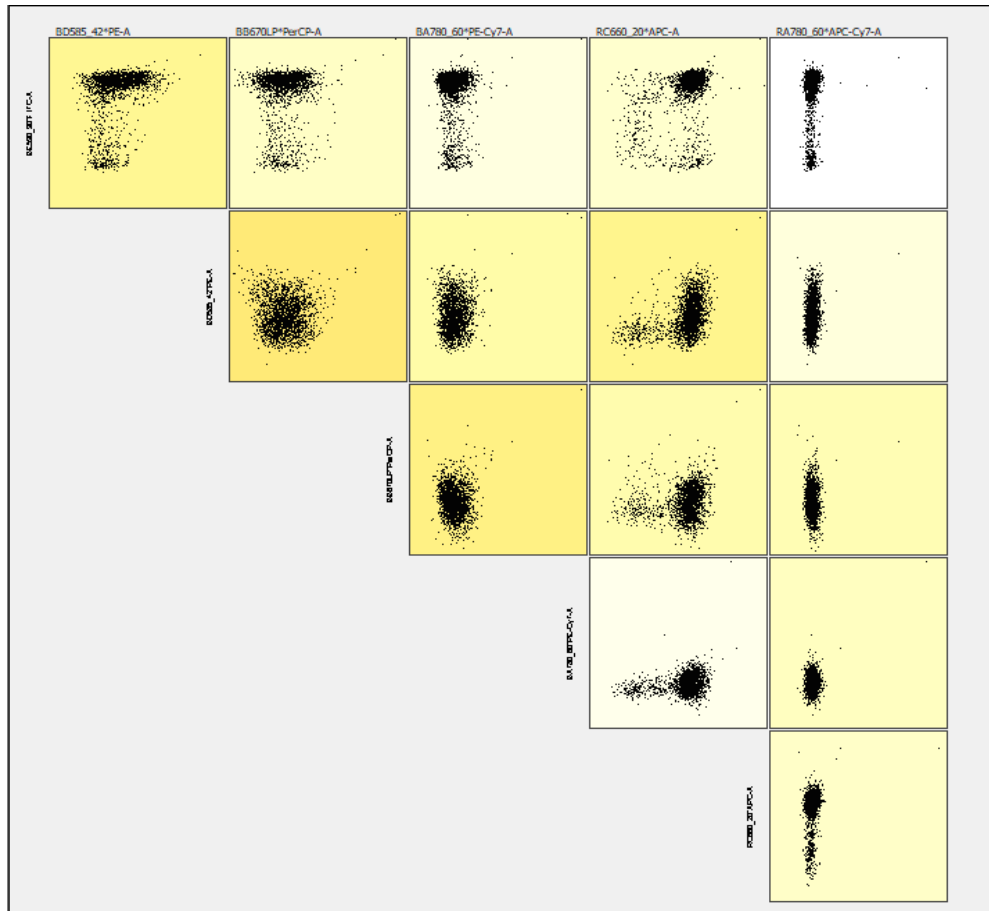
Bunky neznačené protilátkou *CD11c*



Bunky neznačené protilátkou *CD123*

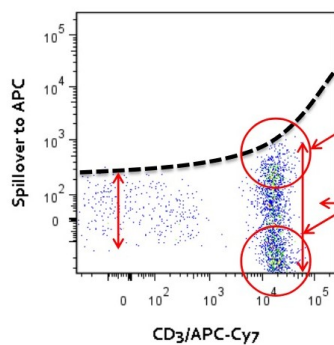
Na obrázku sú znázornené bunky neznačené CD11c protilátkou v prípade mDC a CD123 protilátkou v rámci pDC; jedná sa teda o negatívnu kontrolu. Vidíme, že nami nadstavená hranica pre pozitivitu je správna (Obr. 7 a 8).

PRÍLOHA 3



U FoxP3 (Obr. 10C) sa možno zdá, že dáta nie sú dobre skompenzované. Podľa tejto kompenzácie zobrazenej na obrázku boli však ohraničené všetky nami analyzované dáta. Pri pokuse manuálneho nastavenia kompenzačnej matrix došlo k viditeľným rozdielom, k tzv. „neskompenzovaniu“ dát u viacerých meraných parametrov. Z toho dôvodu sme ostali pri tejto pôvodnej kompenzácií.

Nemôžeme vylúčiť ani chyby spôsobené kompenzáciou:



- Falošná pozitivita/ vysoké pozadie narastá
- Objavujú sa bunky s negatívnou fluorescenciou
- Čím je fluorescencia kompenzované populácie vyššia, tým viac sa po kompenzácií „rozťahne“ (EXBIO Diagnostics, 2014).

- APC-Cy7 (CD4) je tandemom znaku APC (FoxP3) (Obr. 10) -> svieti do kanálu APC, čím tak isto dochádza k „rozťahnutiu“ populácie.

PRÍLOHA 4

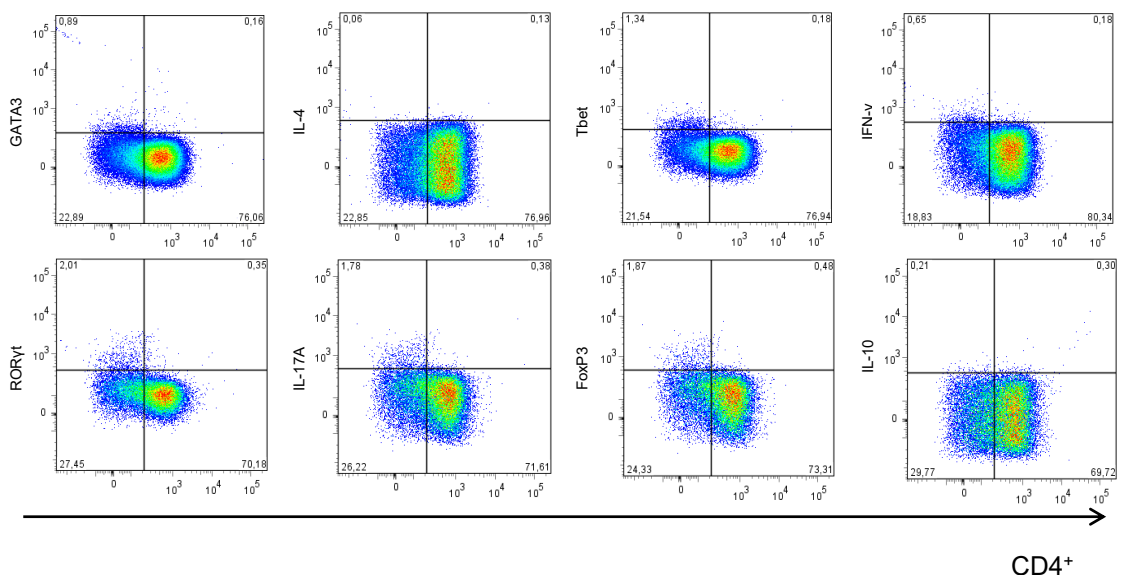
FMO (Fluorescence Minus One) je kontrola, kde v skúmavke sú bunky ofarbené všetkými fluorochrómmi použitými v experimente okrem jedného. Viacfarebný imunoflorescenčný experiment má jednu FMO kontrolu pre každý fluorochróm. Nedostatočný rozdiel medzi pozitívnymi a negatívnymi populáciami je výraznejší v dôsledku prekryvov fluorescenčnej kompenzácie viacerých fluorochromov.

Keď sú antigény variabilne exprimované, použitie FMO kontrol je v takomto prípade kritické. To platí najmä pri analýze aktivačných znakov na bunkách. Vtedy sa nesmie zabudnúť na **nestimulované kontroly**.

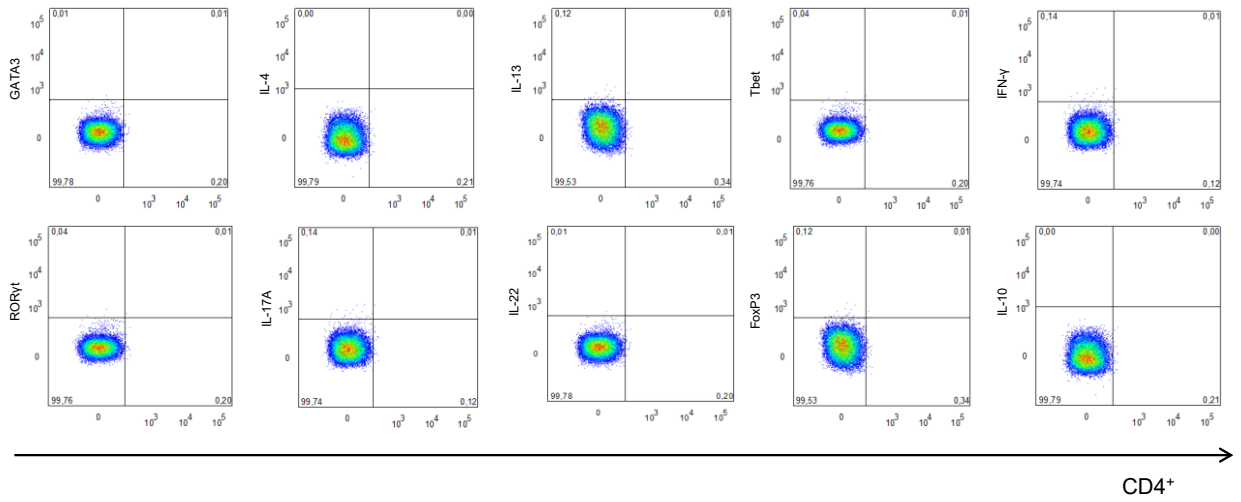
Na detekciu auto-fluorescencie alebo zafarbenia pozadia (tzv. background staining) na bunkách, ktoré nás zaujímajú sa používa **negatívna kontrola**. Auto-fluorescencia môže byť významným problémom, najmä v suspenziách obsahujúcich monocyty/makrofágy, kultivovaných alebo aktivovaných bunkách.

V nasledujúcich obrázkoch sú zobrazené FMO, negatívne, nestimulované a stimulované kontroly. V jednom prípade sme spravili pokus použiť na stimuláciu namiesto LAC Golgi Plug, v druhom prípade bola vzorka nameraná klasickým spôsobom, ktorý je opísaný v diplomovej práci.

➤ FMO

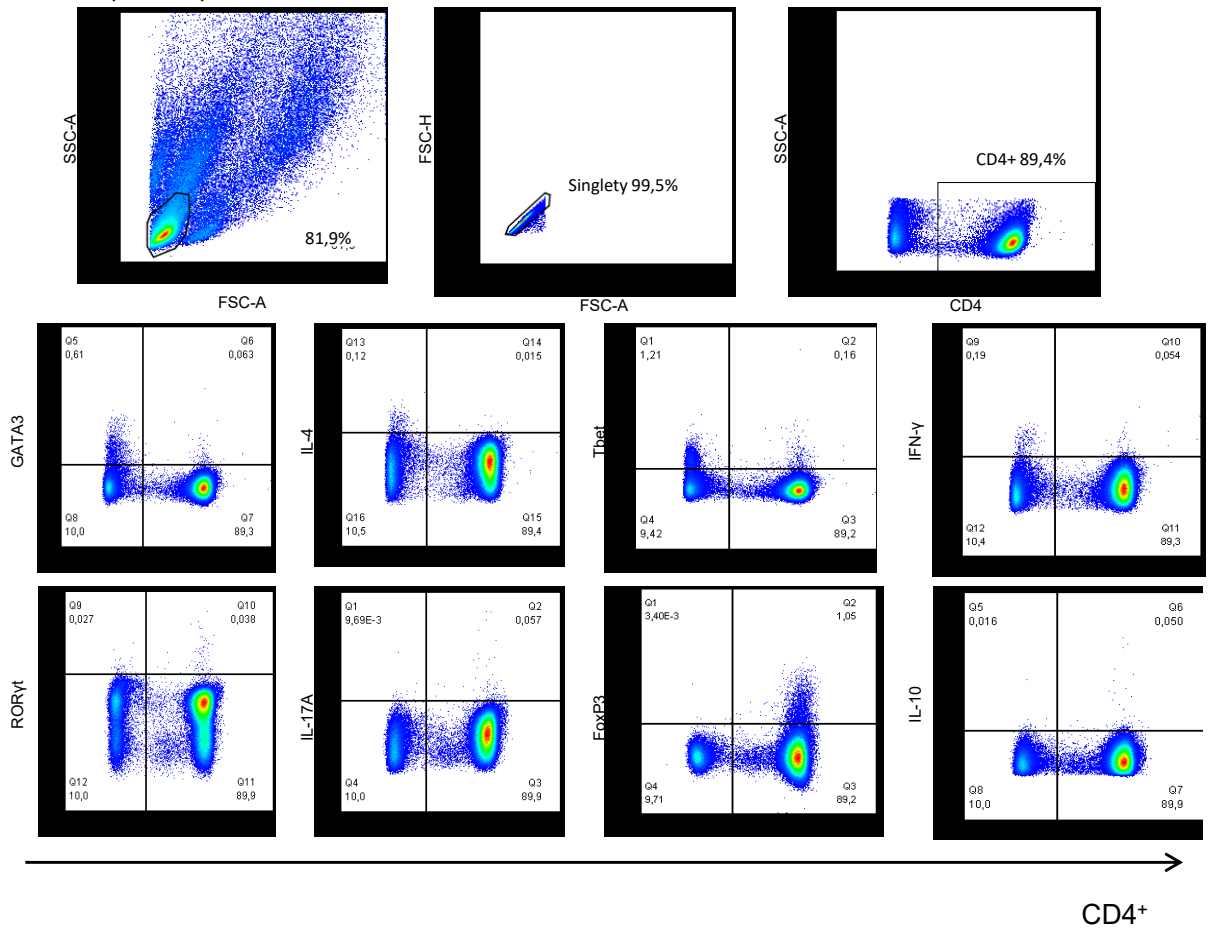


➤ Negatívna kontrola

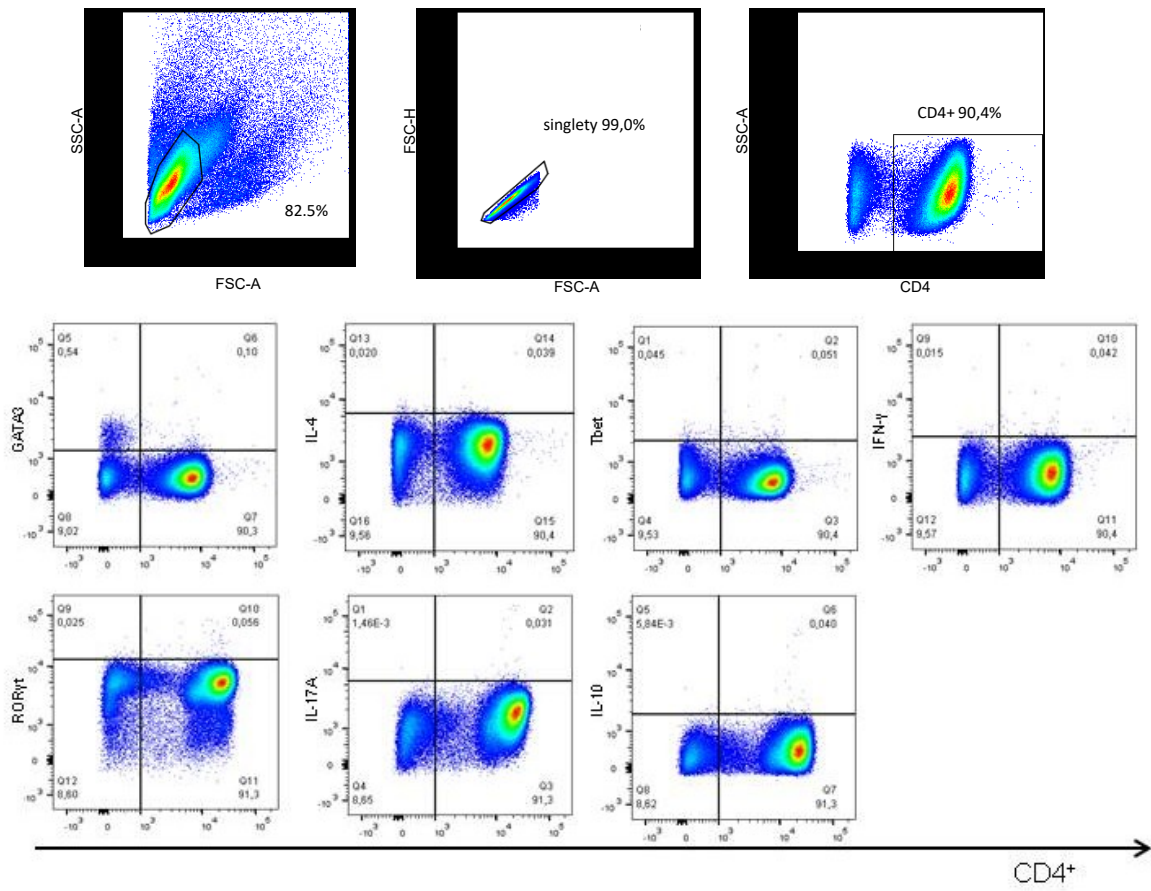


➤ Nestimulovaná kontrola – bez CD3, CD28 a bez LAC

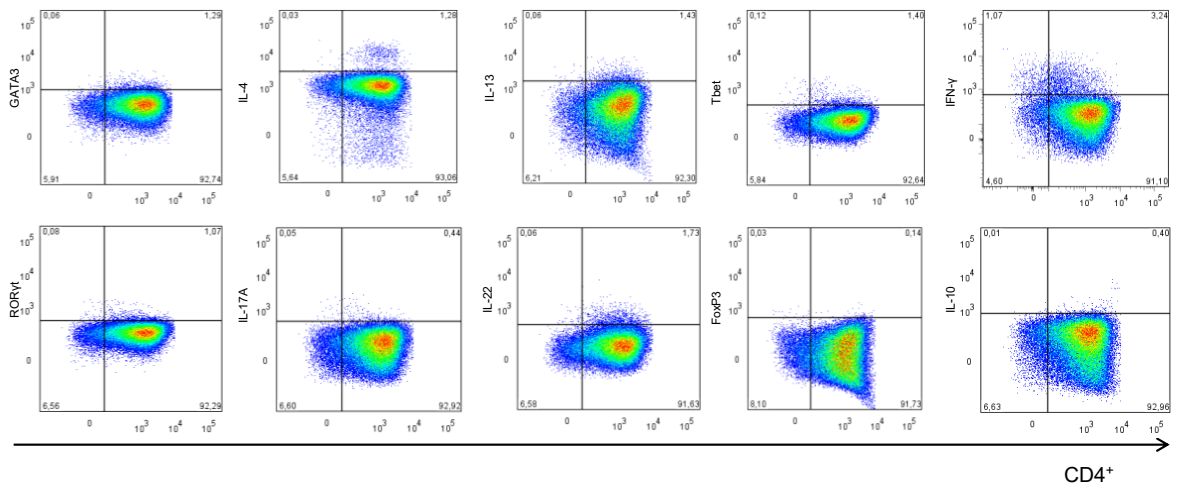
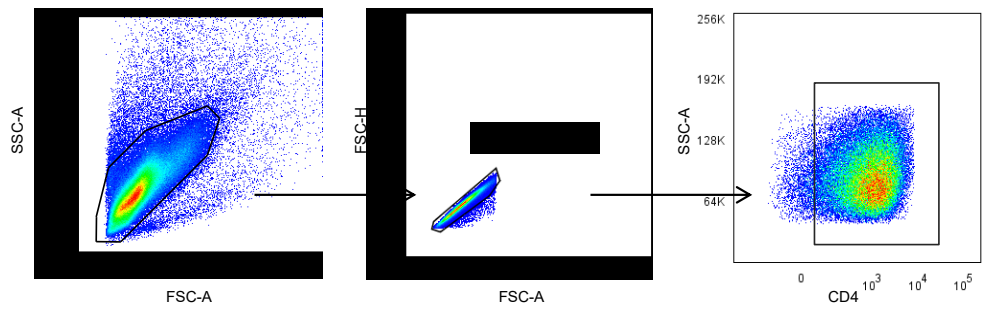
Bez LAC, bez CD3, CD28



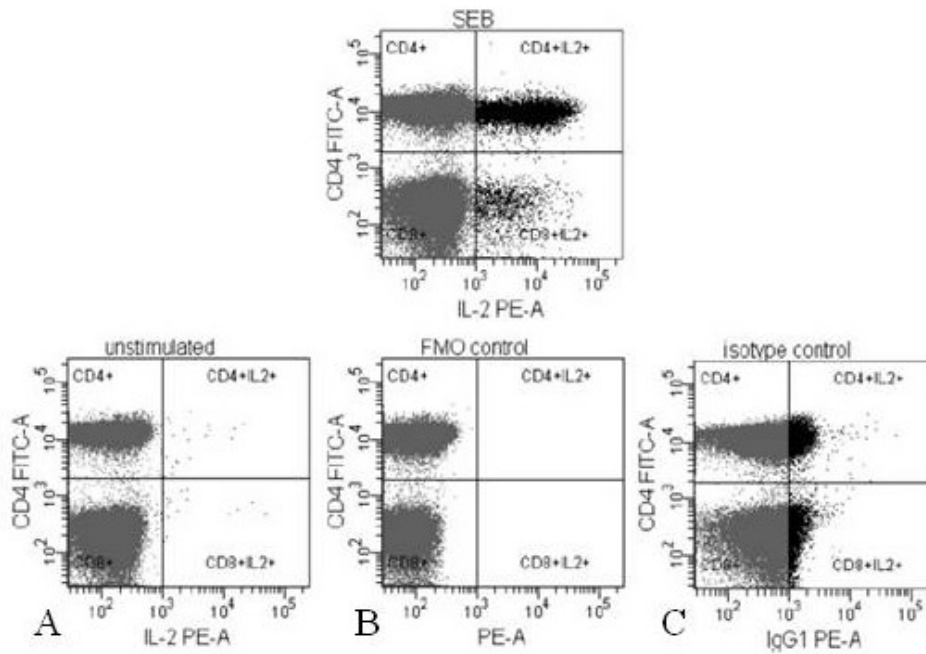
➤ Po stimulácii CD3, CD28 a Golgi plug



➤ Po stimulácii CD3, CD28 a LAC

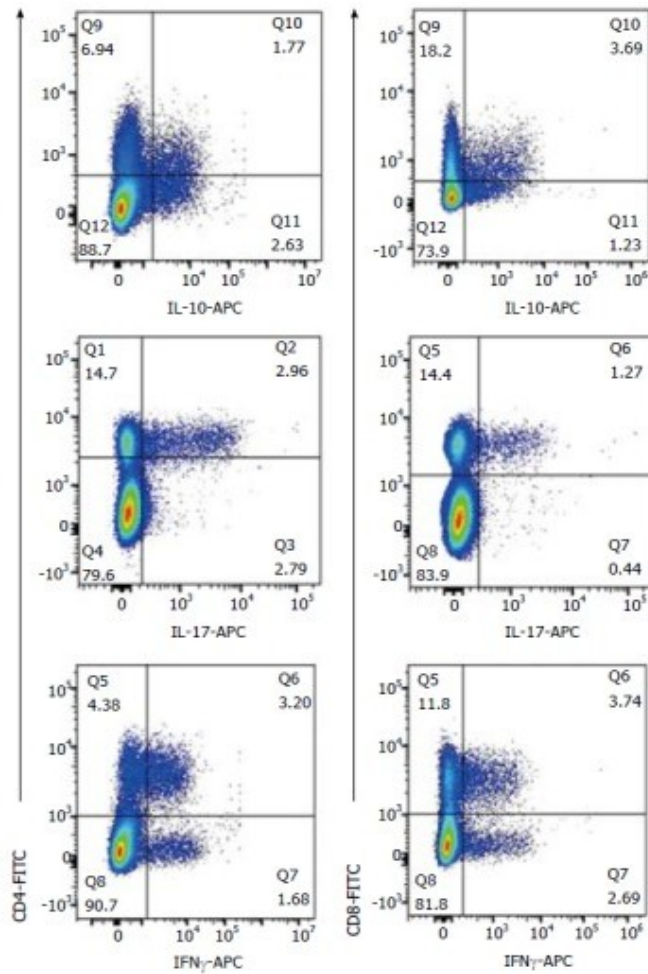


PRÍLOHA 5



Obrázok popisuje nestimulovanú (alebo negatívne stimulovanú) kontrolu za najlepšiu kontrolu pre marker stimulovaný *in vitro*. Táto kontrola je zafarbená rovnakými protilátkami ako testovaná vzorka. Nestimulovaná kontrola (A) nám najlepšie určí, ako umiestniť kvadranty v znaku PE. V prípade použitia FMO (B) alebo izotypovej kontroly (C) by bolo nastavenie jednotlivých kvadrantov príliš nízke alebo naopak vysoké. tiež si môžeme všimnúť, že nie je potrebná žiadna kontrola pri nastavení znaku FITC, pretože v každom panely (A, B, C) sú dobre oddeliteľné populácie buniek. (prevzaté a upravené podľa Maeckera a Trottera) [180].

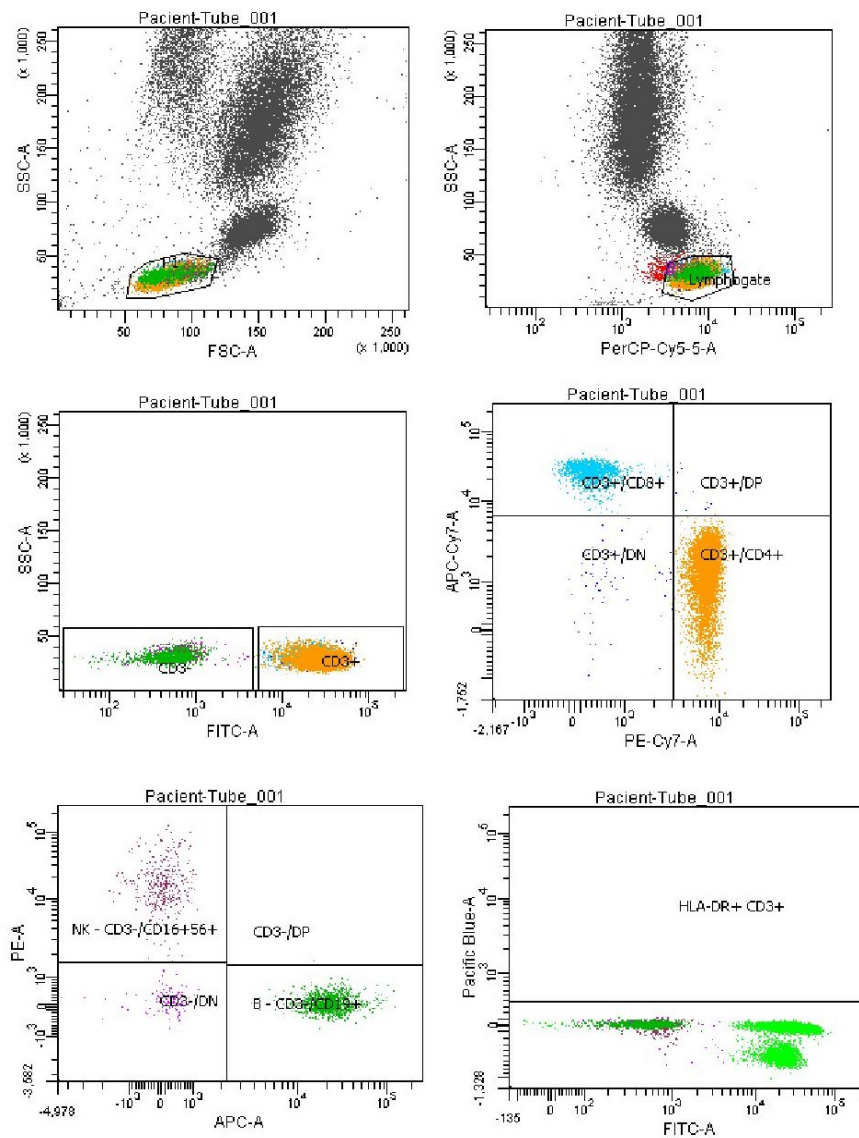
PRÍLOHA 6



Obrázok zobrazuje analýzu plnej krvi prietokovým cytometrom poukazujúca na ohraničenie populácie buniek na zhodnotenie produkcie intracelulárnych cytokínov (IL-10, IL-17 a IFN- γ) na periférnych CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytoch ²⁴.

²⁴ BOIX, F. et al., 2018.

PRÍLOHA 7



Meranie pacientov v klinickom laboratóriu na rutinné stanovenie % zastúpenia buniek v krvi. K PBMC (50 μ l) sa pridá 5 μ l protilátky (6-Kombi test, EXBIO) a 20 minút farbíme pri pokojovej teplote a tme. Následne bunky lyzujeme 20 minút. Po uplynutí času prebehne centrifugácia a môžeme zmerať prietokovou cytometriou.

6-Kombi test obsahuje:

- CD3 - FITC
- CD4 - PE-Cy7
- CD8 - APC-Cy7
- CD16 + CD56 - PE
- CD19 - APC
- CD45 - PerCP

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1]* I. Mellman, M. Nussenzweig, Ralph M. Steinman (1943-2011), *Science* (80-). 334 (2011) 466–466. doi:10.1126/science.1215136.
- [2]* D.A. Rowley, F.W. Fitch, The road to the discovery of dendritic cells, a tribute to Ralph Steinman, *Cell. Immunol.* 273 (2012) 95–98. doi:10.1016/j.cellimm.2012.01.002.
- [3] I. Kocourková, R. Žádníková, J. Žižka, V. Rosová, 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 Microbiol.* (Praha). 52 (2007) 189–193. doi:10.1007/BF02932158.
- [4]* S. Scheurer, M. Toda, S. Vieths, What makes an allergen?, *Clin. Exp. Allergy.* 45 (2015) 1150–1161. doi:10.1111/cea.12571.
- [5] S.G.A. Brown, S.F. Stone, D.M. Fatovich, S.A. Burrows, A. Holdgate, A. Celenza, A. Coulson, L. Hartnett, Y. Nagree, C. Cotterell, G.K. Isbister, Anaphylaxis: Clinical patterns, mediator release, and severity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013). doi:10.1016/j.jaci.2013.06.015.
- [6]* M. Jutel, C.A. Akdis, T-cell subset regulation in atopy, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 11 (2011) 139–145. doi:10.1007/s11882-011-0178-7.
- [7]* C. Ober, T.C. Yao, The genetics of asthma and allergic disease: A 21st century perspective, *Immunol. Rev.* 242 (2011) 10–30. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x.
- [8] J.M. Spergel, From atopic dermatitis to asthma: The atopic march, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 105 (2010) 99–106. doi:10.1016/j.anai.2009.10.002.
- [9]* A. Patrizi, A. Pileri, F. Bellini, B. Raone, I. Neri, G. Ricci, Atopic Dermatitis and the Atopic March: What Is New?, *J. Allergy.* 2011 (2011) 1–5. doi:10.1155/2011/279425.
- [10]* H.J. Gould, B.J. Sutton, IgE in allergy and asthma today, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 205–217. doi:10.1038/nri2273.
- [11] U. Rinas, G. Horneff, V. Wahn, Interferon- γ 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, *Pediatr. Allergy Immunol.* 4 (1993) 60–64. doi:10.1111/j.1399-3038.1993.tb00068.x.
- [12] S.L. Prescott, C. Macaubas, B.J. Holt, T.B. Smallacombe, R. Loh, P.D. Sly, P.G. Holt, Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile., *J. Immunol.* 160 (1998) 4730–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590218>.
- [13]* T. V. Rajan, The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: A re-interpretation, *Trends Immunol.* 24 (2003) 376–379. doi:10.1016/S1471-4906(03)00142-X.
- [14]* H. Tlaskalová-Hogenová, R. Štěpánková, T. Hudcovic, L. Tučková, B. Cukrowska, R. Lodinová-Žádníková, H. Kozáková, P. Rossmann, J. Bártová, D. Sokol, D.P. Funda, D. Borovská, Z. Řeháková, J. Šinkora, J. Hofman, P. Drastich, A. Kokešová, Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases, *Immunol. Lett.* 93 (2004) 97–108. doi:10.1016/j.imlet.2004.02.005.
- [15]* H. Tlaskalová-Hogenová, R. Štěpánková, The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases., *Cell. Mol. Immunol.* (2011). <http://www.nature.com/cmi/journal/v8/n2/abs/cmi201067a.html%5Cnpapers2://publication/uuid/59C168B1-0A80-4D9B-BEBA-4F6D7B9597C9>.
- [16]* H. Tlaskalová-Hogenová, L. Tučková, R. Lodinová-Žádníková, R. Štěpánková, B. Cukrowska, D.P. Funda, I. Striž, H. Kozáková, I. Trebichavský, D. Sokol, Z. Řeháková, J. Šinkora, P. Fundová, D. Horáková, L. Jelínková, D. Sánchez, Mucosal immunity: Its role in defense and allergy, *Int. Arch.*

Allergy *Immunol.* 128 (2002) 77–89. doi:10.1159/000059397.

- [17]* J. Mestecky, Z. Moldoveanu, C.O. Elson, Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens, in: *Vaccine*, 2005: pp. 1800–1803. doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.009.
- [18]* H. Tlaskalova-Hogenova, R. Stepankova, L. Tuckova, M. a Farre, D.P. Funda, E.F. Verdu, J. Sinkora, T. Hudcovic, Z. Rehakova, B. Cukrowska, H. Kozakova, L. Prokesova, Autoimmunity, immunodeficiency and mucosal infections: chronic intestinal inflammation as a sensitive indicator of immunoregulatory defects in response to normal luminal microflora., *Folia Microbiol.* (Praha). 43 (1998) 545–550. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9821323>.
- [19]* K. Matter, M.S. Balda, Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay., *J. Cell Sci.* 120 (2007) 1505–1511. doi:10.1242/jcs.005975.
- [20] J. Mankertz, S. Tavalali, H. Schmitz, a Mankertz, E.O. Riecken, M. Fromm, J.D. Schulzke, Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma., *J. Cell Sci.* 113 (Pt 1 (2000) 2085–2090. doi:10.1083/jcb.133.1.43.
- [21]* K.R. Groschwitz, S.P. Hogan, Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis., *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (2009) 3-20; quiz 21–2. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038.
- [22]* H. Liu, J. Dicksved, T. Lundh, J. Lindberg, Heat Shock Proteins: Intestinal Gatekeepers that Are Influenced by Dietary Components and the Gut Microbiota, *Pathogens.* 3 (2014) 187–210. doi:10.3390/pathogens3010187.
- [23]* J. Berkes, V.K. Viswanathan, S.D. Savkovic, G. Hecht, Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation, *Gut.* 52 (2003) 439–451. doi:10.1136/gut.52.3.439.
- [24]* D. Ulluwishewa, R.C. Anderson, W.C. McNabb, P.J. Moughan, J.M. Wells, N.C. Roy, Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components., *J. Nutr.* 141 (2011) 769–776. doi:10.3945/jn.110.135657.
- [25] S. Resta-Lenert, K.E. Barrett, Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC)., *Gut.* 52 (2003) 988–97. doi:10.1136/GUT.52.7.988.
- [26] A.A. Zyrek, C. Cichon, S. Helms, C. Enders, U. Sonnenborn, M.A. Schmidt, Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of Escherichia coli Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair, *Cell. Microbiol.* 9 (2007) 804–816. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00836.x.
- [27] H. Qin, Z. Zhang, X. Hang, Y. Jiang, L. plantarum prevents enteroinvasive Escherichia coli-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells., *BMC Microbiol.* 9 (2009) 63. doi:10.1186/1471-2180-9-63.
- [28] J.B. Ewaschuk, H. Diaz, L. Meddings, B. Diederichs, A. Dmytrash, J. Backer, M. Looijer-van Langen, K.L. Madsen, Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295 (2008) G1025–G1034. doi:10.1152/ajpgi.90227.2008.
- [29] J. Karczewski, F.J. Troost, I. Konings, J. Dekker, M. Kleerebezem, R.-J.M. Brummer, J.M. Wells, Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298 (2010) G851–G859. doi:10.1152/ajpgi.00327.2009.
- [30] C. Burke, P. Steinberg, D.B. Rusch, S. Kjelleberg, T. Thomas, Bacterial community assembly based on functional genes rather than species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108 (2011) 14288–14293. doi:10.1073/pnas.1101591108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1101591108.
- [31]* D. Graf, R. Di Cagno, F. Fåk, H.J. Flint, M. Nyman, M. Saarela, B. Watzl, Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota., *Microb. Ecol. Health Dis.* 26 (2015) 26164.

doi:10.3402/mehd.v26.26164.

- [32]* D.M. LILLY, R.H. STILLWELL, PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS., *Science*. 147 (1965) 747–8. doi:10.1126/science.147.3659.747.
- [33]* Y. Vandenplas, G. Huys, G. Daube, Probiotics: An update, *J. Pediatr.* (Rio. J). 91 (2015) 6–21. doi:10.1016/j.jpeds.2014.08.005.
- [34]* M. De Vrese, J. Schrezenmeir, Probiotics, prebiotics, and synbiotics, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 111 (2008) 1–66. doi:10.1007/10_2008_097.
- [35] G. Moro, S. Arslanoglu, B. Stahl, J. Jelinek, U. Wahn, G. Boehm, A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age, *Arch. Dis. Child*. 91 (2006) 814–819. doi:10.1136/adc.2006.098251.
- [36] M. van den Nieuwboer, E. Claassen, L. Morelli, F. Guarner, R.J. Brummer, Probiotic and synbiotic safety in infants under two years of age, *Benef. Microbes*. 5 (2014) 45–60. doi:10.3920/BM2013.0046.
- [37] R. Lodinová-Zádníková, M. Slavíková, H. Tlaskalová-Hogenová, I. Adlerberth, L. a Hanson, a Wold, B. Carlsson, C. Svanborg, L. Mellander, The antibody response in breast-fed and non-breast-fed infants after artificial colonization of the intestine with *Escherichia coli* O83., *Pediatr. Res*. 29 (1991) 396–399. doi:10.1203/00006450-199104000-00013.
- [38] R. Lodinova-Zadnikova, L. Prokešová, I. Kocourková, J. Hrdý, J. Žižka, Prevention of allergy in infants of allergic mothers by probiotic *Escherichia coli*, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 153 (2010) 201–206. doi:10.1159/000312638.
- [39] J. Hejnova, U. Dobrindt, R. Nemcova, C. Rusniok, A. Bomba, L. Frangeul, J. Hacker, P. Glaser, P. Sebo, C. Buchrieser, Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A0 34/86 (O83:K24:H31), *Microbiology*. 151 (2005) 385–398. doi:10.1099/mic.0.27469-0.
- [40] J. Žižka, M. Kverka, O. Novotná, I. Staňková, R. Lodinová-Žádníková, I. Kocourková, I. Šterzl, L. Prokešová, Perinatal period cytokines related to increased risk of future allergy development, *Folia Microbiol.* (Praha). 52 (2007) 549–555. doi:10.1007/BF02932118.
- [41]* M. Merad, P. Sathe, J. Helft, J. Miller, A. Mortha, The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting., *Annu. Rev. Immunol.* 31 (2013) 563–604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- [42]* M.F. Lipscomb, B.J. Masten, Dendritic cells: immune regulators in health and disease., *Physiol. Rev.* 82 (2002) 97–130. doi:10.1152/physrev.00023.2001.
- [43]* B. Pulendran, Immune Activation: Death, Danger and Dendritic Cells, *Curr. Biol.* 14 (2004). doi:10.1016/j.cub.2003.12.020.
- [44]* J.-L. Casanova, L. Abel, Primary immunodeficiencies: a field in its infancy., *Science*. 317 (2007) 617–9. doi:10.1126/science.1142963.
- [45]* J.-L. Casanova, Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E7128-37. doi:10.1073/pnas.1521651112.
- [46] P.S. Linsley, E.A. Clark, J.A. Ledbetter, T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 5031–5035. doi:10.1073/pnas.87.13.5031.
- [47]* G. Liu, L. Zhang, Y. Zhao, Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells, *Clin. Exp. Immunol.* 160 (2010) 168–175. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04091.x.
- [48]* J.R. Podojil, S.D. Miller, Targeting the B7 family of co-stimulatory molecules: Successes and

- challenges, *BioDrugs*. 27 (2013) 1–13. doi:10.1007/s40259-012-0001-6.
- [49]* R.M. Steinman, The control of immunity and tolerance by dendritic cells, in: *Pathol. Biol.*, 2003: pp. 59–60. doi:10.1016/S0369-8114(03)00096-8.
- [50]* O. Joffre, M.A. Nolte, R. Spörri, C.R.E. Sousa, Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity, *Immunol. Rev.* 227 (2009) 234–247. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x.
- [51] G. De Becker, V. Moulin, F. Tielemans, F. De Mattia, J. Urbain, O. Leo, M. Moser, Regulation of T helper cell differentiation in vivo by soluble and membrane proteins provided by antigen-presenting cells, *Eur J Immunol.* 28 (1998) 3161–3171. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3161::AID-IMMU3161>3.0.CO;2-Q.
- [52]* I. Gutcher, B. Becher, APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1119–1127. doi:10.1172/JCI31720.
- [53] M. Stein, S. Keshav, N. Harris, S. Gordon, Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation., *J. Exp. Med.* 176 (1992) 287–92. doi:10.1084/jem.176.1.287.
- [54] M. Tajima, D. Wakita, D. Noguchi, K. Chamoto, Z. Yue, K. Fugo, H. Ishigame, Y. Iwakura, H. Kitamura, T. Nishimura, IL-6–dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17–producing CD8 + T cells, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 1019–1027. doi:10.1084/jem.20071133.
- [55] N. Manel, D. Unutmaz, D.R. Littman, The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 641–649. doi:10.1038/ni.1610.
- [56] S.K. Mazmanian, H.L. Cui, A.O. Tzianabos, D.L. Kasper, An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system, *Cell.* 122 (2005) 107–118. doi:10.1016/j.cell.2005.05.007.
- [57]* O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell.* 140 (2010) 805–820. doi:S0092-8674(10)00023-1 [pii]r10.1016/j.cell.2010.01.022.
- [58]* S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, S. Akira, S. Uematsu, S. Uematsu, O. Takeuchi, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity., *Cell.* 124 (2006) 783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.
- [59]* E. Procko, M.L. O’Mara, W.F.D. Bennett, D.P. Tieleman, R. Gaudet, The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter, *FASEB J.* 23 (2009) 1287–1302. doi:10.1096/fj.08-121855.
- [60]* E.J.A.M. Sijts, P.M. Kloetzel, The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 1491–1502. doi:10.1007/s00018-011-0657-y.
- [61]* J. Neefjes, M.L.M. Jongsma, P. Paul, O. Bakke, Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 823–836. doi:10.1038/nri3084.
- [62]* S. Murata, Y. Takahama, K. Tanaka, Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides, *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 192–196. doi:10.1016/j.coi.2008.03.002.
- [63] N.A. Kukutsch, S. Roßner, J.M. Austyn, G. Schuler, M.B. Lutz, Formation and kinetics of MHC class I-ovalbumin peptide complexes on immature and mature murine dendritic cells, *J. Invest. Dermatol.* 115 (2000) 449–453. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00084.x.
- [64]* A. Sijts, Y. Sun, K. Janek, S. Kral, A. Paschen, D. Schadendorf, P.M. Kloetzel, The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing, *Mol. Immunol.* 39 (2002) 165–169. doi:10.1016/S0161-5890(02)00099-8.
- [65] M. Rescigno, S. Citterio, C. Thèry, M. Rittig, D. Medaglini, G. Pozzi, S. Amigorena, P. Ricciardi-

- Castagnoli, Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 5229–34. doi:10.1073/pnas.95.9.5229.
- [66]* J.P.-Y. Ting, J. Trowsdale, Genetic Control of MHC Class II Expression, *Cell*. 109 (2002) S21–S33. doi:10.1016/S0092-8674(02)00696-7.
- [67] N.S. Wilson, D. El-Sukkari, J.A. Villadangos, Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis, *Blood*. 103 (2004) 2187–2195. doi:10.1182/blood-2003-08-2729.
- [68] C.D. Platt, J.K. Ma, C. Chalouni, M. Ebersold, H. Bou-Reslan, R.A.D. Carano, I. Mellman, L. Delamarre, Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 4287–4292. doi:10.1073/pnas.0910609107.
- [69]* G. van Niel, R. Wubbolts, W. Stoorvogel, Endosomal sorting of MHC class II determines antigen presentation by dendritic cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 20 (2008) 437–444. doi:10.1016/j.ceb.2008.05.011.
- [70] L. Delamarre, H. Holcombe, I. Mellman, Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation., *J. Exp. Med.* 198 (2003) 111–22. doi:10.1084/jem.20021542.
- [71]* S. Ishido, Y. Matsuki, E. Goto, M. Kajikawa, M. Ohmura-Hoshino, MARCH-I: A new regulator of dendritic cell function, *Mol. Cells*. 29 (2010) 229–232. doi:10.1007/s10059-010-0051-x.
- [72] A. De Gassart, V. Camosseto, J. Thibodeau, M. Ceppi, N. Catalan, P. Pierre, E. Gatti, MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 3491–3496. doi:10.1073/pnas.0708874105.
- [73] K. Inaba, S. Turley, T. Iyoda, F. Yamaide, S. Shimoyama, C. Reis e Sousa, R.N. Germain, I. Mellman, R.M. Steinman, The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli., *J. Exp. Med.* 191 (2000) 927–36. doi:10.1084/jem.191.6.927.
- [74]* J.A. Villadangos, P. Schnorrer, N.S. Wilson, Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: A balance between creative and destructive forces, *Immunol. Rev.* 207 (2005) 191–205. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00317.x.
- [75] S. Jansen, A. Collins, C. Yang, G. Rebowksi, T. Svitkina, R. Dominguez, Mechanism of actin filament bundling by fascin, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 30087–30096. doi:10.1074/jbc.M111.251439.
- [76] R. Ross, H. Jonuleit, M. Bros, X.L. Ross, A.H. Enk, J. Knop, A.B. Reske-Kunz, S. Yamashiro, F. Matsumura, Expression of the actin-bundling protein fascin in cultured human dendritic cells correlates with dendritic morphology and cell differentiation, *J. Invest. Dermatol.* 115 (2000) 658–663. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00112.x.
- [77] M. Bros, X.-L. Ross, A. Pautz, A.B. Reske-Kunz, R. Ross, The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer., *J. Immunol.* 171 (2003) 1825–1834. doi:10.4049/jimmunol.171.4.1825.
- [78] P. Verdijk, P.A. van Veelen, A.H. de Ru, P.J. Hensbergen, K. Mizuno, H.K. Koerten, F. Koning, C.P. Tensen, A.M. Mommaas, Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane, *Eur. J. Immunol.* 34 (2004) 156–164. doi:10.1002/eji.200324241.
- [79] D.Y. Wong, D. Sept, The interaction of cofilin with the actin filament, *J. Mol. Biol.* 413 (2011) 97–105. doi:10.1016/j.jmb.2011.08.039.
- [80] G.J. Randolph, J. Ochando, S. Partida-Sánchez, Migration of dendritic cell subsets and their precursors., *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008) 293–316.

doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090254.

- [81] D. Alvarez, E.H. Vollmann, U.H. von Andrian, Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration, *Immunity*. 29 (2008) 325–342. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.006.
- [82]* R.J. Greenwald, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, the B7 Family Revisited, *Dx.Doi.Org. Annu. Rev. Immunol.* 23 (2004) 515–548. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611.
- [83]* A.H. Sharpe, E.J. Wherry, R. Ahmed, G.J. Freeman, The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection., *Nat. Immunol.* 8 (2007) 239–45. doi:10.1038/ni1443.
- [84] S. Yao, Y. Zhu, G. Zhu, M. Augustine, L. Zheng, D.J. Goode, M. Broadwater, W. Ruff, S. Flies, H. Xu, D. Flies, L. Luo, S. Wang, L. Chen, B7-H2 Is a Costimulatory Ligand for CD28 in Human, *Immunity*. 34 (2011) 729–740. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.014.
- [85]* B. O’Sullivan, R. Thomas, CD40 and dendritic cell function, *Crit Rev Immunol.* 23 (2003) 83–107. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12906261.
- [86]* A.T. Prechtel, A. Steinkasserer, CD83: An update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells, *Arch. Dermatol. Res.* 299 (2007) 59–69. doi:10.1007/s00403-007-0743-z.
- [87]* D.N. Hart, Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response., *Blood*. 90 (1997) 3245–3287.
- [88]* M. Lechmann, S. Berchtold, A. Steinkasserer, J. Hauber, CD83 on dendritic cells: More than just a marker for maturation, *Trends Immunol.* 23 (2002) 273–275. doi:10.1016/S1471-4906(02)02214-7.
- [89]* L.J. Zhou, R. Schwarting, H.M. Smith, T.F. Tedder, A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily., *J. Immunol.* 149 (1992) 735–742. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378080>.
- [90*] M. Lechmann, E. Zinser, A. Golka, A. Steinkasserer, Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129 (2002) 113–118. doi:10.1159/000065883.
- [91] C. Aerts-Toegaert, C. Heirman, S. Tuyaeerts, J. Corthals, J.L. Aerts, A. Bonehill, K. Thielemans, K. Breckpot, K. Breckpot, CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 686–695. doi:10.1002/eji.200636535.
- [92] F. Granucci, C. Vizzardelli, E. Virzi, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 2539–2546. doi:10.1002/1521-4141(200109)31:9<2539::AID-IMMU2539>3.0.CO;2-9.
- [93] T.T. Espir, L.D.P. Figueira, M.D.F. Naiff, A.G. Da Costa, M. Ramalho-Ortigão, A. Malheiro, A.M.R. Franco, The Role of Inflammatory, Anti-Inflammatory, and Regulatory Cytokines in Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State, Brazil, *J. Immunol. Res.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/481750.
- [94] S.E. Macatonia, N.A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C.S. Hsieh, J.A. Culpepper, M. Wyszocka, G. Trinchieri, K.M. Murphy, A. O’Garra, Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells., *J. Immunol.* 154 (1995) 5071–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730613>.
- [95]* S. Romagnani, T-cell subsets (Th1 versus Th2), *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 85 (2000) 9–21. doi:10.1016/S1081-1206(10)62426-X.
- [96]* C.A. Hunter, New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions, *Nat Rev Immunol.* 5 (2005) 521–531. doi:10.1038/nri1648.
- [97]* M. Saraiva, A. O’Garra, The regulation of IL-10 production by immune cells, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 170–181. doi:10.1038/nri2711.

- [98]* T. Walzer, M. Dalod, S.H. Robbins, L. Zitvogel, E. Vivier, Natural-killer cells and dendritic cells: “L’union fait la force,” *Blood*. 106 (2005) 2252–2258. doi:10.1182/blood-2005-03-1154.
- [99]* D.M. Hilbert, M.P. Cancro, P.A. Scherle, R.P. Nordan, J. Van Snick, W. Gerhard, S. Rudikoff, T cell derived IL-6 is differentially required for antigen-specific antibody secretion by primary and secondary B cells, *J Immunol*. 143 (1989) 4019–4024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2480384>.
- [100] C. Pasare, R. Medzhitov, Toll Pathway– Dependent Blockade of CD4+CD25+ T Cell-Mediated Suppression by Dendritic Cells, *Science*. 299 (2003) 1033–1036. doi:10.1126/science.1078231.
- [101] F. Granucci, S. Feau, V. Angeli, F. Trottein, P. Ricciardi-Castagnoli, Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming., *J. Immunol*. 170 (2003) 5075–5081. doi:10.4049/jimmunol.170.10.5075.
- [102] R. Sporri, S. Reis e, Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function, *Nat.Immunol*. 6 (2005) 163–170. doi:10.1038/ni1162.
- [103]* M.B. Lutz, G. Schuler, Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity?, *Trends Immunol*. 23 (2002) 445–449. doi:10.1016/S1471-4906(02)02281-0.
- [104]* J.-S. Frick, F. Grünebach, I.B. Autenrieth, Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6., *Int. J. Med. Microbiol*. 300 (2010) 19–24. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.010.
- [105]* C. Kumar, S. Kohli, P.P. Bapsy, A.K. Vaid, M. Jain, V.S.S. Attili, B. Sharan, Immune modulation by dendritic-cell-based cancer vaccines, *J. Biosci*. 42 (2017) 161–173. doi:10.1007/s12038-017-9665-x.
- [106]* X. Liao, A.M. Reihl, X.M. Luo, Breakdown of immune tolerance in systemic lupus erythematosus by dendritic cells, *J. Immunol. Res*. 2016 (2016). doi:10.1155/2016/6269157.
- [107]* M. Colonna, G. Trinchieri, Y.-J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells in immunity, *Nat. Immunol*. 5 (2004) 1219–1226. doi:10.1038/ni1141.
- [108]* K. Shortman, S.H. Naik, Steady-state and inflammatory dendritic-cell development., *Nat. Rev. Immunol*. 7 (2007) 19–30. doi:10.1038/nri1996.
- [109]* L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart, P.J.M. Leenen, Y.J. Liu, G. MacPherson, G.J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J.M. Austyn, M.B. Lutz, Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood, *Blood*. 116 (2010). doi:10.1182/blood-2010-02-258558.
- [110] S. Vandenabeele, H. Hochrein, N. Mavaddat, K. Winkel, K. Shortman, Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations, *Blood*. 97 (2001) 1733–1741. doi:10.1182/blood.V97.6.1733.
- [111]* K. Sato, S. Fujita, Dendritic cells: nature and classification., *Allergol. Int*. 56 (2007) 183–191. doi:10.2332/allergolint.R-06-139.
- [112] A. Dzionek, A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D.W. Buck, J. Schmitz, BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood., *J. Immunol*. 165 (2000) 6037–46. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6037.
- [113] P. Szabolcs, K.-D. Park, M. Reese, L. Marti, G. Broadwater, J. Kurtzberg, Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method, *Stem Cells*. 21 (2003) 296–303. doi:10.1634/stemcells.21-3-296.
- [114]* K. Shortman, W.R. Heath, The CD8+ dendritic cell subset, *Immunol. Rev*. 234 (2010) 18–31. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x.
- [115] J. Diao, E. Winter, W. Chen, C. Cantin, M.S. Cattral, Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow., *J. Immunol*. 173 (2004) 1826–33. doi:10.4049/JIMMUNOL.173.3.1826.

- [116]* M. Collin, N. Mcgovern, M. Haniffa, Human dendritic cell subsets, *Immunology*. 140 (2013) 22–30. doi:10.1111/imm.12117.
- [117] M. Williams, P. Bruhns, Y. Saeys, H. Hammad, B.N. Lambrecht, The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages., *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 94–108. doi:10.1038/nri3582.
- [118]* T. Kaisho, Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets, *Vaccine*. 30 (2012) 7652–7657. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.043.
- [119] S. Iborra, H.M. Izquierdo, M. Martínez-López, N. Blanco-Menéndez, C. Reis E Sousa, D. Sancho, The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 1628–1643. doi:10.1172/JCI60660.
- [120] L.F. Poulin, Y. Reyal, H. Uronen-Hansson, B.U. Schraml, D. Sancho, K.M. Murphy, U.K. Håkansson, L.F. Moita, W.W. Agace, D. Bonnet, C. Reis E Sousa, DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues, *Blood*. 119 (2012) 6052–6062. doi:10.1182/blood-2012-01-406967.
- [121] C.E. Angel, E. George, A.E.S. Brooks, L.L. Ostrovsky, T.L.H. Brown, P.R. Dunbar, Cutting edge: CD1a⁺ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands., *J Immunol.* 176 (2006) 5730–4. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5730.
- [122] L.C. Zaba, J. Fuentes-Duculan, R.M. Steinman, J.G. Krueger, M.A. Lowes, A.T. Larregina, L.D. Faló, J. Valladeau, S. Saeland, R.E. Hunger, R. Cerio, C.E. Griffiths, K.D. Cooper, B.J. Nickoloff, J.T. Headington, P. Henriksson, S. Becker, G. Lynch, J. McDonagh, D. Torocsik, H. Bardos, L. Nagy, R. Adany, P.S. Freudenthal, R.M. Steinman, K.L. Summers, B.D. Hock, J.L. McKenzie, D.N. Hart, K.P. MacDonald, M. Brigl, M.B. Brenner, A. Granelli-Piperno, S.R. Krutzik, S. Gordon, P.R. Taylor, F. Wang, V.J. Tormey, C.E. Angel, F.O. Nestle, X.G. Zheng, C.B. Thompson, L.A. Turka, B.J. Nickoloff, L. Meunier, A. Gonzalez-Ramos, K.D. Cooper, M. Deguchi, S. Aiba, H. Ohtani, H. Nagura, H. Tagami, F.O. Nestle, L.A. Turka, B.J. Nickoloff, M. Dupasquier, P. Stoitzner, A. van Oudenaren, N. Romani, P.J. Leenen, J. Narbutt, D.P. Fivenson, B.J. Nickoloff, B. de Saint-Vis, S. Ebner, B.O. Fabrick, C.D. Dijkstra, T.K. van den Berg, E.P. McGreal, J.L. Miller, S. Gordon, R.M. Steinman, H. Hemmi, P.J. Lea, A. Pawlowski, H. Fujita, Y. Nishii, K. Yamashita, S. Kawamata, K. Yoshikawa, C.R. Taylor, R.R. Anderson, R.W. Gange, N.A. Michaud, T.J. Flotte, A.W. Lee, Normal human dermis contains distinct populations of CD11c⁺BDCA-1⁺ dendritic cells and CD163⁺FXIIIa⁺ macrophages., *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2517–25. doi:10.1172/JCI32282.
- [123]* A.G. Jegalian, F. Facchetti, E.S. Jaffe, Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states, *Adv. Anat. Pathol.* 16 (2009) 392–404. doi:10.1097/PAP.0b013e3181bb6bc2.
- [124] J.R. Tversky, T. V Le, a P. Bieneman, K.L. Chichester, R.G. Hamilton, J.T. Schroeder, Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via Toll-like receptor 9., *Clin. Exp. Allergy*. 38 (2008) 781–8. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.02954.x.
- [125]* M. Swiecki, M. Colonna, The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells., *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 471–485. doi:10.1038/nri3865.
- [126]* I. Bekeredjian-Ding, J. Greil, S. Ammann, M. Parcina, Plasmacytoid dendritic cells: Neglected regulators of the immune response to staphylococcus aureus, *Front. Immunol.* 5 (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00238.
- [127]* T. Kaisho, Molecular mechanisms for plasmacytoid dendritic cell function and development, *Vaccine*. 28 (2010) 8046–8047. doi:10.1016/j.vaccine.2010.09.025.
- [128]* M. Gilliet, W. Cao, Y.-J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases., *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 594–606. doi:10.1038/nri2358.
- [129] U. O’Doherty, M. Peng, S. Gezelter, W.J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj, R.M. Steinman, Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature., *Immunology*. 82 (1994) 487–93. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1414873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- [130] M. Rissoan, Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation, *Science* (80-.). 283 (1999) 1183–1186. doi:10.1126/science.283.5405.1183.
- [131]* J.J. Lafaille, The Role of Helper T Cell Subsets in Autoimmune Diseases, *Cytokine Growth Factor Rev.* 9 (1998) 139–151. doi:10.1016/S1359-6101(98)00009-4.
- [132]* A.K. Abbas, K.M. Murphy, A. Sher, Functional diversity of helper T lymphocytes., *Nature.* 383 (1996) 787–93. doi:10.1038/383787a0.
- [133] W. Ouyang, S.H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T.L. Murphy, W.C. Sha, K.M. Murphy, Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4- independent mechanism, *Immunity.* 9 (1998) 745–755. doi:10.1016/S1074-7613(00)80671-8.
- [134] J.P. Contreras, N.P. Ly, D.R. Gold, H. He, M. Wand, S.T. Weiss, D.L. Perkins, T.A.E. Platts-Mills, P.W. Finn, Allergen-induced cytokine production, atopic disease, IgE, and wheeze in children, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (2003) 1072–1077. doi:10.1016/j.jaci.2003.08.036.
- [135] S.-H. Cho, L.A. Stanciu, S.T. Holgate, S.L. Johnston, Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171 (2005) 224–30. doi:10.1164/rccm.200310-1416OC.
- [136]* P.J. Barnes, Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 183–192. doi:10.1038/nri2254.
- [137] D. a Randolph, C.J. Carruthers, S.J. Szabo, K.M. Murphy, D.D. Chaplin, Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma., *J. Immunol.* 162 (1999) 2375–2383.
- [138]* S.T. Holgate, Pathogenesis of Asthma, in: *Allergy Allerg. Dis. Second Ed.*, 2009: pp. 1608–1631. doi:10.1002/9781444300918.ch78.
- [139] D. Amsen, J.M. Blander, G.R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, R.A. Flavell, Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells, *Cell.* 117 (2004) 515–526. doi:10.1016/S0092-8674(04)00451-9.
- [140]* A.E. Kelly-Welch, Interleukin-4 and Interleukin-13 Signaling Connections Maps, *Science* (80-.). 300 (2003) 1527–1528. doi:10.1126/science.1085458.
- [141] D.H. Zhang, L. Yang, L. Cohn, L. Parkyn, R. Homer, P. Ray, A. Ray, Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3, *Immunity.* 11 (1999) 473–482. doi:10.1016/S1074-7613(00)80122-3.
- [142] F.L. van der Heijden, E.A. Wierenga, J.D. Bos, M.L. Kapsenberg, High Frequency of IL-4–Producing CD4+ Allergen-Specific T Lymphocytes in Atopic Dermatitis Lesional Skin, *J. Invest. Dermatol.* 97 (1991) 389–394. doi:10.1111/1523-1747.ep12480966.
- [143] Q. Hamid, T. Naseer, E.M. Minshall, Y.L. Song, M. Boguniewicz, D.Y.M. Leung, In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 98 (1996) 225–231. doi:10.1016/S0091-6749(96)70246-4.
- [144]* B. Stockinger, M. Veldhoen, Differentiation and function of Th17 T cells, *Curr. Opin. Immunol.* 19 (2007) 281–286. doi:10.1016/j.coi.2007.04.005.
- [145]* C.T. Weaver, L.E. Harrington, P.R. Mangan, M. Gavrieli, K.M. Murphy, Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties, *Immunity.* 24 (2006) 677–688. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002.
- [146] C. Infante-Duarte, H.F. Horton, M.C. Byrne, T. Kamradt, Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells, *J. Immunol.* 165 (2000) 6107–6115. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6107.
- [147] Ivanov II, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, D.R. Littman, The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of

- proinflammatory IL-17+ T helper cells, *Cell*. 126 (2006) 1121–1133. doi:S0092-8674(06)01105-6 [pii] 10.1016/j.cell.2006.07.035.
- [148] E. V. Acosta-Rodriguez, G. Napolitani, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 942–949. doi:10.1038/ni1496.
- [149]* J. Verhagen, K. Blaser, C.A. Akdis, M. Akdis, Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy: T-Regulatory Cells and More, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 26 (2006) 207–231. doi:10.1016/j.iac.2006.02.008.
- [150] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases., *J. Immu.* 155 (1995) 1151–1164. doi:10.4049/jimmunol.1202464.
- [151]* S. Sakaguchi, Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses, *Annu Rev Immunol.* 22 (2004) 531–562. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122.
- [152] K. Wing, Z. Fehérvári, S. Sakaguchi, Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells, *Int. Immunol.* 18 (2006) 991–1000. doi:10.1093/intimm/dx1044.
- [153] E.M. Ling, T. Smith, X.D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V.A. Carr, D.S. Robinson, Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease, *Lancet*. 363 (2004) 608–615. doi:10.1016/S0140-6736(04)15592-X.
- [154] R. Lodinova-Zadnikova, B. Cukrowska, H. Tlaskalova-Hogenova, Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years), *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131 (2003) 209–211. doi:10.1159/000071488.
- [155] J.M. Hall, P. Lingenfelter, S.L. Adams, D. Lasser, J.A. Hansen, M.A. Bean, Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescence in situ hybridization., *Blood*. 86 (1995) 2829–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545474>.
- [156]* G.S. Dawe, X.W. Tan, Z.C. Xiao, Cell migration from baby to mother., *Cell Adh. Migr.* 1 (2007) 19–27. doi:10.4161/cam.4082.
- [157]* A.M. Stevens, Do maternal cells trigger or perpetuate autoimmune diseases in children?, *Pediatr. Rheumatol.* 5 (2007). doi:10.1186/1546-0096-5-9.
- [158] J. Hrdý, P. Zanvit, O. Novotná, I. Kocourková, J. Žižka, L. Prokešová, Cytokine expression in cord blood cells of children of healthy and allergic mothers, *Folia Microbiol. (Praha)*. 55 (2010) 515–519. doi:10.1007/s12223-010-0085-7.
- [159] L. Súkeníková, V. Černý, O. Novotná, P. Petrásková, K. Boráková, L. Kolářová, L. Prokešová, J. Hrdý, 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, *Immunol. Lett.* (2017). doi:10.1016/j.imlet.2017.05.013.
- [160] J. Žižka, J. Hrdý, R. Lodinová-Žádníková, I. Kocourková, O. Novotná, I. Šterzl, L. Prokešová, Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on in vitro stimulation of cord blood lymphocytes, *Pediatr. Allergy Immunol.* 18 (2007) 486–494. doi:10.1111/j.1399-3038.2007.00563.x.
- [161] L. Prokešová, Gene expression of subunits of the IL-12 family cytokines in moDCs derived in vitro from the cord blood of children of healthy and allergic mothers, *Folia Biol. (Praha)*. 60 (2014) 74–82.
- [162] J. Hrdý, I. Kocourková, L. Prokešová, Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers, *Clin. Exp. Immunol.* 170 (2012) 10–17. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04630.x.

- [163] J. Hrdý, O. Novotná, I. Kocourková, L. Prokešová, The effect of the colostrum cells on gene expression of cytokines in cord blood cells, *Folia Microbiol. (Praha)*. (2017) 1–5. doi:10.1007/s12223-017-0519-6.
- [164] D. Ghadimi, R. Fölster-Holst, M. de Vrese, P. Winkler, K.J. Heller, J. Schrezenmeier, 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 (2008) 677–692. doi:10.1016/j.imbio.2008.02.001.
- [165] M. V Kopp, M. Goldstein, A. Dietschek, J. Sofke, A. Heinzmann, R. Urbanek, Lactobacillus GG has in vitro effects on enhanced interleukin-10 and interferon-gamma release of mononuclear cells but no in vivo effects in supplemented mothers and their neonates., *Clin. Exp. Allergy*. 38 (2008) 602–610. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02911.x.
- [166] S.L. Prescott, B. King, T.L. Strong, P.G. Holt, The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age., *Allergy*. 58 (2003) 1187–1194. doi:10.1034/j.1398-9995.2003.00263.x.
- [167] G.-Q. Zhang, H.-J. Hu, C.-Y. Liu, Q. Zhang, S. Shakya, Z.-Y. Li, Probiotics for Prevention of Atopy and Food Hypersensitivity in Early Childhood: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials., *Medicine (Baltimore)*. 95 (2016) e2562. doi:10.1097/MD.0000000000002562.
- [168] J. Liska, K. Siala, V. Holcek, S. Sobotova, M. Kepkova, F. Sefrna, Effect of early treatment of newborns by peroral colonization using non-pathogenic *E. coli* on the development of their immunological system, *Clin. Anti-Inflamm. Anti-Allergy Drugs*. 1 (2014) 111–121. http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed12&AN=2015110067%5Cnhttp://sfxeu09.hosted.exlibrisgroup.com/sfx_ubit?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:&issn=2212-7038&isbn=&volume=1&issue=2&spage=111&pages=111-121&date=2014&title=Cl.
- [169] A. Polissi, P. Sperandio, The lipopolysaccharide export pathway in *Escherichia coli*: Structure, organization and regulated assembly of the Lpt machinery, *Mar. Drugs*. 12 (2014) 1023–1042. doi:10.3390/md12021023.
- [170] L. Jiao, X. Han, S. Wang, Y. Fan, M. Yang, H. Qiu, X. Yang, Imprinted DC mediate the immune-educating effect of early-life microbial exposure, *Eur. J. Immunol.* 39 (2009) 469–480. doi:10.1002/eji.200838367.
- [171] M. Ebrahimi, Z.M. Hassan, J. Hadjati, P. Hayat, S.M. Moazzeni, Immediate exposure to TNF-alpha activate dendritic cells derived from non-purified cord blood mononuclear cells., *Iran. J. Immunol.* 6 (2009) 107–118. doi:10.1002/eji.200838367.
- [172] C. Quinello, A.L. Silveira-Lessa, M.E.J.R. Ceccon, M.A. Cianciarullo, M. Carneiro-Sampaio, P. Palmeira, Phenotypic differences in leucocyte populations among healthy preterm and full-term newborns, *Scand. J. Immunol.* 80 (2014) 57–70. doi:10.1111/sji.12183.
- [173] F. Spinozzi, E. Agea, A. Russano, O. Bistoni, L. Minelli, D. Bologni, A. Bertotto, F.M. De Benedictis, CD4+IL13+ T lymphocytes at birth and the development of wheezing and/or asthma during the 1st year of life, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124 (2001) 497–501. doi:10.1159/000053785.
- [174] A.J. Stoppelenburg, S. De Rooek, M.P. Hennis, L. Bont, M. Boes, Elevated Th17 response in infants undergoing respiratory viral infection, *Am. J. Pathol.* 184 (2014) 1274–1279. doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.033.
- [175] F. Annunziato, L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, S. Romagnani, Phenotypic and functional features of human Th17 cells, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 1849–1861. doi:10.1084/jem.20070663.
- [176] L.E.M. Niers, M.O. Hoekstra, H.M. Timmerman, N.O. Van Uden, P.M.A. De Graaf, H.H. Smits, J.L.L. Kimpfen, G.T. Rijkers, Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases:

- Immunomodulation of neonatal dendritic cells, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 344–352. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03421.x.
- [177] C.M. Petersen, E.I. Christensen, B.S. Andresen, B.K. Møller, Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells, *Exp. Cell Res.* 201 (1992) 160–173. doi:10.1016/0014-4827(92)90360-K.
- [178] M. Bigby, P. Wang, J.F. Fierro, M.S. Sy, Phorbol myristate acetate-induced down-modulation of CD4 is dependent on calmodulin and intracellular calcium., *J. Immunol.* 144 (1990) 3111–3116.
- [179] A. Trickett, Y.L. Kwan, T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads, *J. Immunol. Methods.* 275 (2003) 251–255. doi:10.1016/S0022-1759(03)00010-3.
- [180] H.T. Maecker, J. Trotter, Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity, *Cytom. Part A.* 69 (2006) 1037–1042. doi:10.1002/cyto.a.20333.
- [181] J.R. Currier, E.G. Kuta, E. Turk, L.B. Earhart, L. Loomis-Price, S. Janetzki, G. Ferrari, D.L. Birx, J.H. Cox, A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays, *J. Immunol. Methods.* 260 (2002) 157–172. doi:10.1016/S0022-1759(01)00535-X.
- [182] J.D. Peoples, S. Cheung, M. Nesin, H. Lin, A.M. Francesca Tatad, D. Hoang, J.M. Perlman, S. Cunningham-Rundles, Neonatal cord blood subsets and cytokine response to bacterial antigens, *Am. J. Perinatol.* 26 (2009) 647–657. doi:10.1055/s-0029-1220788.
- [183] L. Farkas, E.O. Kvale, F.E. Johansen, F.L. Jahnsen, F. Lund-Johansen, Plasmacytoid dendritic cells activate allergen-specific TH2 memory cells: Modulation by CpG oligodeoxynucleotides, *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (2004) 436–443. doi:10.1016/j.jaci.2004.04.035.
- [184] B. Danis, T.C. George, S. Goriely, B. Dutta, J. Renneson, L. Gatto, P. Fitzgerald-Bocarsly, A. Marchant, M. Goldman, F. Willems, D. de Wit, Interferon regulatory factor 7-mediated responses are defective in cord blood plasmacytoid dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 507–517. doi:10.1002/eji.200737760.
- [185] S. Vale-Pereira, A. Todo-Bom, L. Geraldes, C. Schmidt-Weber, C.A. Akdis, A. Mota-Pinto, FoxP3, GATA-3 and T-bet expression in elderly asthma, *Clin. Exp. Allergy.* 41 (2011) 490–496. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03640.x.
- [186] A. Nitsche, M. Zhang, T. Clauss, W. Siegert, K. Brune, A. Pahl, Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors., *BMC Immunol.* 8 (2007) 18. doi:10.1186/1471-2172-8-18.
- [187] E. Marschan, J. Honkanen, K. Kukkonen, M. Kuitunen, E. Savilahti, O. Vaarala, Increased activation of GATA-3, IL-2 and IL-5 of cord blood mononuclear cells in infants with IgE sensitization, *Pediatr. Allergy Immunol.* 19 (2008) 132–139. doi:10.1111/j.1399-3038.2007.00593.x.
- [188] S. Olsson, F. Cagnoni, P. Dignetti, G. Melioli, G.W. Canonica, Low concentrations of cytokines produced by allergen-stimulated peripheral blood mononuclear cells have potent effects on nasal polyp-derived fibroblasts, *Clin. Exp. Immunol.* 132 (2003) 254–260. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02148.x.
- [189] M.K. Tulic, M. Hodder, A. Forsberg, S. McCarthy, T. Richman, N. DVaz, A.H.J. Van Den Biggelaar, C.A. Thornton, S.L. Prescott, Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: New insights into immune ontogeny, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011). doi:10.1016/j.jaci.2010.09.020.
- [190] Prescott, Macaubas, Smallacombe, Holt, Sly, Loh, Holt, Reciprocal age-related patterns of allergen-specific T-cell immunity in normal vs. atopic infants, *Clin. Exp. Allergy.* 28 (1998) 39–44. doi:10.1046/j.1365-2222.1998.028s5039.x.
- [191] S.L. Prescott, Early origins of allergic disease: A review of processes and influences during early immune development, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 3 (2003) 125–132. doi:10.1097/00130832-200304000-00006.

- [192] S. Basha, N. Surendran, M. Pichichero, Immune responses in neonates, *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10 (2014) 1171–1184. doi:10.1586/1744666X.2014.942288.
- [193] A. Taylor, J. Verhagen, K. Blaser, M. Akdis, C.A. Akdis, Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : The role of T regulatory cells, *Immunology.* 117 (2006) 433–442. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02321.x.
- [194]* B.M. Matta, A. Castellaneta, A.W. Thomson, Tolerogenic plasmacytoid DC, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 2667–2676. doi:10.1002/eji.201040839.
- [195] A.J. Kassianos, M.Y. Hardy, X. Ju, D. Vijayan, Y. Ding, A.J.E. Vulink, K.J. McDonald, S.L. Jongbloed, R.B. Wadley, C. Wells, D.N.J. Hart, K.J. Radford, Human CD1c (BDCA-1) + myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to *Escherichia coli*, *Eur. J. Immunol.* 42 (2012) 1512–1522. doi:10.1002/eji.201142098.
- [196] P. Amoudruz, U. Holmlund, V. Malmström, C. Trollmo, K. Bremme, A. Scheynius, E. Sverremark-Ekström, Neonatal immune responses to microbial stimuli: Is there an influence of maternal allergy?, *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 (2005) 1304–1310. doi:10.1016/j.jaci.2005.02.036.
- [197] I.H. Ismail, R.J. Boyle, L.J. Mah, P. V. Licciardi, M.L.K. Tang, Reduced neonatal regulatory T cell response to microbial stimuli associates with subsequent eczema in high-risk infants, *Pediatr. Allergy Immunol.* 25 (2014) 674–684. doi:10.1111/pai.12303.
- [198] S. Meng, R. Gao, B. Yan, J. Ren, F. Wu, P. Chen, J. Zhang, L. Wang, Y. Xiao, J. Liu, Maternal allergic disease history affects childhood allergy development through impairment of neonatal regulatory T-cells, *Respir. Res.* 17 (2016) 114. doi:10.1186/s12931-016-0430-8.
- [199] S. De Roock, A.J. Stoppelenburg, R. Scholman, S.B.E.A. Hoeks, J. Meerding, B.J. Prakken, M. Boes, Defective TH17 development in human neonatal T cells involves reduced RORC2 mRNA content, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013). doi:10.1016/j.jaci.2013.04.014.
- [200] L. Cosmi, R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, F. Annunziato, Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor., *J. Exp. Med.* 205 (2008) 1903–16. doi:10.1084/jem.20080397.
- [201] S. shan Meng, R. Gao, B. di Yan, J. Ren, F. Wu, P. Chen, J. Zhang, L. fang Wang, Y. ming Xiao, J. Liu, Erratum to: Maternal allergic disease history affects childhood allergy development through impairment of neonatal regulatory T-cells. [*Respir Res.*, 17, (2016), (114)], doi 10.1186/s12931-016-0430-8, *Respir. Res.* 17 (2016). doi:10.1186/s12931-016-0443-3.
- [202] O.N. Donkor, M. Ravikumar, O. Proudfoot, S.L. Day, V. Apostolopoulos, G. Paukovics, T. Vasiljevic, S.L. Nutt, H. Gill, Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure, *Clin. Exp. Immunol.* 167 (2012) 282–295. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04496.x.
- [203] R. Ashraf, T. Vasiljevic, S.L. Day, S.C. Smith, O.N. Donkor, Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms, *J. Funct. Foods.* 6 (2014) 395–409. doi:10.1016/j.jff.2013.11.006.
- [204] M. Ashman, N. Sachdeva, L. Davila, G. Scott, C. Mitchell, L. Cintron, M. Rathore, D. Asthana, Influence of 4- and 6-color flow cytometers and acquisition/analysis softwares on the determination of lymphocyte subsets in HIV infection, *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* 72 (2007) 380–386. doi:10.1002/cyto.b.20178.
- [205] C.M. Freeman, F.J. Martinez, M.L.K. Han, G.R. Washko, A.L. McCubrey, S.W. Chensue, D.A. Arenberg, C.A. Meldrum, L. McCloskey, J.L. Curtis, Lung CD8+ T cells in COPD have increased expression of bacterial TLRs, *Respir. Res.* 14 (2013). doi:10.1186/1465-9921-14-13.
- [206] H.A. Zdolsek, M.C. Jenmalm, Expression of the T-cell markers CD2 and CD28 in healthy and atopic children during the first 18 months of life, in: *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2003: pp. 169–177.

doi:10.1034/j.1399-3038.2003.00016.x.

- [207] M. Dalod, R. Chelbi, B. Malissen, T. Lawrence, Dendritic cell maturation: Functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming, *EMBO J.* 33 (2014) 1104–1116. doi:10.1002/embj.201488027.

[..]* označenie pre Review

Knihy

- BUC, M. 2012. *Základná a klinická imunológia*. Bratislava : Veda, 2012. 832 s. ISBN 978-80-224-1235-3.
- BUREŠ, J. *et al.*, 2015. *Vnitřní lékařství*. 2. vyd. Praha : Galén, 2015. 1400 s. ISBN 978-80-749-2145-2.
- BUSHNELL, T. 2015. *Modern flow cytometry, Excite expert cytometry*. 2015. United States. 67 s. Ebook.
- OWEN, J.A. *et al.*, 2013. *Kuby Immunology*. 7th edition. New York : W.H. Freeman and Company, 2013. 801 s. ISBN 978-14292-1919-8.
- MURPHY, K., WEAVER, C. 2017. *Janeway's immunobiology*. 9th ed. New York, NY : Garland Science, Taylor & Francis. 2017. 904 p. ISBN 978-0-8153-4551-0.

Internetové publikácie a stránky

- BOIX, F. *et al.*, 2018. *In vitro* intracellular IFN γ , IL-17 and IL-10 producing T cells correlates with the occurrence of post-transplant opportunistic infection in liver and kidney recipients, In *World J Transplant*. [online]. 2018, 8 (1) : 23-37. doi: 10.5500/wjt.v8.i1.23. Dostupné na internete: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5829452/>>.
- DUSILOVÁ, A. 2012. *Porovnání tvorby cytokinů novorozeneckými leukocyty dětí zdravých a alergických matek* : diplomová práce. Praha : Přírodovědecká fakulta, 2012. 93s.
- FRÜHAUF, P. 2011. Mikrobiota v období mezi 6. a 24. měsícem věku, In *Pediatric pro praxi* [online]. 2011, 12 (3) : 214-216. ISSN 1803-5264. Dostupné na internete: <<https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2011/03/18.pdf>>.
- HÁJKOVÁ, A. 2013. *Dynamika kolonizace trávicího traktu člověka bakteriemi rezistentními k antibiotikům* : diplomová práce. Brno : Přírodovědecká fakulta, 2013. 87 s.
- MARSCHAN, E. 2007. *Immunological Effects of Probiotic Bacteria in Prevention and Treatment of Allergic Diseases in Children* : academic dissertation. Helsinki : Medical Faculty, 2007. Publications of the National Public Health Institute, A13/2007, 131 p. ISBN: 978-951-740-712-0.
- ORSKOV, I. *et al.*, 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli. In *Bacteriol Rev* [online]. PMC414020. PMID: 334154 Dostupné na internete: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC414020/>>.
- TOURNUT, J. 1989. Applications of probiotics to animal husbandry, In *Revue scientifique et technique - Office international des épizooties* [online]. 1989, 8 (2) : 551-566. ISSN 0253 1933. Dostupné na internete: <<https://www.oie.int/doc/ged/D8331.PDF>>.
- YU, H.R. *et al.* 2017. L-Arginine-Dependent Epigenetic Regulation of Interleukin-10, but Not Transforming Growth Factor- β , Production by Neonatal Regulatory T Lymphocytes In *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, 8 : 487. doi.org/10.3389/fimmu.2017.00487. Dostupné na internete: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5403834/pdf/fimmu-08-00487.pdf>>.

ŽÁDNÍKOVÁ, R. *et al.* 2006. Prevention of allergy in infants of allergic mothers by oral colonization with probiotic *E. coli* after birth. In *Alergie* [online]. 2006, 6 (2) : 49. ISSN 1212-687X. Dostupné na internete: <<http://docplayer.cz/24809347-Prevence-alergie-u-deti-alergickych-matek-peroralnim-osidlenim-probiotickym-kmenem-e-coli-po-narozeni.html>>.