

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

**Imunologické vlastnosti mléka zdravých
a alergických matek**

Jiří Hrdý

Praha, 2006

Vedoucí diplomové práce: doc. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím citované literatury pod vedením doc. MUDr. Ludmily Prokešové, CSc.

V Praze dne 11.5. 2006

Jiří Hrdý

Handwritten signature of Jiří Hrdý in cursive script.

Za laskavé vedení mé diplomové práce, ochotu a přátelský přístup děkuji
doc. MUDr. Ludmile Prokešové, CSc.

Děkuji Mgr. Petrovi Zanvitovi za cenné rady a pomoc v oblasti molekulárně
biologických metod.

Děkuji Mgr. Olze Novotné za pomoc při imunoenzymatických metodách.

Děkuji všem ostatním spolupracovníkům za vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

Diplomovou práci jsem vypracoval v letech 2004 – 2006 na Ústavu imunologie a
mikrobiologie, 1.LF UK v rámci grantu IGA MZ NR/8040-3.

Immunologic Characteristics of Milk: Differences Between Nonallergic and Allergic Mothers

Maternal milk influences positively the development of newborn's immune system. Differences between milk of healthy and allergic mothers are not well established and the results concerning effect of allergic milk on newborn's immunity are controversial. In the present work, the effects of healthy and allergic colostrum/milk on the stimulation of cord blood lymphocytes of children of healthy and allergic mothers were studied. The properties of milk and cord blood cells were tested using cytokine and immunoglobulin detection by immunoenzymatic methods (ELISA and ELISPOT respectively), cell cultivation, ³H-thymidine incorporation and cytokine mRNA expression by real-time PCR. According to the results obtained, there are not larger differences between healthy and allergic milk. Colostrum/milk in high concentration suppresses proliferation of cord blood lymphocytes after stimulation by polyclonal activators. Lymphocytes of children of allergic mothers incorporate ³H-thymidine more intensively than lymphocytes of children of healthy mothers. On the other hand, colostrum/milk increases Ig production by stimulated cord lymphocytes in vitro. Cocultivation of milk cells with stimulated cord mononuclear leucocytes in Transwell system influences cytokine mRNA expression in cord leucocytes (suppresses IL-8 and EGF). Stimulated lymphocytes of children of allergic mothers express larger amount of IL-2 which is not further increased by milk cells. In nonstimulated cord blood cells immediately after birth, significantly lower expression of TGF- β , IL-8 and IFN- γ and higher expression of IL-10 in children of allergic mothers in comparison with children of healthy mothers were found..

In conclusion: Colostrum and milk influence stimulation of cord blood leucocytes. There are not significant differences between the effects of healthy and allergic colostrum/milk. There are differences in cord blood leucocytes of children of healthy and allergic mothers. Cord blood cells from allergic group are more prompt to proliferation and express different pattern of cytokines corresponding to allergic phenotype.

Key words: milk, cord blood leucocytes, immunoglobulin, cytokine, ELISPOT, real-time PCR, Transwell system, proliferation, expression

Klíčová slova: mléko, kolostrum, imunoglobulin, cytokin, ELISPOT, real-time PCR, exprese, proliferace

Obsah

IMUNOLOGICKÉ VLASTNOSTI MLÉKA ZDRAVÝCH A ALERGICKÝCH MATEK	8
1. ÚVOD	9
2. PŘEHLED LITERATURY	11
2.1. Charakteristika slizniční imunity a její klinický význam	11
2.2. Zvláštnosti slizniční imunity	11
2.3. Oddíly slizniční imunity	12
2.4. Společný slizniční imunitní systém	12
2.5. Slizniční bariéra jako integrální komponenta vrozené slizniční imunity.....	14
2.6. Komenzální mikroflóra.....	16
2.7. Obranná funkce slizničního imunitního systému.....	17
2.8. Antigenní prezentace na slizničních površích.....	18
2.8.1. Indukční místa.....	18
2.8.2. Slizniční efektorová místa.....	19
2.8.3. Slizniční podání antigenu.....	20
2.8.4. T buňky a cytokiny ve slizničním imunitním systému	21
2.9. Funkce S-IgA protilátek.....	22
2.9.1. Neutralizace virů pomocí IgA.....	22
2.9.2. Antibakteriální funkce	23
2.9.3. Imunitní exkluze	23
2.9.4. Cytokinová regulace IgA odpovědi	24
2.10. Sekreční komponenta a její funkce v transcytóze.....	25
2.10.1. Regulace slizniční imunity.....	25
2.10.2. Molekulární aspekty slizniční imunity.....	26
2.11. Mléčná žláza	27
2.11.1. Spojení mezi matkou a kojencem	27
2.11.2. Postnatální rozvoj slizniční imunity.....	27
2.11.3. Fyziologie mléčné žlázy a tvorba mléka.....	28
2.11.3.1. Funkční anatomie laktující mléčné žlázy.....	28
2.11.3.1.1. Exocytotická cesta (exocytóza).....	30
2.11.3.1.2. Sekreční cesta tuků	30
2.11.3.1.3. Transcytotická cesta (transcytóza).....	31
2.11.3.1.4. Membránový transport.....	31
2.11.3.1.5. Paracelulární transport	31
2.11.3.2. Diferenciace mléčné žlázy a produkce mléka.....	31
2.11.3.3. Hormonální řízení sekrece a přenosu.....	32
2.11.4. Složení mléka.....	32
2.11.4.1. Nebuněčné složky v mléce.....	33
2.11.4.1.1. Sывátkové proteiny	33
2.11.4.1.2. Lysozym.....	34
2.11.4.1.3. α -laktalbumin	35
2.11.4.1.4. Oponiny	35
2.11.4.1.5. Glykokonjugáty a oligosacharidy	35
2.11.4.1.6. Lipidy.....	35
2.11.4.1.7. Nukleotidy.....	36
2.11.4.1.8. Komplement.....	36

2.11.4.1.9.	Peroxidázy.....	36
2.11.4.1.10.	Mikroorganismy a jejich riziko pro novorozence.....	36
2.11.4.1.11.	Růstové faktory a cytokiny v mléce (a další imunomodulátory).....	37
2.11.4.2.	Buňky v mléce	38
2.11.5.	Kojení a alergie.....	39
2.11.6.	Vliv kojení na obezitu.....	41
2.11.7.	Vliv dlouhodobého kojení na autoimunitní onemocnění a jiné zánětlivé stavy	41
2.11.8.	Prospěšnost kojení	41
3.	MATERIÁL A METODY	43
3.1.	Získávání materiálu.....	43
3.2.	Imunoenzymatický průkaz cytokinů (ELISA).....	43
3.2.1.	Materiál a chemikálie.....	43
3.2.2.	Metodika stanovení koncentrace EGF v mléce metodou ELISA	43
3.3.	Imunoenzymatický průkaz buněk tvořících protilátky (ELISPOT).....	44
3.3.1.	Materiál a chemikálie.....	44
3.3.2.	Metodika průkazu buněk tvořících imunoglobuliny (ELISPOT)	45
3.4.	Izolace buněk z mléka a krve.....	46
3.4.1.	Materiál a chemikálie.....	46
3.4.1.1.	Materiál a chemikálie na izolaci mononukleárních leukocytů z pupečnickové krve	46
3.4.1.2.	Materiál a chemikálie na izolace buněk z mléka	47
3.4.2.	Metodika izolace buněk	47
3.4.2.1.	Izolace mononukleárních leukocytů z krve	47
3.4.2.2.	Izolace buněk z mléka.....	48
3.5.	Kultivace buněk v systému Transwell	49
3.5.1.	Materiál a chemikálie.....	49
3.5.2.	Metodika kultivace v systému Transwell	49
3.6.	Blastická transformace.....	50
3.6.1.	Materiál a chemikálie.....	50
3.6.2.	Metodika kultivace buněk lymfocytů metodou blastických transformací	51
3.7.	Sledování změn genové exprese pomocí real-time PCR	51
3.7.1.	Izolace RNA.....	51
3.7.1.1.	Izolace RNA z celé krve	51
3.7.1.1.1.	Materiál a chemikálie.....	51
3.7.1.1.2.	Metodika izolace RNA z celé krve	52
3.7.1.2.	Izolace RNA z buněk po kultivaci v systému Transwell.....	53
3.7.1.2.1.	Materiál a chemikálie.....	53
3.7.1.2.2.	Metodika izolace RNA z buněk po kultivaci v systému Transwell	53
3.7.2.	Elektroforéza.....	54
3.7.2.1.	Materiál a chemikálie.....	54
3.7.2.2.	Metodika	54
3.7.3.	Reverzní transkripce	54
3.7.3.1.	Materiál a chemikálie.....	54
3.7.3.2.	Metodika	55
3.7.4.	Real-time PCR	55

3.7.4.1.	Materiál a chemikálie.....	55
3.7.4.2.	Metodika real-time PCR	56
3.8.	Použité roztoky	56
3.9.	Použité přístroje	58
4.	VÝSLEDKY.....	60
4.1.	Průkaz rozdílu ve složení mateřského mléka alergických a zdravých matek.	60
4.2.	Ovlivnění proliferace buněk pupečnickové krve nebuněčnými složkami mateřského mléka.....	61
4.3.	Ovlivnění produkce imunoglobulinů buněk pupečnickových kreví dětí nebuněčnými složkami mateřského mléka.	70
4.4.	Vliv buněk mateřského mléka na změnu genové exprese buněk pupečnickové krve	78
4.5.	Rozdíl v genové expresi buněk pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek.....	86
5.	DISKUZE.....	88
6.	SOUHRN.....	91
	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	93

Seznam zkratek

AEC	3-amino-9-ethylcarbazol
AF	antisekreční faktor (antisecretory factor)
APC	buňka prezentující antigen (antigen presenting cell)
BALT	bronchiální lymfatický systém (bronchus associated lymphoid tissue)
BF	<i>Bacillus firmus</i>
BM	bazální membrána
BPI	protein zvyšující permeabilitu bakterií (bacterial permeability-increasing protein)
BSA	bovinní sérový albumin
CMV	cytomegalovirus
ConA	konkanavalin A
CpG	CpG motiv z bakteriální DNA
CSF	faktor stimulující kolonie (colony stimulating factor)
CTL	cytotoxický T lymfocyt
DBF	delipidovaný <i>Bacillus firmus</i>
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
dNTP	deoxy-nukleotid trifosfát
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunoabsorbent spot
ER	endoplazmatické retikulum
ESC	<i>Escherichia coli</i>
FAE	epitel asociovaný s folikuly (follicle-associated epithelium)
FDA	adipocyt zbavený tuku (fat depleted adipocyte)
FDC	folikulární dendritické buňky (follicle dendritic cell)
FTS	fetální telecí sérum
GA	Golgiho aparát
GALT	střevní lymfatická tkáň (gut associated lymphoid tissue)
GIT	gastrointestinální trakt

GJ	gap junction
HA	hemaglutinin
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HIV	virus lidské imunodeficiency, human immunodeficiency virus
HRP	křenová peroxidáza (horse radish peroxidase)
HSV	herpes simplex virus
HTLV-1	virus lidské T-buněčné leukémie typu 1
IEL	intraepiteliální lymfocyty
Ig	imunoglobulin
IGF	inzulinový růstový faktor (insuline growth factor)
IL	interleukin
IFN	interferon
JC	místo těsných spojů (junctional complex)
LBP	protein vážící lipopolysacharid (lipopolysacharide binding protein)
LP	lamina propria
LPL	lymfocyty z lamina propria
LPS	lipopolysacharid
MALT	mukózní lymfatická tkáň (mucosa associated lymphoid tissue)
MAP	protein aktivovaný mitogeny (mitogen-activated protein)
M buňky	microfold
M-CSF	růstový faktor pro makrofágy (macrophage colony stimulating factor)
ME	myoepiteliální buňka
MFG	mléčná tuková globule (milk fat globule)
MHCII	hlavní histokompatibilní komplex II (major histocompatibility complex II)
MIF	faktor inhibující migraci (migration inhibition factor)
N	jádro (nucleus)
NA	neuraminidáza
NDCM	NDCM – mitogen z <i>Nocardia opaca</i> (Nocardia Delipidated Cell Mitogen)

PAMP	charakteristické vzory přítomné na povrchu mikroorganismů (pathogen associated molecular pattern)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PC	plazmatická buňka
PHA	fytohematoglutinin
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
pIgR	receptor pro polymerní imunoglobuliny
PLA ₂	sekreční fosfolipáza 2
PP	Peyerovy pláty (Peyer's patches)
PRR	receptor rozeznávající PAMP (pattern recognition receptor)
RANTES	related on activated normal T-cell expressed and secreted
RER	drsné ER (rough ER)
SC	sekreční komponenta (secretory component)
S-Ig	sekreční imunoglobulin
SV	sekreční váček (secretory vesicle)
TBS	fyziologický roztok pufovaný Tris (tris-buffered saline)
TCR	T buněčný receptor
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TLR	receptor podobný Toll receptoru (Toll-like receptor)
TMB	3,3- 5,5-tetramethylenbenzidin
TNF- α	faktor nekrotizující tumory (tumor nekrosis faktor α)
VZV	varicella zoster virus

1. ÚVOD

O prospěšnosti kojení nejsou v současné době pochybnosti. Mateřské kolostrum a mléko je pro novorozence optimální potravou, zvyšuje jeho odolnost proti infekci, ovlivňuje vývoj a diferenciaci různých buněk a tkání a mezi nimi i rozvoj v době narození ještě nedostatečně fungujícího imunitního systému (BRANDTZAEG *et al.* 2003). Přesto, že tyto skutečnosti jsou známy již dlouho, mechanismy regulačního působení kolostra a mléka ještě zdaleka nejsou objasněny a setkáváme se s řadou kontroverzních údajů.

Imunologický význam mají jednak rozpustné molekuly mléka, jednak buňky v něm obsažené. Obojí zahrnují jak složky vrozené tak specifické imunity. Z humorálních faktorů je třeba jmenovat zejména laktoferin, lysozym, fibronektin, složky komplementu, muciny, oligosacharidy a lipidy, které všechny působí antimikrobiálně a zvyšují obranyschopnost novorozence proti infekci. Dále jsou přítomny hormony, růstové faktory a cytokiny, které kromě jiných funkcí ovlivňují také vývoj imunitního systému. Kromě nespecifických faktorů obsahuje mateřské mléko velké množství imunoglobulinů (Ig), které jsou pro novorozence velkým zdrojem širokého spektra protilátek, zejména proti mikrobiálním antigenům. Jedním z cílů diplomové práce je posouzení vlivu nebuněčných složek mateřského mléka na proliferaci lymfocytů a tvorbu imunoglobulinů a zjištění, zda je rozdíl v působení mateřského mléka alergických a zdravých matek a mléka z různé doby laktace.

Mléko obsahuje také několik druhů buněk, důležitých pro imunitní reakce. Celkový počet buněk v lidském kolostru je 10^6 - 10^7 /ml a v mléce 10^4 - 10^5 /ml a proporce jednotlivých druhů buněk se během kojení také mění. U některých zvířat (ovce, krávy) byl prokázán prostup mateřských buněk střevní stěnou a jejich průnik do cirkulace (JARVINEN *et al.* 2002). U lidí byl tento jev zatím pozorován jen nepřímo. Proto dalším cílem diplomové práce je sledování vlivu sekrečních produktů mléčných buněk na změnu genové exprese cytokinů v novorozeneckých lymfocytech.

Kojení představuje úzké spojení mezi matkou a plodem po narození. Nutriční a protinfekční působení mateřského mléka je dlouho známo. Regulační působení na rozvoj imunitního systému je také velmi důležité, ale daleko méně objasněné. Již v

časném postnatálním období se rozhoduje o “ladění” imunitního systému, kojení v tom patrně hraje závažnou roli a výsledek jeho působení přetrvává i několik let po odstavu a může ovlivnit celý následující život (HANSON *et al.* 2002). V časném postnatálním období se navozuje orální (slizniční) tolerance a její kvalita může ovlivňovat pozdější případný rozvoj alergických a autoimunitních onemocnění (SRIVASTAVA a SRIVASTAVA 1999). Všeobecně se uznává, že u kojených dětí vznikají méně často alergická onemocnění, ale občas se vyskytují i údaje opačné. Vystává zde otázka složení mléka alergických matek ve srovnání se zdravými matkami. Genetická závislost vzniku alergií je prokázána, ale není zatím objasněno, nemůže-li mléko alergické matky ovlivnit pozdější charakter imunitních reakcí dítěte. Nentwich (2002) v kolostru alergických matek prokázal zvýšení množství IL-5 a hladiny IL-10 v mléce negativně korelovaly s IgE séra kojených dětí ve věku 6 měsíců. Bottcher (2003) popsal vyšší hladiny IL-4 v kolostru alergických matek a podobný trend byl též u IL-5 a IL-13, avšak později tentýž autor nenašel žádný vztah mezi hladinou těchto a dalších cytokinů v kolostru a mléce a vznikem alergie u kojených dětí. Meki při testování řady cytokinů našel v mléce alergických matek zvýšené hladiny IL-8. Zdá se, že mateřské mléko může ovlivnit vztah mezi aktivitou Th1 a Th2 buněk a tím i izotyp protilátek, navození orální tolerance a event. vznik alergie (či autoimunity). Za tuto aktivitu mohou být zodpovědné cytokiny mléka. V mléce byly prokázány IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNF- α , INF- γ , TGF- β , CSF a RANTES. V tomto výčtu jsou přítomny jak zánětlivé tak supresivní cytokiny a jejich vliv na novorozence zdaleka není objasněn. Významná úloha je připisována imunosupresivním cytokinům TGF- β a IL-10 a cytokinům ovlivňujícím izotypy vznikajících protilátek (IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β). IL-4 by mohl podpořit tvorbu IgE, ostatní uvedené cytokiny jsou důležité pro tvorbu IgA. Další cíl diplomové práce se týká porovnání koncentrace EGF v mléce alergických a zdravých matek a porovnání genové exprese cytokinů v buňkách pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek.

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1. Charakteristika slizniční imunity a její klinický význam

Povrchy kůže a sliznice zprostředkovávají každodenní kontakt organismu s vnějším prostředím, během něhož se organismus setkává s velkým množstvím antigenů, superantigenů, mitotických a toxických stimulů, látkami přítomnými v jídle a vzduchu, komenzální mikroflórou a s mnoha dalšími mikroorganismy. Většina mikroorganismů vstupuje do hostitelského organismu slizniční cestou a odehrává se tu mnoho infekčních onemocnění. Pro zachování ochranných imunitních odpovědí je nezbytné, aby slizniční imunitní systém rozeznal nebezpečné od bezpečného. Slizniční imunitní systém brání organismus před poškozením mikroorganismy, před vstupem infekčních a imunogenních složek přítomných na sliznicích do krevního oběhu. Snižuje reaktivitu antigenů přítomných na sliznicích (ústní nebo slizniční tolerance), udržuje slizniční homeostázu.

2.2. Zvláštnosti slizniční imunity

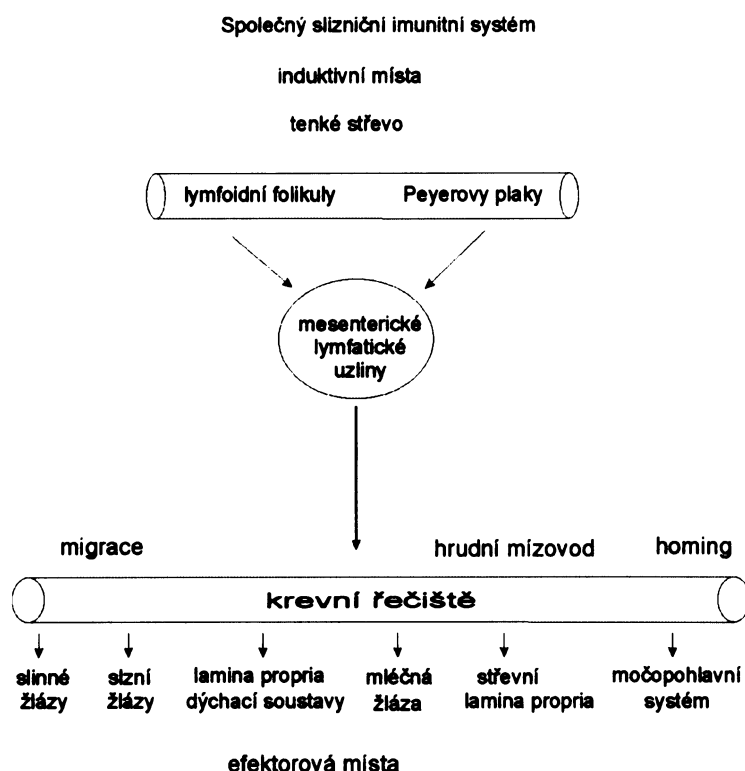
Sliznice tvoří plochu větší než 300m² (McGHEE *et al.* 1992). Na takto velké ploše dochází ke styku s mnoha různorodými antigeny, a proto mají sliznice vysoce vyvinutý imunitní systém. Charakteristickými znaky odlišující slizniční imunitu od systémové imunity jsou především sekreční IgA, velmi dobře rozvinutý mechanismus vrozené obrany, existence unikátních populací lymfocytů lišících se od krevních T buněk vznikem, fenotypem a sekrečními produkty, osídlení slizničních a sekrečních žláz buňkami vzniklých z organizované slizniční tkáně a preferenční stimulační nebo inhibiční odpověď na lumenální antigeny - slizniční tolerance (jejíž navození je velmi snadné). Pro slizniční imunitu je charakteristická kompartmentalizace na indukční a efektorová místa s preferenční IgA odpovědí. Slizniční imunitní systém je autonomní, nezávislý na systémovém imunitním systému. Mnoho chronických onemocnění včetně alergií může vzniknout jako důsledek změny regulace slizniční imunity a tolerance. To může vést například k poruše slizniční bariéry, porušené imunitní exkluzi a zvýšenému napadání mikroby, přehnané imunitní odpovědi na antigeny, alergeny, superantigeny a mitogeny vyskytující se na sliznici.

2.3. Oddíly slizniční imunity

Antigeny z prostředí, které jsou vdechnuty nebo pohlceny s potravou, jsou přijaty speciální lymforetikulární tkání (mukózním lymfatickým systémem, MALT-mucosa associated lymphoid tissue) v dýchací či trávicí soustavě. Slizniční imunitní systém můžeme rozdělit na dvě části: indukční a efektorovou. V indukčních místech dochází ke styku s antigenem a jeho pohlcení a k aktivaci primárních imunitních odpovědí. V efektorových místech, která jsou větší a obsahují plazmatické buňky, dochází k místní imunitní obraně produkcí S-IgA protilátek. MALT se skládá z organizované tkáně představované lymfatickými folikuly (Peyerovy pláty, apendix, Waldayerův okruh), drobnými shluky lymfocytů a lymfocyty volně rozmístěnými (IEL intraepiteliální lymfocyty) nebo vyskytujícími se v mezibuněčné hmotě pod epitelem (LPL lymfocyty z lamina propria). MALT lze dělit dle toho, kde se nachází. V trávicím traktu je označován jako GALT (střevní lymfatický systém, gut associated lymphoid tissue) a v dýchací soustavě je označován jako BALT (bronchiální lymfatický systém, bronchus associated lymphoid tissue). GALT je tvořen hlavně Peyerovými pláty (PP Peyer's patches), lymfatickými folikuly střev, apendixem a četnými uzlinami. BALT je tvořen uzlinami, patrovými a nasofaryngeálními mandlemi, které společně představují tzv. Waldayerův okruh.

2.4. Společný slizniční imunitní systém

Po antigenní prezentaci v organizované lymfatické tkáni, např. v PP pomocnými buňkami (APC), T a B buňky opouštějí PP eferentními lymfatickými cévami a směřují do krevního oběhu. Cirkulující B i T buňky vstupují do LP i ve vzdálených slizničních tkáních (obr. 1). Stimulované buňky nesou na povrchu speciální receptory ($\alpha E\beta 7$), které specificky interagují s povrchovými molekulami (E-kadherin) na endotelu sliznic a exokrinních žláz (homing) (BRANDTZAEG 1995).



Obr. 1. Migrace a ‘homing’ buněk ve společném slizničním imunitním systému. Upraveno dle TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* (2002).

V těchto slizničních efektorových místech se B buňky klonálně množí a zrají v plazmatické buňky. Společný slizniční imunitní systém charakterizuje tato distribuční cesta z induktivních míst (GALT, BALT) do efektorových míst (lamina propria v trávicí, dýchací a močopohlavní soustavě).

Rozšiřování lymfocytů z PP do dalších exokrinních tkání, kde se vyskytují prekurzory plazmatických buněk pro tvorbu IgA, bylo dokázáno pokusem, kde byly použity dvě střevní kličky, jedna s PP a druhá bez PP bez porušení krevních a lymfatických cest. Po aktivaci kličky s PP antigenem se objevila S-IgA odpověď v obou kličkách, zatímco po aktivaci kličky bez PP se neprojevila žádná imunitní odpověď (McGhee *et al.* 1992). Tento pokus dokázal, že PP je zdrojem prekurzorových buněk, které jsou schopny po aktivaci antigenem se začít dělit, migrovat, diferenciovat a osídlit lamina propria sliznic.

2.5. Slizniční bariéra jako integrální komponenta vrozené slizniční imunity

Hlavní mechanickou bariéru na slizničním povrchu představuje glykokalyxem pokrytý epitel. Glykokalyx je tvořen muciny a glykoproteiny. Epitel většiny sliznic je tvořen jednou vrstvou buněk, které jsou spojeny těsnými spoji a polarizovány. Největší epiteliální plochu tvoří střevní sliznice (200m²), pak následuje epitel dýchací soustavy o rozloze asi 80m² (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* 2002). Základním a vysoce rozvinutým obranným mechanismem epiteliálních povrchů je vrozená imunita, která brání hostitele před infekcí v časném stádiu.

Schopnost rozeznávat cizorodé strukturní charakteristiky (vzory) přítomné na povrchu mikroorganismů (PAMP pathogen-associated molecular pattern) řadou receptorů (PRR pattern recognition receptors) je charakteristická pro vrozenou imunitu. Mezi PRR patří TLR (Toll-like receptor), manosový a galaktosový receptor, CD 14, scavengerové (uklízecí) receptory. TLR po aktivaci přenáší signál na transkripční faktory, které aktivují geny odpovědné za imunitní odpověď. Hlavní roli v aktivaci obranných mechanismů hostitele nese transkripční faktor NF-κB, který je zodpovědný za regulaci exprese genů kódujících syntézu antimikrobiálních proteinů, cytokinů a chemokinů (DWINNELL *et al.* 1999, ECKMANN *et al.* 1995). Epiteliální buňky odpovídají na prozánětlivé cytokiny syntézou imunologicky aktivních proteinů, cytokinů (TGF-β, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 a dalších). Epiteliální buňky se mohou účastnit i imunitních odpovědí zprostředkovaných slizničními lymfocyty. Epiteliální buňky mají schopnost transportovat polymerní imunoglobuliny (IgA, IgM) produkované plazmatickými buňkami v lamina propria do lumen jako sekreční imunoglobuliny. Epiteliální buňky mohou transportovat i IgA v komplexu s antigenem a tak pomáhají vylučovat antigen.

Buňky epitelu tvoří antibakteriální peptidy. V epitelu se nachází Panethovy buňky, které mají ve svých apikálních granulích antibiotické peptidy – defensiny, které zabíjí bakterie a protozoální parazity, např. *Giardia lamblia* (ALEY *et al.* 1994). Savčí defensiny zabíjí i patogeny z řad hub, např. *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus fumigatus* (LEHRER *et al.* 1993). Defensiny hrají důležitou roli i v antivirové ochraně – například θ-defensin se váže na gp 120, a tak brání

buňky před HIV infekcí (COLE *et al.* 2002). Defensiny ovlivňují aktivaci komplementu, zvyšují expresi adhezivních molekul a podporují adhezi polymorfonukleárů. Defensiny z neutrofilů jsou chemotaktickým faktorem pro monocyty (TERRITO *et al.* 1989), T-buňky (CHERTOV *et al.* 1996) a nezralé DC (YANG *et al.* 2000) *in vitro*. Defensiny indukují syntézu IL-8, C-X-C cytokinů (LEHRER *et al.* 2005).

Sekreční fosfolipáza A₂ (PLA₂) produkovaná Panethovými buňkami a neutrofilly štěpí fosfolipidy čteně zastoupené v bakteriálních membránách. Od pankreatické fosfolipázy se liší i strukturně (LEHRER *et al.* 2005).

Katelidin je peptid přítomný v buňkách dýchacího epitelu a vykazuje širokou antimikrobiální funkci.

Kolektin má kolagenní strukturu s navázanými lektiny, které váží cukerné zbytky, vykazuje chemotaktickou aktivitu pro neutrofilly a polymorfonukleáry. Do této rodiny patří surfaktanty A a D, které váží bakterie, viry, houby, prachové částice nebo pylová zrna.

Další molekuly zúčastněné v ochraně sliznic jsou inhibitory proteáz, BPI (bacterial permeability-increasing protein), antimikrobiální ribonukleáza, lysozym, laktoferin, histony, angiogeniny (angiogenin 4).

Během normálního dýchání jsou dýchací cesty vystaveny částicím a mikroorganismům přítomným ve vdechnutém vzduchu. K zabezpečení sterility plic (na rozdíl od střeva) slouží fagocytární systém tvořený alveolárními makrofágy a polymorfonukleárními leukocyty. Důležitou část plicního obranného systému tvoří místní produkce cytokinů TNF- α , IL-10, IL-12, INF- γ a chemokinů (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* 2002). Vrozené mechanismy slizniční imunity hrají důležitou roli v patogenezi zánětlivých onemocnění dýchacího systému, např. astmatu. Bronchiální buňky jsou významným producentem chemokinů, které regulují vtok zánětlivých buněk jako odpověď na poranění dýchacích cest. Bronchiální epitelální buňky uvolňují cytokiny spojené s akutním zánětem: IL-1 β , TNF- γ , IL-6 a cytokiny ovlivňující regulaci Th1/Th2 odpovědi: IL-5, IL-18.

2.6. Komenzální mikroflóra

Komenzální mikroflóra, která kolonizuje sliznici a kůži v symbiotické koexistenci, patří do mechanismu přirozené obrany před infekcí. Mikrobiální a hostitelské složky těla spolu interagují v různých fyziologických a biologických drahách (BRY *et al.* 1996, SAVAGE 1989). Toto potvrzuje myšlenku, že se živočišné a mikrobiální buňky vyvíjely v symbióze do vysokého stupně vzájemné závislosti (SAVAGE 1977, 1986, 2002, STEVENS a HUME 1995). Jedním důsledkem této koevoluce jsou i imunologické funkce (CEBRA 1999, HENDERSON *et al.* 1996). Bakterie střevní mikroflóry se účastní mnoha metabolických procesů, nejvíce jich je v rektu, nejméně v tenkém střevě u zdravého člověka. Celková populace mikroorganismů je odhadována na 10^{14} buněk (SAVAGE 1977), zatímco celkový počet buněk lidského organismu je 10^{13} . Nejvíce zastoupenou skupinou jsou gramnegativní anaerobní bakterie. Mnoho bakterií je nekultivovatelných. PCR a následná hybridizace nám umožní se dovědět více o složení střevní mikroflóry. Mikroflóra má nejen antiinfekční funkci (kompetice s patogenními mikroorganismy), ale dokonce ovlivňuje i rozvoj imunitního systému. Střevní kolonizace nově narozených bezmikrobních (germfree) zvířat nepatogenním kmenem bakterie *Escherichia coli* vyvolá fyziologický zánět charakterizovaný velkou buněčnou infiltrací střevní sliznice a asociované lymfatické tkáně a rychlý rozvoj specifické a nespecifické imunitní odpovědi. Stimulace lokální a systémové imunity složkami střevní mikroflóry u gnotobiontů aktivuje supresivní mechanismy, které udržují stabilitu slizniční a systémové imunity. U germfree zvířat se velmi pomalu vyvíjí lymfatická tkáň. Je nutno podotknout, že se střevní mikroflóra během věku mění – vyvíjí. Je odlišná u novorozence, kde probíhá osídlování střeva bakteriemi, u dospělého člověka středního věku a starších lidí. Z toho vyplývá, že střevní mikroflóra reaguje s imunologickým systémem odlišným způsobem u novorozence a lidí středního věku (PERCIVAL *et al.* 1996). Rozdíl ve složení bakteriálních druhů u novorozenců může též záviset na způsobu porodu – císařský řez, nebo přirozený porod (WHARTON *et al.* 1994). Rovněž se liší složení mikroflóry v různých částech gastrointestinálního traktu. Například v žaludku, kde je nízké pH, se může vyskytovat *Helicobacter pylori*, který se vyrovná s kyselým prostředím a kolonizuje slizniční epitel žaludku (LEE *et al.* 1993), kde může způsobovat akutní a chronické peptické a žaludeční vředy, žaludeční neoplasie (GUILLEMIN *et al.* 2002).

Horní dvě třetiny tenkého střeva kolonizuje poměrně málo bakterií, nejvíce se jich vyskytuje v dolní třetině tenkého střeva (Savage 2005). Děti s nespecifickými střevními záněty a celiakií mají v horních dvou třetinách tenkého střeva bakterie různých druhů ve významném množství dokonce i poté, co prošla potrava (CIAMPOLINI *et al.* 1996). V tlustém střevě se nachází 99,9% mikrobiální flóry (HOLDEMAN *et al.* 1976, SAVAGE 1977, 1986, 1989, FINEGOLD *et al.* 1983).

2.7. Obranná funkce slizničního imunitního systému

Pro slizniční imunitní systém je charakteristická přítomnost sekrečního imunoglobulinu A (S-IgA), což je hlavní humorální obranný faktor. Tento izotyp protilátek představuje více než 80% všech protilátek v těle (McGHEE *et al.* 1992). S-IgA je indukován, transportován a regulován odlišným způsobem, než je tomu u systémové protilátkové odpovědi. Slizniční imunitní systém obsahuje speciální lymfatické tkáně (induktivní místa), kde dochází ke styku s antigeny z vnějšího prostředí. Některé antigeny jsou zachyceny a indukují odpovědi T a B buněk.

Po této aktivaci následuje transport specifických lymfocytů do různých efektorových míst, např. lamina propria žláz. Tento proces je regulován T-lymfocyty a cytokiny a vede k diferenciaci B-lymfocytů v plazmatické buňky a k následné sekreci protilátek – S-IgA. Tento poznatek byl využit k přípravě vakcín, které byly směřovány do slizničních induktivních míst s cílem vyvolat obranyschopnost hostitele před infekcí na slizničních površích. Bylo již provedeno mnoho pokusů, které dokazují, že stimulace prekurzorových B buněk pro tvorbu IgA v GALT ústně podaným antigenem vedla k rozšíření stimulovaných B a T buněk do vzdálených slizničních efektorových míst, nejen do lamina propria v trávicím systému, ale i do lamina propria v dýchacím, močopohlavním systému a sekrečních žlázách. Řada ústně podávaných vakcín byla schopna vyvolat odpovídající S-IgA protilátkovou odpověď ve vzdálených slizničních efektorových místech.

Je možno říci, že většina vakcín dnes běžně podávaných systémovou cestou by mohla být podávána ústně nebo nosem. Ústní imunizace je praktická, snadná, bez nežádoucích postranních projevů a může aktivovat systémovou i slizniční imunitní

odpověď. Nevýhodou je, že ústní podávání proteinů a podjednotkových vakcín může navodit stav neodpovídavosti, nazývaný ústní tolerance.

2.8. Antigenní prezentace na slizničních površích

2.8.1. Indukční místa

V Peyeroých plátech jsou B a T oblasti (dle převahy B- či T-lymfocytů), APC a plazmatické buňky. Povrch Peyeroých plátů tvoří epitel (FAE, follicle-associated epithelium) obsahující kromě enterocytů M buňky. Též do FAE zasahují výběžky specializovaných buněk prezentujících antigen (APC). M buňky mají krátké mikrokilky, malé cytoplazmatické váčky a lysozomy. M buňky přijímají a transportují antigeny z lumen, jako jsou proteiny, virové částice, bakterie a malí paraziti. Tyto antigenní částice nekončí degradací v M buňkách, ale jsou transportovány do lymfatické tkáně, kde se dostávají do kontaktu s dendritickými buňkami (DC). Antigeny se mohou dostat přes epiteliální bariéru nejen transcelulární cestou, ale i paracelulární cestou – přes těsné spoje, jimiž jsou spojeny jednotlivé epiteliální buňky. Těsnost těchto spojů je regulována vnějšími faktory (bakteriálními produkty) nebo vnitřními (hormony, cytokiny). Některé cytokiny včetně TNF- α , INF- γ , IL-4, IL-13 zvyšují propustnost epiteliální bariéry (COLGAN *et al.* 1994, OBISO *et al.* 1997). TGF- β a IL-15 naopak snižují propustnost epiteliální bariéry pro antigeny (PLANCHON *et al.* 1994, STEVENS *et al.* 1997).

Hlavními buňkami prezentujícími antigen v PP jsou dendritické buňky. V PP u myši se nachází nejméně tři podtřídy DC: myeloidní (CD 11b⁺), lymfoidní (CD 8 α ⁺) a dvojitě negativní DC (CD 11b⁻, CD 8 α ⁻) (IWASAKI a KELSALL 2000, 2001). Myeloidní DC postrádají maturační znaky jako DEC-205, a proto se zdají být nezralé. Lymfoidní a dvojitě negativní DC podporují diferenciaci Th1 nezbytnou pro následný rozvoj buněčné imunity. Myeloidní DC podporují rozvoj Th2 odpovědi nezbytné pro tvorbu IgA ve slizničních efektorových místech (ISHIKAWA *et al.* 2005). Po setkání s neškodným antigenem myeloidní DC produkují IL-10 a TGF- β a tím přispívají k navození systémové neodpovídavosti k ústně podávaným antigenům. Tento jev je znám jako ústní tolerance nebo jako slizniční tolerance zprostředkovaná T buňkami (Th3, Tr1) (IWASAKI a KELSALL 1999). Navození tolerance nebo stimulace imunitní odpovědi zřejmě závisí na zúčastněné subpopulaci DC a stadiu diferenciaci DC při prezentaci antigenu

T-lymfocytům (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* 2002). Normální (bezpečný) antigen je prezentován T buňkám nezralými DC (mají nízkou expresi kostimulačních molekul). Produkce IL-10 a TGF- β vede k aktivaci regulačních buněk, které inhibují imunitní odpověď a aktivují slizniční toleranci (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.* 2002). Patogenní organizmy nebo jejich části (nebezpečné antigeny) indukují zrání DC (expresi kostimulačních molekul) a produkci IL-12 nezbytného pro aktivaci Th1 buněk.

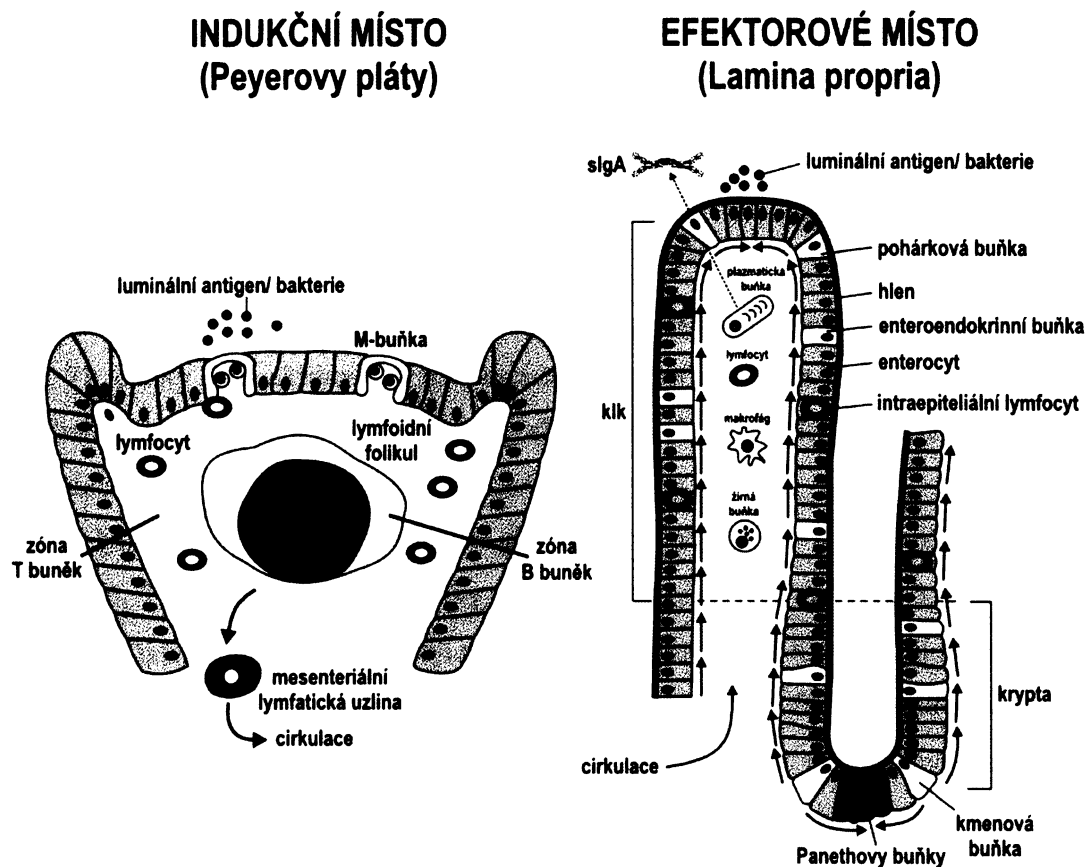
V lymfatických folikulech se nachází zárodečné centrum, kde se dělí stimulované B buňky. Zárodečné centrum je místem, kde dochází k izotypovému přesmyku na IgA a afinitní maturaci, což je proces vedoucí ke zvýšení afinity IgA protilátek. Kolem folikulů je T buněčná zóna, která obsahuje všechny hlavní typy T-lymfocytů. T-lymfocyty přítomné v Peyerových plátech jsou zralé a více než 95% z nich nese $\alpha\beta$ formu T buněčného receptoru (TCR). Přibližně 60% T-lymfocytů přítomných v Peyerových plátech jsou $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^-$ T buňky a mají vlastnosti Th lymfocytů včetně podpory produkce IgA. V Peyerových plátech je též přítomno významné množství $CD3^+$, $CD4^-$, $CD8^+$ T-lymfocytů, které se aktivují v cytotoxické lymfocyty (CTL). V indukčních místech jsou přítomny všechny nezbytné imunokompetentní buňky $CD4^+$ Th, $CD8^+$ CTL, B buňky a pomocné buňky, jako jsou dendritické buňky, makrofágy. Všechny tyto buňky jsou zúčastněny v humorální i buněčné odpovědi slizniční obrany.

2.8.2. Slizniční efektorová místa

Po antigenní stimulaci v Peyerových plátech aktivované B a T buňky opouštějí PP lymfatickými cestami a dostávají se do mesenterální uzliny a přes ductus thoracicus vstupují do systémové cirkulace. Tyto lymfocyty vstupují do efektorových míst jako je lamina propria v trávicí, dýchací a močopohlavní soustavě. B buňky se začnou množit pod vlivem antigenní stimulace a za přispění T-lymfocytů a cytokinů viz obr. 2.

Lamina propria je v gastrointestinálním traktu hlavním slizničním efektorovým místem a hlavním buněčným typem jsou zde lymfocyty, z 20 - 40% to jsou B-lymfocyty včetně plazmatických buněk a ze 40-60% T buňky. Většina plazmatických buněk produkuje IgA, ale malá frakce B buněk produkuje IgM a IgG. Z ostatních buněčných typů zde můžeme najít makrofágy (10%), eozinofily (5%) a slizniční žírné buňky (1-3%). Většina přítomných lymfocytů jsou $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^-$ a vykazují pomocnou funkci. Asi

jednu třetinu v těchto efektorových místech tvoří $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T-lymfocyty (CTL) a vykazují cytotoxickou aktivitu a regulační funkci (McGHEE *et al.* 1992). Část lymfocytů je lokalizována v epitelu na bazolaterální straně enterocytů. Tyto lymfocyty patří mezi IEL T-lymfocyty, $CD8^+$ typu, které se liší od ostatních přítomných v krevním oběhu (viz 2.8.4.).



Obr. 2. Převzato od Šterzl, I. *et al.* (2005).

2.8.3. Slizniční podání antigenu

Při indukci sekreční imunitní odpovědi se uplatňují rozpustné nebo partikulární antigeny. Antigeny podané slizničně aktivují jak slizniční tak systémovou imunitu. Všeobecně je známo, že pro indukci sérových a sekretorických protilátek ústní cestou je třeba vyšších a častějších dávek než při systémové imunizaci. Odpověď na ústně podávané antigeny je nízká, neboť jen málo nenatrávených a plně funkčních antigenů se dostane do imunitního systému ve střevě. Antigeny jsou rovněž odstraňovány

peristaltikou střeva či pohybem řasinkového epitelu v případě dýchací soustavy. U ústně podaných neživých antigenů může dojít ke změně chemické struktury vlivem enzymů slin, nízkého pH v žaludku, natrávením proteázami (pepsin, trypsin) nebo aktivitou žluči. Tyto všechny pochody mohou odhalit nové antigenní epitopy nebo zničit již existující. Antigeny ve formě živých mikroorganismů se mohou množit ve střevě nebo dokonce v GALT, a tak mnohem účinněji stimulují slizniční a systémovou imunitní odpověď. K ochraně ústně podávaného imunogenního materiálu před kyselým pH se používá NaHCO_3 . Virové či bakteriální antigeny je možné zabalit do želatinových kapslí, které jsou pokryty látkou rozpustnou jen v alkalickém pH v tenkém střevě.

2.8.4. T buňky a cytokiny ve slizničním imunitním systému

Při aktivaci imunity proti bakteriím a virům je třeba aktivace obou hlavních tříd T-lymfocytů. Th buňky jsou aktivovány interakcí s antigením peptidem navázaným na MHC II na buňkách prezentujících antigen. Ve slizničních indukčních místech tyto APC zahrnují dendritické buňky, B buňky a makrofágy.

CD4^+ T-lymfocyty v sobě zahrnují dvě skupiny lymfocytů Th1 a Th2, lišící se produkcí cytokinů. Th1 produkují IL-2, INF- γ , TNF- β . Th2 produkují IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13. Oba typy lymfocytů pomáhají při stimulaci B-lymfocytů a vyskytují se jak ve slizničních indukčních místech tak i v efektorových. Lymfocytární frakce z mukózní slizniční tkáně produkuje více IL-5 a INF- γ , než je možné naměřit u lymfocytů ve slezině. Efektorová místa obsahují více Th2 buněk než Th1, zatímco indukční místa mají přibližně stejný počet Th1 a Th2 buněk. IEL (intraepiteliální lymfocyty) v sobě zahrnují přibližně stejné množství buněk tvořících IL-5 a INF- γ . Tyto buňky jsou CD8^+ a vyskytují se pouze v IEL, v PP a slezině se nevyskytují (McGHEE *et al.* 1992).

IEL ve slizničních tkáních jsou tvořeny čtyřmi typy CD4^- , CD8^+ (75%), CD4^+ , CD8^- (7,5%), CD4^+ , CD8^+ (10%) na rozdíl od ostatních lymfatických tkání (McGHEE *et al.* 1992). Mezi IEL je vysoké zastoupení lymfocytů s $\gamma\delta$ TCR. Tato subpopulace T-lymfocytů má z 90% CD8 homodimer (dva α řetězce, žádný β řetězec) a zřejmě mimothymový původ. Ačkoliv jsou IEL heterogenní, vykazují společné charakteristiky: CD25^+ , CD45RO^+ (charakteristický znak pro paměťové lymfocyty), přítomnost adhezivní molekuly $\alpha\text{E}\beta 7$ a cytoplazmatických granulí

obsahujících perforinový typ cytolytického proteinu. Přítomnost perforinu a serinové esterázy umožňuje IEL se účastnit v buněčně zprostředkované cytotoxické reakci. Ústní podání antigenu (viru) aktivuje CTL v GALT stejně jako v ostatní slizniční tkáni a dokonce i v systémových tkáních, např. ve slezině (McGhee *et al.* 1992).

2.9. Funkce S-IgA protilátek

Secernovaný IgA sliznic se nachází převážně v dimerní nebo v menšinové tetramerní formě se čtyřmi nebo osmi vazebnými místy pro antigen, a proto vykazuje větší aviditu než monomerní IgA. U člověka existují dvě podtřídy IgA: IgA1 a IgA2, které se nachází v charakteristickém poměru v séru (84% IgA1 a 16% IgA2), ale v externích sekretech se jejich poměr liší (CONLEY a DELACROIX 1987, MESTECKY a RUSSEL 1986). S-IgA protilátky zabraňují adhezenci bakterií, neutralizují viry a jiné biologicky aktivní antigeny jako jsou enzymy a toxiny produkované bakteriemi. IgA se nachází v prostředí s velkou koncentrací proteolytických enzymů. IgA má větší rezistenci k proteolýze ve srovnání s ostatními protilátkami, které se také nacházejí na slizničních površích. Rezistenci IgA zvyšuje sekreční komponenta (SC), která zakrývá místa potenciálního proteolytického štěpení (CROTTET a CORTHÉSY 1998). U jedinců, kteří netvoří S-IgA, přebírá jeho ochranou funkci S-IgM (ARNOLD *et al.* 1977, PLEBANI 1983, BRANDTZAEG *et al.* 1999), který je náchylnější k degradaci proteázami ve střevě. V případě IgA deficientních jedinců může mít i IgG kompenzační funkci (BRANDTZAEG *et al.* 1986).

2.9.1. Neutralizace virů pomocí IgA

Protilátky neutralizující viry na slizničním povrchu zabraňují místní infekci a onemocnění. S-IgA je důležitou složkou antivirové imunity, neboť se nachází v místech prvotního kontaktu viru s hostitelskou buňkou. Virus má na svém povrchu proteiny účastníci se vazby na receptory buňky a umožňující vlastní infekci, např. virus chřipky má haemaglutinin (HA) a neuraminidázu (NA), ale vlastního přichycení na membránu buňky se účastní jen HA. S-IgA vazbou na povrchové proteiny znemožní viru se navázat na membránu buňky nebo svou vazbou pozmění antigenní povrch viru a znemožní jeho

transkripci uvnitř buňky. Ke zvýšení neutralizační specifity S-IgA přispívá polymerní stav a rezistence vůči proteolytickým enzymům.

2.9.2. Antibakteriální funkce

Slizniční protilátky zabraňují mikroorganismům ve vazbě na povrch sliznice a zabraňují prostupu antigenu slizničním povrchem. S-IgA účinněji zabraňuje ve vazbě antigenů než IgM, protože má unikátní náboj daný glykosylací a je lépe chráněn vůči proteolýze. IgA inhibuje vazbu některých bakterií způsobem nezávislým na specifické protilátkové aktivitě, ale na specifické interakci lektinů bakterie a glykosylovaného IgA. Terminální postranní oligosacharidový řetězec na těžkém řetězci IgA obsahuje manosu, což je molekula rozeznávaná lektinovým receptorem přítomným na bakteriích. Zábřana adherence je podporována dalšími faktory, jako je kompetice potenciálně infekčních bakterií s bakteriemi fyziologické mikroflóry o prostor na sliznici, interakce s vrozenými imunitními složkami. Účinek laktoferinového a laktoperoxidázového systému může být zesílen působením IgA (McGHEE *et al.* 1992). Některé bakteriální druhy (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*), které úspěšně kolonizují nebo infikují slizniční membrány, produkují specifické proteázy, které jsou schopny štěpit zejména IgA1 (PLAUT *et al.* 1975, KILIAN *et al.* 1979, MALE 1979).

2.9.3. Imunitní exkluze

Sekretované protilátky chrání slizniční povrch imunitní exkluzí před infekčními antigeny. Viry mohou být neutralizovány uvnitř epitelálních buněk, kde se mohou potkat v průběhu transcytózy s polymerním IgA nebo IgM v sekrečních váčcích. Imunitní exkluze se může zúčastnit i místně produkovaný IgG a IgE, když se dostane na povrch sliznice pasivní paracelulární difuzí (BRANDTZAEG 2003). Přítomnost těchto prozánětlivých imunoglobulinů (IgE, IgG) vysvětluje imunopatologické reakce, když je imunitní exkluze neúspěšná. IgA rovněž neutralizuje enzymy a toxiny produkované mikroorganismy.

IgA není schopen aktivovat komplement jak klasickou tak alternativní cestou. Kdyby IgA byl schopen aktivovat komplement, štěpením C3 a C5 by vznikly fragmenty, které by způsobily lokální zánětlivou reakci a vstup neutrofilů. Tyto polymorfonukleáry

by uvolněním svých substancí způsobily poškození tkáně a tak zvýšení prostupnosti slizniční membrány. Po zábraně adherence, eventuálně po aglutinaci se bakterie snadno odstraní s hlenem.

IgG může také tvořit komplexy s antigeny a bránit jejich vazbě na slizniční povrchy, ale může také aktivovat komplement. Zdá se, že důležitou biologickou rolí IgA je zmírnění zánětlivých postranních efektů, které mohou být způsobovány jinými imunitními mechanizmy.

2.9.4. Cytokinová regulace IgA odpovědi

Cytokiny, které ovlivňují sekreci IgA, lze rozdělit do dvou skupin. Jednu skupinu tvoří cytokiny, které se účastní izotypového přesmyku, cytokiny z druhé skupiny se podílejí na terminální diferenciaci B buněk v plazmatické buňky produkující IgA.

Cytokiny účastnící se izotypového přesmyku:

TGF- β 1 je hlavním cytokinem zúčastněným v izotypovém přesmyku na IgA u B buněk. TGF- β 1 působí na B buňky tvořící IgM a vyvolává v nich přesmyk na tvorbu IgA. Předpokládalo se, že cytokiny IL-4 a IL-10 jsou rovněž zúčastněny v izotypovém přesmyku na IgA, ale v tkáňových kulturách bylo prokázáno, že v nepřítomnosti TGF- β 1 se z purifikovaných B buněk produkujících IgM nestanou B buňky tvořící IgA, ale zvyšují produkci IgA (CERUTTI *et al.* 1998). IL-4 a IL-10 nejsou nezbytné pro tvorbu IgA, neboť u deficientních myší pro IL-4 (VAJDY *et al.* 1995, OKAHASHI *et al.* 1996) i u deficientních myší pro IL-10 (JUSTICE *et al.* 2001) bylo možno sledovat normální tvorbu IgA po antigenní stimulaci. IL-4 může podporovat produkci IgA, neboť preferuje rozvoj Th2 odpovědi. Pro izotypový přesmyk na IgA je nutná stimulace T-lymfocyty přes CD40L. U jedinců, kteří nemají CD40L na T-lymfocytech, je možno detekovat hyper IgM-syndrom.

Cytokiny zúčastněné v terminální diferenciaci:

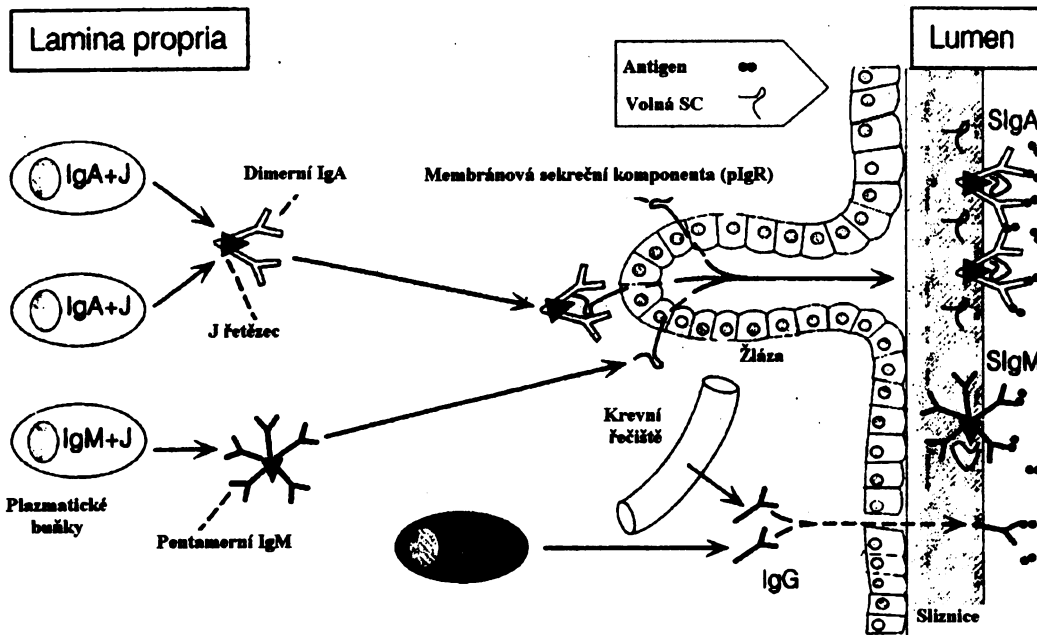
Cytokin IL-5 selektivně zvyšuje sekreci IgA u prekurzorových B buněk pro tvorbu IgA. IL-2, IL-6 a IL-10 podporují terminální diferenciaci B buněk v plazmocyty. Mezi cytokiny podporující terminální diferenciaci IgA buněk zřejmě patří i IL-15. U myší je dosaženo nejvyšší produkce IgA za přítomnosti IL-6 a IL-5, přičemž se zdá, že

IL-6 je hlavní cytokin terminální diferenciace u myší. U lidí se předpokládá, že hlavní úlohu v terminální diferenciaci hraje IL-10 (STROBER *et al.* 2005).

2.10. Sekreční komponenta a její funkce v transcytóze

2.10.1. Regulace slizniční imunity

Transport IgA na povrch sliznic receptorem zprostředkovanou transcytózou závisí na transmembránovém receptoru pro polymerní imunoglobuliny (pIgR), obdobně je secernován S-IgM (viz obr. 3). Odhaduje se, že jsou denně přes epiteliální buňky do lumen střeva takto přeneseny tři gramy S-IgA (MESTECKY *et al.* 1991, NORDERHAUG *et al.* 1999). Vazebné místo pro pIgR je na polymerní imunoglobulinové molekule určeno malým peptidem - J řetězcem (15 kDa) (BRANDTZAEG 1995). Přítomnost J řetězce se zdá být rozhodující pro stabilizaci a prvotní nekovalentní vazbu SC. J řetězec je produkován většinou slizničních lymfocytů B bez ohledu na jimi produkováný izotyp imunoglobulinů (J řetězec je tvořen v 70-90% slizničních plazmocyty sekretujícími IgG). J řetězec je spojen disulfidickými můstky s Fc fragmentem polymerního IgA nebo IgM. J řetězec není schopen asociovat s ostatními typy imunoglobulinů, přestože je s nimi současně syntetizován. Normální střevní sliznice obsahuje dvacetkrát více plazmatických buněk tvořících IgA než IgG, rovněž plazmatické buňky tvořící IgM představují relativně malou frakci.



Obr. 3. Transport imunoglobulinů obsahujících J řetězec receptorem pro polymerní imunoglobuliny (pIgR), který je exprimován na bazolaterální straně epitelu sliznic. Sekreční imunoglobulinové molekuly (S-IgA, S-IgM) vykonávají svoji úlohu v obraně před cizorodými látkami imunitní exkluzí antigenů na povrchu sliznic. Místně produkovaný IgG (a sérový IgG) není předmětem aktivního transportu do lumen střeva, ale prostupuje paracelulárně do lumen, jak ukazuje přerušovaná šipka. Upraveno dle BRANDTZAEG (2003).

2.10.2. Molekulární aspekty slizniční imunity

PIgR je epiteliální glykoprotein (100kDa), který patří do imunoglobulinové rodiny, a je exprimován na bazolaterální plazmatické membráně slizničního epitelu. PIgR je stále produkován, ale jeho produkce může být zvýšena za přítomnosti prozánětlivých cytokinů (INF- γ , TNF- α a IL-4) (BRANDTZAEG 2003). Na apikálním povrchu epitelu jsou S-IgA a S-IgM vylučovány exocytózou po rozštěpení receptoru. Pouze malá C-terminální část receptoru zůstane v membráně epiteliálních buněk, zatímco extracelulární část (asi 80kDa) zůstává v molekule sekrečního imunoglobulinu jako SC. PIgR bez navázaného polymerního imunoglobulinu je rovněž rozštěpen a tvoří volnou SC sekretů. První

vazebný krok závisí asi na 15-37 aminokyselinách s relativně nízkou afinitou k polymernímu imunoglobulinu, dojde k nekovalentní vazbě s J řetězcem a následné kovalentní stabilizaci, u IgM zůstává SC vázána nekovalentně v dynamické rovnováze s volnou SC.

2.11. Mléčná žláza

2.11.1. Spojení mezi matkou a kojencem

Mléčná žláza je součástí slizničního imunitního systému s místní produkcí protilátek sestávajících se hlavně z S-IgA. Protilátky obecně odráží antigenní stimulaci mukózní lymfatické tkáně mikroorganismy, proto jsou protilátky v mléce specifické proti infekčním agens vyskytujícím se v prostředí matky, s kterými se pravděpodobně novorozenec setká. Kojení tedy představuje důmyslné imunologické propojení mezi matkou a dítětem. Klinický efekt je zřejmý ve vztahu k zánětu středního ucha, akutní infekci dolních dýchacích cest a střevním zánětům.

2.11.2. Postnatální rozvoj slizniční imunity

PP a další části MALT (tonsily, lymfatické uzliny vázané na sliznice) jsou při narození již dobře vyvinuty. Sekundární folikuly s zárodečnými centry, kde probíhá aktivace B buněk, se objeví až několik týdnů po narození, což odráží jejich závislost na exogenní stimulaci. Velmi málo B buněk schopných produkovat IgA se nachází v periferní krvi novorozence. Asi po měsíci dojde k jejich výraznému zvýšení. Při narození je rovněž málo střevních plazmatických buněk tvořících IgG a IgM. Tyto plazmatické buňky zvýší svůj počet během dvou až čtyř týdnů po narození, ale IgA se stane dominantní nejdříve během prvního nebo druhého měsíce, svého vrcholu však dosáhne teprve ve dvanácti měsících. Časná protilátková odpověď představovaná protilátkami S-IgM má sice určitou ochrannou funkci, ale specifická imunita k určitým bakteriálním polysacharidům je malá až nedostačující do dvou let (BRANDTZAEG 2003).

Nejméně 90% mikroorganismů napadajících člověka využívá sliznice jako vstupní bránu. Vzhledem k nezralosti slizniční imunity jsou tyto mikroorganismy hlavní příčinou nemocí a úmrtí dětí do pěti let.

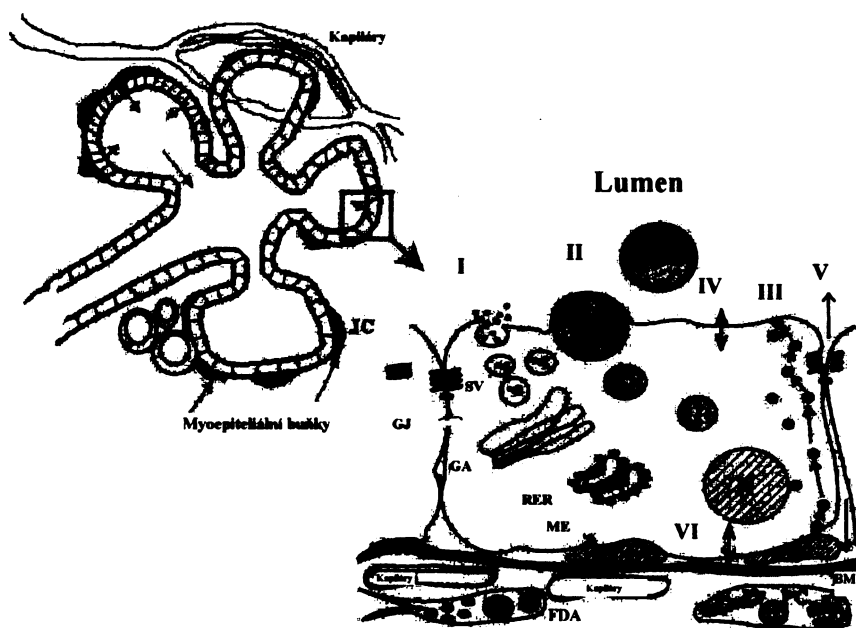
2.11.3. Fyziologie mléčné žlázy a tvorba mléka

Mléko je komplexní směs, jehož složení je výsledkem sekrečních a transportních procesů mléčné žlázy a odráží výživové potřeby novorozenců. Mléko může být rovněž zdrojem metabolitů, xenobiotických látek a drog, které mohou poškozovat novorozence. Vstup těchto látek do mléka je zprostředkován stejnými transportními a sekrečními drahami, jakými se do mléka dostávají živiny.

2.11.3.1. Funkční anatomie laktující mléčné žlázy

Mléčná žláza je složena z větvičí se sítě kanálků tvořených epiteliálními buňkami, které končí v rozšířeném lobulo-alveolárním shluku, který je místem produkce mléka. Jednovrstevný epitel polarizovaných sekrečních buněk tvoří alveol, který je na konci obklopen myoepiteliálními buňkami, které se účastní uvolňování mléka z alveolárních epiteliálních buněk do lumen. V alveolech dále najdeme adipocyty bez lipidů a fibroblasty. Ejekce mléka z alveolů a kanálků je zajištěna oxytocinem. Sekreční buňky mají cytoplazmu bohatou na mitochondrie a drsné endoplazmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA) a v apikální oblasti buňky jsou sekreční váčky bohaté na micely s kaseinem. Golgiho aparát je zbytnělý, neboť je zde produkováno velké množství laktosy následované osmotickým vtokem vody. Sekreční buňky mají velkou schopnost syntetizovat tuky, které jsou posléze sekretovány unikátním způsobem - jsou uvolňovány jako triglyceridové kapky obklopené speciální membránou. Epiteliální buňky jsou na apikální straně spojeny těsnými spoji, které brání přímé paracelulární výměně látek mezi cévním řečištěm a lumen mléčné žlázy. Bazální strana epiteliálních buněk sousedí s myoepiteliálními buňkami a bazální membránou, která odděluje epiteliální část od stromatu a cévního systému, takže je tu dost bariér zabraňujících vstupu exogenních látek z krve do mléka: cévní stěna, stromální buňky, systém membrán epiteliálních buněk, mezibuněčné těsné spoje, Golgiho membrány, (McMANAMAN a NEVILLE 2003).

Mléčné složky mohou vstoupit do mléka jak mimobuněčnou cestou tak buněčnou cestou. Vstup látek do mléka lze rozdělit do pěti hlavních cest (obr. 4). Dvě cesty existují pro sekreci vnitřně produkovaných látek. Pro vodný roztok s proteiny, oligosacharidy, laktosou, citrátem, fosfátem a vápníkem je to exocytotická cesta, která je podobná exocytóze u ostatních buněčných typů. Tuky (triglyceridy) a proteiny s lipidy jsou sekretovány unikátním způsobem charakteristickým pro epiteliální buňky mléčné žlázy. Dvě cesty existují rovněž pro transport složek z krve do mléka. Pro makromolekulární látky (sérové proteiny: imunoglobuliny, albumin, transferin, endokrinní hormony: inzulin, prolaktin, estrogen, cytokiny, lipázy) je to transcytóza a různé membránové přenosy iontů a malých molekul (glukosa, aminokyseliny, voda). Některé složky mléka a mezibuněčné tekutiny vstupují přímo do mléka mezibuněčnou cestou. Přenos látek těmito cestami je ovlivněn funkčním stavem mléčné žlázy a regulován hormony a růstovými faktory.



Obr. 4. Schéma alveolu a alveolární buňky s vyznačenými cestami sekrece mléka. Mléko je sekretováno alveolárními epiteliálními buňkami do lumen (šipky). Alveol má dobré cévní zásobení a je obklopen stromatem, které přispívá složkami extracelulární matrix, fibroblasty, adipocyty. Exocytotická sekrece mléčných proteinů, laktosy, vápníku a dalších složek rozpustných ve vodě je na obrázku označena jako I. Sekreční cesta II představuje sekreci mléčného tuku s tvorbou

cytoplazmatických tukových kapek s následnou tvorbou membránově vázaných tukových globulí. Cesta III popisuje vezikulární transcytózu proteinů např. imunoglobulinů z intersticiálního prostoru. Cesta IV znázorňuje transportéry pro přímý přenos monovalentních iontů, vody buněčnými membránami. Cesta V symbolizuje paracelulární transport složek plasmy a leukocytů. Cesta V je otevřena pouze v průběhu těhotenství, kojení a zánětlivých stavů, např. mastitidy. Zkratky: SV sekreční váčky, RER drsné endoplazmatické retikulum, BM bazální membrána, N jádro, PC plasmatická buňka, FDA tuková buňka bez tuku, JC komplex spojů – těsné a adherentní spoje, GJ gap junction (vmezeřené spoje), ME myoepiteliální buňka. Upraveno dle McMANAMAN a NEVILLE (2003).

2.11.3.1.1. Exocytotická cesta (exocytóza)

Exocytotická cesta je primárním mechanismem sekrece proteinů, vody, laktosy, oligosacharidů, fosfátu, vápníku a citrátu alveolárními buňkami. Jako v případě exocytózy u jiných buněk i tady jsou látky určené pro sekreci zabaleny do váčků v GA a transportovány do apikální části buňky, kde fúzí s membránou a uvolňují svůj obsah do extracelulárního prostoru. Vysoká koncentrace laktosy v GA vede k osmotickému vtoku vody, která přispívá k fluiditě mléka. Z cytoplazmy se vápník dostává do sekrečních váčků ATP-dependentními vápníkovými pumpami, které se nachází na membránách GA a váčků. Ve váčcích tvoří vápník micely s kaseinem a také se váže na citrát a fosfát, což účinně snižuje hladinu volného vápníku.

2.11.3.1.2. Sekreční cesta tuků

Epiteliální buňky mléčné žlázy mají velmi dobře vyvinutý systém syntézy, skladování a sekrece. Mléčné tuky jsou syntetizovány hladkým ER v bazální části buňky z prekurzorů mastných kyselin a glycerolu. Nově syntetizované lipidy jsou uchovávány v malých proteinem pokrytých zásobních strukturách, které se nazývají lipidová tělíska nebo cytoplazmatické lipidové kapky, které se spojují a jsou transportovány do apikální části buňky, kde jsou uvolňovány pučením jako membránou obalené struktury nazývané mléčné tukové globule (MFG, milk fat globule). MFG je pro novorozence hlavním zdrojem energie a membránová složka těchto částic je zdrojem fosfolipidů a brání MFG shlukování do větších celků, které by bylo problematické vyloučit během vylučování

mléka. Membrána MFG obsahuje mnoho enzymů např. oxidázy, reduktázy, hydrolázy a xanthin oxidoreduktázy (McMANAMAN a NEVILLE 2003).

2.11.3.1.3. Transcytotická cesta (transcytóza)

Tento typ sekrece v sobě zahrnuje příjem látek na bazální membráně, tvorbu a zrání endozómu, rozdělení látek určených pro exocytózu a pro degradaci v lysozómech. Transcytózou je sekretován IgA, prolaktin, transferin, touto cestou mohou být transportovány xenobiotické látky (karcinogeny, drogy).

2.11.3.1.4. Membránový transport

Tento typ transcelulárního přenosu závisí na přenášené látce a vyžaduje přítomnost specifického přenašeče na bazální a apikální straně buňky.

Transport iontů: Přenašeče pro sodík, draslík a chlorid jsou na apikální a bazální straně buňky. Přenašeče pro vápník, fosfát a jód se nachází pouze na bazální membráně.

Glukosový transport: Přenašeče pro glukosu se nacházejí jak na apikální tak na bazální membráně a na membránách GA. V prsní žláze se nachází dva odlišné mechanismy přenosu glukosy: GLUT1 a glukosový přenašeč závislý na sodíku. GLUT1 zprostředkovává transport glukosy na bazální membráně a na GA membránách a zřejmě nepřispívá k transportu glukosy na apikální straně.

Transport aminokyselin: V membránách epitelu prsní žlázy byly identifikovány na sodíku závislé i nezávislé přenašeče aminokyselin.

2.11.3.1.5. Paracelulární transport

Během produkce mléka tento typ transportu neprobíhá, neboť působením hormonů došlo k vytvoření těsných spojů mezi epiteliálními buňkami. Tyto těsné spoje zabraňují volnému pohybu látek mimobuněčnou cestou.

2.11.3.2. Diferenciace mléčné žlázy a produkce mléka

Během těhotenství se mění mléčná žláza ve vysoce účinný exokrinní orgán. Tato přeměna je řízena hormonálně a představuje změny jak na úrovni buněčné tak strukturální. Dochází k množení kanálkových a alveolárních buněk, parenchymální buňky nahradí tukovou tkáň. Sekreci prsní žlázy můžeme rozdělit do dvou fází: iniciační

a aktivační, které se odlišují ve složení sekretu a genové expresi, stavebních a funkčních vlastnostech alveolárních buněk.

Pro iniciační fázi je charakteristická zvýšená exprese některých mléčných proteinů, biosyntéza enzymů, hromadění lipidových kapek. V iniciační fázi dochází k omezené produkci mléčných složek, které lze měřit zvýšenou koncentrací laktosy a alfa-laktalbuminu v plazmě a moči.

K hojné produkci mléčných složek dochází v aktivační fázi, která nastává krátce po porodu a je charakterizována syntézou mnoha proteinů, enzymů, polarizací organel, růstem mitochondrií a drsného ER, zráním GA a uzavřením těsných spojů. Tyto změny buněčné a genové exprese vedou ke zvýšené produkci mléka. Lze pozorovat tři výrazné změny ve složení mléka: nejdříve dojde k poklesu koncentrace sodíku a chloridu a k vzestupu laktosy do 72 hodin po porodu, což může být vysvětleno uzavřením těsných spojů a tedy i paracelulární cesty (MCMANAMAN a NEVILLE 2003). Druhou významnou změnou je vzestup koncentrace S-IgA a laktoferinu. S-IgA dosahuje svého sekrečního maxima o den dříve než laktoferin, který dosahuje svého maxima společně s ostatními hlavními proteiny v mléce, což naznačuje, že sekreční dráhy S-IgA a laktoferinu jsou řízeny odlišným způsobem; laktoferin je sekretován exocytózou a S-IgA transcytózou. Třetí změnou je vzestup koncentrace všech složek, které obsahuje zralé mléko.

2.11.3.3. Hormonální řízení sekrece a přenosu.

Pokles progesteronu po porodu je předpokladem pro nastartování produkce mléka a exprese proteinů a biosyntetických procesů. Bylo zjištěno, že pokud se neodstraní placenta (zdroj progesteronu), dochází k opoždění laktace. Po poklesu koncentrace progesteronu musí být rovněž přítomny další hormony (především prolaktin a kortizol), aby mohlo dojít k laktaci. Pro uzavření těsných spojů je třeba poklesu progesteronu a přítomnosti prolaktinu a glukokortikoidů.

2.11.4. Složení mléka

V průběhu laktace vzniká nejprve kolostrum (mlezivo), později pak vzniká zralé mléko. Kolostrum a zralé mléko se liší zastoupením jednotlivých složek. V kolostru a

mléce jsou zastoupeny jak složky humorální tak i buněčné. Mléko je tvořeno třemi hlavními frakcemi: tukem, syrovátkou a kaseinem. Imunoglobuliny, albumin, fragmenty β -kaseinu jsou hlavními syrovátkovými proteiny. Mezi syrovátkové proteiny rovněž patří laktoferin, sekreční komponenta, β 2-mikroglobulin, glykoproteiny z MFG (BUTLER 1999).

Kolostrum obsahuje malé množství kaseinu v porovnání se zralým mlékem. V kolostru najdeme velké množství syrovátkových proteinů, jejich koncentrace může dosáhnout až 200mg/ml. V kolostru se nachází 10^6 - 10^7 buněk/ml, v průběhu přeměny kolostra ve zralé mléko dochází ke snížení počtu buněk na 10^4 - 10^5 /ml (BUTLER 1999, BUTLER *et al.* 2005).

2.11.4.1. Nebuněčné složky v mléce

Odolnost k infekčním onemocněním je obecně vyšší u dětí, které byly kojeny. Příčin může být více, ale zřejmě hlavní je přítomnost antimikrobiálních látek v mléce a jejich lokální působení ve střevě kojence. Antimikrobiální látky jsou z biochemického hlediska různorodé a funkčně odlišné.

2.11.4.1.1. Syrovátkové proteiny

Imunoglobuliny: IgD se v mateřském mléce vyskytuje pouze v minimálním množství. V mnohem větším množství je v mléce přítomen IgG (IgG4 je zde ve větším poměrném zastoupení vůči ostatním podtřídám IgG, než je tomu v séru člověka), ale celková koncentrace IgG (0,21-0,85mg/ml v kolostru a 0,04mg/ml ve zralém mléce) i koncentrace všech jeho podtříd v mléce je nižší než v lidském séru (12mg/ml) (GOLDMAN a OGRA 1999). U primátů je unikátní placentální přenos IgG do plodu od třetího trimestru, díky němuž koncentrace IgG v krvi novorozence dosáhne koncentrace IgG v krvi matky. Předpokládá se, že přenos IgG přes placentu je zprostředkován receptory FcRn (STORY *et al.* 1994, LEACH *et al.* 1996, FIRAN *et al.* 2001). Koncentrace IgM v lidském mléce (0,92-2,64mg/ml v kolostru a 0,1mg/ml ve zralém mléce) je vyšší než koncentrace IgG, neboť sekrece IgM (tak jako IgA) do mléka je zprostředkována vazbou na polymerní imunoglobulinový receptor (pIgR) na bazolaterální straně buněk epitelu prsní žlázy. Dominantním imunoglobulinem v mléce je IgA, který představuje 80-90% všech imunoglobulinů, zatímco v lidském séru je hlavním

imunoglobulinem IgG. Koncentrace IgA je nejvyšší v kolostru (86-13mg/ml) a postupně klesá až k hodnotám 1mg/ml ve zralém mléce (NENTWICH, I. 2002). V lidském séru je IgA1 zastoupen 84% (IgA2 16%), v lidském mléce je poměr IgA1 a IgA2 téměř stejný, toto zvýšené zastoupení IgA2 je výhodné, neboť IgA2 je odolnější k bakteriálním proteázám slizničních patogenů, jako jsou *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*, které jsou schopny štěpit pantovou oblast IgA1 (GOLDMAN a OGRA 1999). S-IgA ve střevě novorozence neutralizuje viry, enzymy a toxiny produkované bakteriemi, zabraňuje vazbě mikroorganismů na povrch sliznice imunitní exkluzí. IgA ochraňuje novorozence dalšími mechanizmy, například svými postranními O-vázanými oligosacharidy se váže na struktury bakterie odpovídající za přisednutí na epiteliální povrch. Oligosacharidy na SC brání *Helicobacter pylori* v přisednutí na epitel žaludku.

Laktoferin: Jednořetězcový glykoprotein, zástupce transferinové rodiny proteinů, je významným syrovátkovým proteinem v lidském mléce. Jeho množství v kolostru představuje 5-7g/l, v mléce se sníží na 1-3g/l (GOLDMAN *et al.* 1982, HENNART *et al.* 1991). Jednou z hlavních funkcí tohoto proteinu je vazba Fe^{3+} iontů, tím dojde ke snížení koncentrace volně dostupných Fe^{3+} iontů, které jsou nezbytné pro růst a množení některých bakterií a hub. Laktoferin má antimikrobiální, protizánětlivé a imunomodulační funkce. Laktoferin je schopen se vázat na bakteriální lipopolysacharidy a poriny. Vysoce kladně nabitý N-konec laktoferinu je schopen zabít bakterie *E. coli* a *Candida albicans* tím, že naruší jejich vnější membránu. Některé izoformy laktoferinu jsou schopny inhibovat retroviry např. *Cytomegalovirus* a HIV, laktoferin brání vazbě HIV na receptory CXCR4 a CCR5 (BERKHOUT *et al.* 2002). Vazba laktoferinu na T-lymfocyty má za následek aktivaci MAP (mitogen-activated protein) kinázy (DHENNIN-DUTHILLE *et al.* 2000). Laktoferin je odolnější vůči trypsinu a chymotrypsinu než ostatní proteiny.

2.11.4.1.2. Lysozym

Lysozym (neuraminidáza) štěpí peptidoglykany, které jsou součástí stěny všech bakterií (velmi silná je peptidoglykanová vrstva bakteriální stěny u Gramm-pozitivních bakterií) enzymaticky hydrolyzuje β -1,4 glykosidickou vazbu mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem v bakteriálních peptidoglykanech (CHIPMAN a SHARON 1969). Koncentrace lysozymu se mění během laktace, v mlezivu je jeho

koncentrace 70 μ g/ml, v prvním měsíci 20 μ g/ml a v šestém měsíci 250 μ g/ml (GOLDMAN a OGRA 1999). Lysozym je relativně odolný vůči trypsinu.

2.11.4.1.3. α -laktalbumin

Snížený výskyt nádorů u kojených dětí je způsoben protinádorovým účinkem α -laktalbuminu přítomného v mléce (SVANBORG *et al.* 2003). α -laktalbumin je jedním z hlavních proteinů obsažených v mléce a má schopnost indukce apoptózy u transformovaných, embryonálních a lymfatických buněk, ale ne u epiteliálních buněk (HAKANSSON *et al.* 1995).

2.11.4.1.4. Oponiny

V lidském mléce jsou tři typy opsoninů: fibronektin, IgG a C3, který po štěpení dává opsonin C3b. Ve srovnání s lidskou krví je koncentrace opsoninů v mléce nízká.

2.11.4.1.5. Glykokonjugáty a oligosacharidy

V lidském mléce se nachází velké množství těchto molekul, které brání vazbě mikrobů na epiteliální povrch. Mezi glykokonjugáty patří velký glykoprotein mucin s O-vázanými cukernými zbytky. Lidský mléčný mucin je tvořen ze dvou menších proteinů, butyrofilinu a laktadherinu. Glykoproteiny, zvláště kasein, podporují růst *Bifidobacterium bifidus* (charakteristický pro střevo kojence). Gangliosid GM1 váže toxiny podobné toxinům *E.coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*. Vazba glykolipidu Gb3 na *Shigella dysenteriae* brání přisednutí této bakterie na epiteliální povrch (GOLDMAN a OGRA 1999).

Oligosacharidy představují třetí největší složku sušiny mléka. Jsou složeny z pěti různých monosacharidů v rozličných kombinacích: glukosy, fukosy, galaktosy, N-acetylglukosaminu a sialové kyseliny (HANSON *et al.* 2005). Oligosacharidy většinou obsahují laktosu na redukujícím konci a fukosu nebo kyselinu sialovou na neredukujícím konci. K zabránění vazby mikrobů na slizniční povrchy je využita homologie oligosacharidu s buněčným receptorem a následná kompetice receptorů o antigen (oligosacharid), další možností je obsazení epiteliálního receptoru vazbou oligosacharidu.

2.11.4.1.6. Lipidy

Tuky se v mléce nevyskytují jako volné lipidy, ale v MFG. Neutrální tuky v lidském mléce nemají antimikrobiální funkci, ale po hydrolyze lipázou vzniknou mastné kyseliny a monoglyceridy, které jsou schopné napadat obalené viry, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* a některé bakterie (GILLIN *et al.* 1983, 1985; RESTA *et al.* 1985, ISAACS *et al.* 1986, MAY *et al.* 1988).

2.11.4.1.7. Nukleotidy

V kolostru je přítomno 53-58mg nukleotidů na 1 litr kolostra. V mléce kolem 33mg/l (KUCHAN *et al.* 1998). Nukleotidy mohou být využity pro syntézu nukleových kyselin, v biosyntetických drahách, jako přenašeč energie, koenzymy či biologické regulátory (HANSON *et al.* 2005).

2.11.4.1.8. Komplement

V mléce byla prokázána přítomnost všech devíti složek komplementu. Monocyty i makrofágy syntetizují a secernují C3 složku komplementu. Protože C3a složka komplementu inhibuje IgE-dependentní degranulaci žírných buněk, byla vyslovena domněnka, že na protialergické funkci mateřského mléka se podílí i komplement (NENTWICH, I. 2002).

2.11.4.1.9. Peroxidázy

Peroxidázová aktivita byla nalezena v exokrinních sekretech včetně mléka, slz, slin. Peroxidázy jsou tvořeny ve žlázách produkujících daný sekret, polymorfonukleárních leukocytech (myeloperoxidáza), eosinofilech (RUSSEL *et al.* 2005).

2.11.4.1.10. Mikroorganismy a jejich riziko pro novorozence

Ačkoli byly v mléce detekovány některé patogenní bakterie, jsou vzácně příčinnou infekčních onemocnění. Většina bakterií přítomných v mléce je výsledkem kontaminace z kůže. Některé viry mohou být za jistých okolností sekretovány do mléka např. rubeola *Cytomegalovirus* (CMV), *virus hepatitidy B* (HBV), *Herpes simplex* (HSV), HIV, virus lidské T-buněčné leukémie typu 1 (HTLV-1), *Varicella zoster* (VZV).

HIV-1 může být přenesen na novorozence kojením. U 75% HIV-pozitivních matek byla detekována virová DNA v mléce pomocí PCR. Bylo zjištěno, že vliv délky kojení

nemá vliv na přenos HIV (GOLDMAN a OGRA 1999), ale nástup onemocnění může být oddálen, neboť mléko obsahuje protilátky (HANSON a TELEMO 1999).

HTLV-1 je retrovirus, který může být přenesen kojením. Výskyt HTLV-1 u dětí, které byly kojeny HTLV-1 pozitivní matkou byl 39%. Výskyt HTLV-1 u dětí, kde matka byla HTLV-1 pozitivní, ale nekojila děti, byl 6%. Není dosud známo, může-li dojít k rozvoji T-buněčné leukémie u dětí, které získaly HTLV-1 kojením, později v životě (GOLDMAN a OGRA 1999).

Cytomegalovirus je jedním z osmi herpes virů, které napadají člověka. Virus je více přítomen v mléce než v kolostru. Sérové protilátky nezabrání infekci CMV. CMV získané kojením se nerozvine v onemocnění.

Zarděnky jsou způsobené virem rubeoly, který je přítomen v mléce infikovaných matek. U dětí nakažených kojením nebyly nalezeny žádné příznaky onemocnění (LOSONSKY *et al.* 1982a, 1982b).

U HBV pozitivních matek nebyl pozorován vliv kojení na výskyt HBV u jejich dětí. U HCV pozitivních matek nebyla v jejich mléce detekována přítomnost HCV RNA (POLYWKA *et al.* 1999).

2.11.4.1.11. Růstové faktory a cytokiny v mléce (a další imunomodulátory)

Imunomodulační faktory lze rozdělit do dvou skupin: (1) faktory, které brání vzniku zánětu v mléčné žláze, (2) faktory, které jsou produktem mléčné žlázy a představují pasivní imunitu přenášenou z matky na dítě. In vitro bylo zjištěno, že kolostrum a mléko je schopno podporovat růst různých buněčných typů (KLAGSBRUM 1978), což je způsobeno přítomností epiteliálního růstového faktoru (EGF), IL-1, CSF, TGF- β .

Průměrná koncentrace TGF- β je v mlezivu 952 ng/ml a 178 ng/ml v mléce (BUTLER 1999). TGF- β podporuje tvorbu těsných spojů mezi buňkami střevního epitelu (XU *et al.* 1999) a tím snižuje propustnost střevní bariéry pro antigeny. TGF- β podporuje izotypový přesmyk B buněk v PP z IgM na IgA a spolu s IL-10 brání Th1 odpovědi. Koncentrace IL-10 v kolostru je rovněž vysoká v prvních 80 hodinách laktace (GAROFALO *et al.* 1995). Dalším důležitým cytokinem je IL-6, jehož koncentrace v kolostru je desetkrát až dvacetkrát vyšší než v krvi (SAITO *et al.* 1991). IL-6 podporuje CSF a růst a diferenciaci B buněk. EGF podporuje růst a vyžrávání střevního epitelu,

zvyšuje expresi TGF (MIETTINEM 1993). IL-1 β inhibuje produkci IL-2 stimulovanými T buňkami (HOOTON *et al.* 1991). Koncentrace TNF- α v mléce dosahuje 600 pg/ml (RUDLOFF *et al.* 1992), podporuje tvorbu pIgR. IL-7 podporuje rozvoj PP a $\gamma\delta$ T buněk (LAKY *et al.* 2000, 2003). V mléce jsou rovněž přítomny IL-12 a IL-18 (BRYAN *et al.* 1999, TAKAHATA *et al.* 2001), M-CSF, G-CSF, MIF, INF- γ , INF- α , IL-8, eotaxin, IL-16, RANTES, IGF-1, leptin (korelace s množstvím tuku), antisekreční faktor (AF), protizánětlivé složky – vitamíny A, C, E, kataláza, glutathion peroxidáza – antioxidanty (HANSON *et al.* 2005).

2.11.4.2. Buňky v mléce

Nejprve je nutno říci, že se v literatuře vyskytují velmi odlišné údaje o poměrném zastoupení jednotlivých buněčných typů v kolostru a v mléce. Tyto odlišnosti odrážejí použitý způsob izolace buněk z mléka. Obecně je možno říci, že celkový počet buněk v mléce se snižuje v průběhu kojení. Nejvíce buněk je zastoupeno v kolostru. Makrofágy a monocyty tvoří 47–66% všech buněk v kolostru, ve zralém mléce 44% (BUTLER *et al.* 2005). Dvě třetiny mononukleárních buněk v kolostru představují monocyty (WILSON 1986, SAITO 1991, BUTLER *et al.* 2005). Počet neutrofilů v kolostru je 21-60% (BUTLER *et al.* 2005), v průběhu laktace se snižuje poměrné zastoupení neutrofilů (HO a LAWTON 1978). V kolostru je méně než jedno procento epiteliálních buněk. V průběhu laktace dochází ke zvyšování počtu epiteliálních buněk uvolněných do lumen mléčné žlázy až na 90% (BUTLER *et al.* 2005). Průtokovou cytometrií bylo zjištěno, že lymfocyty tvoří kolem 4% z celkového počtu buněk v mléce (BERTOTTO *et al.* 1990, WIRT *et al.* 1992, KEENEY *et al.* 1993). Populace lymfocytů v mléce není shodná s PBL, neboť je zde vyšší zastoupení T buněk (WEI *et al.* 1986, DUHAMEL *et al.* 1987, WIRT *et al.* 1992, LE JAN 1994, TAYLOR *et al.* 1994) a nižší poměr CD4:CD8 mezi $\alpha\beta$ T buňkami (RICHIE *et al.* 1980, GIBSON *et al.* 1991, NA *et al.* 1992, WIRT *et al.* 1992, EGLINTON *et al.* 1994, LE JAN 1994, ASAI *et al.* 1998). Téměř všechny CD8⁺ a CD4⁺ buňky mají CD45RO, znak pro aktivované a paměťové buňky. Navíc nesou i jiné aktivační molekuly, jako např. CD25 - receptor pro interleukin-2 (NENTWICH, I. 2002). Poměr lymfocytů s $\gamma\delta$ a $\alpha\beta$ TCR v mléce je dvakrát vyšší než je tomu v krvi (BERTOTTO *et al.* 1990, 1993, GIBSON *et al.* 1991, GOLDMAN a OGRA 1999).

Jelikož se T-lymfocyty podobají IEL, předpokládá se, že mají stejný původ (PARMELY a MANNING 1983, GIBSON *et al.* 1991, LE JAN 1994, TAYLOR *et al.* 1994, ASAI *et al.* 1998).

B- a T-lymfocyty prostupují střevní sliznicí do novorozence. Jedním z výsledků tohoto přenosu buněk je tolerance potomka k matčině HLA, tedy potencionálně lepší přejetí transplantátu od matky (HANSON *et al.* 2005).

2.11.5. Kojení a alergie

Alergické choroby patří v současné době mezi nejrozšířenější onemocnění. Protože představují závažný zdravotně-sociální problém, velký důraz je kladen na jejich prevenci. Atopie je definována jako imunopatologický stav, reakce časné přecitlivělosti mediovaná protilátkami třídy IgE. Kojení patří mezi základní a nejjednodušší způsoby prevence alergie. Mnoho prací popisuje možný ochranný účinek mateřského mléka před vznikem alergií. Na rozvoji alergií se podílí faktory jako dědičnost, věk, dávka antigenu při prvním a následných setkáních, výskyt infekce, stav střevní mikroflóry, schopnost vytvořit si imunologickou toleranci k alergenům (HANSON *et al.* 1997), proto je obtížné sledovat vliv kojení, jako jediný (izolovaný) faktor ovlivňující vznik alergií.

Některé studie říkají, že kojení brání vzniku astmatu (GDALEVICH *et al.* 2001) podobně podle ODDY *et al.* (1999) kojení po dobu nejméně čtyř měsíců zabraňuje rozvoji astmatu. Jiná studie popisuje ochranný vliv kojení při vzniku atopického ekzému u dětí, jejichž rodiče byli atopici (alergici) (GDALEVICH *et al.* 2001). Výskyt pískavého dýchání (wheezing) a astmatu je snížen u kojených dětí bez ohledu na to, zda matka má astma (ODDY *et al.* 2002a, 2002b). Umělá výživa podávaná dětem mladším než tři měsíce zvyšuje riziko vzniku astmatu u dětí do čtyř let (TARIQ *et al.* 1998). Kojení déle než čtyři měsíce snižuje riziko vzniku astmatu, atopické dermatitidy a alergické rýmy (KULL *et al.* 2002). Naproti tomu BERGMANN *et al.* (2002) zjistil, že výskyt alergického ekzému u dětí roste s věkem a počtem měsíců kojení. Kojení dětí nealergických rodičů poněkud zvýšilo výskyt atopického ekzému, ale u dětí, jejichž oba rodiče byli alergici, kojení zpozdilo nebo zabránilo vzniku alergického ekzému (STABELL 2003). U dětí, které byly kojeny matkami s astmatem, byl zjištěn vyšší výskyt astmatu ve srovnání s dětmi, které byly kojeny zdravými matkami (OBERLE *et*

al. 2001). Kojení zvyšuje riziko specifické senzibilizace na běžné antigeny ve věku od třinácti do dvaceti jedna let (SEARS *et al.* 2002).

Mléko australských matek zabraňuje vzniku alergií u dětí účinněji (ODDY *et al.* 2002a, 2002b), než mléko německých matek (OBERLE *et al.* 2001, BERGMANN *et al.* 2002). Poměr n-6: n-3 mastných kyselin je nižší v mléce australských matek (FIDLER a KOLETZKO 2000). V jiné studii bylo zjištěno, že v mléce alergických matek je vyšší poměr n-6: n-3 mastných kyselin (YU *et al.* 1998).

Mateřské mléko ovlivňuje lymfocytární populaci v novorozenci tak, že dochází ke zvyšování počtu NK a snižování CD4+ T buněk ve srovnání s uměle kojenými novorozenci (HAWKENS *et al.* 1999). Vlastnosti mateřského mléka mohou mít vliv na rozvoj alergie na kravské mléko. Uvádí se, že nízké hladiny IgA predisponují děti k rozvoji alergií (JARVINEN *et al.* 2000). Rovněž nižší zastoupení makrofágů a vyšší počet neutrofilů podporuje vznik alergie na kravské mléko (JARVINEN a SUOMALAINEN 2002). Nízká hladina IgA a vysoké zastoupení neutrofilů v krvi pozitivně koreluje se vznikem atopického ekzému do 18 měsíců (CALBI a GIACCHETTI 1998). Rovněž velké množství neutrofilů v mléce koreluje s výskytem alergie. V mateřském mléce alergických matek je vyšší zastoupení chemokinů IL-8 a RANTES (BOTTCHEER *et al.* 2000). Tyto chemoatraktanty mohou ovlivnit přenos a aktivaci buněk v mléce.

Mateřské mléko obsahuje IL-6, IL-10, TGF- β , což jsou faktory zúčastněné v tvorbě S-IgA B-lymfocyty. IL-4 je zvýšený v mléce alergických matek v porovnání s mlékem zdravých matek. IL-4 se účastní izotypového přesmyku na IgE a podporuje rozvoj Th2 odpovědi. Hladiny TGF- β patří mezi hladinami cytokinů v kolostru a mléce mezi nejvyšší (CUMMINS a THOMPSON 1997, SAARINEN *et al.* 2000). Hlavním faktorem účastnícím se izotypového přesmyku na IgA je TGF- β , který rovněž snižuje T buněčnou odpověď. Studie srovnávající hladiny IgE v séru dítěte a matky ukázaly, že děti, které byly kojeny matkami s vysokými hladinami IgE v séru po dobu čtyř měsíců a déle, měly rovněž vysoké hladiny IgE v séru ve srovnání s dětmi, které nebyly kojeny (WRIGHT *et al.* 1999, BEDNAR-TANTSCHER 2001).

2.11.6. Vliv kojení na obezitu

Čím déle byly děti kojeny, tím méně byly obézní (VON KRIES *et al.* 1999, GILLMAN *et al.* 2001). Kojení ovlivňuje sekreci inzulínu (LUCAS *et al.* 1980, 1981), který pak dlouhodobě řídí energetický metabolismus. IL-1 β snižuje tvorbu inzulínu, TNF- α blokuje inzulínový receptor (HAUNER *et al.* 1995, HOTAMISLIGIL *et al.* 1996, MAURICIO a MANDRUL-POULSEN 1998). IL-6 spouští uvolnění inzulínu, glukagonu a kortizolu a podporuje oxidaci glukosy a mastných kyselin.

V mléce je přítomen leptin, který ovlivňuje chuť k jídlu, je produkován tukovými buňkami. Při hladovění je množství leptinu sníženo. Jeho tvorba je zvyšována přítomností IL-1 β , TNF- α a LPS. Leptin podporuje Th1 odpověď (LORD 2002).

2.11.7. Vliv dlouhodobého kojení na autoimunitní onemocnění a jiné zánětlivé stavy

Riziko rozvoje cukrovky prvního typu je výrazně sníženo u kojených dětí (HANSON *et al.* 2005). Rovněž kojení omezuje vznik roztroušené sklerózy (PISACANE *et al.* 1994), revmatoidní artritidy (BRUN *et al.* 1995).

2.11.8. Prospěšnost kojení

Uvádí se, že mléko rovněž obsahuje faktory podporující rozvoj nervového systému, což se odráží vyšším rozvojem zraku a IQ v porovnání s dětmi, které nebyly kojeny (HANSON a TELEMOMO 1999).

Kojení má pro novorozence velký význam, neboť mléko zajistí novorozenci optimální výživu, růst a obranu proti infekcím, aktivaci specifické i nespecifické imunity. Obrana proti infekcím u kojených dětí není pouze pasivní dočasnou záležitostí, ale je možno sledovat aktivní dlouhodobé ovlivnění imunitního systému kojence látkami obsaženými v mléce, které činní imunitní systém kojence výkonnějším. V mléce jsou přítomny metabolicky aktivní hormony, enzymy, cytokiny, protilátky a další regulační látky.

Z hlediska prevence alergií představuje kojení základní a nejjednodušší způsob. Některými autory byly prokázány regionální rozdíly ve složení mateřského mléka. Vznik alergie může být způsoben různými faktory, proto je těžké sledovat vliv kojení na rozvoj

alergií jako izolovaný faktor. Studie popisující vliv kojení na rozvoj alergií jsou do značné míry rozporuplné. Z výše zmíněných studií zabývajících se vlivem mateřského mléka na rozvoj alergií je patrné, že dosavadní poznatky o vztahu kojení a vzniku alergií jsou velmi rozporuplné.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Získávání materiálu

Odběr klinického materiálu byl prováděn v Ústavu péče o matku a dítě po informovaném souhlasu matky. Bylo odebíráno asi 30ml pupečnickové krve do transfuzní nádoby s heparinem. Mateřské mléko (kolostrum, tří- a šesti-měsíční mateřské mléko) bylo odebíráno do polypropylenových zkumavek, během přepravy z porodnice uchováváno na ledu a zpracováno do jedné hodiny od odběru.

3.2. Imunoenzymatický průkaz cytokinů (ELISA)

3.2.1. Materiál a chemikálie

vysokoadsorpční mikrotitrační destičky s plochým dnem pro imunoenzymatické stanovení EGF – F96 Maxisorp Nunc A/S

primární protilátky (monoklonální navazovací protilátky) R&D systems

sekundární protilátky (biotinylované detekční protilátky) R&D systems

rekombinantní cytokiny R&D systems

streptavidin značený křenuvou peroxidázou Immunotech

zásobní roztok má koncentraci 0,5mg/ml (rekonstituce 1ml destilované vody a 1 ml glycerolu)

2M H₂SO₄ PENTA, LACHEMA

H₂O₂ – 30% Chemické závody Sokolov, a.s.

3.2.2. Metodika stanovení koncentrace EGF v mléce metodou ELISA

1. navázání monoklonální protilátky 75μl na jamku (ředěno na koncentraci 3μg/ml v PBS) a nechat přes noc při laboratorní teplotě
2. deska je promyta 3x v PBS s 0,05% TWEENem a vyklepnuta
3. blokování PBS s 1% BSA, 5% sacharosou a 0,05% NaN₃, 300μl na jamku a nechat 1h inkubovat při laboratorní teplotě
4. deska je promyta 3x v PBS s 0,05% TWEENem a vyklepnuta

5. vzorky mateřského mléka jsou ředěny 500x v ředícím roztoku - TBS, 50μl ředěného vzorku na jamku, inkubace 2h při laboratorní teplotě
6. deska je promyta 3x v PBS s 0,05% TWEENem a vyklepnuta
7. je přidáno 50μl biotinylovaných protilátek ředěných v TBS na koncentraci 30μg/ml, inkubace 2h při laboratorní teplotě
8. deska je promyta 3x v PBS s 0,05% TWEENem a vyklepnuta
9. je přidáno 50μl streptavidinu značeného křenovou peroxidázou (ředěno 1: 1000 v TBS) a inkubace 20min při laboratorní teplotě
10. deska je promyta 3x v PBS s 0,05% TWEENem a vyklepnuta
11. je přidáno 50μl substrátu na jamku, inkubace 20 min ve tmě při laboratorní teplotě (3ml TMB + 3ml citrátového pufru + 1μl peroxidu vodíku na jednu desku)
12. je přidáno 50μl zastavovacího roztoku (2M H₂SO₄) do každé jamky
13. vyhodnocení na Labsystems Multiscan RC při vlnové délce 450nm, hodnoty jsou vypočteny programem Genesis
14. výsledky byly statisticky zhodnoceny Mann-Whitney testem v programu GraphPad Prism

3.3. Imunoenzymatický průkaz buněk tvořících protilátky (ELISPOT)

3.3.1. Materiál a chemikálie

destičky s nitrocelulózovým dnem - Multiscreen HTS	Millipore
primární protilátky (ovčí monoklonální navazovací protilátky)	Immunotech
sekundární protilátky (ovčí protilátky značené peroxidázou)	Immunotech
filtry 0,45μm	Millipore
tkáňové medium MEM	Sigma
FTS fetální telecí sérum	Gibco
zkumavky polystyrenové 10ml	GAMA GROUP a.s.
peroxid vodíku H ₂ O ₂ – 30%	Chemické závody Sokolov, a.s.
sterilní voda pro tkáňové kultury	
stimulátory	

Escherichia coli O86 – formolizované bakterie – zásobní suspenze v PBS 10^{11} bakterií/ml; stimulace v kultuře – výsledná koncentrace 10^9 /ml kultury

Bacillus firmus *Bacillus firmus* (formalizované bakterie), kmen CCM 2212, *Bacillus firmus* byl připraven kultivací na krevním agaru obsahujícím ovčí erythrocyty a 1% glukosu. Pro inokulaci a kultivaci je nejvhodnější pH = 7, výsledná koncentrace BF v kultuře je 100µg/ml

pokeweed mitogen Sigma, výsledná koncentrace 1µg/ml kultury

tkáňové medium pro stanovení buněk tvořících imunoglobuliny (ELISPOT)

RPMI suplementováno 0,2ml HEPES (0,002M), 1,2ml glutaminu (0,002M), 0,1ml gentamycinu (40mg/ml), 0,5ml transferinu (20mg/ml), 10ml FTS (10%), 0,1ml merkptoethanolu (0,025M), 96ml RPMI 1640 (Sigma)

3.3.2. Metodika průkazu buněk tvořících imunoglobuliny (ELISPOT)

1. kultivace buněk – suspenze buněk o koncentraci $1,25 \times 10^6$ /ml v RPMI, 800µl buněčné suspenze + 100µl stimulantu, 100µl mateřského mléka (ředěno 1: 10 v RPMI)/zkumavka, kultivace 6 dní v termostatu
2. desky s nitrocelulóзовou membránou jsou nejprve sterilizovány UV světlem
3. na destičky navázána primární protilátka: 100µl navazovací protilátky (o koncentraci 8µg/ml) na jamku, 2h při laboratorní teplotě, přes noc v lednici, vše ve vlhké komůrce, protilátky proti imunoglobulinům se jsou ředěny 1: 250 v uhličitanovém pufru, kontroly – bez navázané protilátky a s navázanou protilátkou bez buněk
4. promývání a blokování - 4x promýt 0,05% Tween a 3x PBS, 200µl na jamku blokování 30min 50µl kultivačního media
5. 2 zkumavky (2x1ml) se po kultivaci v termostatu spojí a 3x se promyjí MEM + 10% FTS, centrifugace 10min při 1 800 ot./min, 4°C a potom se resuspendují v polovičním objemu (tj. v 1ml) kultivačního media (RPMI + 10% FTS), 50µl buněk se přidá do každé jamky k 50µl blokujícího media, kultivace při 37°C + 5% CO₂ ve vlhké komůrce do druhého dne – s deskou se nesmí pohnout.

6. odstranění buněk vylitím a vytřepáním mikrotitrační desky, promýt 4x 0,05% Tween a 3x PBS (200μl na jamku), deska se na 5 min celá ponoří do PBS (odstraní se bubliny), konjugované antiimunoglobulinové protilátky ředit 1: 500 v PBS s 10% FTS, 50μl naředěných sekundárních protilátek (o koncentraci 2μg/ml) na jamku, 1h nechat inkubovat ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě, promýt 4x 0,05% Tween, 3x PBS (200μl na jamku), na 5min ponořit celou desku do PBS, substrát: 10ml AEC + 15μl H₂O₂ – přefiltrovat přes membránový filtr Millipore 0,45μl, 50μl na jamku, 20min ve tmě, reakci zastavit vodou z vodovodu, potom opláchnout destilovanou vodou a usušit
7. hodnocení binokulární lupou, zvětšení 40x, předpokládá se, že v jedné jamce je 10⁵ buněk. Výsledek se vyjadřuje jako počet spotů na 10⁶ jaderných buněk
8. výsledky byly statisticky zhodnoceny párovým t-testem v programu GraphPad Prism

3.4. Izolace buněk z mléka a krve

3.4.1. Materiál a chemikálie

3.4.1.1. Materiál a chemikálie na izolaci mononukleárních leukocytů z pupečnickové krve

100ml transfuzní lahvička s heparinem – heparin	Léčiva a.s.
zkumavky polystyrenové 15ml	GAMA GROUP a.s.
Ficoll-Pague	GE Healthcare Bio-Science AB
Bürkerova komůrka	P-LAB
Türckův roztok	NYCOM a.s., 5x ředěn v destilované vodě
tkáňové medium MEM	Sigma
Injekční stříkačky 10 ml	B/Braun
Injekční stříkačky 2 ml	B/Braun

3.4.1.2. Materiál a chemikálie na izolace buněk z mléka

zkumavky polypropylenové	GAMA GROUP a.s.
Pasteurovy pipety	Wipak Medical
Türckuv roztok	NYCOM a.s., 5x ředěn v destilované vodě
Bürkerova komůrka	P-LAB
tkáňové medium MEM	Sigma
FTS	Gibco
trypanová modř	Sigma
trypanová modř ředěna v PBS 1: 4	

3.4.2. Metodika izolace buněk

3.4.2.1. Izolace mononukleárních leukocytů z krve

1. odběr krve – 30ml krve do nádobky s 0,3ml heparinu o koncentraci 1000j/ml (výsledná koncentrace heparinu = 10j/ml krve, heparizovanou krev zředit minimálně 1: 1 MEMem, nechat vytemperovat na laboratorní teplotu)
2. převrstvení na Ficoll-Paque – na 3ml Ficoll-Paque (laboratorní teplota) navrstvit cca 8ml krve (použít 15ml polystyrenové zkumavky)
3. centrifugace – 25min, 400g, 20°C
4. odstranění vrchní vrstvy plazmy i s mediem MEM až k prstenci buněk sterilní Pasteurovou pipetou
5. odsání prstence buněk (co nejméně ficollu) ze dvou zkumavek do jedné, doplnění pod okraj chladným mediem MEM, promíchání
6. centrifugace – 10min, 1000g, 4°C
7. promývání – slítí supernatantu, roztřepání, spojení buněk ze dvou zkumavek do jedné, doplnění pod okraj mediem MEM, centrifugace 10min, 500g, 4°C opakovat slítí, roztřepání, spojení dvou zkumavek do jedné, doplnění MEMem pod okraj zkumavky, centrifugace 10min, 500g, 4°C, slítí supernatantu, roztřepání, přidání 5ml MEM
8. inkubace 1h při 37°C, 5% CO₂ (uvolnění imunoglobulinů navázaných na buňky prostřednictvím Fc receptorů)

9. 3x promytí – stočení vzorků 10 min, 500g, 4°C – odstranění supernatantu, roztřepání, přidání MEMu pod okraj, promíchání
10. centrifugace 10min, 500g, 4°C
11. příprava buněčné suspenze v RPMI – slítí supernatantu promývání, roztřepání, přidání
5ml media RPMI
12. příprava vzorků pro počítání v Bürknerově komůrce – z promíchaného vzorku je odebráno 50 μ l suspenze buněk + 950 μ l Türkova roztoku, nechat stát cca 10 min (zlyžují erytrocyty)
13. Počítání v Bürknerově komůrce – je spočítáno 2x50 čtverců, výsledný počet buněk $\times 10^5$ = koncentrace buněk v ml výchozí suspenze
14. ředění na blastickou transformaci – požadovaná koncentrace buněk $1,33 \times 10^6$ buněk/ml (výsledný počet buněk v jedné jamce - 250 μ l je 2×10^5), stimulatory musí být 5x koncentrovanější (naředí se buňkami), ředidlo RPMI na blastickou transformaci
15. ředění na kultivaci v systému Transwell – požadovaná koncentrace buněk $1,1 \times 10^6$ buněk/ml (výsledná koncentrace buněk v kultuře 10^6 /ml), stimulatory musí být 10x koncentrovanější (naředí se buňkami), ředidlo RPMI na blastickou transformaci
16. ředění na ELISPOT – požadovaná koncentrace buněk $1,25 \times 10^6$ buněk/ml (výsledná koncentrace buněk v kultuře 10^6 /ml), stimulatory musí být 10x koncentrovanější (naředí se buněčnou suspenzí), ředidlo RPMI na imunoglobuliny
17. počítání životnosti – kapka buněčné suspenze + trypanová modř (mrtvé buňky mají porušenou buněčnou membránu, která dovoluje vstup barviva do buňky – mrtvé buňky jsou modré), počet mrtvých buněk se vyjadřuje v procentech

3.4.2.2. Izolace buněk z mléka

1. mléko je odebráno do polypropylenových zkumavek, vzorky jsou přepravovány na ledu a okamžitě zpracovány

2. buňky jsou izolovány čtyřmi promytími v mediu MEM + 10% FTS, centrifugace 10min při 4°C, 500g, supernatant je odstraněn a peleta resuspendována v MEM + 10% FTS
3. po poslední centrifugaci je peleta resuspendována 1ml RPMI
4. buňky jsou spočítány v Bürkerově komůrce (viz výše)

3.5. Kultivace buněk v systému Transwell

3.5.1. Materiál a chemikálie

FTS Gibco
 mikrokultivační destičky Corning Incorporated
 sterilní voda pro tkáňové kultury

stimulátory *Bacillus firmus* (formalizované bakterie), kmen CCM 2212, *Bacillus firmus* byl připraven kultivací na krevním agaru obsahujícím ovčí erythrocyty a 1% glukosu. Pro inokulaci a kultivaci je nejvhodnější pH = 7

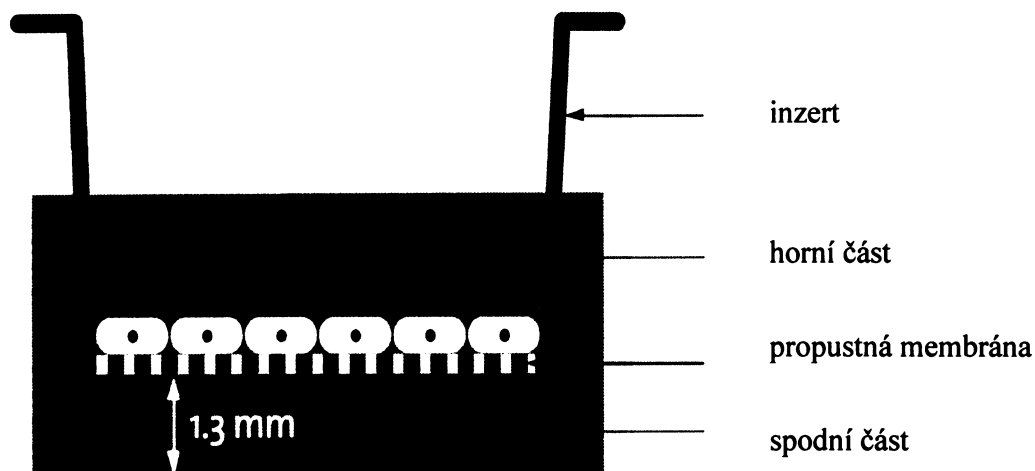
delipidovaný *Bacillus firmus* (DBF) byl získán extrakcí bakterií chloroform-methanolem (MÁRA *et al.* 1992)

fytohematoglutinin A Sigma
 koncentrace v kultuře pro stimulaci 10µg/ml

tkáňové medium RPMI pro kultivaci buněk v systému Transwell je suplementováno 0,2ml HEPES (0,002M), 1,2ml glutaminu (0,002M), 0,1ml gentamycinu (40mg/ml), 5ml FTS (0,05%), 96ml RPMI 1640

3.5.2. Metodika kultivace v systému Transwell

1. do jamek systému Transwellu je nanášeno 540µl buněčné suspenze o koncentraci $1,1 \times 10^6$ a 60µl stimulátoru (u kontrol 60µl media), inkubace 1h v termostatu při 37°C, 5% CO₂, poté je přidáno do insertů 0,1ml buněk mléka o koncentraci 10^5 buněk na ml, do kontrol se přidá 0,1ml media
2. kultivace dva dny v termostatu při 37°C, 5% CO₂ pro stanovení exprese cytokinů



Obr.5 Schematické znázornění jedné kultivační jamky a uspořádání experimentu.

3.6. Blastická transformace

3.6.1. Materiál a chemikálie

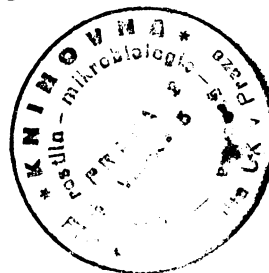
FTS	Gibco
mikrokultivační destičky	Becton Dickinson Labware
^3H thymidin	Lacomed
MeltiLex A	Wallac
filtrační papír Printed filtermat A	Wallac
stimulátory fytohemaglutinin A (PHA)	Sigma
konkanavalin A (ConA)	Sigma
<i>Bacillus firmus</i> (formalizované bakterie), viz výše	
delipidovaný <i>Bacillus firmus</i> (DBF), viz výše	
pokeweed mitogen PWM	Sigma

výsledná koncentrace v kultuře 1 $\mu\text{g/ml}$

Escherichia coli O86 inaktivovaná teplem, výsledná koncentrace 10⁹/ml

NDCM mitogen z delipidované *Nocardia Opaca* (BAROT-CIORBARU *et*

al. 1985) výsledná koncentrace v kultuře 100 $\mu\text{g/ml}$



medium RPMI pro kultivaci buněk na blastickou transformaci je suplementováno:
0,2ml HEPES (0,002M), 1,2ml glutaminu (0,002M), 0,1ml gentamycinu (40mg/ml), 5ml FTS (5%), 96ml RPMI 1640

3.6.2. Metodika kultivace buněk lymfocytů metodou blastických transformací

Do sterilních destiček na blastickou transformaci je napipetováno 50 μ l stimulatoru na jamku (u kontrol medium), 50 μ l mléka v různých ředěních (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) a 150 μ l buněčné suspenze o koncentraci $1,33 \times 10^6$ buněk na ml v tripletech, kultivace 3 dny v termostatu při 37°C, 5% CO₂, po 48h je přidán radioaktivně značený thymidin (³H) - 50 μ l na jamku, thymidin je 50x ředěn v RPMI na blastickou transformaci, ukončení kultivace po 16 – 18h zamražením v mediu, později zharvestováním přeneseno na filtr (Filtermat A) a promyto. Zatavení MeltiLexu a měření radioaktivity.

Množství inkorporovaného radioaktivně značeného thymidinu bylo změřeno na 1450 Microbeta Trilux

Výsledky byly statisticky zhodnoceny analýzou rozptylu ve statistickém programu NCSS.

3.7. Sledování změn genové exprese pomocí real-time PCR

3.7.1. Izolace RNA

3.7.1.1. Izolace RNA z celé krve

3.7.1.1.1. Materiál a chemikálie

kit na izolaci RNA z celé krve - PAXgene Blood RNA kit	PreAnalytiX
zkumavky na odběr krve - PAXgene Blood RNA Tube	PreAnalytiX
ethanol (96%)	PENTA

3.7.1.1.2. Metodika izolace RNA z celé krve

1. odebrání 2,5ml krve do zkumavky PAXgene Blood RNA Tube a 10x otočit dnem vzhůru (promíchání obsahu ve zkumavce s krví), inkubovat minimálně 2h při laboratorní teplotě k dosažení kompletní buněčné lýzy.
2. centrifugace 10min při 3500g (použit výkyvný rotor), odstranění supernatantu, osušení okraje zkumavky, přidání 5ml vody bez RNáz a uzavření zkumavky novým víčkem.
3. protřepání na vortexu, dokud není peleta viditelně rozpuštěna, centrifugace 10min při 3500g, supernatant je odstraněn
4. přidání 360 μ l pufru pro resuspendování (BR1) a vortexování, dokud není peleta rozpuštěna
5. vzorek je přenesen do 1,5ml centrifugační zkumavky, přidání 300 μ l pufru pro navázání RNA na kolonku (BR2) a 40 μ l proteinázy K, vortexovat a inkubace 10 min při 55°C ve vodní lázni, nejméně jednou během inkubace vzorek promíchat, teplota vzorku by neměla klesnout, nesmíchat BR2 a proteinázu K před přidáním do vzorku
6. vortexování vzorků 30s, centrifugace 10min při 17000g, supernatant je přenesen do nové 1,5 ml mikrozukavky
7. přidání 350 μ l 96% ethanolu, vortexování, centrifugování 1-2s, aby se odstranily kapky z víčka mikrozukavky
8. do kolonky PAXgene spin column je napipetováno 700 μ l vzorku, centrifugace 1min při 17000g, kolonka je přenesena do nové 2ml mikrozukavky
9. do kolonky je přidán zbytek vzorku, centrifugace 1min při 17000g, kolonka je přenesena do nové 2ml mikrozukavky
10. je přidáno 700 μ l promývacího pufru BR3, centrifugace 1min při 17000g, kolonka je přenesena do nové 2ml mikrozukavky
11. je přidáno 500 μ l promývacího pufru BR4, centrifugace 1min při 17000g, kolonka je přenesena do nové 2ml mikrozukavky
12. je přidáno 500 μ l BR4, centrifugace 3min při 17000g, kolonka je přenesena do nové 2ml mikrozukavky

13. kolonka je přenesena do nové 2ml mikrozkušavky, centrifugování 1min při 17000g, kolonka je přenesena do 1,5ml mikrozkušavky, je přidáno 40 μ l elučního roztoku BR5, centrifugování 1min při 14000g, aby se získala RNA
14. je přidáno dalších 40 μ l BR5, centrifugování 1min při 14000g
15. inkubování vzorku 5min ve vodní lázni při 65°C, po ukončení inkubace je vzorek zchlazen na ledu
16. kvalita izolované RNA byla ověřována elektroforézou ve 2% agarosovém gelu

3.7.1.2. Izolace RNA z buněk po kultivaci v systému

Transwell

3.7.1.2.1. Materiál a chemikálie

kit na izolaci RNA - RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
Ethanol 96%	PENTA
Ethanol 70%	Lékárna VFN
merkapt ethanol	Sigma

3.7.1.2.2. Metodika izolace RNA z buněk po kultivaci v systému Transwell

1. destička je po kultivaci centrifugována 10min, 450g, supernatant je odebrán, pelety v jamkách jsou resuspendovány 200 μ l lyzačního roztoku RLT (lyzační roztok s merkapt ethanol 100: 1)
2. vzorek ze dvou jamek je spojen do jedné 1,5ml mikrozkušavky a je přidáno 350 μ l 70% ethanolu, promíchat špičkou pipety
3. 700 μ l vzorku je napipetováno do kolonky RNease mini spin column a centrifugováno 1min při 17000g
4. supernatant je odstraněn a přidáno 700 μ l RW1, centrifugace 1min při 17000g
5. supernatant je odstraněn a přidáno 500 μ l promývacího roztoku RPE, centrifugace 1min při 17000g
6. supernatant je odstraněn a přidáno 500 μ l RPE a centrifugace 2min při 17000g

7. supernatant je odstraněn a kolonka je přenesena do nové mikrokumavky, centrifugace 1min při 17000g
8. kolonka je přenesena do nové 1,5ml mikrokumavky a je přidáno 30 μ l vody, centrifugace 1min při 14000g
9. je přidáno dalších 30 μ l vody, centrifugace 1min při 14000g
10. kvalita izolované RNA je ověřena elektroforézou ve 2% agarosovém gelu

3.7.2. Elektroforéza

3.7.2.1. Materiál a chemikálie

TAE (tris acetát)	Promega
agarosa (Type II: Medium EEO)	Sigma
ethidium bromid	Sigma

bromfenolová modř byla připravena smícháním bromfenolové modři (Sigma) s glycerolem (Sigma) a destilované vody v poměru 2: 1: 2

3.7.2.2. Metodika

Přítomnost izolované RNA byla ověřena elektroforézou ve 2% agarosovém gelu s přidaným ethidium bromidem (600mg agarosy a 30ml pufru TAE, 10 μ l ethidium bromidu). K 10 μ l vzorku byly přidány 3 μ l bromfenolové modři. Tato směs byla nanášena na gel a separována 15min při 120V. K vizualizaci gelu byl použit transluminátor a k upravení vyfoceního gelu počítačový program GeneSnap.

3.7.3. Reverzní transkripce

3.7.3.1. Materiál a chemikálie

kit pro reverzní transkripci - TaqMan kit	Applied Biosystems
sterilní voda pro tkáňové kultury	

3.7.3.2. Metodika

Do 0,2ml mikrozkušavek byly napipetovány jednotlivé reagenty pro reverzní transkripci v následujícím poměru (na 10μl výsledné cDNA):

voda	1,35μl
pufr pro reverzní transkripci	1μl
roztok MgCl ₂	2,2μl
směs dNTP	2μl
náhodné hexamery	0,5μl
inhibitor RNáz	0,2μl
enzym pro reverzní transkripci Multiscribe Reverse Transcriptase	0,25μl
izolovaná RNA	2,5μl

Termální režim reverzní transkripce:

10min 25°C

30min 48°C

10min 95°C

minimálně 5min při 4°C

3.7.4. Real-time PCR

3.7.4.1. Materiál a chemikálie

reakční směs pro PCR - TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
fluorescenčně značené sondy - TaqMan Gene Expression Assays	Applied Biosystems
96-jamkové destičky na PCR - 96 Well Reaction Plates	Applied Biosystems
víčka na destičky - Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
mikrozkušavky - Optical Tubes	Applied Biosystems
víčka na mikrozkušavky - Optical Caps	Applied Biosystems
sterilní voda pro tkáňové kultury	

3.7.4.2. Metodika real-time PCR

celkový objem reakční směsi pro PCR je 25 μ l, které obsahují:

6,25 μ l vody

12,5 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix

1,25 μ l sondy

5 μ l cDNA

termální režim PCR reakce:

2 minuty 50°C

10 minut 95°C

40 cyklů: denaturace při 95°C 15s

elongace při 60°C 60s

Byly použity TaqMan sondy značené na 5' konci fluorescenčním barvivem.

K vyhodnocení byl použit program 7300 System Software. Naměřené Ct hodnoty (cyklus, ve kterém fluorescence překročila určitou hodnotu) byly přeneseny do Excelu a vyjádřeny relativní kvantifikací.

3.8. Použité roztoky

substrát tetramethylbenzidin (TMB)

200mg 3, 3-, 5, 5-tetramethylbenzidinu (Sigma) rozpustit ve 135ml dimethylformamidu (PENTA), doplnit na 500ml destilovanou vodou, uchovávat v tmavé lahvi v lednici

citrátový pufr

2,94g citronanu sodného (LACHEMA) rozpustit v destilované vodě, pH upravit na 4,2 pomocí kyseliny citrónové (LACHEMA), doplnit destilovanou vodou na 100ml (0,1M roztok)

fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS)

v destilované vodě rozpustit:

NaCl (LACHEMA) 9,09g

Na₂HPO₄ x 12H₂O (LACHEMA) 1,2g

Na₂HPO₄ x 2H₂O (LACHEMA) 0,2g

pH = 7,2 – 7,4

doplnit destilovanou vodou na 1000ml

0,05% Tween

do 1000ml PBS přidat 0,5ml Tween 20 (Sigma)

blokovací roztok na ELISU

ve 100 ml PBS rozpustit:

sacharosa (LACHEMA)	5g
BSA – bovinní sérový albumin (Sigma)	1g
NaN ₃ (Sigma)	0,05g

ředící roztok TBS na vzorky mateřského mléka na ELISU

v destilované vodě rozpustit:

Trizma (Tris[hydroxymetyl]-aminomethan) (Sigma)	0,2423g (20mM)
NaCl (LACHEMA)	0,876g (150mM)

pomocí 2M HCl (PENTA) upravit pH na 7,3

přidat 0,05 ml Tween 20 (Sigma) a 0,1g BSA (Sigma)

doplnit destilovanou vodou na 100ml

substrát AEC (3-amino-9-ethylcarbazol)

30 mg AEC (Sigma) rozpustit v 0,5 ml dimethylformamidu (PENTA) + 90 ml acetátového pufru

vzniklá hnědá kalná tekutina se přefiltruje přes membránový filtr Millipore 0,45 µm a uchovává se rozplněná při -20°C (trochu vypadne z roztoku)

acetátový pufr

13,6g CH₃COONa . 3 H₂O (LACHEMA)+ 800 ml H₂O

pH upravit na 4,8 konc. kyselinou octovou (CHEMAPOL)

doplnit destilovanou vodou na 1000 ml

Uhličitanový pufr pH 9,6

0,1M NaHCO₃ 8,4g, doplnit na 1000ml destilovanou vodou

0,1M Na₂CO₃ 10,59g, doplnit na 1000ml destilovanou vodou

smíchat za kontroly pH metrem, aby bylo dosaženo pH 9,6

(1000ml NaHCO₃ se upraví cca 200ml Na₂CO₃)

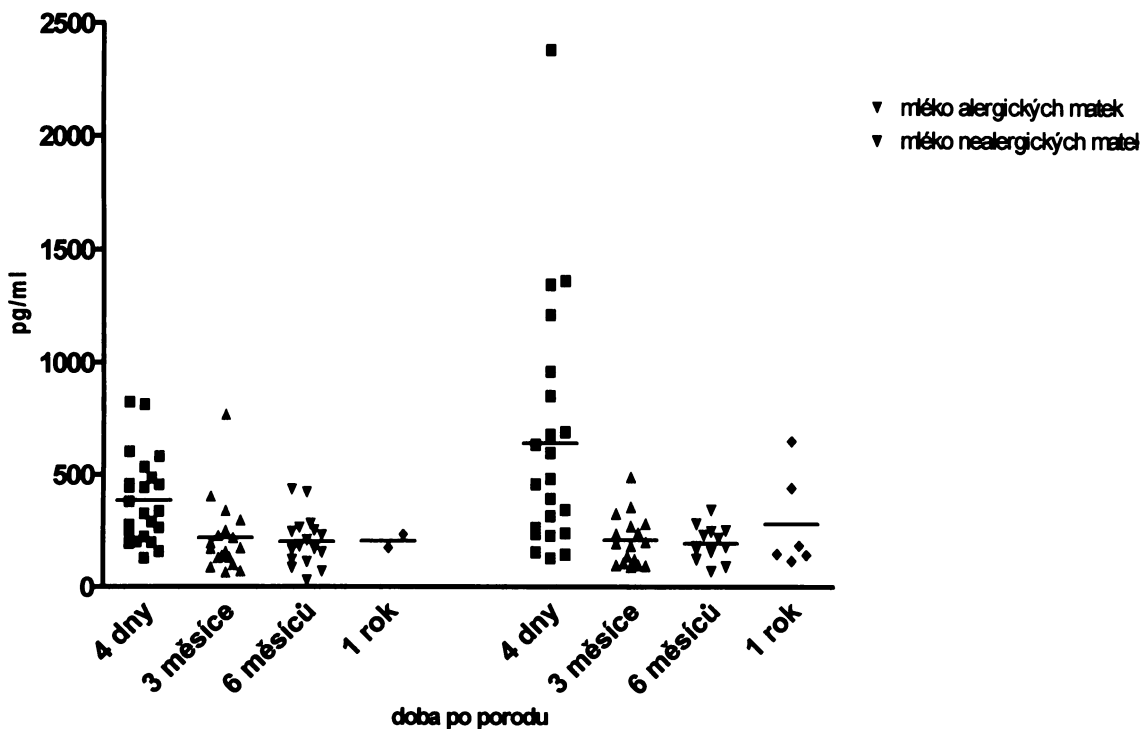
tkáňové medium pro kultivaci buněk v systému Transwell a blastické transformace

vortex Vortex-Genie 2, Scientific Industrie, Inc., USA
box s laminárním prouděním pro práci s buňkami EM BOX 180, MK SERVIS s.r.o., ČR
box pro molekulární biologii Box ABX 200, umima-ka, ČR
termostat pro kultivaci buněk s regulací CO₂ MCO-15AC, SANYO ELECTRIC Co.,
Ltd. Japonsko
binokulární lupa pro hodnocení metody ELISPOT
přístroj na sklízení buněk (harvester) HARVESTOR MACH III, TOMTECH, USA
měřicí zařízení pro detekci β-záření 1450 Microbeta Trilux (Liquid scintillation and
luminiscence counter), Wallace Oy, Finland
zátavovač Microsealer, Wallace Oy, Finland
zařízení na elektroforézu MINI-SUB CELL GT, BIO-RAD, USA
zdroj napětí pro elektroforézu Power Pac 200, BIO-RAD, USA
UV transiluminátor Transilluminator, BIO-RAD, USA
Software GENE-SNAP pro úpravy agarosových gelů po elektroforéze
 Genesis pro vyhodnocování metody ELISA
 7300 System Software pro vyhodnocování real-time PCR
centrifugy Universal 30 RF, Hettich, Německo
 Mikro 22R, Hettich, Německo
Cycler Petier Thermal Cycler - 200, MJ RESEARCH, Inc., USA
7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Singapur

4. VÝSLEDKY

4.1. Průkaz rozdílu ve složení mateřského mléka alergických a zdravých matek.

Na pracovišti byl již dříve zjištěn rozdíl v hladinách některých cytokinů v kolostru a mléce zdravých a alergických matek (PROKEŠOVÁ *et al.* 2006). Stanovení EGF doplňuje tyto analýzy. U kolostru nealergických matek je v průměru vyšší koncentrace EGF, ale tento rozdíl není statisticky významný, neboť je mezi individuálními hodnotami velký rozptyl (viz graf 1).



Graf 1. Stanovení EGF v mateřském mléce a kolostru metodou ELISA. Průměry jsou označeny přímkou a body označují individuální hodnoty. Ke statistickému zhodnocení byl použit Mann-Whitney test.

4.2. Ovlivnění proliferace buněk pupečnickové krve nebuněčnými složkami mateřského mléka

Pro posouzení vlivu mateřského kolostra/mléka na proliferaci buněk novorozence byly mononukleární leukocyty pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek kultivovány s různými polyklonálními aktivátory samotnými nebo v kombinaci s různými ředěními mateřského mléka a kolostra alergických a zdravých matek.

Byla zjištěna větší inkorporace ^3H thymidinu u nestimulovaných lymfocytů (kontroly) pupečnickové krve dětí alergických matek než u nealergických. Buňky pupečnickových krvinek dětí alergických matek byly daleko více stimulovány polyklonálními aktivátory než buňky dětí zdravých matek. Mléko signifikantně ovlivňovalo proliferaci jen v nejvyšších použitých koncentracích (konečná koncentrace mléka v kultuře 1 : 5) a to v negativním smyslu – proliferace byla snížena. Větší ředění mléka již neměla výraznější účinek, byla patrná určitá tendence ke zvyšování proliferace, ale rozdíly nebyly signifikantní. Nebyly zjištěny žádné výrazné rozdíly mezi působením alergického nebo zdravého mléka (kolostra) na proliferaci buněk pupečnickové krve.

Byla provedena kontrola životnosti buněk pupečnickové krve po kultivaci, aby se zjistilo, zda koncentrované mléko nepůsobí na novorozenecké lymfocyty toxicky. Životnosti buněk s koncentrovaným mlékem se pohybovaly mezi 91-97%, u kontrol bez přidaného mléka a stimulatoru od 87% do 95%.

Buňky pupečnickové krve dětí alergických matek byly kultivovány s mateřským mlékem a kolostrem nealergických i alergických matek. Z výsledků ze šesti až osmi dílčích pokusů v každé skupině byly vypočteny průměry a % stimulace, přičemž hodnoty nestimulovaných kontrol odpovídají 100%. (viz tab. 1). Rovněž tak byly zpracovány výsledky z kultivace buněk pupečnickové krve dětí nealergických matek s mateřským mlékem a kolostrem alergických a nealergických matek (viz tab. 2).

Tab. 1. Proliferace buněk pupečnickové krve dětí alergických matek kultivovaných s nebuněčnými složkami mateřského mléka prokazovaná inkorporací ³H-thymidinu

stimulátor	mléko	NK		AK		NM		AM	
		Průměr	%	Průměr	%	Průměr	%	Průměr	%
K		6544	100,0	8173	100,0	6359	100,0	6127	100,0
K	M konc.	6054	92,5	7112	87,0	3977	62,6	5265	85,9
K	M 1:10	10254	156,7	11892	145,5	8994	141,5	13362	218,1
K	M 1:100	9915	151,5	10384	127,1	8333	131,1	10521	171,7
K	M 1:1000	5512	84,2	5969	73,0	6286	98,9	6907	112,7
K	M 1:10000	5676	86,7	6046	74,0	6340	99,7	6138	100,2
PHA 10		238474	100,0	213118	100,0	263164	100,0	279739	100,0
PHA 10	M konc.	79538	33,4	71040	33,3	125460	47,7	118296	42,3
PHA 10	M 1:10	202767	85,0	169277	79,4	232880	88,5	247531	88,5
PHA 10	M 1:100	245840	103,1	200047	93,9	250581	95,2	265273	94,8
PHA 10	M 1:1000	233469	97,9	199722	93,7	249452	94,8	261357	93,4
PHA 10	M 1:10000	251618	105,5	198750	93,3	250582	95,2	261835	93,6
ConA 5		187884	100,0	188191	100,0	218814	100,0	232796	100,0
ConA 5	M konc.	23871	12,7	34282	18,2	65220	29,8	82161	35,3
ConA 5	M 1:10	114678	61,0	104951	55,8	181348	82,9	256139	110,0
ConA 5	M 1:100	195871	104,3	167786	89,2	212594	97,2	232747	100,0
ConA 5	M 1:1000	198731	105,8	166250	88,3	206976	94,6	207047	88,9
ConA 5	M 1:10000	199744	106,3	157906	83,9	201653	92,2	202166	86,8
DBF10		19769	100,0	23347	100,0	19560	100,0	28024	100,0
DBF10	M konc.	9455	47,8	14067	60,3	7087	36,2	8347	29,8
DBF10	M 1:10	19077	96,5	21070	90,3	17348	88,7	37282	133,0
DBF10	M 1:100	21911	110,8	21994	94,2	14875	76,1	32014	114,2
DBF10	M 1:1000	19277	97,5	21533	92,2	18868	96,5	27097	96,7
DBF10	M 1:10000	17790	90,0	21163	90,7	18426	94,2	26629	95,0
BF10		21077	100,0	28078	100,0	25586	100,0	27048	100,0
BF10	M konc.	9723	46,1	13288	47,3	8280	32,4	9978	36,9
BF10	M 1:10	18699	88,7	22205	79,1	18535	72,4	30978	114,5
BF10	M 1:100	23158	109,9	24007	85,5	21632	84,6	27833	102,9
BF10	M 1:1000	23117	109,7	24647	87,8	24859	97,2	32252	119,2
BF10	M 1:10000	24484	116,2	26382	94,0	25234	98,6	35093	129,7
ESC 10 ⁹		11090	100,0	16568	100,0	12232	100,0	16764	100,0
ESC 10 ⁹	M konc.	6657	60,0	8683	52,4	5245	42,9	5926	35,4
ESC 10 ⁹	M 1:10	12747	114,9	14651	88,4	12885	105,3	20105	119,9
ESC 10 ⁹	M 1:100	15149	136,6	16609	100,2	12720	104,0	18820	112,3
ESC 10 ⁹	M 1:1000	14326	129,2	17377	104,9	14445	118,1	18842	112,4
ESC 10 ⁹	M 1:10000	12962	116,9	15941	96,2	13095	107,1	19166	114,3
NDCM 10		42112	100,0	54878	100,0	50903	100,0	53766	100,0
NDCM 10	M konc.	9725	23,1	18376	33,5	8867	17,4	11581	21,5
NDCM 10	M 1:10	27744	65,9	33671	61,4	37675	74,0	48420	90,1
NDCM 10	M 1:100	39099	92,8	43293	78,9	46712	91,8	51744	96,2
NDCM 10	M 1:1000	41885	99,5	48088	87,6	49442	97,1	60337	112,2
NDCM 10	M 1:10000	43406	103,1	49823	90,8	51838	101,8	66837	124,3

K – kontrola, bez stimulantu a kolostra, PHA – fytohematoglutinin, ConA – konkanavalin A, DBF – delipidovaný *Bacillus firmus*, BF – *Bacillus firmus*, ESC – *Escherichia coli*, NDCM – mitogen z *Nocardia opaca* (Nocardia Delipidated Cell Mitogen), M – mateřské mléko, % - % stimulace – hodnoty nestimulovaných kontrol odpovídají 100%

NK – kolostrum zdravé matky

AK – kolostrum alergické matky

NM – mléko zdravé matky

AM – mléko alergické matky

Tab. 2. Proliferace buněk pupečnickové krve dětí nealergických matek kultivovaných s nebuněčnými složkami mateřského mléka prokazovaná inkorporací ³H-thymidinu

stimulátor	mléko	NK		AK		NM		AM	
		Průměr	%	Průměr	%	Průměr	%	Průměr	%
K		3274	100,0	3742	100,0	4318	100,0	3111	100,0
K	M konc.	2243	68,5	2175	58,1	1481	34,3	2820	90,7
K	M 1:10	3412	104,2	2968	79,3	4132	95,7	4760	153,0
K	M 1:100	3188	97,4	4080	109,0	3569	82,7	4145	133,2
K	M 1:1000	4304	131,5	2975	79,5	3584	83,0	2774	89,2
K	M 1:10000	3435	104,9	2292	61,2	2324	53,8	2292	73,7
PHA 10		148599	100,0	129915	100,0	140909	100,0	143768	100,0
PHA 10	M konc.	37876	25,5	45659	35,1	60736	43,1	56203	39,1
PHA 10	M 1:10	88094	59,3	115646	89,0	137364	97,5	129160	89,8
PHA 10	M 1:100	115834	78,0	137661	106,0	146020	103,6	137014	95,3
PHA 10	M 1:1000	137523	92,6	140212	107,9	166281	118,0	150320	104,6
PHA 10	M 1:10000	165655	111,5	148478	114,3	133776	94,9	151608	105,5
ConA 5		98163	100,0	88431	100,0	123395	100,0	104551	100,0
ConA 5	M konc.	15023	15,3	20272	22,9	71057	57,6	50076	47,9
ConA 5	M 1:10	84576	86,2	61397	69,4	114575	92,9	116435	111,4
ConA 5	M 1:100	107147	109,2	84544	95,6	134485	109,0	109053	104,3
ConA 5	M 1:1000	88658	90,3	78435	88,7	93021	75,4	93953	89,9
ConA 5	M 1:10000	91500	93,2	76095	86,1	80541	65,3	95979	91,8
DBF10		8751	100,0	6549	100,0	7929	100,0	8584	100,0
DBF10	M konc.	3688	42,2	2388	36,5	2660	33,6	3563	41,5
DBF10	M 1:10	6970	79,6	5517	84,2	9136	115,2	11026	128,5
DBF10	M 1:100	7433	84,9	7523	114,9	10375	130,9	11795	137,4
DBF10	M 1:1000	9267	105,9	7425	113,4	10622	134,0	11427	133,1
DBF10	M 1:10000	9692	110,8	7552	115,3	9886	124,7	11479	133,7
BF10		9964	100,0	8429	100,0	10270	100,0	11389	100,0
BF10	M konc.	6238	62,6	4659	55,3	5025	48,9	5553	48,8
BF10	M 1:10	12571	126,2	7585	90,0	13375	130,2	13990	122,8
BF10	M 1:100	12812	128,6	9535	113,1	12987	126,5	15683	137,7
BF10	M 1:1000	9620	96,6	8505	100,9	12506	121,8	14767	129,7
BF10	M 1:10000	9414	94,5	8353	99,1	11542	112,4	13392	117,6
ESC 10 ⁹		5023	100,0	4440	100,0	4642	100,0	5346	100,0
ESC 10 ⁹	M konc.	2718	54,1	2350	52,9	2408	51,9	2972	55,6
ESC 10 ⁹	M 1:10	5408	107,7	3935	88,6	5647	121,6	5865	109,7
ESC 10 ⁹	M 1:100	4927	98,1	4845	109,1	6637	143,0	6386	119,5
ESC 10 ⁹	M 1:1000	4745	94,5	4492	101,2	6506	140,2	6591	123,3
ESC 10 ⁹	M 1:10000	4943	98,4	4258	95,9	5966	128,5	5716	106,9
NDCM 10		13192	100,0	11687	100,0	21268	100,0	22831	100,0
NDCM 10	M konc.	4204	31,9	5985	51,2	3681	17,3	4767	20,9
NDCM 10	M 1:10	9778	74,1	8616	73,7	17263	81,2	18621	81,6
NDCM 10	M 1:100	10581	80,2	12724	108,9	22831	107,4	25690	112,5
NDCM 10	M 1:1000	14910	113,0	14428	123,5	27077	127,3	28402	124,4
NDCM 10	M 1:10000	19019	144,2	15089	129,1	22075	103,8	27387	120,0

K – kontrola, bez stimulátoru a kolostra, PHA – fytohematoglutinin, ConA – konkanavalin A, DBF – delipidovaný *Bacillus firmus*, BF – *Bacillus firmus*, ESC – *Escherichia coli*, NDCM – mitogen z *Nocardia opaca* (Nocardia Delipidated Cell Mitogen), M – mateřské mléko, % - , % - % stimulace – hodnoty nestimulovaných kontrol odpovídají 100%

NK – kolostrum zdravé matky

AK – kolostrum alergické matky

NM – mléko zdravé matky

AM – mléko alergické matky

Bylo statisticky zhodnoceno, zda se liší proliferace pupečnickových lymfocytů dětí alergických a zdravých matek při kultivaci se stejným typem mléka (od alergické nebo zdravé matky) respektive kolostra. Ve sloupcích označených 1, 2, 3, 4 v tab. 3 je p hodnota statistické funkce t-test vyjádřená na tři desetinná místa. Jak je vidět, je velmi výrazný rozdíl v proliferaci novorozeneckých lymfocytů dětí alergických matek ve srovnání s dětmi nealergických matek.

Tab. 3. Stanovení statistické významnosti rozdílů proliferace buněk pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek při kultivaci s různými ředěními mateřského mléka (kolostra) alergických či zdravých matek.

stimulátor	mléko	1(p)	2(p)	3(p)	4(p)
K		0,003	0,003	0,003	0,003
K	M konc.	0,075	0,046	0,167	0,213
K	M 1:10	0,080	0,050	0,188	0,124
K	M 1:100	0,049	0,055	0,066	0,050
K	M 1:1000	0,730	0,223	0,392	0,083
K	M 1:10000	0,373	0,088	0,100	0,088
PHA 10		0,000	0,000	0,000	0,000
PHA 10	M konc.	0,063	0,069	0,111	0,026
PHA 10	M 1:10	0,063	0,233	0,025	0,011
PHA 10	M 1:100	0,033	0,184	0,015	0,003
PHA 10	M 1:1000	0,099	0,151	0,033	0,049
PHA 10	M 1:10000	0,275	0,277	0,007	0,062
ConA 5		0,000	0,000	0,000	0,000
ConA 5	M konc.	0,325	0,246	0,886	0,102
ConA 5	M 1:10	0,363	0,100	0,078	0,002
ConA 5	M 1:100	0,143	0,067	0,057	0,019
ConA 5	M 1:1000	0,085	0,030	0,005	0,003
ConA 5	M 1:10000	0,093	0,050	0,003	0,004
DBF10		0,000	0,000	0,000	0,000
DBF10	M konc.	0,079	0,003	0,094	0,079
DBF10	M 1:10	0,035	0,009	0,106	0,103
DBF10	M 1:100	0,036	0,015	0,382	0,049
DBF10	M 1:1000	0,124	0,009	0,071	0,051
DBF10	M 1:10000	0,118	0,011	0,041	0,029
BF10		0,000	0,000	0,000	0,000
BF10	M konc.	0,256	0,002	0,205	0,046
BF10	M 1:10	0,273	0,016	0,261	0,131
BF10	M 1:100	0,080	0,008	0,069	0,118
BF10	M 1:1000	0,030	0,009	0,028	0,049
BF10	M 1:10000	0,017	0,008	0,003	0,002
ESC 10 ⁹		0,000	0,000	0,000	0,000
ESC 10 ⁹	M konc.	0,105	0,019	0,207	0,104
ESC 10 ⁹	M 1:10	0,117	0,035	0,112	0,069
ESC 10 ⁹	M 1:100	0,066	0,040	0,220	0,063
ESC 10 ⁹	M 1:1000	0,056	0,031	0,090	0,060
ESC 10 ⁹	M 1:10000	0,071	0,035	0,109	0,028
NDCM 10		0,000	0,000	0,000	0,000
NDCM 10	M konc.	0,242	0,054	0,207	0,106
NDCM 10	M 1:10	0,081	0,072	0,171	0,041
NDCM 10	M 1:100	0,056	0,068	0,134	0,100
NDCM 10	M 1:1000	0,087	0,048	0,138	0,065
NDCM 10	M 1:10000	0,099	0,058	0,034	0,030

K – kontrola, bez stimulantu a bez kolostra, PHA – fytohematoglutinin, ConA – konkanavalin A, DBF – delipidovaný *Bacillus firmus*, DF – *Bacillus firmus*, ESC – *Escherichia coli*, NDCM – mitogen z *Nocardia opaca* (Nocardia Delipidated Cell Mitogen), M – mateřské mléko, p – dosažená hladina t-testu

1 – statistické zhodnocení kultivace pupečnickových buněk dětí alergických a zdravých matek s nealergickým kolostrem

2 - statistické zhodnocení kultivace pupečnickových buněk dětí alergických a zdravých matek s alergickým kolostrem

3 - statistické zhodnocení kultivace pupečnickových buněk dětí alergických a zdravých matek s nealergickým mlékem

4 - statistické zhodnocení kultivace pupečnickových buněk dětí alergických a zdravých matek s alergickým mlékem

V následující tabulce (tab. 4) je statisticky zhodnocen vliv koncentrace mateřského mléka na změnu proliferace pupečnickových lymfocytů. Hodnoty inkorporace ^3H thymidinu v kulturách s různými ředěními mléka byly porovnávány s hodnotou kultury bez přidaného mléka pro daný stimulant. U kultur bez přidaného polyklonálního stimulantu byly hodnoty inkorporace ^3H thymidinu porovnávány s hodnotou v kultuře bez přidaného mléka a stimulantu. Statisticky významné hodnoty jsou zpravidla v kulturách, kde bylo přidáno koncentrované mateřské mléko.

Tab. 4. Statistické zhodnocení vlivu koncentrace přidaného mateřského mléka ke kultuře na proliferaci.

stimulátor	mléko	1	2	3	4	5	6	7	8
K									
K	M konc.	0,141	0,387	0,716	0,862	0,015	0,555	0,154	0,193
K	M 1:10	0,509	0,213	0,315	0,204	0,724	0,408	0,873	0,636
K	M 1:100	0,497	0,191	0,289	0,218	0,961	0,725	0,659	0,668
K	M 1:1000	0,868	0,941	0,519	0,720	0,984	0,339	0,833	0,639
K	M 1:10000	0,863	0,764	0,605	0,712	0,157	0,153	0,917	0,285
PHA 10									
PHA 10	M konc.	0,006	0,000	0,000	0,000	0,006	0,001	0,000	0,000
PHA 10	M 1:10	0,505	0,918	0,359	0,089	0,926	0,642	0,100	0,177
PHA 10	M 1:100	0,978	0,695	0,906	0,269	0,839	0,848	0,448	0,879
PHA 10	M 1:1000	0,953	0,833	0,722	0,212	0,248	0,702	0,912	0,992
PHA 10	M 1:10000	0,980	0,834	0,998	0,264	0,708	0,681	0,481	0,647
ConA 5									
ConA 5	M konc.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,416	0,002	0,000	0,000
ConA 5	M 1:10	0,274	0,096	0,015	0,002	0,735	0,686	0,349	0,021
ConA 5	M 1:100	0,903	0,566	0,800	0,319	0,363	0,865	0,907	0,247
ConA 5	M 1:1000	0,941	0,920	0,845	0,231	0,628	0,712	0,587	0,144
ConA 5	M 1:10000	0,804	0,760	0,860	0,185	0,219	0,764	0,678	0,115
DBF10									
DBF10	M konc.	0,000	0,000	0,001	0,011	0,000	0,009	0,103	0,000
DBF10	M 1:10	0,242	0,315	0,464	0,745	0,662	0,330	0,747	0,232
DBF10	M 1:100	0,131	0,283	0,897	0,905	0,375	0,305	0,925	0,902
DBF10	M 1:1000	0,343	0,500	0,312	0,804	0,341	0,269	0,766	0,887
DBF10	M 1:10000	0,237	0,465	0,142	0,737	0,457	0,272	0,634	0,924
BF10									
BF10	M konc.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,006	0,113	0,017
BF10	M 1:10	0,091	0,595	0,099	0,497	0,315	0,343	0,572	0,292
BF10	M 1:100	0,339	0,732	0,523	0,714	0,334	0,206	0,545	0,863
BF10	M 1:1000	0,859	0,375	0,540	0,846	0,519	0,200	0,930	0,611
BF10	M 1:10000	0,908	0,081	0,803	0,873	0,610	0,259	0,878	0,488
ESC 10 ⁹									
ESC 10 ⁹	M konc.	0,003	0,001	0,012	0,051	0,009	0,078	0,055	0,010
ESC 10 ⁹	M 1:10	0,760	0,407	0,743	0,914	0,648	0,621	0,630	0,408
ESC 10 ⁹	M 1:100	0,756	0,448	0,844	0,618	0,325	0,408	0,947	0,999
ESC 10 ⁹	M 1:1000	0,953	0,428	0,975	0,522	0,382	0,305	0,957	0,781
ESC 10 ⁹	M 1:10000	0,790	0,336	0,753	0,706	0,566	0,579	0,962	0,615
NDCM 10									
NDCM 10	M konc.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,011
NDCM 10	M 1:10	0,206	0,855	0,041	0,171	0,992	0,860	0,046	0,015
NDCM 10	M 1:100	0,729	0,926	0,374	0,579	0,542	0,477	0,072	0,237
NDCM 10	M 1:1000	0,918	0,451	0,531	0,839	0,353	0,363	0,488	0,498
NDCM 10	M 1:10000	0,920	0,198	0,586	0,951	0,568	0,428	0,713	0,649

K – kontrola, bez stimulátoru a bez kolostra, PHA – fytohematoglutinin, ConA – konkanavalin A, DBF – delipidovaný *Bacillus firmus*, DF – *Bacillus firmus*, ESC – *Escherichia coli*, NDCM – mitogen z *Nocardia opaca* (Nocardia Delipidated Cell Mitogen), M – mateřské mléko

1 – kultivace buněk pupečnickové krve dětí alergických matek s nebuněčnými složkami mateřského mléka zdravých matek

2 - kultivace buněk pupečnickové krve dětí alergických matek s nebuněčnými složkami mateřského mléka alergických matek

3 - kultivace buněk pupečnickové krve dětí alergických matek s nebuněčnými složkami kolostra zdravých matek

4 - kultivace buněk pupečnickové krve dětí alergických matek s nebuněčnými složkami kolostra alergických matek

5 - kultivace buněk pupečnickové krve dětí nealergických matek s nebuněčnými složkami mateřského mléka zdravých matek

6 - kultivace buněk pupečnickové krve dětí nealergických matek s nebuněčnými složkami mateřského mléka alergických matek

7 - kultivace buněk pupečnickové krve dětí nealergických matek s nebuněčnými složkami kolostra nealergických matek

8 - kultivace buněk pupečnickové krve dětí nealergických matek s nebuněčnými složkami kolostra alergických matek

4.3. Ovlivnění produkce imunoglobulinů buněk pupečnickových krví dětí nebuněčnými složkami mateřského mléka.

Vliv mateřského mléka na tvorbu Ig buňkami novorozence byl studován metodou ELISPOT, která umožňuje stanovit jednotlivé buňky produkující Ig. V tomto případě nelze použít průkaz tvořených Ig v supernatantu kultur, protože v mléce ke kulturám přidávaném jsou Ig ve značném množství. Byl srovnáván vliv kolostra a zralého mléka (6 měsíční mléko) zdravých a alergických matek na pupečnickové lymfocyty dětí zdravých nebo alergických matek.

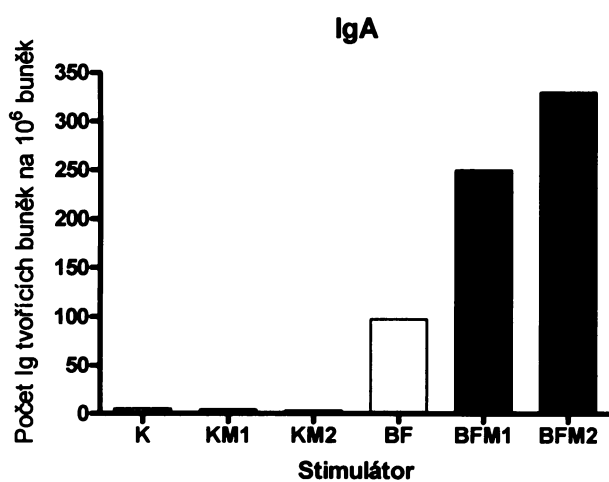
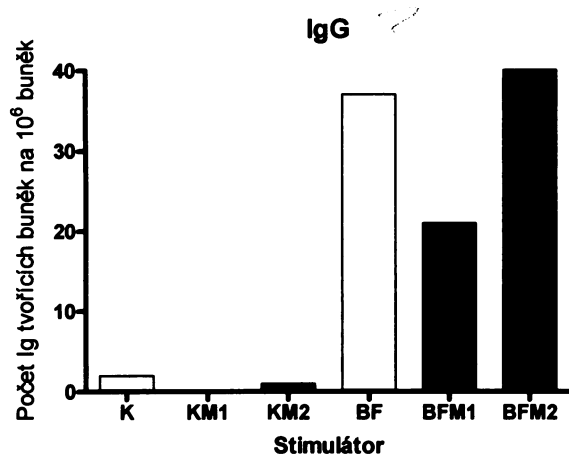
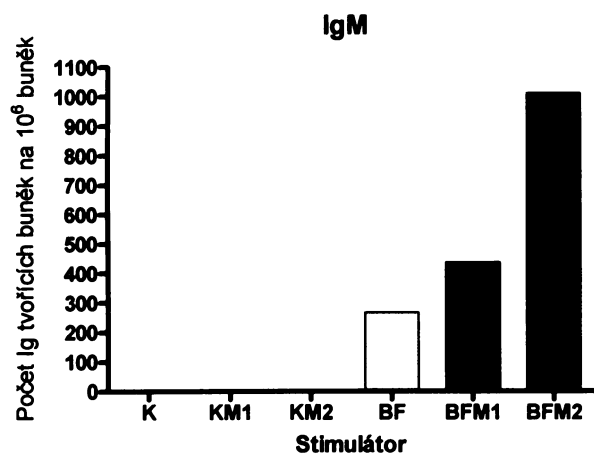
V nestimulované kultuře je prokazatelné jen malé množství buněk tvořících Ig a toto množství se podstatně nemění při kultivaci buněk s mlékem. V kulturách u nestimulovaných novorozeneckých lymfocytů je podstatně nižší tvorba IgG u buněk pupečnickových krví dětí alergických matek.

Produkce Ig buňkami pupečnickové krve kultivovanými s nebuněčnými složkami mléka (kolostra) bez polyklonálních stimulatorů nebyla zvýšena, byla stejná s produkcí Ig u nestimulovaných kontrol.

Při stimulaci kultur se silným polyklonálním aktivátorem B lymfocytů, kterým je v našem případě formolizovaný *Bacillus firmus* (BF), se zvýší počet buněk tvořících IgA a IgM přibližně stejně u buněk pupečnickových krví dětí alergických a zdravých matek. Kultury s BF nejsou výrazněji stimulovány k vyšší tvorbě IgG. V kulturách s BF nejsou zřetelné rozdíly v produkci Ig mezi novorozeneckými lymfocyty dětí alergických a zdravých matek.

Buňky pupečnickové krve dětí alergických matek byly kultivovány s nebuněčnými složkami kolostra zdravých a alergických matek. U IgA a IgM po stimulaci BF a přidání kolostra je výrazné zvýšení produkce imunoglobulinů, podobný trend nemůžeme sledovat u IgG (viz graf 2).

Kultivace buněk pupečníkové krve dětí alergických matek s nebuněčnými složkami kolostra.



Graf 2. Tvorba Ig pupečnickovými buňkami dítěte alergické matky a její ovlivnění kolostrem alergických a zdravých matek.

Prokazováno metodou ELISPOT

Průměrné hodnoty ze 3 samostatných pokusů

BF – *Bacillus firmus*, BFM – kultivace buněk se stimulem *Bacillus firmus* a s kolostrem zdravé nebo alergické matky, K – buňky pupečnickové krve kultivované bez ovlivnění kolostrem, M1 – kolostrum nealergické matky, M2 – kolostrum alergické matky

Nedošlo ke zřetelnému zvýšení tvorby imunoglobulinů po přidání mateřského mléka ke kultuře buněk pupečnickové krve dětí alergických matek. Mírné zvýšení produkce IgM novorozeneckými lymfocyty bylo možno sledovat po přidání mateřského mléka do kultury s BF, u IgA mléko produkci výrazně neovlivňuje. U IgG je velmi málo buněk tvořících IgG po stimulaci s polyklonálním aktivátorem a nepatrné zvýšení po přidání mléka nelze pokládat za významné (viz graf 3).

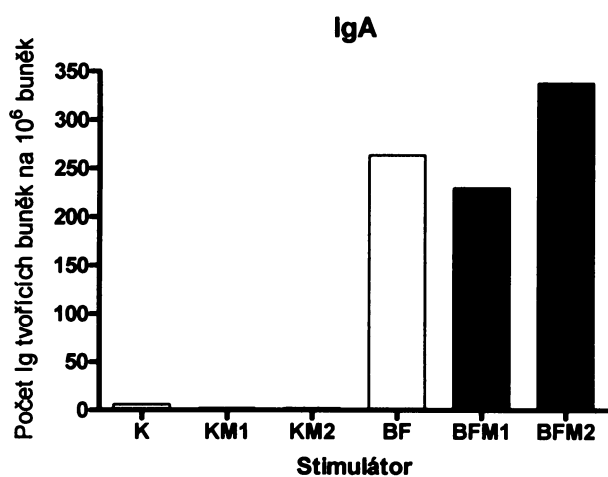
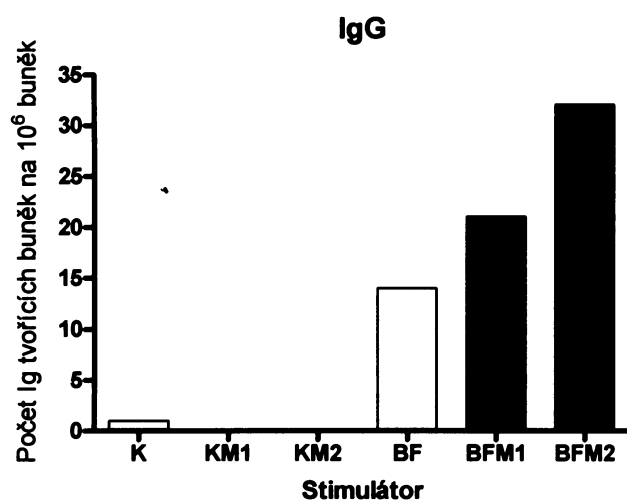
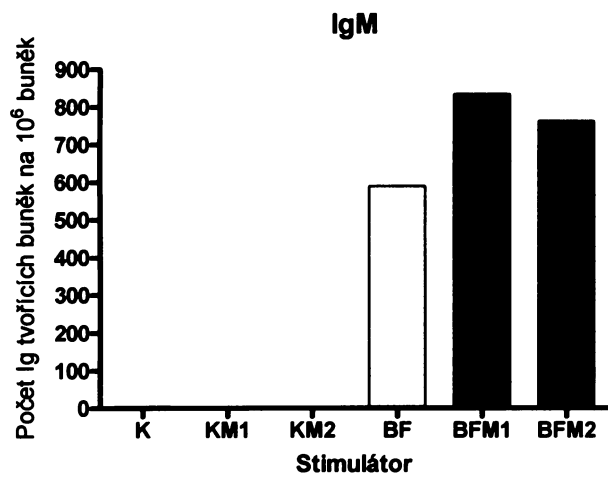
Graf 3. Tvorba Ig pupečnickovými buňkami dítěte alergické matky a její ovlivnění mateřským mlékem alergických a zdravých matek.

Prokazováno metodou ELISPOT

Průměrné hodnoty ze 3 samostatných pokusů

BF – *Bacillus firmus*, BFM – kultivace buněk se stimulem *Bacillus firmus* a s mateřským mlékem zdravé nebo alergické matky, K - buňky pupečnickové krve kultivované bez ovlivnění mateřským mlékem, M1 – mateřské mléko zdravých matek, M2 – mateřské mléko alergických matek

Kultivace buněk pupečníkové krve dětí alergických matek s nebuněčnými složkami mateřského mléka



Buňky pupečnickové krve dětí nealergických matek byly kultivovány s nebuněčnými složkami kolostra zdravých a alergických matek. U všech tříd Ig po stimulaci BF a přidání kolostra je výrazné zvýšení produkce imunoglobulinů ve srovnání s lymfocyty kultivovanými pouze s BF. V případě IgG jsou výsledky obtížně interpretovatelné vzhledem k vysokým hodnotám nestimulovaných kontrol (viz graf 4).

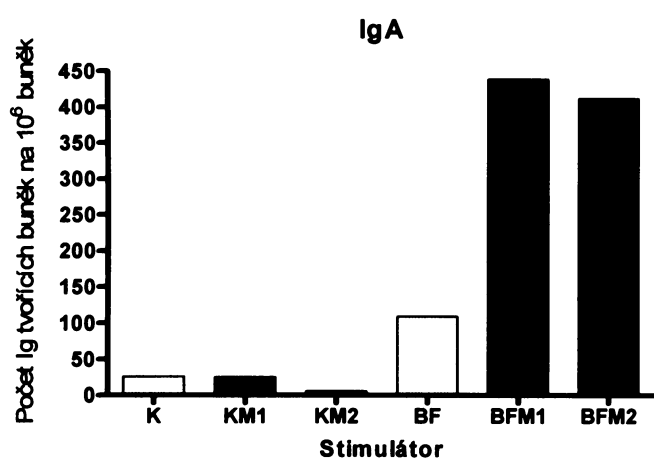
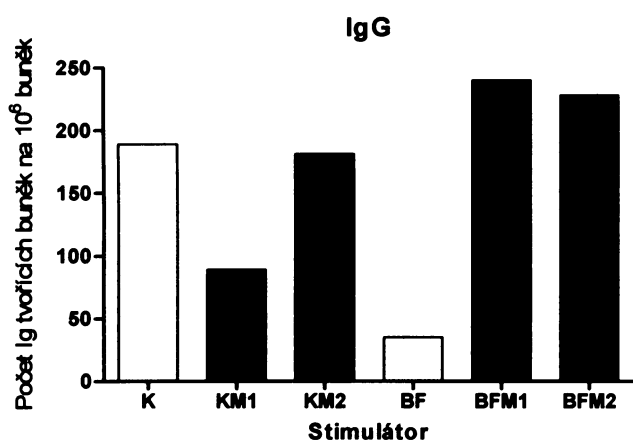
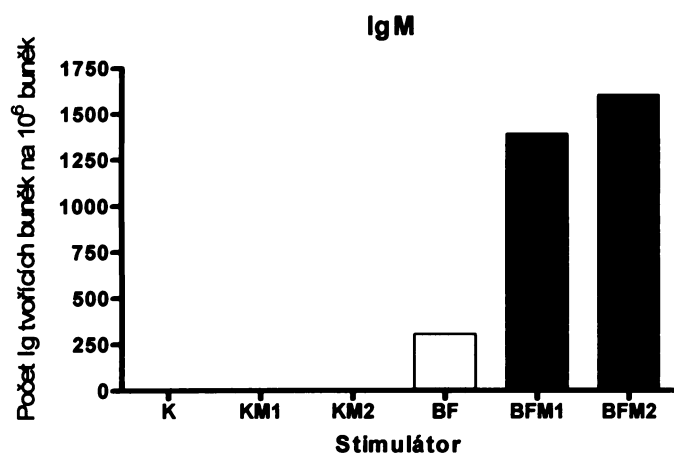
Graf 4. Tvorba Ig pupečnickovými buňkami dítěte nealergické matky a její ovlivnění kolostrem alergických a zdravých matek.

Prokazováno metodou ELISPOT

Průměrné hodnoty ze 3 samostatných pokusů

BF – *Bacillus firmus*, BFM – kultivace buněk se stimulátorem *Bacillus firmus* a s kolostrem zdravé nebo alergické matky, K - buňky pupečnickové krve kultivované bez ovlivnění mateřským mlékem, M1 – kolostrum zdravé matky, M2 – kolostrum alergické matky

Buňky pupečníkové krve dětí nealergických matek kultivovány s nebuněčnými složkami kolostra.



Buňky pupečnickové krve dětí nealergických matek byly kultivovány s nebuněčnými složkami mateřského mléka zdravých a alergických matek. U všech tříd Ig po stimulaci BF a přidání mateřského mléka lze pozorovat zvýšení produkce Ig. Nejvýraznější zvýšení je u IgM (viz graf 5).

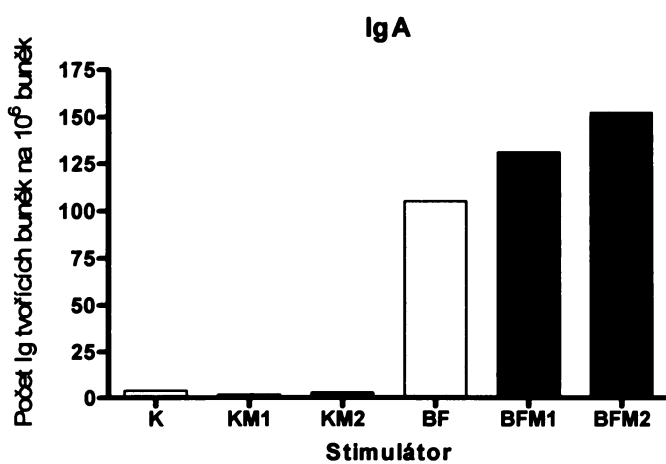
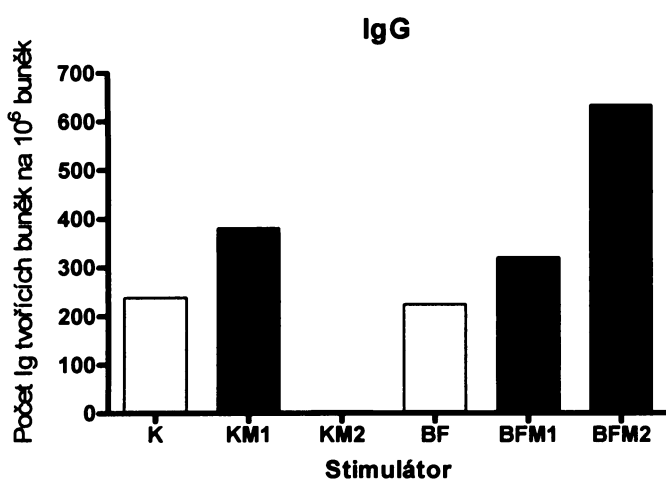
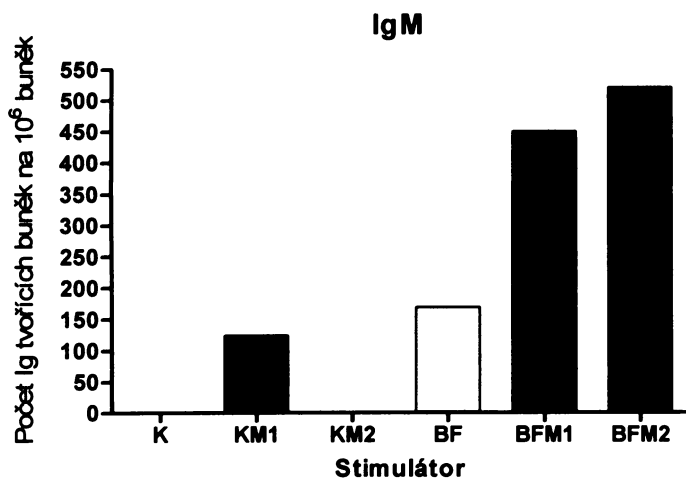
Graf 5. Tvorba Ig pupečnickovými buňkami dítěte nealergické matky a její ovlivnění mateřským mlékem alergických a zdravých matek.

Prokazováno metodou ELISPOT

Průměrné hodnoty ze 3 samostatných pokusů

BF – *Bacillus firmus*, BFM – kultivace buněk se stimulátorem *Bacillus firmus* a s mateřským mlékem zdravé nebo alergické matky, K - buňky pupečnickové krve kultivované bez ovlivnění mateřským mlékem, M1 – mateřské mléko zdravých matek, M2 – mateřské mléko alergických matek

Buňky pupečníkové krve dětí nealergických matek kultivovány s nebuněčnými složkami mateřského mléka.



Kolostrum přidané ke kultuře buněk pupečnickových krví při stimulaci polyklonálními aktivátory zvyšuje tvorbu Ig účinněji než mléko. Nejsou patrné rozdíly mezi účinkem kolostra (mléka) zdravých a alergických matek. V jednotlivých skupinách však není dostatečně velký soubor individuálních vzorků, aby bylo možné seriózní statistické zpracování.

Pro stimulaci pupečnickových lymfocytů byly použity i jiné polyklonální aktivátory (PWM a *E. coli*), ty však ve srovnání s BF stimulovaly podstatně méně, a proto v tomto případě nebylo možné dobře sledovat vliv mléka přidaného ke kultuře.

4.4. Vliv buněk mateřského mléka na změnu genové exprese buněk pupečnickové krve

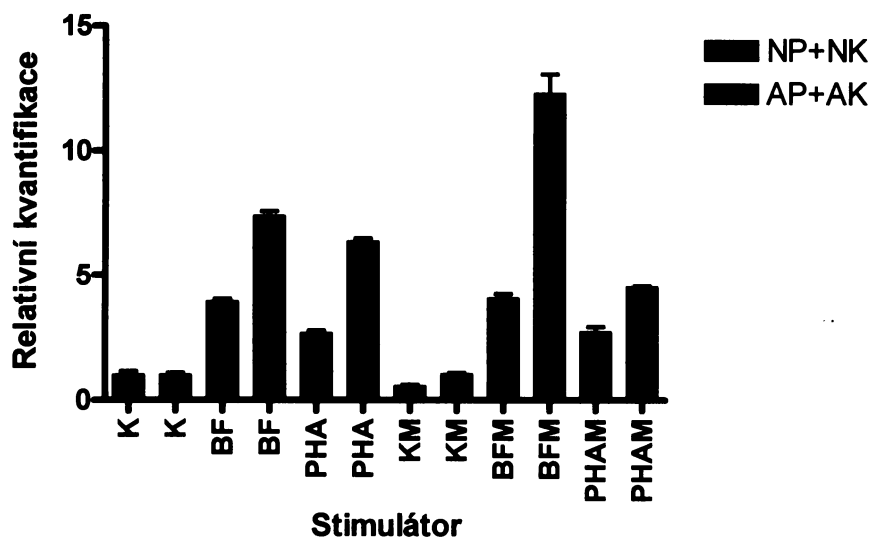
Ke sledování vlivu buněk mateřského mléka na změnu genové exprese cytokinů u buněk pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek byly buňky společně kultivovány. Protože jde o alogenní kombinaci buněk, použili jsme pro kultivaci systém Transwell, ve kterém jsou geneticky odlišné buňky od sebe odděleny membránou, která zabraňuje kontaktu buněk a dovoluje difúzi rozpustných molekul, tedy i látek, které jsou eventuelně uvolňovány mléčnými buňkami. Na dně jamek kultivačních destiček byly kultivovány novorozenecké lymfocyty. Do inzertů byly přidány buňky kolostra. Vzhledem k obtížnému získávání materiálu (mateřského mléka) a k malé výtěžnosti při izolaci buněk z kolostra a vzhledem k určité době, která byla zapotřebí k zavedení a optimalizaci metod používaných v těchto pokusech (kultivace v systému Transwell, izolace RNA, real-time PCR) není dostatečné množství výsledků ke korektnímu statistickému zhodnocení.

Jelikož se jedná o relativní kvantifikaci, proto nestimulovaná kontrola u novorozeneckých lymfocytů pupečnickové krve alergických a zdravých matek je rovna jedné. Buňky pupečnickové krve ovlivněné stimulatorem či produkty mléčných buněk nebo jejich kombinací jsou vztaženy k nestimulované kontrole.

Rozdíl v genové expresi pro IL-2 (viz graf 6.a) naznačuje rozdíl v reaktivitě mezi buňkami pupečnickové krve alergických a zdravých matek, což je ve shodě s vyšší inkorporací ³H thymidinu novorozeneckými lymfocyty dětí alergických matek při

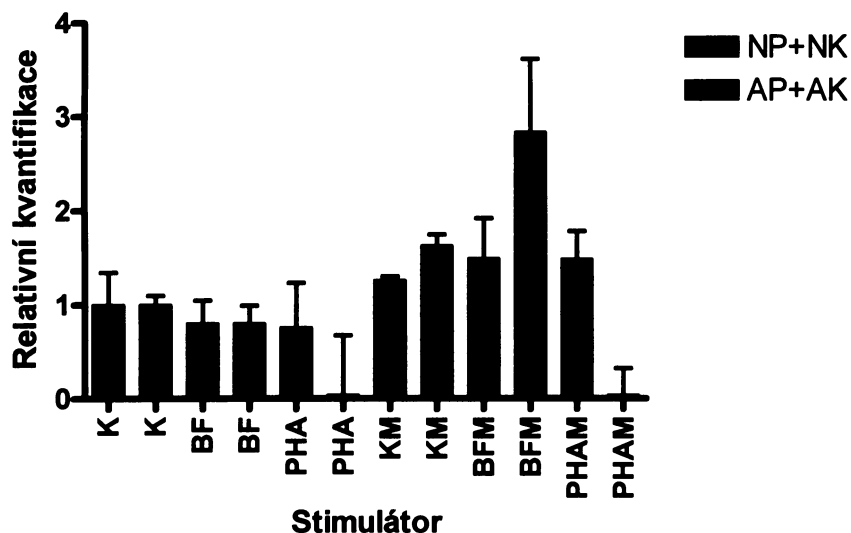
testování blastické transformace. Buňky pupečnickové krve dětí alergických matek jsou ovlivněny sekrečními produkty mléčných buněk nepravidelně, buňky pupečnickové krve dětí nealergických matek nejsou nikterak ovlivněny mléčnými buňkami.

Graf 6.a Změna genové exprese IL-2 v buňkách pupečnickové krve po ovlivnění produkty buněk mateřského mléka.



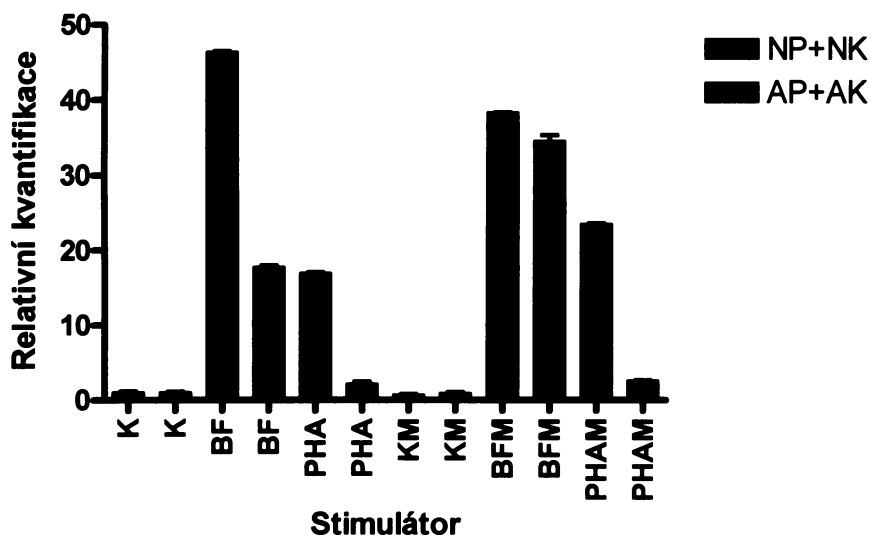
Genová exprese IL-4 je u buněk pupečnickové krve dětí alergických i zdravých matek mírně zvýšena sekrečními produkty mléčných buněk (viz graf 6.b)

Graf 6.b Změna genové exprese IL-4 v buňkách pupečnickové krve po ovlivnění produkty buněk mateřského mléka.



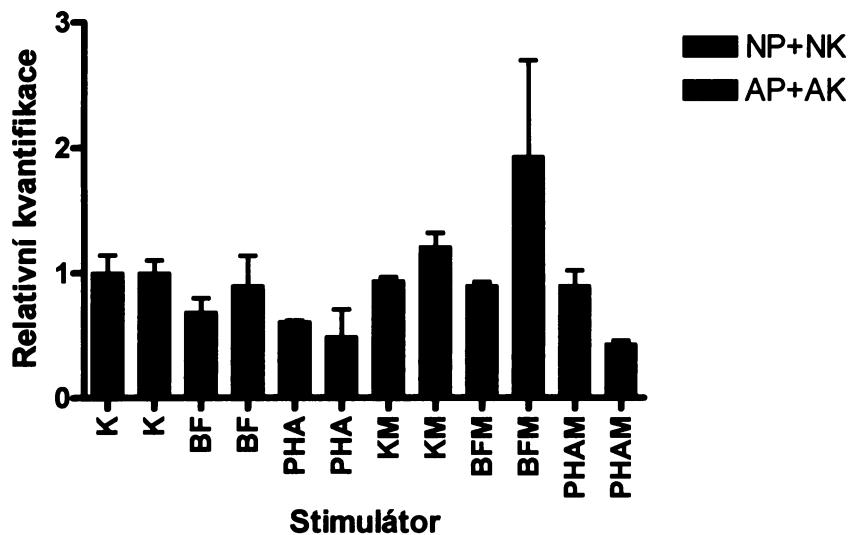
Buňky pupečnickové krve dětí alergických matek mají sníženou expresi IL-8 u buněk pupečnickové krve kultivovaných bez mléčných buněk, ale u lymfocytů pupečnickové krve s buňkami mléka je zvýšená exprese IL-8. U buněk pupečnickové krve dětí zdravých matek je poněkud snížená exprese IL-8 po kultivaci s buňkami mléka (viz graf 6.c). Vzhledem k malému počtu provedených pokusů lze jen těžko hodnotit dosažené výsledky.

Graf 6.c Změna genové exprese IL-8 v buňkách pupečnickové krve po ovlivnění produkty buněk mateřského mléka.



Pro IL-10 není žádná zřetelná změna genové exprese u buněk pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek. Rovněž ani po kultivaci s mléčnými buňkami není žádná výrazná změna genové exprese. U BFM je poněkud vyšší hodnota ale s velkou odchylkou (viz graf 6.d).

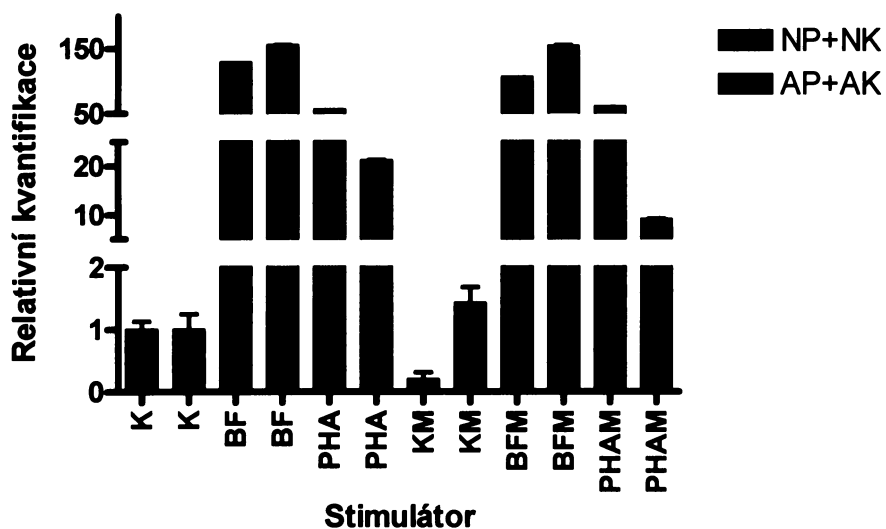
Graf 6.d Změna genové exprese IL-10 v buňkách pupečníkové krve po ovlivnění produkty buněk mateřského



mléka.

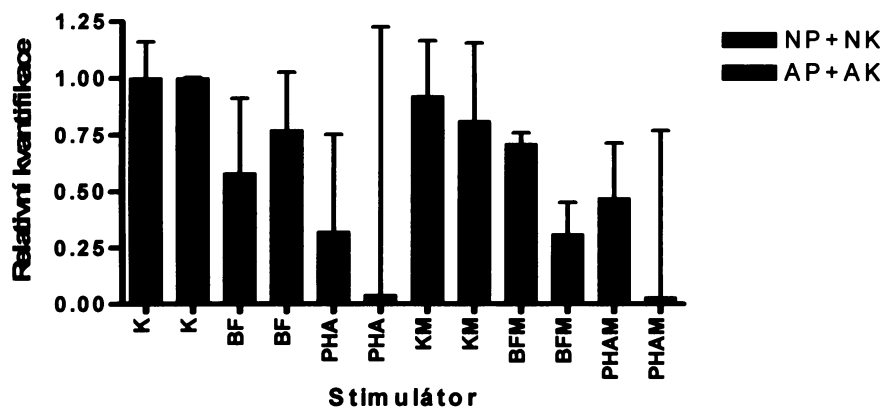
Buňky pupečníkové krve po stimulaci polyklonálními aktivátory exprimují velké množství IL-13. V genové expresi nejsou podstatné rozdíly mezi buňkami pupečníkové krve dětí alergických a zdravých matek. Kultivace buněk pupečníkové krve s mléčnými buňkami nemá žádný vliv na změnu genové exprese IL-13 (viz graf 6.e).

Graf 6.e Změna genové exprese IL-13 v buňkách pupečníkové krve po ovlivnění produkty buněk mateřského mléka.



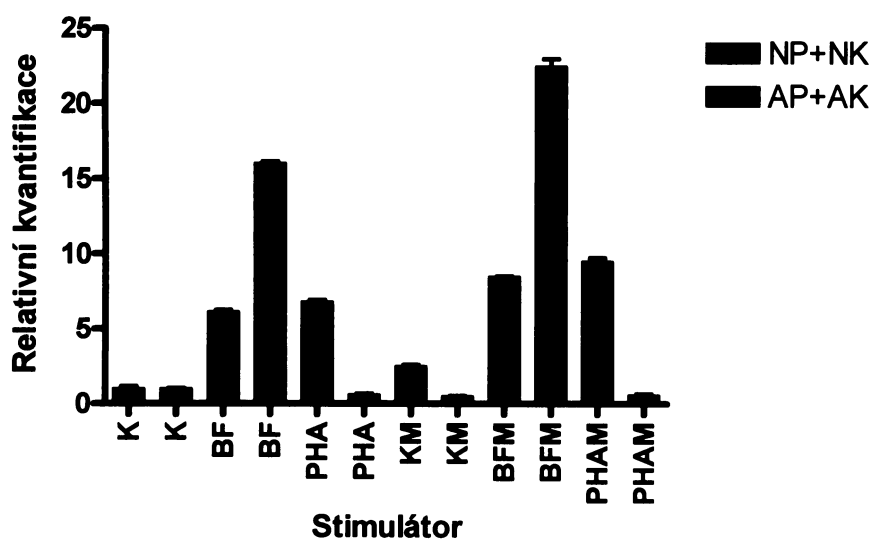
Stimulace buněk pupečníkové krve dětí alergických a zdravých matek BF a PHA má inhibiční vliv na genovou expresi EGF. Není žádný rozdíl mezi pupečnickovými buňkami dětí zdravých a alergických matek. Rovněž ani kultivace s buňkami kolostra výrazně nemění genovou expresi EGF u novorozeneckých lymfocytů (viz graf 6.f).

Graf 6.f Změna genové exprese EGF v buňkách pupečnickové krve po ovlivnění produkty buněk mateřského mléka.



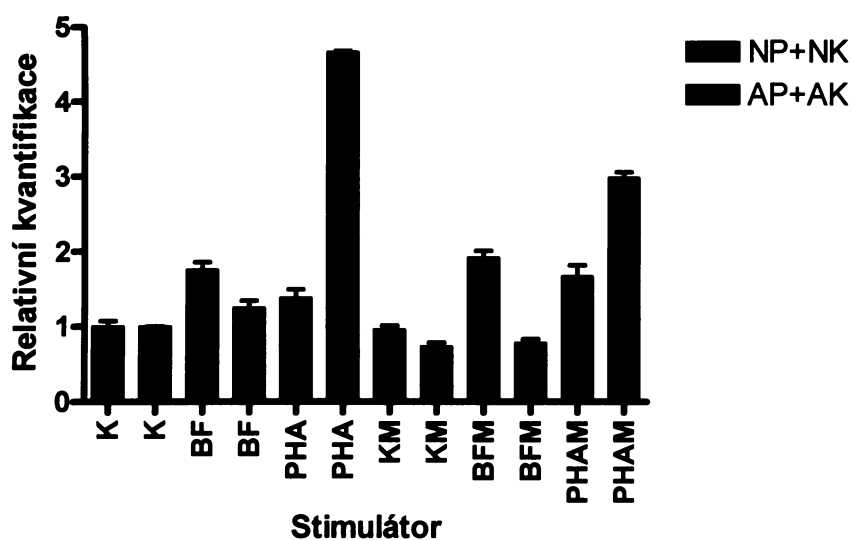
Na změnu genové exprese IFN- γ buněk pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek nemají vliv produkty mléčných buněk. BF způsobuje větší změnu genové exprese u buněk pupečnickové krve dětí alergických matek (viz graf 6.g).

Graf 6.g Změna genové exprese IFN- γ v buňkách pupečnickové krve po ovlivnění produkty buněk mateřského mléka.



U TGF- β nepozorujeme žádný vliv mléčných buněk na změnu genové exprese. PHA výrazně zvyšuje genovou expresi u AK (viz graf 6.h).

Graf 6.h Změna genové exprese TGF- β v buňkách pupečnickové krve po ovlivnění produkty buněk mateřského mléka.



NP+NK – buňky pupečnickové krve od nealergické matky kultivované v systému Transwell s buňkami kolostra od nealergické matky

AP+AK – buňky pupečnickové krve od alergické matky kultivované v systému Transwell s buňkami kolostra od alergické matky

K - kontrola, kultivace pouze buněk pupečnickové krve

BF - kultivace buněk pupečnickové krve se stimulátorem *Bacillus firmus*

PHA - kultivace buněk pupečnickové krve se stimulátorem fytohematoglutininem

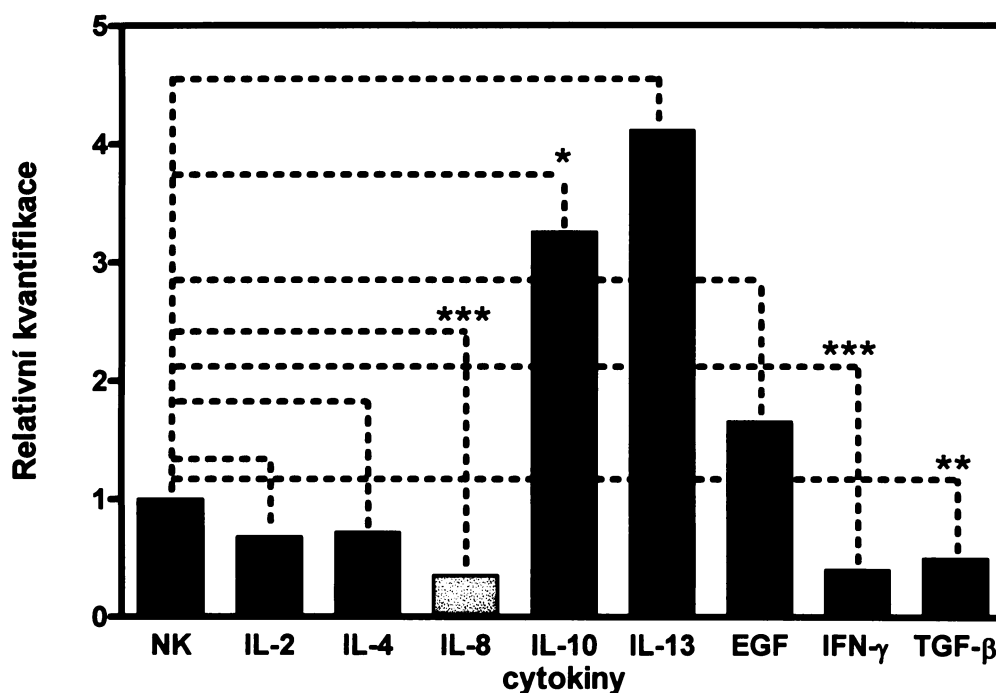
KM – kultivace buněk pupečnickové krve bez stimulantu s buňkami kolostra

BFM – kultivace buněk pupečnickové krve se stimulátorem *Bacillus firmus* a buňkami mateřského mléka

PHAM – kultivace buněk pupečnickové krve se stimulátorem fytohematoglutininem a buňkami mateřského mléka

4.5. Rozdíl v genové expresi buněk pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek

Genová exprese v nestimulovaných buňkách pupečnickové krve u jedenácti dětí alergických matek byla stanovena pomocí real-time PCR. Kvantitativní rozdíly jsou vyjádřeny na základě srovnání se směsným preparátem mRNA izolované z deseti různých vzorků pupečnickové krve dětí nealergických matek. IL-8, IFN-gama a TGF-beta jsou signifikantně sníženy u buněk pupečnickové krve dětí alergických matek, IL-10 je signifikantně zvýšen. U IL-13 je sice průměrná hodnota genové exprese u buněk pupečnickové krve dětí alergických matek výrazně vyšší než u nealergických, ale tento rozdíl není statisticky významný, neboť je mezi naměřenými relativními hodnotami změn genové exprese u buněk pupečnickové krve alergických matek značně velký rozptyl.



Graf 14. Rozdíl v genové expresi cytokinů IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, EGF, IFN- γ , TGF- β stanovený pomocí real-time PCR

Průměry analýz 11 vorků pupečnickových krvinek dětí alergických matek

NK = 1 pro všechny testované cytokiny (referenční hodnoty získané analýzou směsné mRNA izolované z buněk 10 vzorků pupečnickové krve dětí zdravých matek)

Jedna hvězdička představuje statisticky významný rozdíl v genové expresi buněk pupečnickové krve matek zdravých a alergických na hladině $\alpha \leq 0,05$. Dvě hvězdičky představují statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha \leq 0,01$. Tři hvězdičky představují statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha \leq 0,001$.

5. DISKUZE

Na pracovišti byly stanovovány cytokiny v mléce alergických a zdravých matek. Toto pracoviště se již dlouhou dobu zabývá vlivem mateřského mléka na rozvoj imunitního systému novorozence. Byly zjištěny rozdíly v koncentraci cytokinů mléka alergických a zdravých matek. V mléce alergických matek je vyšší zastoupení IL-4 a IL-10 (HANSON *et al.* 2005, PROKEŠOVÁ *et al.* 2006). Mateřské mléko má nejen pozitivní vliv na rozvoj imunitního systému novorozence, ale zajišťuje novorozenci optimální výživu a rovněž ho ochraňuje před infekčními antigeny zevního prostředí. Koncentrace EGF byla stanovována metodou ELISA v mléce a kolostru alergických a zdravých matek. EGF podporuje vyzrávání střevního epitelu (enterocytů) a kdyby koncentrace EGF byla nižší u mateřského mléka alergických matek, dalo by se předpokládat, že by u dětí kojených tímto mlékem mohl hůře vyvíjet střevní epitel, který by potom mohl být dostupnější pro zevní antigeny a to by mohlo usnadňovat alergizaci dítěte. Tato hypotéza nebyla potvrzena, ve výsledcích bylo možno sledovat jen tendenci k vyšším hodnotám EGF u mléka nealergických matek ve srovnání s alergickými matkami, ale rozdíly nebyly signifikantní.

Vliv mléka se neprojevuje jen ve střevě, některé složky mléka, i část bílkovin, mohou prostupovat neporušené střevní stěnou. U zvířat a nepřímo i u lidí byl prokázán dokonce i vstup buněk střevní sliznicí (HANSON *et al.* 2005). Proto byl studován vliv nebuněčných a buněčných složek mléka (kolostra) alergických a zdravých matek na pupečnickové buňky. Pupečnicková krev je jediným relativně dobře dostupným zdrojem leukocytů pro studium imunity perinatálního období. Kolostru (mléku) se připisuje imunosupresivní aktivita, a to je jedno z vysvětlení, proč se u kojených dětí méně často vyskytují alergická onemocnění, než u dětí nekojených. To zajisté platí u dětí zdravých matek, ale na vliv kolostra/mléka alergické matky na imunitu novorozence není jednotný názor. Při sledování vlivu nebuněčných složek mateřského mléka na tvorbu imunoglobulinů buňkami pupečnickové krve, jsme nepopsali supresi, naopak stimulaci především IgM a IgA. Tvorba IgG je celkově velmi malá, proto je těžké změny hodnotit. Tvorba Ig byla přibližně stejně ovlivněna zdravým i alergickým kolostrem/mlékem.

Mléko méně zvyšuje tvorbu Ig než kolostrum, neboť ve zralém mléce jsou zastoupeny imunologicky aktivní složky v menší koncentraci.

Při sledování vlivu nebuněčných složek mateřského mléka na proliferaci pupečnickových leukocytů při stimulaci polyklonálními stimulatory byla na rozdíl od stimulačního působení na tvorbu Ig prokázáno snížení inkorporace ^3H -thymidinu, avšak jen při nejvyšších použitých koncentracích mléka. Taková koncentrace mléka asi při situacích *in vivo* nepřichází v úvahu. Při větších ředěních bylo možno sledovat tendenci mateřského mléka ke zvýšení stimulace pupečnickových lymfocytů, ale tento trend nebyl statisticky významný. Nejsou rozdíly mezi mléky alergických a zdravých matek, ale mezi buňkami pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek. U alergických pupečnicků byla naměřena vyšší reaktivita při stimulaci polyklonálními aktivatory, ale i větší inkorporace u nestimulovaných buněk v kontrolní kultuře. Větší reakční pohotovost by mohla predisponovat k rozvoji alergie – nepřiměřené reakce.

Vliv mléčných buněk na produkci cytokinů pupečnickových lymfocytů byl měřen real-time PCR, aby výsledky nebyly ovlivněny mediatory uvolňovanými z mléčných buněk, jak by tomu bylo např. při průkazu cytokinů v supernatantech kultur. Vyšší hodnoty genové exprese pro IL-2 u buněk pupečnickových krvinek dětí alergických matek jsou ve shodě s vyšší pohotovostí těchto buněk k proliferaci. Odpovídá to výsledkům blastických transformací, kdy u buněk pupečnickových krvinek dětí alergických matek byla vyšší inkorporace ^3H thymidinu. Zvýšené hodnoty IL-4 by mohly podporovat rozvoj alergií, ale zvýšení je velmi nízké a asi

nemá praktický význam. Genová exprese IL-8 byla snížena po stimulaci polyklonálními aktivatory, produkty mléčných buněk zvyšují expresi IL-8 u pupečnickových lymfocytů. Buňky mléka alergických matek zvyšují expresi IL-8 u novorozeneckých lymfocytů více než mléčné buňky zdravého mléka. Je známo, že v alergickém mléce jsou vyšší hladiny IL-8 než ve zdravém mléce. Je možné se domnívat, že tam jsou i faktory podporující tvorbu IL-8 a ty, pokud by byly tvořeny buňkami mléka, by mohly zvyšovat expresi IL-8 v systému Transwell.

Změna v genové expresi IL-10 není výrazná, ani po kultivaci s polyklonálními aktivatory. Buňky mléka rovněž neovlivňují expresi IL-10 v buňkách pupečnickové krve.

Pomocí real-time PCR bylo prokázáno, že nestimulované buňky pupečnickové krve ihned po narození mají odlišnou expresi cytokinů u dětí zdravých a alergických matek. Bylo by možné v tom vidět fenotypický projev genetické predispozice. Pupečnickové buňky dětí alergických matek mají nižší expresi IL-8, IFN- γ a TGF- β . U lymfocytů dětí alergických matek je statisticky vyšší exprese IL-10. Exprese IL-13 je rovněž zvýšena, ale protože je mezi jednotlivými testovanými vzorky velký rozptyl, není tento rozdíl statisticky významný. Zjištěné rozdíly v expresi cytokinů naznačují výraznější ladění ve směru Th2 odpovědi u dětí alergických matek a sníženou tendenci k supresivním funkcím T lymfocytů, což obojí může napomáhat budoucímu rozvoji alergie.

Dosažené výsledky nenaznačují tomu, že by mléko alergických matek neblaze ovlivňovalo imunitní systém dítěte a že by kojení tímto mlékem napomáhalo rozvoji alergie. Rozdíly v reaktivitě a cytokinovém profilu pupečnickových lymfocytů u dětí zdravých a alergických matek představují patrně fenotypický projev genetických rozdílů mezi dětmi zdravých a alergických rodičů.

6. SOUHRN

Při zjišťování, zda je rozdíl v zastoupení EGF v mléce (kolostru) alergických a zdravých matek, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami průměrné koncentrace EGF v kolostru a ve zralém mléce alergických a zdravých matek z různé doby laktace, i když tendence k vyšším hodnotám u zdravých matek je patrná. Příčinou nedostatečné signifikace rozdílu je velký rozptyl individuálních hodnot..

Při prokazování vlivu nebuněčných složek mateřského mléka na tvorbu Ig u buněk pupečnickové krve dětí alergických a zdravých matek metodou ELISPOT byla naměřena vyšší produkce Ig po kultivaci novorozeneckých lymfocytů s polyklonálním aktivátorem B buněk – formolizovaným *Bacillus firmus* spolu s mateřským mlékem (kolostrem) ve srovnání se stimulací samotným polyklonálním aktivátorem. Nebyl zjištěn výrazný rozdíl mezi mlékem (kolostrem) alergických a zdravých matek ve vlivu na zvýšení tvorby Ig pupečnickovými lymfocyty. Bylo zjištěno, že kolostrum více zvyšuje tvorbu Ig než mateřské mléko. Buňky pupečnickové krve dětí zdravých matek tvoří výrazně více IgG jak při kultivaci nestimulovaných kontrol tak po stimulaci BF a mateřským mlékem ve srovnání s buňkami pupečnickové krve dětí alergických matek.

Výsledky získané měřením změny genové exprese při polyklonální aktivaci buněk pupečnickové krve po ovlivnění sekrečními produkty mléčných buněk prokazují snížení exprese EGF po kultivaci s buňkami mateřského mléka v systému Transwell. U IL-8 byla naměřena nižší hodnota genové exprese u lymfocytů dětí alergických matek kultivovaných v nepřítomnosti mléčných buněk, ale po kultivaci s buňkami mléka došlo k výraznému zvýšení exprese IL-8. Genová exprese IL-2 je vyšší u novorozeneckých lymfocytů dětí alergických matek než u zdravých. Produkty mléčných buněk nemají výrazný vliv na změnu genové exprese IL-2 novorozeneckých lymfocytů.

Při zjišťování, zda je nějaký rozdíl v ovlivnění proliferace novorozeneckých lymfocytů nebuněčnými složkami mateřského mléka zdravých nebo alergických matek a zda je proliferace ovlivněna stářím mléka, bylo zjištěno, že není výrazný rozdíl v působení zdravého a alergického mléka a podobně působí kolostrum i zralé mléko. Mléko bez ohledu na to, zda bylo od alergické nebo zdravé matky v koncentrované podobě výrazně snižovalo proliferaci buněk pupečnickové krve dětí alergických i zdravých matek. Ředěné mléko již nemělo významný vliv na snížení proliferace

novorozeneckých lymfocytů. Bylo ale zjištěno, že je rozdíl v reaktivitě samotných pupečnickových lymfocytů. Buňky pupečnickové krve dětí alergických matek měly vyšší hodnoty inkorporace ^3H thymidinu než novorozenecké lymfocyty dětí zdravých matek. Tento trend byl zřetelný i po kultivaci buněk s řadou stimulátorů.

Pomocí real-time PCR byla prokázána nižší exprese TGF- β u buněk pupečnickové krve dětí alergických matek než u zdravých, což by mohlo působit zhoršení podmínek pro vznik tolerance proti různým alergenům a vyšší dispozici k rozvinutí alergie. Vyšší exprese IL-10 u buněk pupečnickových krvinek dětí alergických matek by mohla kompenzovat nižší expresi TGF- β . U buněk pupečnickových krvinek dětí alergických matek byla zjištěna snížená exprese IL-8 a INF- γ vůči buňkám pupečnickové krve zdravých matek. Nižší exprese INF- γ vytváří lepší podmínky pro převahu Th2 imunitní odpovědi a k snazšímu vzniku alergie u rizikových skupin.

Prvním cílem diplomové práce bylo srovnání zastoupení EGF v mateřském mléce alergických a zdravých matek. Tento cíl byl splněn se závěrem, že není výrazný rozdíl v EGF v mateřském mléce alergických a zdravých matek.

Druhým cílem diplomové práce bylo sledování vlivu nebuněčných složek mateřského mléka na novorozenecké lymfocyty. Mateřské mléko stimuluje tvorbu Ig a ve vysokých koncentracích potlačuje proliferaci lymfocytů a ovlivňuje produkci cytokinů. Výsledkem je, že nebyl pozorován výrazný rozdíl v působení mateřského mléka (kolostra) alergických a zdravých matek.

Třetí cíl diplomové práce byl vyřešen se závěrem, že genová exprese buněk pupečnickové krve dětí alergických matek je nižší u IL-8, INF- γ TGF- β ale vyšší u IL-10 ve srovnání s genovou expresí v buňkách pupečnickové krve dětí zdravých matek.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Abdel-Raheim, M.A., Saleem, T.H., Al-Ghazali, M.H., Sayed, A.A. (2003): Interleukins - 6, -8 and - 10 and tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptor I in human milk at different periods of lactation. *Nutrition Res.* 23: 845-855.
2. Aley, S.B., Zimmerman, M., Hetsko, M., Selsted, M.E., Gillin, F.D. (1994): Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect.Immun.* 62: 5397-5403.
3. Arnold, R.R., Cole, M.F., Prince, S., McGhee, J.R. (1977): Secretory IgM antibodies to *Streptococcus mutans* in subjects with selective IgA deficiency. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 8: 475-486.
4. Asai, K., Kai, K., Rikiishi, H., Sugawara, S., Maruyama, Y., Yamaguchi, T., Ohta, M., Kumagai, K. (1998): Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 65: 51-61.
5. Barot-Ciorbaru, R., Brochier, J., Miyawaki, T., Preud'Homme, J.L., Petit, J.F., Bona, C., Taniguchi, N., Revillard, J.P. (1985): Stimulation of human B lymphocytes by Nocardia-derived cell mitogen and derived fractions from *N. opaca*. Structure-activity relationship. *J. Immun.* 35: 3277-3283.
6. Bednar-Tantscher, E., Mudde, G.C., Rot, A. (2001): Maternal antigen stimulation downregulates via mother's milk the specific immune responses in young mice. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 126: 300-308.
7. Bergmann, R.L., Diepgen, T.L., Kuss, O., Bergmann, K.E., Kujat, J., Dudenhausen, J.W., Wahn, U. (2002): Breastfeeding duration is a risk factor for atopic eczema. *Clin.Exp.Allergy.* 32: 205-209.
8. Berkhout, B., van Wamel, J.L., Beljaars, L., Meijer, D.K., Visser, S., Floris, R. (2002): Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Res.* 55: 341-355.
9. Bertotto, A., Castellucci, G., Fabietti, G., Scalise, F., Vaccaro, R. (1990): Lymphocytes bearing the T cell receptor gamma delta in human breast milk. *Arch.Dis.Child.* 65: 1274-1275.
10. Bertotto, A., Gerli, R., Castellucci, G., Crupi, S., Scalise, F., Spinozzi, F., Fabietti, G., Forenza, N., Vaccaro, R. (1993): Mycobacteria-reactive gamma/delta

T cells are present in human colostrum from tuberculin-positive, but not tuberculin-negative nursing mothers. *Am.J.Reprod.Immunol.* 29: 131-134.

11. Bottcher, M.F., Jenmalm, M.C., Bjorksten, B., Garofalo, R.P. (2000): Chemoattractant factors in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatr.Res.* 47: 592-597.
12. Bottcher, M.F., Jenmalm, M.C., Bjorksten, B. (2003): Cytokine, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants. *Pediatric Allergy Immunol.* 14: 35-41.
13. Brandtzaeg, P., Kett, K., Rognum, T.O., Soderstrom, R., Bjorkander, J., Soderstrom, T., Petrusson, B., Hanson, L.A. (1986): Distribution of mucosal IgA and IgG subclass-producing immunocytes and alterations in various disorders. *Monogr Allergy.* 20: 179-194.
14. Brandtzaeg, P. (1995): Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS.* 103: 1-19.
15. Brandtzaeg, P., Farstad, I.N., Johansen, F.E., Morton, H.C., Norderhaug, I.N., Yamanaka, T. (1999): The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol.Rev.* 171: 45-87.
16. Brandtzaeg, P. (2003): Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine.* 21: 3382-3388.
17. Brun, J.G., Nilssen, S., Kvale, G. (1995): Breast feeding, other reproductive factors and rheumatoid arthritis. A prospective study. *Br.J.Rheumatol.* 34: 542-546.
18. Bry, L., Falk, P.G., Midtvedt, T., Gordon, J.I. (1996): A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science.* 273: 1380-1383.
19. Bryan, D.L., Hawkes, J.S., Gibson, R.A. (1999): Interleukin-12 in human milk. *Pediatr.Res.* 45: 858-859.
20. Butler, J.E. (1999): Immunoglobulins and immunocytes in animal milk. In: Ogra P. L., Mestecky J., Lamm M. E., Strober W., Bienenstock J., McGhee J. R. (eds.): *Mucosal Immunology* (druhé vydání). Academic Press, San Diego-Lodon-Boston-New York-Sydney-Tokio-Toronto, 1531- 1554.
21. Butler, J.E., Kehrli M.E.Jr. (2005): Immunoglobulins and immunocytes in the mammary gland and its secretions. In: Mestecky J., Bienenstock J., Lamm M.E., Mayer L., McGhee J.R., Strober, W. (eds.): *Mucosal Immunology* (díl druhý, třetí vydání). Academic Press, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 1763-1793.

22. Calbi, M., Giacchetti, L. (1998): Low breast milk IgA and high blood eosinophil count in breast-fed newborns determine higher risk for developing atopic eczema after an 18-month follow-up. *J.Investig.Allergol.Clin.Immunol.* 8: 161-164.
23. Cebra, J.J. (1999): Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am.J.Clin.Nutr.* 69: 1046S-1051S.
24. Cerutti, A., Zan, H., Schaffer, A., Bergsagel, L., Harindranath, N., Max, E.E., Casali, P. (1998): CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. *J.Immunol.* 160: 2145-2157.
25. Ciampolini, M., Bini, S., Orsi, A. (1996): Microflora persistence on duodenojejunal flat or normal mucosa in time after a meal in children. *Physiol Behav.* 60: 1551-1556.
26. Cole, A.M., Hong, T., Boo, L.M., Nguyen, T., Zhao, C., Bristol, G., Zack, J.A., Waring, A.J., Yang, O.O., Lehrer, R.I. (2002): Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99: 1813-1818.
27. Colgan, S.P., Parkos, C.A., Matthews, J.B., D'Andrea, L., Awtrey, C.S., Lichtman, A.H., Ip-Archer, C., Madara, J.L. (1994): Interferon-gamma induces a cell surface phenotype switch on T84 intestinal epithelial cells. *Am.J.Physiol.* 267: C402-C410.
28. Conley, M.E., Delacroix, D.L. (1987): Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann.Intern.Med.* 106: 892-899.
29. Crottet, P., Corthesy, B. (1998): Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding competent F(ab')₂: a possible implication for mucosal defense. *J.Immunol.* 161: 5445-5453.
30. Cummins, A.G., Thompson, F.M. (1997): Postnatal changes in mucosal immune response: a physiological perspective of breast feeding and weaning. *Immunol.Cell Biol.* 75: 419-429.
31. Dhennin-Duthille, I., Masson, M., Damiens, E., Fillebeen, C., Spik, G., Mazurier, J. (2000): Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. *J.Cell Biochem.* 79: 583-593.
32. Duhamel, G.E., Bernoco, D., Davis, W.C., Osburn, B.I. (1987): Distribution of T and B lymphocytes in mammary dry secretions, colostrum and blood of adult dairy cattle. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 14: 101-122.

33. Dwinell, M.B., Eckmann, L., Leopard, J.D., Varki, N.M., Kagnoff, M.F. (1999): Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 117: 359-367.
34. Eckmann, L., Kagnoff, M.F., Fierer, J. (1995): Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends Microbiol.* 3: 118-120.
35. Eglinton, B.A., Robertson, D.M., Cummins, A.G. (1994): Phenotype of T cells, their soluble receptor levels, and cytokine profile of human breast milk. *Immunol.Cell Biol.* 72: 306-313.
36. Fidler, N., Koletzko, B. (2000): The fatty acid composition of human colostrum. *Eur.J.Nutr.* 39: 31-37.
37. Filipp, D., Alizadeh-Khiavi, K., Richardson, C., Palma, A., Paredes, N., Takeuchi, O., Akira, S., Julius, M. (2001): Soluble CD14 enriched in colostrum and milk induces B cell growth and differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98: 603-608.
38. Finegold S. M., Sutter V. L., Mathisen G. E. (1983): Normal indigenous intestinal flora. In: Hentges, D. J. (eds.): *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Academic Press, New York, 3-32.
39. Firan, M., Bawdon, R., Radu, C., Ober, R.J., Eaken, D., Antohe, F., Ghetie, V., Ward, E.S. (2001): The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gamma-globulin in humans. *Int.Immunol.* 13: 993-1002.
40. Garofalo, R., Chheda, S., Mei, F., Palkovetz, K.H., Rudloff, H.E., Schmalsieg, F.C., Rassin, D.K., Goldman, A.S. (1995): Interleukin-10 in human milk. *Ped. Res.* 37: 444-449.
41. Gdalevich, M., Mimouni, D., Mimouni, M. (2001): Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. *J.Pediatr.* 139: 261-266.
42. Gibson, C.E., Eglinton, B.A., Penttila, I.A., Cummins, A.G. (1991): Phenotype and activation of milk-derived and peripheral blood lymphocytes from normal and coeliac subjects. *Immunol.Cell Biol.* 69 (Pt 6): 387-393.
43. Gillin, F.D., Reiner, D.S., Wang, C.S. (1983): Human milk kills parasitic intestinal protozoa. *Science.* 221: 1290-1292.
44. Gillin, F.D., Reiner, D.S., Gault, M.J. (1985): Cholate-dependent killing of *Giardia lamblia* by human milk. *Infect.Immun.* 47: 619-622.
45. Gillman, M.W., Rifas-Shiman, S.L., Camargo, C.A., Jr., Berkey, C.S., Frazier, A.L., Rockett, H.R., Field, A.E., Colditz, G.A. (2001): Risk of overweight

among adolescents who were breastfed as infants. JAMA. 285: 2461-2467.

46. Goldman, A.S., Garza, C., Nichols, B.L., Goldblum, R.M. (1982): Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. J.Pediatr. 100: 563-567.
47. Goldman A. S., Ogra P. L. (1999): Anti-infectious and infectious agents in human milk. In: Ogra P. L., Mestecky J., Lamm M. E., Strober W., Bienenstock J., McGhee J. R. (eds.): Mucosal Immunology (druhé vydání). Academic Press, San Diego-Lodon-Boston-New York-Sydney-Tokio-Toronto, 1511-1522.
48. Guillemin, K., Salama, N.R., Tompkins, L.S., Falkow, S. (2002): Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 99: 15136-15141.
49. Hakansson, A., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Sabharwal, H., Svanborg, C. (1995): Apoptosis induced by a human milk protein. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 92: 8064-8068.
50. Hanson L.A., Dahlman-Höglund A., Lundin S., Karlsson M., Saalman R., Dahlgren U., Telemo E. (1997): Food allergy and oral tolerance. In: Bellani J.A., Bracci R., Prindull G., Xanthou M. (eds.): Neonatal Hematology and Immunology III. Elsevier Science B. V., New York, 153-158.
51. Hanson L. A., Telemo E. (1999): Immunology and epidemiology of the breastfeeding in relation to prevention of infections from a global perspective. In: Ogra P. L., Mestecky J., Lamm M. E., Strober W., Bienenstock J., McGhee J. R. (eds.): Mucosal Immunology (druhé vydání). Academic Press, San Diego-Lodon-Boston-New York-Sydney-Tokio-Toronto, 1501-1510.
52. Hanson, L.A., Korotkova, M., Haversen, L., Mattsby-Baltzer, I., Hahn-Zoric, M., Silfverdal, R.A., Strandvik, B., Telemo, E. (2002): Breast-feeding, a complex support system for the offspring. Pediatrics International 44: 347-352.
53. Hanson L.P., Korotkova M., Telemo E. (2005): Human milk: its components and their immunobiologic functions. In: Mestecky J., Bienenstock J., Lamm M.E., Mayer L., McGhee J.R., Strober, W. (eds.): Mucosal Immunology (díl druhý, třetí vydání). Academic Press, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 1795-1827.

54. Hauner, H., Petruschke, T., Russ, M., Rohrig, K., Eckel, J. (1995): Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia*. 38: 764-771.
55. Hawkes, J.S., Neumann, M.A., Gibson, R.A. (1999): The effect of breast feeding on lymphocyte subpopulations in healthy term infants at 6 months of age. *Pediatr.Res.* 45: 648-651.
56. Henderson, B., Poole, S., Wilson, M. (1996): Microbial/host interactions in health and disease: who controls the cytokine network? *Immunopharmacology*. 35: 1-21.
57. Hennart, P.F., Brasseur, D.J., ogne-Desnoeck, J.B., Dramaix, M.M., Robyn, C.E. (1991): Lysozyme, lactoferrin, and secretory immunoglobulin A content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status, and parity of mother. *Am.J.Clin.Nutr.* 53: 32-39.
58. Ho, P.C., Lawton, J.W. (1978): Human colostrum cells: phagocytosis and killing of *E. coli* and *C. albicans*. *J.Pediatr.* 93: 910-915.
59. Holdeman, L.V., Good, I.J., Moore, W.E. (1976): Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl.Environ.Microbiol.* 31: 359-375.
60. Hooton, J.W., Pabst, H.F., Spady, D.W., Paetkau, V. (1991): Human colostrum contains an activity that inhibits the production of IL-2. *Clin.Exp.Immunol.* 86: 520-524.
61. Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., Spiegelman, B.M. (1996): IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 271: 665-668.
62. Chertov, O., Michiel, D.F., Xu, L., Wang, J.M., Tani, K., Murphy, W. J., Longo, D. J., Taub, D. D., Oppenheim, J. J. (1996): Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 271: 2935-2940.
63. Chipman, D.M., Sharon, N. (1969): Mechanism of lysozyme action. *Science*. 165: 454-465.
64. Isaacs, C.E., Thormar, H., Pessolano, T. (1986): Membrane-disruptive effect of human milk: inactivation of enveloped viruses. *J.Infect.Dis.* 154: 966-971.
65. Ishikawa H., Kanamori Y., Hamada H.Kiyono H. (2005): Development and function of organized gut-associated lymphoid tissues. In. Mestecky J.,

Bienestock J., Lamm M.E., Mayer L., McGhee J.R., Strober, W. (eds.): Mucosal Immunology (díl druhý, třetí vydání). Academic Press, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 385-405.

66. Iwasaki, A., Kelsall, B.L. (1999): Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J.Exp.Med.* 190: 229-239.
67. Iwasaki, A., Kelsall, B.L. (2001): Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J.Immunol.* 166: 4884-4890.
68. Jarvinen, K.M., Laine, S.T., Jarvenpaa, A.L., Suomalainen, H.K. (2000): Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr.Res.* 48: 457-462.
69. Jarvinen, K.M., Suomalainen, H. (2002): Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk-allergic infants. *Pediatr.Allergy Immunol.* 13: 243-254.
70. Justice, J.P., Shibata, Y., Sur, S., Mustafa, J., Fan, M., Van Scott, M.R. (2001): IL-10 gene knockout attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 280: L363-L368.
71. Keeney, S.E., Schmalstieg, F.C., Palkowetz, K.H., Rudloff, H.E., Le, B.M., Goldman, A.S. (1993): Activated neutrophils and neutrophil activators in human milk: increased expression of CD11b and decreased expression of L-selectin. *J.Leukoc.Biol.* 54: 97-104.
72. Kilian, M., Mestecky, J., Schrohenloher, R.E. (1979): Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect.Immun.* 26: 143-149.
73. Klagsbrun, M. (1978): Human milk stimulates DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75: 5057-5061.
74. Koldovsky O., Goldman A. S. (1999): Growth factors and cytokines in milk. In: Ogra P. L., Mestecky J., Lamm M. E., Strober W., Bienestock J., McGhee J. R. (eds.): Mucosal Immunology (druhé vydání). Academic Press, San Diego-Lodon-Boston-New York-Sydney-Tokio-Toronto, 1523-1530.
75. Kuchan M., Winship T., Masor M. (1998): Nucleotides in infant nutrition: effects on immune function. In: Reifen R., Lener A., Branski D., Heymans H.S.A. (eds.): Pediatric Nutrition. Krager, Basel: 80-94.

76. Kull, I., Wickman, M., Lilja, G., Nordvall, S.L., Pershagen, G. (2002): Breast feeding and allergic diseases in infants - a prospective birth cohort study. *Arch.Dis.Child.* 87: 478-481.
77. Laky, K., Lefrancois, L., Lingenheld, E., Ishikawa, H., Lewis, J., Olson, S., Suzuki, K., Tigelaar, E., Puddington, L. (2000): Enterocyte expression of interleukin 7 induces development of gd cells and Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 191: 1569-1580.
78. Laky, K., Lewis, J., Tigelaar, E., Puddington, L. (2003): Distinct requirements for IL-7 in development of TCR gammadelta cells during fetal and adult life. *J. Immunol.* 170: 4087-4094.
79. Le, J.C. (1994): A study by flow cytometry of lymphocytes in sow colostrum. *Res.Vet.Sci.* 57: 300-304.
80. Leach, J.L., Sedmak, D.D., Osborne, J.M., Rahill, B., Lairmore, M.D., Anderson, C.L. (1996): Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J.Immunol.* 157: 3317-3322.
81. Lee, A., Fox, J., Hazell, S. (1993): Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect.Immun.* 61: 1601-1610.
82. Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K., Ganz, T. (1993): Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu.Rev.Immunol.* 11: 105-128.
83. Lehrer R.I., Bevins C.L., Ganz T. (2005): Defensins and other antimicrobial peptides and proteins. In: Mestecky J., Bienstock J., Lamm M.E., Mayer L., McGhee J.R., Strober, W. (eds.): *Mucosal Immunology* (díl druhý, třetí vydání). Academic Press, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 95-110.
84. Lord, G. (2002): Role of leptin in immunology. *Nutr.Rev.* 60: S35-S38.
85. Losonsky, G.A., Fishaut, J.M., Strussenberg, J., Ogra, P.L. (1982a): Effect of immunization against rubella on lactation products. I. Development and characterization of specific immunologic reactivity in breast milk. *J.Infect.Dis.* 145: 654-660.
86. Losonsky, G.A., Fishaut, J.M., Strussenberg, J., Ogra, P.L. (1982b): Effect of immunization against rubella on lactation products. II. Maternal-neonatal interactions. *J.Infect.Dis.* 145: 661-666.
87. Lucas, A., Sarson, D.L., Blackburn, A.M., Adrian, T.E., ynsley-Green, A., Bloom, S.R. (1980): Breast vs bottle: endocrine responses are different with formula feeding. *Lancet.* 1: 1267-1269.

88. Lucas, A., Boyes, S., Bloom, S.R., ynsley-Green, A. (1981): Metabolic and endocrine responses to a milk feed in six-day-old term infants: differences between breast and cow's milk formula feeding. *Acta Paediatr.Scand.* 70: 195-200.
89. Male, C.J. (1979): Immunoglobulin A1 protease production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 26: 254-261.
90. Mára, M., Julák, J., Menčíková, E., Očenášková, J., Dohnalová, A. (1992): Effect of crude lipids on the course of listeria infection in mice. *Folia Microbiol.* 37: 455-460.
91. Mauricio, D., Mandrup-Poulsen, T. (1998): Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes.* 47: 1537-1543.
92. May, J.T. (1988): Microbial contaminants and antimicrobial properties of human milk. *Microbiol.Sci.* 5: 42-46.
93. McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M., Kiyono, H. (1992): The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine.* 10: 75-88.
94. McManaman, J.L., Neville, M.C. (2003): Mammary physiology and milk secretion. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 55: 629-641.
95. Mestecky, J., Russell, M.W., Jackson, S., Brown, T.A. (1986): The human IgA system: a reassessment. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 40: 105-114.
96. Mestecky, J., Lue, C., Russell, M.W. (1991): Selective transport of IgA. Cellular and molecular aspects. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 20: 441-471.
97. Mestecky J., Abraham J., Ogra P. L. (1994): Common mucosal immune system and strategies for the development of vaccines effective at the mucosal surfaces. In: Ogra P.L., Mestecky J., Lamm M.E., Strober W., McGhee J.K., Bienestock J. (eds.): *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego-London-Boston-New York-Sydney-Tokio-Toronto, 357-369.
98. Miettinen, P.J. (1993): Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor expression in human fetal gastrointestinal tract. *Pediatr.Res.* 33: 481-486.
99. Na, H.R., Hiserodt, J.C., Seelig, L.L., Jr. (1992): Distribution of lymphocyte subsets in rat milk from normal and *Trichinella spiralis*-infected rats. *J.Reprod.Immunol.* 22: 269-279.
100. Nentwich, I. (2002): *Alergie* 2: 125-132.

101. Norderhaug, I.N., Johansen, F.E., Schjerven, H., Brandtzaeg, P. (1999): Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins. *Crit Rev.Immunol.* 19: 481-508.
102. Oberle, D., Von Kries, R., Von Murous, E. (2001): Asthma and breast feeding. *Thorax.* 56: 896-
103. Obiso, R.J., Jr., Azghani, A.O., Wilkins, T.D. (1997): The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. *Infect.Immun.* 65: 1431-1439.
104. Oddy, W.H., Holt, P.G., Sly, P.D., Read, A.W., Landau, L.I., Stanley, F.J., Kendall, G.E., Burton, P.R. (1999): Association between breast feeding and asthma in 6 year old children: findings of a prospective birth cohort study. *BMJ.* 319: 815-819.
105. Oddy, W.H., de Klerk, N.H., Sly, P.D., Holt, P.G. (2002a): The effects of respiratory infections, atopy, and breastfeeding on childhood asthma. *Eur.Respir.J.* 19: 899-905.
106. Oddy, W.H., Peat, J.K., de Klerk, N.H. (2002b): Maternal asthma, infant feeding, and the risk of asthma in childhood. *J.Allergy Clin.Immunol.* 110: 65-67.
107. Okahashi, N., Yamamoto, M., Vancott, J.L., Chatfield, S.N., Roberts, M., Bluethmann, H., Hiroi, T., Kiyono, H., McGhee, J.R. (1996): Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant *Salmonella* strain or cholera toxin reveals that CD4⁺ Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. *Infect.Immun.* 64: 1516-1525.
108. Parmely, M.J., Manning, L.S. (1983): Cellular determinants of mammary cell-mediated immunity in the rat: kinetics of lymphocyte subset accumulation in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 409: 517-533.
109. Percival, R.S., Marsh, P.D., Challacombe, S.J. (1996): Serum antibodies to commensal oral and gut bacteria vary with age. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 15: 35-42.
110. Pisacane, A., Impagliazzo, N., Russo, M., Valiani, R., Mandarini, A., Florio, C., Vivo, P. (1994): Breast feeding and multiple sclerosis. *BMJ.* 308: 1411-1412.
111. Planchon, S.M., Martins, C.A., Guerrant, R.L., Roche, J.K. (1994): Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J.Immunol.* 153: 5730-5739.

112. Plaut, A.G., Gilbert, J.V., Artenstein, M.S., Capra, J.D. (1975): *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A. *Science*. 190: 1103-1105.
113. Plebani, A., Mira, E., Mevio, E., Monafò, V., Notarangelo, L.D., Avanzini, A., Ugazio, A.G. (1983): IgM and IgD concentrations in the serum and secretions of children with selective IgA deficiency. *Clin.Exp.Immunol*. 53: 689-696.
114. Polywka, S., Schroter, M., Feucht, H.H., Zollner, B., Laufs, R. (1999): Low risk of vertical transmission of hepatitis C virus by breast milk. *Clin.Infect.Dis*. 29: 1327-1329.
115. Prokešová, L., Lodinová-Žádníková, R., Žižka, J., Kocourková, I., Novotná, O., Petrásková, P., Šterzl, I.(2006): Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol*. 17:175-183.
116. Resta, S., Luby, J.P., Rosenfeld, C.R., Siegel, J.D. (1985): Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science*. 229: 978-981.
117. Richie, E.R., Steinmetz, K.D., Meistrich, M.L., Ramirez, I., Hilliard, J.K. (1980): T lymphocytes in colostrum and peripheral blood differ in their capacity to form thermostable E-rosettes. *J.Immunol*. 125: 2344-2346.
118. Rudloff, H.E., Schmalstieg, F.C., Jr., Mushtaha, A.A., Palkowetz, K.H., Liu, S.K., Goldman, A.S. (1992): Tumor necrosis factor-alpha in human milk. *Pediatr.Res*. 31: 29-33.
119. Russel M.W., Bobek L.A., Brock J.A., Hajishengallis G., Tenovuo J. (2005): Innate humoral defense factors. In: Mestecky J., Bienestock J., Lamm M.E., Mayer L., McGhee J.R., Strober, W. (eds.): *Mucosal Immunology* (díl druhý, třetí vydání). Academic Press, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 73-93.
120. Saarinen, K.M., Juntunen-Backman, K., Jarvenpaa, A.L., Klemetti, P., Kuitunen, P., Lope, L., Renlund, M., Siivola, M., Vaarala, O., Savilahti, E. (2000): Breast-feeding and the development of cows' milk protein allergy. *Adv.Exp.Med.Biol*. 478: 121-130.
121. Saito, S., Maruyama, M., Kato, Y., Moriyama, I., Ichijo, M. (1991): Detection of IL-6 in human milk and its involvement in IgA production. *J.Reprod.Immunol*. 20: 267-276.
122. Savage, D.C. (1977): Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu.Rev.Microbiol*. 31: 107-133.

123. Savage, D.C. (1986): Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annu.Rev.Nutr.* 6: 155-178.
124. Savage, D.C. (1989): The normal human microflora composition. In: Grubb R., Midvedt T., Norin E. (eds.): *The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora*. Stockton, London, 3-18.
125. Savage, D. C. (2002): Intestinal bacteriology for the 21st century. *Biosci. Microflora* 20: 107-114.
126. Savage, D.C. (2005): Mucosal microbiota. In: Mestecky J., Bienestock J., Lamm M.E., Mayer L., McGhee J.R., Strober, W. (eds.): *Mucosal Immunology (díl druhý, třetí vydání)*. Academic Press, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 19-33.
127. Sears, M.R., Greene, J.M., Willan, A.R., Taylor, D.R., Flannery, E.M., Cowan, J.O., Herbison, G.P., Poulton, R. (2002): Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet.* 360: 901-907.
128. Srivastava, M.D., Srivastava, B.I. (1999): Soluble Fas and soluble Fas Ligand proteins in human milk: possible significance in the development of immunological tolerance. *Scand. J. Immunol.* 47: 51-54.
129. Stabel, B.C., Wohlfahrt, J., Aaby, P., Westergard, T., Bendfeldt, E., Fleisher, M.K., Bjorksten, B., Melbye, M. (2004): Breastfeeding and risk of atopic dermatitis, by parental history of allergy, during the first 18 months of life. *Am. J. Epidemiol.* 160: 217-223.
130. Stevens, C. E., Hume, I. D. (1995): *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*. Cambridge University Press, Cambridge.
131. Stevens, A.C., Matthews, J., Andres, P., Baffis, V., Zheng, X.X., Chae, D.W., Smith, J., Strom, T.B., Maslinski, W. (1997): Interleukin-15 signals T84 colonic epithelial cells in the absence of the interleukin-2 receptor beta-chain. *Am.J.Physiol.* 272: G1201-G1208.
132. Story, C.M., Mikulska, J.E., Simister, N.E. (1994): A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *J.Exp.Med.* 180: 2377-2381.
133. Strober W., Fagarasan S., Lycke N. (2005): IgA B cell development. In: Mestecky J., Bienestock J., Lamm M.E., Mayer L., McGhee J.R., Strober, W. (eds.): *Mucosal Immunology (díl druhý, třetí vydání)*. Academic Press, Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 583-616.

134. Svanborg, C., Agerstam, H., Aronson, A., Bjerkvig, R., Durrer, C., Fischer, W., Gustafsson, L., Hallgren, O., Leijonhuvud, I., Linse, S., Mossberg, A.K., Nilsson, H., Pettersson, J., Svensson, M. (2003): HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism--cellular, molecular, and therapeutic aspects. *Adv.Cancer Res.* 88: 1-29.
135. Šterzl, I. (2005): *Základy imunologie.*
136. Takahata, Y., Takada, H., Nomura, A., Ohshima, K., Nakayama, H., Tsuda, T., Nakano, H., Hara, T. (2001): Interleukin-18 in human milk. *Pediatr.Res.* 50: 268-272.
137. Tariq, S.M., Matthews, S.M., Hakim, E.A., Stevens, M., Arshad, S.H., Hide, D.W. (1998): The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study. *J.Allergy Clin.Immunol.* 101: 587-593.
138. Taylor, B.C., Dellinger, J.D., Cullor, J.S., Stott, J.L. (1994): Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell Immunol.* 156: 245-253.
139. Territo, M.C., Ganz, T., Selsted, M.E., Lehrer, R. (1989): Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J.Clin.Invest.* 84: 2017-2020.
140. Tlaskalova-Hogenova, H., Tuckova, L., Lodinova-Zadnikova, R., Stepankova, R., Cukrowska, B., Funda, D.P., Striz, I., Kozakova, H., Trebichavsky, I., Sokol, D., Rehakova, Z., Sinkora, J., Fundova, P., Horakova, D., Jelinkova, L., Sanchez, D. (2002): Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 128: 77-89.
141. Vajdy, M., Kosco-Vilbois, M.H., Kopf, M., Kohler, G., Lycke, N. (1995): Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *J.Exp.Med.* 181: 41-53.
142. Von Kries, R., Koletzko, B., Sauerwald, T., Von Murous, E., Barnert, D., Grunert, V., Von Voss, H. (1999): Breast feeding and obesity: cross sectional study. *BMJ.* 319: 147-150.
143. Wei, W.Z., Malone, K., Mahoney, K., Heppner, G. (1986): Characterization of lymphocytic infiltrates in normal, preneoplastic, and neoplastic mouse mammary tissues. *Cancer Res.* 46: 2680-2685.
144. Wharton, B.A., Balmer, S.E., Scott, P.H. (1994): Sorrento studies of diet and fecal flora in the newborn. *Acta Paediatr.Jpn.* 36: 579-584.

145. Wilson, R.A., Linn, J.A., Eberhart, R.J. (1986): A study of bovine T-cell subsets in the blood and mammary gland secretions during the dry period. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 13: 151-164.
146. Wirt, D.P., Adkins, L.T., Palkowetz, K.H., Schmalstieg, F.C., Goldman, A.S. (1992): Activated and memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry.* 13: 282-290.
147. Wright, A.L., Sherrill, D., Holberg, C.J., Halonen, M., Martinez, F.D. (1999): Breast-feeding, maternal IgE, and total serum IgE in childhood. *J.Allergy Clin.Immunol.* 104: 589-594.
148. Xu, R., Doan, Q.C., Regester, G.O. (1999): Detection and characterisation of transforming growth factor-beta in porcine colostrum. *Biol.Neonate.* 75: 59-64.
149. Yang, D., Chen, Q., Chertov, O., Oppenheim, J.J. (2000): Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* 68: 9-14.
150. Yu, G., Duchon, K., Bjorksten, B. (1998): Fatty acid composition in colostrum and mature milk from non-atopic and atopic mothers during the first 6 months of lactation. *Acta Paediatr.* 87: 729-736.