

UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE

# DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium vlivu  $\beta$ -1,3-glukanu aplikovaného v dlouhodobém  
pitném programu na vybrané imunitní parametry

JAN RICHTER

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Šíma, CSc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Petra Šímy, CSc. v Laboratoři přirozené buněčné imunity, Sektoru imunologie a gnotobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR za použití uvedených literárních pramenů.

Praha, květen 2006

*Jan Kielisz*

Děkuji svému školiteli RNDr. Petru Šímovi, CSc. za vedení a pomoc při přípravě mé diplomové práce, MUDr. Anně Fišerové, CSc. za cenné poznámky týkající se diskuse, paní Evě Truxové za metodickou pomoc a celému kolektivu Laboratoře přirozené buněčné imunity, Sektoru imunologie a gnotobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR.

## Seznam použitých zkratek

Zkratka	Anglický ekvivalent	Český ekvivalent
ADCC	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity	Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
AIF	Apoptosis Inducing Factor	Faktor indukující apoptózu
APC	Antigen-Presenting Cell	Buňka prezentující antigen
BCR	B-Cell Receptor	Antigenně specifický receptor B lymfocytů
CD	Cluster of differentiation	Diferenciační antigen
CR	Complement Receptor	Komplementový receptor
CRD	Carbohydrate Recognition Domain	Doména rozeznávající sacharidy
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	Cytotoxický T lymfocyt
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Deoxyribonukleová kyselina
E buňky	Effector	Efektorová buňky
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter/ing	Průtokový cytometr/průtoková cytometrie
FITC	Fluoroisothiocyanate	Fluoroisothiocyanát
FL detektor	Fluorescent light detector	Detektor fluorescenčního světla
FPBS	FACS Phosphate Buffer Saline	Fyziologický roztok pro průtokovou cytometrii
FSC	Forward Scatter	Přímý rozptyl
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue	Střevní lymfatická tkáň
GIT	Gastro-Intestinal Tract	Gastrointestinální trakt
H řetězec	Heavy	Těžký řetězec
ICAM	Intercellular Adhesive Molecule	Mezibuněčná adhezivní molekula
ICE	Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme	Enzym konvertující interleukin 1 $\beta$ (caspasa 1)
IEL	Intestinal Epithelial Lymphocytes	Intraepiteliální lymfocyty
IFN	Interferon	Interferon
Ig	Immunoglobulin	Imunoglobulin
IL	Interleukin	Interleukin

<b>ITAM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif	Aktivační motiv imunoreceptoru na bázi tyrozinu
<b>KIR</b>	Killer Inhibitory Receptor	Inhibiční receptor NK buněk
<b>L řetězec</b>	Light	Lehký řetězec
<b>LFA</b>	Leukocyte-Function-Associated antigen	Adhezivní molekula leukocytů
<b>MAC</b>	Membrane Attack Complex	Komplex napadající membránu
<b>MDC</b>	Myeloid Dendritic Cell	Myeloidní dendritická buňka
<b>MHCgp</b>	Major Histocompatibility Complex glycoprotein	Hlavní histokompatibilitní komplex
<b>MIP</b>	Macrophage Inflammatory Protein	Chemotaktický faktor pro monocity
<b>NK</b>	Natural Killer	Přirozený zabíječ
<b>PAMP</b>	Pathogen Associated Molecular Pattern	Molekulární vzor asociovaný s patogenem
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline	Fosfát-fyziologický roztok
<b>PDC</b>	Plasmatic Dendritic Cell	Plasmatická dendritická buňka
<b>PE</b>	Phycoerythrine	Fykoerythrín
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor	Receptor rozeznávající molekulární vzory PAMP
<b>PS</b>	Phosphatidylserine	Fosfatidylserin
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid	Ribonukleová kyselina
<b>SSC</b>	Side Scatter	Boční rozptyl
<b>T buňky</b>	Target	Cílová buňka
<b>T<sub>C</sub></b>	T Cytotoxic	Cytotoxický T lymfocyt
<b>TCR</b>	T-Cell Receptor	Antigenně specifický receptor T lymfocytů
<b>T<sub>H</sub></b>	T Helper	Pomocný T lymfocyt
<b>TLR</b>	Toll-Like Receptor	Receptor skupiny Toll
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor	Faktor nekrotizující nádory
<b>V<sub>H</sub></b>	Variable Heavy	Variabilní doména těžkého řetězce
<b>V<sub>L</sub></b>	Variable Light	Variabilní doména lehkého řetězce

# **Obsah**

1. Úvod .....	8
1.1 Cíl práce .....	9
2. Literární přehled .....	10
2.1 Prebiotika.....	10
2.1.1 $\beta$ -glukan .....	10
2.1.2 Receptory rozeznávající $\beta$ -glukan .....	12
2.1.2.1 Lactosylceramid .....	12
2.1.2.2 CR3.....	13
2.1.2.3 Dectin-1 .....	13
2.2 Nespecifická imunita .....	15
2.2.1 TLR.....	16
2.2.2 NK buňky .....	17
2.3 Specifická imunita .....	18
2.3.1 T lymfocyty.....	18
2.3.1.1 $\alpha\beta$ T lymfocyty.....	19
2.3.1.2 $\gamma\delta$ T lymfocyty .....	21
2.3.2 B lymfocyty.....	21
2.3.2.1 Struktura imunoglobulinů .....	22
2.4 Apoptóza.....	23
3. Experimentální část .....	25
3.1 Chemikálie .....	25
3.2 Materiál .....	25
3.3 Přístroje .....	25
3.4 Roztoky a média .....	26
3.5 Linie cílových buněk pro test cytotoxicity .....	27
3.6 Experimentální model .....	27
3.6.1 Skupiny experimentálních zvířat .....	27
3.7 Časové rozvržení experimentů .....	27
3.8 Příprava ovčích erytrocytů a imunizace .....	27
3.9 Příprava inaktivovaného blokačního séra pro FACS .....	28
3.10 Ředění monoklonálních protilátek pro FACS .....	28
3.11 Statistické vyhodnocení dat .....	28
4. Metodika .....	29
4.1 Izolace a příprava slezinných buněk.....	29
4.2 Průtoková cytometrie (FACS).....	29
4.2.1 Značení buněk pro FACS .....	31
4.3 Test cytotoxicity .....	32
4.3.1 Příprava cílových buněk pro test cytotoxicity .....	32
4.3.2 Příprava efektorových buněk a provedení testu.....	33
4.4 Kvantifikace buněk tvořících hemolytické protilátky .....	33

<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	Stanovení změn hmotností experimentálních zvířat v průběhu experimentu .....	35
<b>5.2</b>	Stanovení absolutního počtu splenocytů, tvořících hemolytické protilátky typu IgM a IgG.....	36
<b>5.3</b>	Stanovení relativního zastoupení splenických T lymfocytů .....	37
<b>5.4</b>	Stanovení relativního zastoupení splenických T lymfocytů nesoucích znaky CD4 a CD8 .....	38
<b>5.5</b>	Stanovení relativního zastoupení splenických B lymfocytů .....	39
<b>5.6</b>	Stanovení relativního zastoupení splenických B lymfocytů nesoucích povrchové IgM.....	40
<b>5.7</b>	Stanovení relativního zastoupení splenických NK a NKT buněk .....	41
<b>5.8</b>	Stanovení relativního zastoupení splenocytů v časném stadiu apoptózy .....	42
<b>5.9</b>	Stanovení relativního zastoupení B lymfocytů v časném stadiu apoptózy .....	43
<b>5.10</b>	Stanovení relativního zastoupení splenických NK buněk v časném stadiu apoptózy .....	44
<b>5.11</b>	Stanovení aktivity cytotoxických splenocytů .....	45
<b>6.</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>47</b>
<b>6.1</b>	Buněčná imunita – T lymfocyty, $T_H$ , $T_C$ , NK, NKT .....	48
<b>6.2</b>	Humorální imunita – B lymfocyty, IgM.....	48
<b>6.3</b>	Stanovení absolutního počtu buněk produkovujících hemolytické protilátky IgM a IgG .....	49
<b>6.4</b>	Stanovení časného stadia apoptózy u vybraných populací imunokompetentních buněk .....	50
<b>6.5</b>	Stanovení míry cytotoxicity efektorových splenocytů.....	50
<b>7.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>53</b>

# **1. Úvod**

---

Potrava je pro organismus zdrojem nejen nutričních složek, ale i tzv. nutričních antigenů v ní obsažených. Kromě nich se s potravou dostává do organismu velké množství patogenů a jiných, sice nepatogenních, ale přesto imunogenních struktur. Ty se pak spolu s antigeny střevní mikroflóry dostávají do lymfoidní tkáně asociované s trávicí soustavou – GALT, představující největší lymfoidní orgán lidského těla (BENGMARK, 1998). Tento antigenní stimulus je potřebný pro správný vývoj imunitního systému hned po narození a lze ho považovat za přirozenou formu vakcinace (GERRARD ET AL., 1976). Nesprávná nebo nedostatečná stimulace imunitního systému GALT pak vede k nepřiměřeným reakcím na alergeny případně jiné neutrální antigeny.

Odedávna byly známy v přírodě běžně se vyskytující potraviny (rostliny, houby) konzumované pro své léčivé účinky. S přibývajícími znalostmi o působení různých nutričních složek na organismus v nich byly objeveny látky, které se souhrnně nazývají prebiotika. Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravy, které prospěšně působí na zdraví hostitele selektivní stimulací růstu nebo aktivity jednoho druhu nebo omezeného počtu druhů bakterií obývajících střevo (GIBSON, ROBERFROID, 1995). Tyto látky jsou samy o sobě neimunogenní, ale mohou mít různé imunomodulační funkce.

Typickým prebiotikem je i laminarin, kterým se zabývá tato diplomová práce. Svou strukturou se řadí mezi  $\beta$ -glukany, které už našly využití zejména v terapii nádorových onemocnění, kde se dají využít jako imunostimulanty podporující klasickou protinádorovou terapii. Jejich využití je běžné zejména v Japonsku, kde má dlouhou tradici konzumace hub obsahujících ve svých stěnách  $\beta$ -glukan. Komerční přípravky obsahující  $\beta$ -glukany se už objevily i na našem trhu. Působení  $\beta$ -glukanu na imunitní systém však nabízí možnost nejen terapeutického, ale i preventivního využití. Do popředí zájmu se v poslední době dostávají potraviny často obohacené právě o imunomodulační prebiotické složky (SALMINEN ET AL., 1998). Jejich využití tkví zejména v preventivních programech aplikovaných před očekávaným nástupem sezónních epidemických onemocnění nebo by měly být podávány rizikovým skupinám v populaci (malnutrice atd.) (STOREY, 2004). Mimoto by měly podporovat správný vývoj imunitního systému u dětí.

Přestože imunomodulační působení  $\beta$ -glukanů je již prokázané a bylo mnohokrát popsáno, dosud není přesně znám vliv těchto látek na některé složky a funkce imunitního systému jako jsou B lymfocyty nebo apoptóza. Dobře popsané je působení  $\beta$ -glukanu na makrofágy (ABEL ET AL., 1989; FERENČÍK ET AL., 1986; TAYLOR ET AL., 2002).

## 1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit na experimentálním modelu (myš kmene BALB/c) vliv dlouhodobé suplementace laminarinem ( $\beta$ -glukan získaný z buněčných stěn hnědé řasy *Laminaria digitata*) v pitném programu *ad libitum* na níže uvedené imunologické parametry, kterým nebyla ve spojení s  $\beta$ -glukany zatím věnována větší pozornost. Dlouhodobý pitný program byl zvolen z důvodu potenciálního využití  $\beta$ -glukanu jako součásti potravin pro zvláštní účely. Vliv laminarinu byl studován zároveň na neimunizovaných zvířatech i zvířatech imunizovaných T závislým antigenem (ovčí erytrocyty).

### Sledované parametry:

- ▶ relativní zastoupení T lymfocytů nesoucích antigeny CD4 a CD8
- ▶ relativní zastoupení celkové populace B lymfocytů a B lymfocytů produkujících protilátky izotypu IgM
- ▶ relativní zastoupení NK a NKT buněk
- ▶ intenzita apoptózy ve slezině u celkové populace splenocytů, B lymfocytů a NK buněk
- ▶ primární imunitní odpověď (kvantifikace buněk tvořících protilátky IgM a IgG)
- ▶ cytotoxická aktivita efektorových splenocytů proti buňkám myší nádorové linie YAC-1

## **2. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

---

### **2.1 Prebiotika**

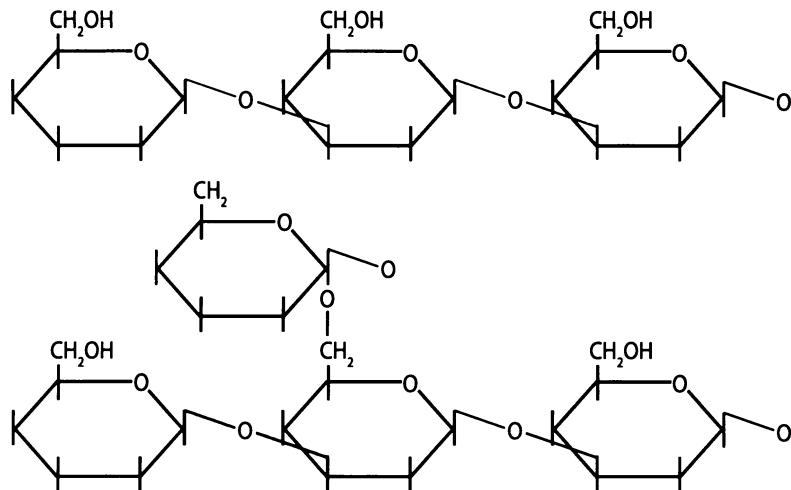
Je všeobecně známo, že pro zdraví člověka má velký význam mikroflóra, která kolonizuje střevo. Tato bakteriální populace aktivně přispívá k řádnému průběhu metabolických procesů ve střevě a svou přítomností brání usazení patogenních bakterií. K tomu, aby se kolonizující bakterie ve střevě dlouhodobě udržely, potřebují vhodné živiny, které pochází z potravy. Ta je ale nemusí vždy obsahovat v množství nebo formě, pro potřeby bakterií nejvhodnější. Z těchto základních skutečností vychází představa o možnostech ovlivňovat složení a aktivitu střevní mikroflóry dietou, přesněji jejím obohacením prebiotiky.

Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které příznivě ovlivňují hostitele tím, že selektivně stimulují růst nebo aktivitu bud' jednoho druhu nebo více určitých druhů bakterií v tlustém střevě. Těmito bakteriemi mohou být například *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* nebo *Escherichia* (GIBSON, ROBEFROID, 1995). Prebiotika tedy selektivně podporují růst takových střevních mikroorganismů, které je dokáží využít pro svůj růst ať už ve formě nezměněné nebo rozštěpené (hydrolyzované). Mezi prebiotika patří vlákniny, látky jako taniny (polymery katechinu), ligniny, hemicelulosy, pektiny, fruktany nebo inulin (BLAUT, 2002; MODRIANSKÝ, 2003).

Nejlépe je prozkoumáno prebiotické působení frukto-oligosacharidů, které jsou hydrolyzovány a metabolizovány ve střevech bakteriemi, které produkují enzym fruktosidasu. Stimulují tak hlavně růst bakterie *Bifidobacterium* (např. *B. infantis* a *adolescentis*) a *Lactobacillus* a potlačují růst mnoha patogenů, např. *Clostridium*, *Veillonella* a *Klebsiella*. Nerozpustná prebiotika ovlivňují metabolismus sacharidů a lipidů, zlepšují glukosovou toleranci nebo váží žlučové soli, čímž snižují hladinu volných mastných kyselin a cholesterolu v séru (MACFARLANE, CUMMINGS, 1991; MACFARLANE, CUMMINGS, 1999; FRIČ, 2002; GUARNER, MALAGELADA, 2003).

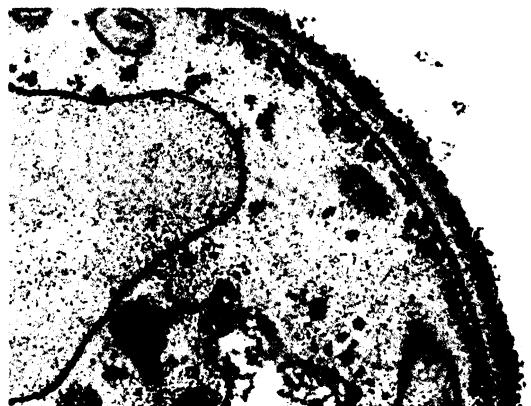
#### **2.1.1 $\beta$ -glukan**

Imunomodulačně aktivní  $\beta$ -glukany jsou polysacharidy složené z různého počtu glukosových podjednotek spojených vazbou typu  $\beta$ -(1,3). Jejich struktura bývá řídce větvena vazbou  $\beta$ -(1,6). Jedná se tedy o homopolymeru  $\beta$ -(1,3)-gluko-pyranosy s nízkým stupněm  $\beta$ -(1,6) větvení. Frekvence výskytu těchto větvení se nazývá substituční stupeň a liší se podle konkrétního typu glukanu.

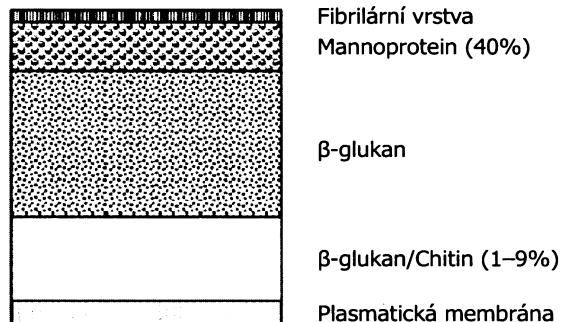


Obr. 1: Struktura  $\beta$ -(1,3)-glukanu (nahoře), větvení  $\beta$ -(1,6) (dole)  
(podle HERRE ET AL., 2004)

$\beta$ -glukany jsou v přírodě hojně zastoupené. Jsou obsaženy především v buňčných stěnách mnoha druhů hub, kvasinek, rostlin a řas. Na rozdíl od mnoha jiných látek dostupných v přírodě, které vykazují imunostimulační aktivitu pouze ve směsi s dalšími látkami, u  $\beta$ -glukanů nedochází ke změně biologické aktivity po purifikaci (BORCHERS ET AL., 1999; BROWN A GORDON, 2003). To umožňuje jejich využití jako imunostimulantů v čisté a purifikované formě.



Obr. 2: Buněčná stěna houby *Candida albicans*  
(TEM snímek, Zv. 20000x)  
(převzato z OHNO, 2003)



Obr. 3: Struktura buněčné stěny  
některých hub  
(převzato z HERRE ET AL., 2004)

Rozpustné  $\beta$ -glukany v mnoha studiích prokázaly protektivní působení proti mnoha infekcím a zároveň podpůrné účinky v léčbě infekčních onemocnění (např. podpoření antibiotické léčby chorob způsobených rezistentními kmeny bakterií). Experimentálně byl popsán vliv na bakteriální i protozoální infekce *Staphylococcus aureus* (CISNEROS ET AL., 1996; LIANG ET AL., 1998), *Bacillus anthracis* (VĚTVIČKA ET AL., 2002), *Plasmodium berghei* (KROP ET AL., 1985), *Leishmania major* (AL TUWAIJRI ET AL., 1987),

*Toxoplasma gondii* (BOUSQUET ET AL., 1988), *Trypanosoma cruzi* (WILLIAMS ET AL., 1989) nebo *Candida albicans* (AOYAGI ET AL., 1992).

V různých pracích bylo prokázáno, že vliv  $\beta$ -glukanu není závislý na způsobu aplikace do organismu (MUCKSOVA ET AL., 2001). Proto se jako nejlepší způsob jeví aplikace perorální, která je nejméně stresující ať už pro experimentální model nebo pro klinického pacienta a zároveň umožňuje využití rozpustných  $\beta$ -glukanů v preventivních programech.

$\beta$ -glukany jsou rozeznávány neadaptivní složkou imunitního systému jako cizorodé struktury PAMP (JANEWAY, 1992), což je podstatou jejich imunomodulační aktivity (BROWN, GORDON, 2003). Jejich biologická aktivita byla sledována v *in vitro* testech. Bylo prokázáno, že mají stimulační vliv na různé složky imunitního systému – monocity, makrofágy, granulocyty a NK buňky (COOK ET AL., 1977; AMINO ET AL., 1983; SELJELID ET AL., 1984; SUGAWARA ET AL., 1984; MORIKAWA ET AL., 1986; ROSS ET AL., 1987; SHERWOOD ET AL., 1987).  $\beta$ -glukany jsou v organizmu rozpoznávány několika buněčnými receptory. Je to například receptor TLR 2 vázající  $\beta$ -glukan obsažený v částici zymosanu (BROWN, GORDON, 2003). Při vazbě zymosanu vytváří TLR 2 funkční pár s TLR 6 a indukuje tak produkci cytokinů a chemokinů (OZINSKY ET AL., 2000). Mimo zmíněnou vazbu TLR 2 a TLR 6 je nezbytná přítomnost TLR signalizační dráhy obsahující MyD88 a NF $\kappa$ B (KATAOKA ET AL., 2002; YOUNG ET AL., 2001). Dalším z receptorů vázajících  $\beta$ -glukan je například lactosylceramid (BROWN, GORDON, 2003). Hlavními receptory rozeznávajícími  $\beta$ -glukan jsou nicméně jiné dva proteiny, a to CR3 a dectin-1. Přesný mechanismus signalizace spuštěné  $\beta$ -glukanem není dosud přesně popsán, ale je známo, že dochází k aktivaci transkripčního faktoru NF $\kappa$ B (WAKSHULL ET AL., 1999).

## 2.1.2 Receptory rozeznávající $\beta$ -glukan

### 2.1.2.1 Lactosylceramid

Lactosylceramid je glykosfingolipid nacházející se v cytoplasmatických membránách mnoha buněčných typů. Jako receptor pro  $\beta$ -glukan byl identifikován pomocí biochemické analýzy interakcí mezi glukanem a izolovanými komponentami membrány lidských leukocytů. Bylo zjištěno, že interakce  $\beta$ -glukanu s tímto receptorem může indukovat MIP-2 a aktivaci NF $\kappa$ B, a může stimulovat zesílení oxidačního vzplanutí neutrofilů a antimikrobiální funkce. Mechanismy skryté za těmito projevy jsou však dosud neznámé (BROWN, GORDON, 2003).

### 2.1.2.2 CR3

Komplementový receptor 3 (CR3) je protein exprimovaný na buňkách myeloidní linie, NK buňkách a některých lymfocytech. Receptor CR3 (CD11b/CD18) je složen ze dvou různých podjednotek a to  $\alpha_m$  (CD11b) a  $\beta_2$  (CD18) a slouží jako adhesivní molekula rozeznávající endoteliální ICAM-1 a také jako fagocytický receptor pro částice opsonizované komplementovým proteinem iC3b (BROWN, GORDON, 2003). CR3 obsahuje lektinovou doménu, která rozeznává některé monosacharidy a množství různých  $\beta$ -glukanů. Přítomnost této domény byla po prvé zjištěna za použití inhibičních monoklonálních protilátek a buněk pacientů s deficiencí  $\beta_2$ -integrinu (ROSS ET AL., 1999).

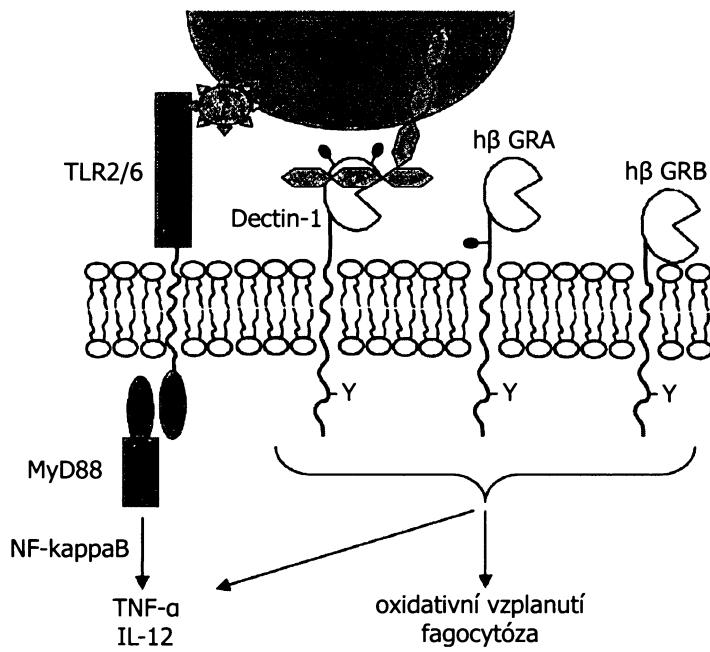
Lektinová doména je zodpovědná za iniciaci cytotoxické reakce závislé na CR3. Mikroorganismy opsonizované C3 prezentují na povrchu kromě opsonizační částice iC3b také polysacharidy buněčné stěny. To umožňuje vazbu CR3 zároveň na opsonizační částici iC3b i na  $\beta$ -glukan v buněčné stěně, který se váže na lektinovou doménu. Po této dvojnásobné vazbě je fagocytóza nebo cytotoxická degranulace stimulována silněji než pouze po vazbě iC3b. Nepřítomnost příslušných polysacharidů v buněčných membránách živočišných buněk je proto důvodem snížení účinnosti CR3-dependentní fagocytózy nebo i extracelulární cytotoxicity proti nádorovým buňkám opsonizovaným iC3b. Buňky opsonizované částicí iC3b se váží pouze na I-doménu, nikoliv na lektinovou doménu CD11b.

Bylo však zjištěno, že nízkomolekulární rozpustné  $\beta$ -1,3-glukany se váží na tuto lektinovou doménu s vysokou afinitou a připraví receptor CR3 k následné aktivaci cytotoxické reakce po vazbě na nádorové buňky opsonizované iC3b (VĚTVIČKA ET AL., 1996).

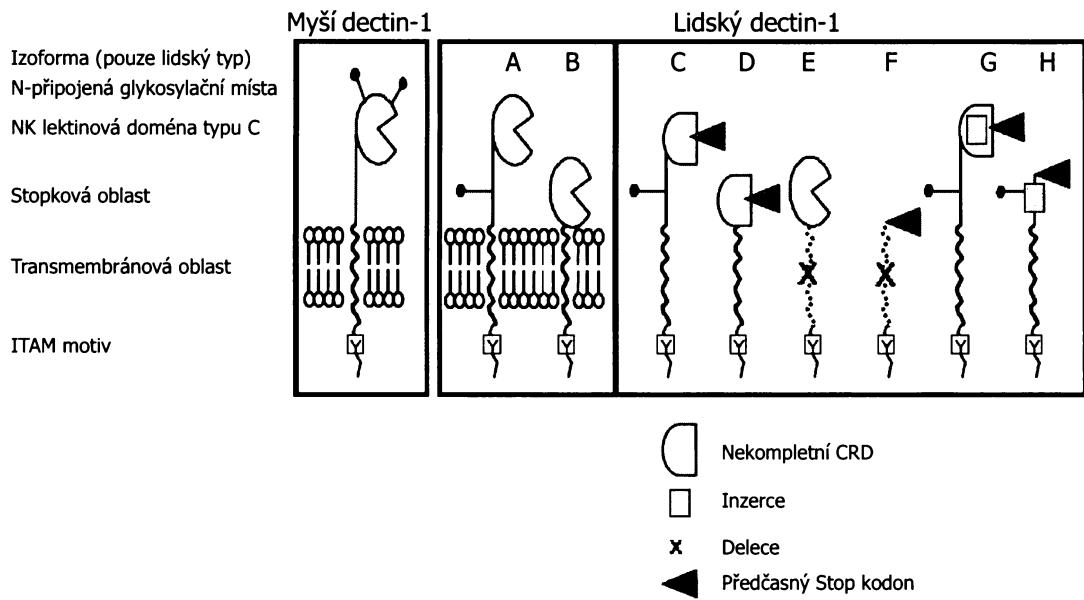
### 2.1.2.3 Dectin-1

Dectin-1 byl poprvé nalezen na T lymfocytech jako receptor vázající v té době ještě neidentifikovaný ligand způsobující T buněčnou proliferaci (ARIIZUMI ET AL., 2000). Teprve později byl identifikován jako receptor pro  $\beta$ -glukan (zymosan) pomocí makrofágové cDNA (BROWN, GORDON, 2001). Dectin-1 nese neklasickou CRD typu C připojenou k transmembránové oblasti cytoplasmatickou doménou ne-soucí ITAM.

Lidský dectin-1 receptor je na rozdíl od myšího podroben buněčně specifickému alternativnímu sestřihu, čímž vzniká několik isoform (A – H), z nichž funkční jsou pouze dvě (A a B) (WILLMENT ET AL., 2001).



**Obr. 4:** Signalizace vazbou  $\beta$ -glukanu (zymosan) přes TLR2 a dectin-1  
(převzato z BROWN, GORDON, 2003)



**Obr. 5:** Struktury myšího a lidského dectin-1 receptoru  
(varianty C-H jsou nefunkční varianty lidského dectin-1 receptoru)  
(převzato z HERRE ET AL., 2004)

Dectin-1 rozeznává glukany obsahující  $\beta$ -1,3 nebo  $\beta$ -1,6 vazby a je exprimován na monocytech, makrofágách a neutrofilech. V nižší koncentraci se také vyskytuje na splenických T lymfocytech a dendritických buňkách (BROWN, GORDON, 2001; TAYLOR ET AL., 2002). Bylo zjištěno, že dectin-1 je hlavním receptorem pro rozpustný i nerozpustný  $\beta$ -glukan na makrofágách, kde přispívá k rozpoznání opsonizovaných glukanových částic (BROWN ET AL., 2002). V poslední době bylo

zjištěno, že dectin-1 ovlivňuje buněčnou odpověď na  $\beta$ -glukany a produkci prozáhnětlivých cytokinů (BROWN ET AL., 2003). Aktivita  $\beta$ -glukanových receptorů byla zjištěna na širokém spektru leukocytů včetně monocytů, makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk (CZOP, AUSTEN, 1985; GOLDMAN, 1988; REIS E SOUSA ET AL., 1993; WILLIAMS, 1997).

Pomocí Northern blottingu byl dectin-1 zjištěn ve větším množství v játrech, plicích, thymu, žaludku, slezině, tenkém střevě, ledvině a srdeci (ARIIZUMI ET AL., 2000; BROWN, GORDON, 2001). Pro přesnější popsání povrchové exprese dectin-1 receptoru na buněčných populacích různého orgánového původu, byla použita průtoková cytometrie, kdy byly buňky označeny protilátkou 2A11 vázající extracelulární doménu tohoto receptoru (TAYLOR ET AL. 2002). Ve slezině byl dectin-1 nalezen na více různých typech splenocytů (HERRE ET AL., 2004), čímž byl vyvrácen původní předpoklad, že dectin-1 je omezen pouze na dendritické buňky (ARIIZUMI ET AL., 2000). Jedná se zejména o monocity a makrofágy.

Cytometrickou analýzou periferní krve bylo zjištěno, že periferní neutrofily a monocity vykazují vysokou hladinu exprese povrchového dectinu-1. V kostní dřeni se na rozdíl od periferní krve vyskytují dvě populace neutrofilů lišících se v expresi dectinu-1, z nichž jedna vykazuje silnou expresi a druhá středně silnou nebo slabou. Z toho lze vyvodit, že se jedná o populace plně diferencovaných a ne zcela diferencovaných neutrofilů. Nejvyšší povrchová exprese dectinu-1 byla v kostní dřeni zjištěna na monocytech a makrofágách (TAYLOR ET AL., 2002). Vysoká exprese tohoto receptoru byla zjištěna také na alveolárních makrofágách, zatímco na peritoneálních makrofágách se exprese zvyšuje teprve po určité době kultivace *in vitro* (HERRE ET AL., 2004).

## 2.2 Nespecifická imunita

Antigenně nespecifická složka imunitního systému je jeho nedílnou součástí zajišťující udržení funkční integrity vnitřního prostředí organismu. Má jedinečnou ochrannou funkci u živočichů, u kterých není vyvinuta adaptivní imunita, ale zároveň přetrvala i u živočichů, kteří adaptivní imunitu vyvinutou mají, včetně člověka (FEARON, LOCKSLEY, 1996; PASTORET ET AL., 1998; VĚTVIČKA, ŠÍMA, 1998).

Nespecifická složka imunity rozpoznává relativně neměnné molekulární struktury, které jsou specificky přítomny na povrchu patogenů a reaguje na ně. Tyto struktury jsou označovány jako molekulární vzory asociované s patogeny – PAMP. Mezi takovéto molekulární vzory patří například: lipopolysacharidy

Gram-negativních bakterií, bakteriální lipoproteiny nebo peptidoglykany, dvouvláknová RNA (charakteristická pro některé viry), flagelin (protein bakteriálních bičíků), virové RNA, nemethylované CpG motivy (typické pro prokaryotickou DNA) atd. Rozpoznání těchto PAMP je zajištěno mnoha různými typy povrchových receptorů PRR imunokompetentních buněk, které je váží. (MEDZHITOV, JANEWAY, 1997). Patří mezi ně například:  $\beta$ 2-integriny (CD11/CD18), lektiny typu C, složky komplementového systému (CR1/CD35, CR2/CD21), receptory makrofágů nebo receptor CD14, který kooperuje ve své funkci s transmembránovým receptorovým proteinem TLR (ANDERSON, 2000).

Nespecifická složka imunitního systému hraje zásadní roli také v interakci s antigeny získanými z potravy. Lidská trávicí soustava (GIT) zpracovává na svém obrovském povrchu ( $300\text{--}400\text{ m}^2$ ) denně 1,5–2 kg potravy. S potravou se do organismu dostává i množství mikroorganismů nesoucích mikrobiální antigeny včetně potenciálně patogenních, různé imunogenní struktury a alergeny pocházející z potravy, které jsou schopny vyvolat lokální imunitní odpověď (BENGMARK, 1998). Z tohoto důvodu se v GIT vyvinul největší imunitní orgán lidského těla – GALT (MACFARLANE, CUMMINGS, 1991; ANDERSON, MATSUNAGA, 1996; FRIČ, 2002; GUARNER, MALAGELADA, 2003).

GALT je vystaven neustálému přísunu nutričních antigenů i antigenů kontaminujících mikroorganismů a střevní mikroflóry. Značný význam v jejich rozpoznávání je v posledních letech připisován TLR proteinům, které stojí na začátku signalizační dráhy spuštěné přítomností antigenu z potravy. Mezi tyto antigeny patří například i CpG sekvence používané jako adjuvancia při vakcinacích (HAYASHI ET AL., 2001).

## 2.2.1 TLR

Rodina receptorů TLR vykazuje vysoký stupeň homologie s proteiny Toll, vyskytujícími se u bezobratlých a objevenými na modelu *Drosophila melanogaster* (DUSHAY, ELDON, 1998; ROCK ET AL., 1998; LUO, ZHENG, 2000). Receptory TLR specificky rozeznávají řadu molekul a struktur bakteriálního původu, jako jsou CpG motivy (TLR9), lipopolysacharidy (TLR4) nebo virová, dvouvláknová RNA (TLR3).

TLR proteiny jsou exprimovány mnoha různými buňkami, ale pouze dendritické buňky a makrofágy exprimují většinu z nich. Dendritické buňky existují ve dvou odlišných populacích – myeloidní dendritické buňky (MDC) a plasmatické dendritické buňky (PDC). Tyto populace jsou vybaveny různými TLR.

MDC na svém povrchu nesou TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 a TLR8, zatímco PDC exprimují TLR7 a TLR9 (KRUG ET AL., 2001; RISSOAN ET AL., 1999; LIU ET AL., 2001; JARROSSAY ET AL., 2001; ITO ET AL., 2002). Po maturaci zůstává na povrchu dendritických buněk pouze TLR3. Exprese TLR1, TLR2 a TLR4 je v průběhu maturace snížena (MUZIO ET AL., 2000; VISINTIN ET AL., 2001). TLR2 a TLR4 se u člověka objevuje na leukocytech periferní krve (MACKMAN, 2000; GUHA, MACKMAN, 2001). Lidské B buňky exprimují TLR9 a TLR10 (BOURKE, ET AL., 2003).

Receptory TLR jsou součástí velké rodiny IL-1R (receptoru pro interleukin 1) a proto i signalizační dráha vedoucí od TLR je podobné té u IL-1R. Intracelulární TIR doména TLR proteinu je asociována s adaptorovými proteiny MyD88, TIRAP/Mal (FITZGERALD ET AL., 2001; HORNG ET AL., 2001), TRIF, TRAM (BIN ET AL., 2003) a Tollip (BURNS ET AL., 2000).

## 2.2.2 NK buňky

NK buňky patří mezi buňky vrozené imunity. Jejich fenotyp lze charakterizovat přítomností nebo naopak chyběním některých znaků ze systému CD: CD2<sup>+</sup>, CD3/TCR-, CD7<sup>+</sup>, CD11/CD18<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD94<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, CD122<sup>+</sup>, CD158<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup>. 30–50 % NK buněk může také nést molekulu CD8. Tato subpopulace se pak nazývá NKT lymfocyty (SMYTH ET AL., 2002; CERWENKA ET AL., 2001). Morfologicky se NK buňky řadí mezi velké granulární lymfocyty (KUBY, FREEMAN, 1997). Nacházejí se nejen v krvi (až 15 % z celkového množství lymfocytů), ale i v periferních tkáních, játrech a placentě. Společně s T lymfocyty rozpoznávají řadu mikrobiálních, virových a nádorových antigenů (TRIENCHIERI, 1989). Klidové NK buňky cirkulují v krvi a po aktivaci cytokinou (IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) infiltrují infikovanou nebo nádorovou tkáň (GLAS ET AL., 2000).

NK buňky na rozdíl od klasických T a B lymfocytů nenesou na svém povrchu antigenně specifický receptor, exprimují však jiné dva typy receptorů – aktivační a inhibiční, na jejichž kompetici závisí cytotoxická reakce. Převáží-li aktivační signál, reagují NK buňky po setkání s buňkou cílovou cytotoxickou aktivitou. Hlavními cíli NK buněk jsou buňky nedostatečně prezentující vlastní antigeny (expresí MHCgp I) (LANIER, PHILLIPS, 1996; DIEFENBACH, RAULET, 1999; MANDELBOIM ET AL., 1999; SU ET AL., 1998).

NK buňky se zapojují do ranné imunitní odpovědi (1.–3. den po infekci). Systém zabíjení cílových buněk je u NK stejný jako u cytotoxických T lymfocytů ( $T_C$ ). Dochází k sekreci lytických proteinů a indukcí apoptózy systémem mem-

bránových proteinů Fas-FasL. NK buňky jsou také schopny uplatnit buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC). Tento typ imunitní odpovědi vyžaduje přítomnost Fc receptorů (např. CD16) na NK buňkách, které váží Fc části protilátek třídy IgG, kterými je cílová buňka opsonizována (pro přehled SCHAEDEL, REITER, 2006). NK buňky také produkují cytokiny a to např. IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  (SMYTH ET AL., 2002).

Jak již bylo zmíněno, NK buňky nesou na svém povrchu aktivační a inhibiční receptory. Mezi aktivační receptory patří integriny (LFA-1), receptory imunoglobulinové nadrodiny (CD2, CD16, CD56, NKp30, NKp44, NKp46) a receptory lektinového typu (CD69, NKRPIA, NKG2D) (LANIER, 2001). Většina těchto aktivačních receptorů je asociována s transmembránovými adaptorovými proteiny (DAP12, CD3 $\xi$ ), které na své intracelulární straně nesou ITAM motivy nesoucí tyrosinové zbytky fosforylované po vazbě ligandu na receptor. Toho se účastní asociované kinasy skupiny Src. Toto je začátek signalizační kaskády, které se účastní další fosforylované proteiny, a která vede k cytotoxiccké aktivitě NK buněk (SMYTH ET AL., 2002; LANIE, ANNU, 1998; MORETTA ET AL., 2000).

Proti aktivačním receptorům působí NK-buněčné inhibiční receptory. Řadí se mezi ně další proteiny imunoglobulinové nadrodiny (lidské KIR) a lektiny C-typu (Ly-49 u myší nebo CD94/NKG2A komplex u člověka) (RAJAGOPALAN ET AL., 1995; YOKOYAMA, SEAMAN, 1993; GUMPERZ, PARHAM, 1995). Po vazbě MHCgp I zprostředkovávají tyto receptory inhibiční signály, jejichž výsledkem je inhibice cytotoxicity a cytokinové produkce NK buňkou.

## 2.3 Specifická imunita

Specifická imunita je evolučně mladší složka imunitního systému, založená na přesném rozeznání konkrétních – specifických antigenů specializovanými buňkami. Patří mezi ně buňky vznikající ze společného lymfoidního progenitoru, což jsou T-lymfocyty a B-lymfocyty (pro přehled viz HAEN, 1995; MEDVINSKY, DZIERZAK, 1996; CUMANO ET AL., 1996; NUNEZ ET AL., 1996).

### 2.3.1 T lymfocyty

T lymfocyty jsou imunokompetentní buňky nezbytné pro antigenně specifickou, buněčnou i protilátkovou odpověď. Jejich název je odvozen od thymu, primárního lymfoidního orgánu, ve kterém dochází k jejich diferenciaci. Na svém povrchu nesou antigenně specifický receptor TCR. Skládá se ze dvou transmem-

bránových řetězců typu  $\alpha$  a  $\beta$ , nebo  $\gamma$  a  $\delta$ . Podle kombinace řetězců TCR se T lymfocyty dělí na  $\alpha\beta$  T a  $\gamma\delta$  T. Převážná většina T lymfocytů nese na svém povrchu  $\alpha\beta$  TCR. Pouze 1–5 % nese receptor složený z podřetězců  $\gamma\delta$ . Antigenně specifický TCR je na membráně T lymfocytu nekovalentně asociovan s komplexem proteinů, který je nezbytný pro přenos receptorového signálu – CD3 komplex. Řetězce CD3 komplexu ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) patří do imunoglobulinové nadrodiny a jejich intracelulární část obsahuje tzv. ITAM motiv a jsou asociované s intracelulárními kinasami signální kaskády (KUBY, FREEMAN, 1997; KEARSE ET AL., 1995; CALL ET AL., 2002; EXLEY ET AL., 1991; HUA ET AL., 1986; MARIE-CARDINE, SCHRAVEN, 1999).

### 2.3.1.1 $\alpha\beta$ T lymfocyty

Prekursorsy T lymfocytů se už v časné embryogenezi dostávají do thymu (resp. thymového primordia), kde dochází k jejich diferenciaci působením thymového stromatu a epitelu (HAYNES, 1984). V tomto vývojovém stadiu se vytváří antigenně specifický receptor TCR (přes mezistupeň – tzv. pre-TCR) a koreceptory CD4 a CD8.

V thymu probíhá negativní a pozitivní selekce thymocytů, v jejímž důsledku se diferencují klony antigenně specifických T lymfocytů. V průběhu negativní selekce jsou odstraněny autoreaktivní klony. Nereagující buňky přecházejí do dalších diferenciačních stupňů. Naproti tomu pozitivní selekce vyřazuje buňky, jejichž TCR není funkční, a proto nejsou schopny rozeznávat MHC glykoproteiny, takže selekcí procházejí jen reagující buňky (BLACKMAN ET AL., 1990; FINKEL ET AL., 1991). Během těchto differenciačních pochodů hyne v thymu až 95% buněk (METCALF, BRUMBY, 1966; MILLER, WATSON, 1988). Selektované thymocyty přecházejí do periferie a osídlují příslušné zóny sekundárních lymfoidních struktur a orgánů. Převažující většina periferních T lymfocytů nese povrchový koreceptor CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup>. Pouze malé procento tyto molekuly exprimuje obě, nebo naopak neexprimuje žádnou (VON BOEHMER, 1986).

CD4<sup>+</sup> T buňky rozpoznávají MHCgp II nesoucí a prezentující fragment cizorodého antigenu. Tento typ lymfocytů je označován jako T<sub>H</sub> – pomocné T buňky. Populace T<sub>H</sub> buněk se dále dělí na T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2, které se liší spektrem produkovaných cytokinů (MOSMANN ET AL., 1989). T<sub>H</sub>1 buňky produkuji prozánětlivé cytokiny, jako jsou IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  nebo TNF- $\beta$ , které aktivují makrofágy k zabíjení intracelulárních parazitů. T<sub>H</sub>2 buňky produkuji např. cytokiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, které regulují izotypový přesmyk imunoglobulinů (ABBAS ET AL., 1996).

Vývoj T<sub>H</sub> buněk ve směru T<sub>H</sub>1 nebo T<sub>H</sub>2 je ovlivněn cytokinovým prostředím, ve kterém dochází ke kontaktu mezi buňkou prezentující antigen (APC) a prekursorovým stadiem T<sub>H</sub> buňky. IL-1 a IL-12 stimuluje vývoj buněk typu T<sub>H</sub>1 a IL-4 usměrňuje vývoj směrem k T<sub>H</sub>2. Tato diferenciace je rovněž závislá na intenzitě signálu z APC, což je dáno množstvím prezentovaného antigenu a intenzitou kostimulace (množství kostimulačních molekul CD80 a CD86 na povrchu APC). Produkty jednotlivých T<sub>H</sub> populací působí antagonisticky: IFN-γ silně inhibuje produkci T<sub>H</sub>2, zatímco IL-4 inhibuje produkci T<sub>H</sub>1.

T lymfocyty nesoucí na svém povrchu koreceptor CD8 na rozdíl od CD4 pozitivních T lymfocytů rozeznávají MHCgp I. Molekula MHC I je exprimována na všech buňkách a buňkám imunitního systému prezentuje fragmenty vlastních proteinů. Je-li buňka napadena virem nebo došlo k nějaké mutaci, prezentuje pomocí molekul MHC I i tyto nestandardní proteinové fragmenty a vyvolá imunitní odpověď zprostředkovánou T lymfocyty nesoucími koreceptor CD8 – tzv. cytotoxické T buňky (T<sub>C</sub> nebo CTL). Tyto buňky cytotoxicky zabíjejí poškozenou buňku přímo, bez předchozí aktivace.

Mechanismus cytotoxické aktivity CTL je dvojí. První spočívá v působení lytických enzymů, perforinů a granzymů na cílovou buňku. Tyto látky uvolňuje cytotoxický T lymfocyt z cytoplasmatických granul okamžitě po kontaktu s cílovou buňkou. Perforin působí na buňku analogicky jako komplex napadající membrány MAC, který je součástí komplementového systému a otevírá cestu do poškozené buňky dalším proteinům, jako jsou serinové esterázy.

Druhý, přesně lokalizovaný cytotoxický mechanismus působení T<sub>C</sub> je reakce receptorové molekuly Fas a Fas ligandu (CD95 a CD95L). Fas ligand exprimovaný na povrchu T<sub>C</sub> se přímo váže na apoptotický receptor Fas na povrchu cílové buňky. Tím je spuštěna signální kaskáda vedoucí k apoptóze cílové buňky. Zabíjení přes Fas a Fas ligand není na rozdíl od perforinového systému závislé na intracelulární hladině Ca<sup>2+</sup> (ŠTERZL, 1993; BERKE, 1995; GRIFFITHS, 1995)

T lymfocyt získává aktivační signál nutný k buněčné proliferaci a diferenciaci na výkonné buňky po interakci TCR a koreceptoru CD4 nebo CD8 na jeho povrchu s antigenem prezentovaným na MHC glykoproteinu první nebo druhé třídy na povrchu APC. Dále je nezbytným signálem kostimulace zprostředkována molekulou CD28 na povrchu T lymfocytu, která vzniká vazbou CD28 na kostimulační ligandy CD80 (B7.1) nebo CD86 (B7.2) na povrchu APC.

### 2.3.1.2 $\gamma\delta$ T lymfocyty

T lymfocyty nesoucí  $\gamma\delta$  TCR spadají převážně do populace CD4-CD8-(TONEGAWA, 1988). V mukózních tkáních GIT, v kůži a urogenitálním traktu představují  $\gamma\delta$ T lymfocyty až 50% všech T lymfocytů (HAYDAY, 2000; CARDING ET AL., 2002).  $\gamma\delta$  TCR je funkčně bližší imunoglobulinům než  $\alpha\beta$  TCR, protože váže antigeny přímou vazbou jako protilátky, z čehož vyplývá, že k rozpoznání antigenu nepotřebuje předchozí zpracování a vystavení v komplexu s MHCgp na povrchu APC (ALLISON ET AL., 2001).

Nezanedbatelná populace  $\gamma\delta$  T lymfocytů byla identifikována ve střevním epitelu. Jsou to tzv. intraepiteliální T lymfocyty, označované jako IEL a nesou na svém povrchu  $\gamma\delta$  TCR-CD3 receptorový komplex asociovaný s homodimerem CD8aa (KUBY, FREEMAN, 1997).

### 2.3.2 B lymfocyty

B lymfocyty jsou hlavními buňkami zprostředkujícími protilátkovou imunitní odpověď. Jejich název je odvozen od Fabriciovy bursy, která je primárním imunitním orgánem u ptáků. U savců se prekursorsy B lymfocytů vyvíjejí převážně v kostní dřeni, odkud putují do B dependentních zón sekundárních lymfoidních tkání a orgánů, kde jejich vývoj pokračuje maturací a diferenciací. Proces přeměny B buněčného prekursoru na zralý B lymfocyt je doprovázen množstvím funkčních i morfologických změn, během nichž dochází k expresi povrchového B lymfocytárního receptoru BCR a dalších molekul, jako jsou CD19, CD22 nebo CD10 (KINKADE, 1982; NISHIKAWA ET AL., 1985; LOKEN ET AL., 1988).

BCR je hlavním B lymfocytárním receptorem. Je exprimován na všech B lymfocytech a je tvořen monomerním IgM nebo jiným izotypem. Pro přenos imunogenního signálu do buňky slouží BCR další akcesorické proteiny a koreceptory zprostředkovávající signalizaci jako molekuly heterodimeru CD79 $\alpha$ /CD79 $\beta$ , které pro svou příslušnost do imunoglobulinové nadrodiny bývají označovány jako Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ . BCR je ještě asociován s komplementovým receptorem CR2 (CD21), a další asociovanou B specifickou molekulou CD19. Tento proteinový komplex převádí signál indukovaný vazbou antigenu na BCR na asociované protein-tyrosin kinasy skupiny Src. V případě, že je antigen opsonizován komplementovými proteiny, dochází k zesílení signálu propojením BCR a CR2 (CD21), který váže degradační produkt komplementového systému C3dg (CARTER ET AL., 1997; TEDDER ET AL., 1997; FEARON ET AL., 2000; CARTER ET AL., 1991; DEMPSEY ET AL., 1996).

B lymfocyty lze dále dělit na dvě subpopulace (B1 a B2), a to na základě exprese molekuly CD5. Subpopulace B1 znak CD5 exprimuje, a to buď konstitutivně (B1a), nebo až po aktivaci (B1b). Subpopulace B2 molekulu CD5 nenesí. B1 lymfocyty exprimují imunoglobuliny izotypu IgM spolu s komplementovým, heterodimerním receptorem 3 (CR3, CD11b/CD18) a molekulou CD43 a nevyžadují kooperaci s T lymfocyty. Působí jako producenti IgM protilátek proti polysacharidovým antigenům. Naproti tomu B2 lymfocyty kooperaci s T buňkami vyžadují a produkují zejména protilátky izotypu IgG (BJORCK ET AL., 1991; MUTO ET AL., 1993; MOND ET AL., 1981; MOND ET AL., 1995; YOUINOU ET AL., 1999; DEFARNO, 2000; SU, TARAKHOVSKY, 2000).

### 2.3.2.1 Struktura imunoglobulinů

Molekuly sekretovaných imunoglobulinů se skládají ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců. H řetězce jsou v tzv. pantové oblasti spojeny cysteinovými S-S můstky (PORTER, 1960; EDELMAN, 1970). Dalšími dvěma disulfidickými můstky je ke každému H řetězci připojen jeden řetězec L. H řetězec obsahuje čtyři nebo pět (IgA, IgM) domén skládajících se ze 110–120 aminokyselin. Vysoká variabilita molekul imunoglobulinů je dána přítomností hypervariabilních úseků na koncích H i L řetězce ( $V_H$  a  $V_L$ ). Tato oblast imunoglobulinu specificky váže antigen (OHNO ET AL., 1984). Molekula imunoglobulinu je enzymaticky (proteolyticky) štěpitelná na odlišné fragmenty. Působením papainu se protilátka rozštěpí na dva Fab fragmenty (každý nese jedno vazebné místo pro antigen – je monovalentní) a fragment Fc. Naproti tomu, působením pepsinu je protilátka rozštěpena až pod prvním disulfidickým můstkem spojujícím H řetězce a vzniká Fab<sub>2</sub> fragment nesoucí obě antigenně specifická vazebná místa (PARKE, AVIS, 1964).

Existují pouze dva typy L řetězců – κ a λ. Ty jsou kódovány dvěma různými geny a strukturně se příliš neliší. H řetězce definující izotyp výsledné protilátky jsou lokalizovány za sebou na jediném chromosomu (u člověka č. 14). Jednotlivé typy těžkých řetězců jsou označeny μ, δ, γ<sub>1-4</sub>, α<sub>1-2</sub> a ε. Jednotlivé izotypové třídy charakterizované těmito H řetězci jsou označovány IgM, IgD, IgG1-IgG4, IgA1-IgA2 a IgE. Kromě struktury H řetězce se izotypy liší i množstvím disulfidických můstek a celkovou strukturou (ESSER, RADBRUCH, 1990).

Izotypy IgM a IgD jsou na povrchu B lymfocytů exprimovány v monomerní formě jako antigenně specifické receptory BCR. Naproti tomu sekretovaná forma IgM existuje ve formě pentameru. Jednotlivé monomery jsou spojeny disulfidic-

kými můstky a řetězcem označovaným J. Vzniká tak struktura obsahující deset antigenně specifických vazebných míst. Protilátkový izotyp IgG (IgG1-IgG4) se vyskytuje v monomerní formě a je nejčastějším sérovým izotypem. Podtypy IgG1 a IgG3 mohou u člověka aktivovat komplement. IgG hraje roli při opsonizaci, je hlavním protilátkovým typem při sekundární imunitní odpovědi a jako jediný izotyp může procházet placentární bariérou (SIMISTER, 2003).

S funkcí GALT je úzce spjat izotyp IgA, který je ve velkém množství sekretován na povrch sliznic a tvoří jednu z hlavních součástí obrany proti mikroorganismům. Sekretované IgA má formu dimeru spojenou J řetězcem a sekreční komponentou (fragment transportního Fc receptoru). Sérové IgA se vyskytuje buď jako monomer, dimer nebo trimer a funguje jako opsonizační částice (KOSHLAND, 1985; MESTECKÝ, RUSSEL, 1997).

## 2.4 Apoptóza

Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je fyziologický proces, kterým jsou eliminovány buňky během vývoje nebo během běžných fyziologických procesů, jako je např. obměna tkání nebo stárnutí (GOLD ET AL., 1994). Naproti tomu nekróza je patofyziologický proces, ke kterému dochází po expozici buněk poškozujícímu fyzikálnímu nebo chemickému vlivu. Apoptotický proces je odpovědný za buněčnou smrt rovněž během negativní selekce při diferenciaci imunokompetentních buněk, účastní se zabíjení buněk zprostředkovaného T lymfocyty a často jím zanikají i buňky vystavené cytotoxickým vlivům, hypoxii nebo virové infekci (SANDERSON, 1981).

Apoptotické procesy mohou být indukovány stimulací několika různých povrchových buněčných receptorů. Např. receptorová molekula CD95 (Fas) po kontaktu se svým specifickým ligandem CD95L (FasL) indukuje apoptotickou smrt buňky. Tento systém nazývaný často Fas/FasL je základním prvkem několika fyziologických a patofyziologických procesů, zejména pak cytotoxického působení subpopulace T<sub>C</sub> lymfocytů. Receptor CD95 aktivuje přenosovou signální dráhu vedoucí k apoptotické smrti závislé na caspasách.

Během časné fáze apoptózy dochází ke změnám struktury plazmatické membrány. Jednou z těchto změn je translokace fosfatidylserinu (PS) z její vnitřní vrstvy do vrstvy vnější (FADOK ET AL., 1992). Tuto změnu lze detegovat při stanovení apoptózy vazbou Annexinu V na PS, protože fosfatidylserin je na vnějším povrchu membrány exponován pouze v průběhu apoptózy (VERMES ET AL., 1995).

Signály vedoucí k aktivaci rodiny caspas, hrají základní roli v iniciaci a spuštění apoptózy různými stimuly. V savčích buňkách byly identifikovány různé druhy caspas. Mezi nejlépe charakterizované patří caspasa-1 neboli ICE, která byla původně objevena jako cysteinová proteáza zodpovědná za modifikaci molekuly interleukinu 1 $\beta$  (THORNBERRY, 1997; THORNBERRY, 1998).

V průběhu procesu apoptózy dochází také ke změnám mitochondriální permeability a uvolňují se aktivátory proteáz specifických pro apoptózu. Desintegrata vnější mitochondriální membrány vede k uvolnění cytochromu C do cytosolu, což je následováno depolarizací vnitřní mitochondriální membrány. Další molekulou uvolněnou do cytoplasmy je AIF, který je sám o sobě schopen indukovat apoptózu (ARMSTRONG, 2006).

Dalším z charakteristických znaků apoptózy je fragmentace DNA. Tento ireverzibilní děj vedoucí ke smrti buňky nastává dříve než změny v permeabilitě plasmatické membrány (prelytická fragmentace DNA). Tato fragmentace vychází z aktivace endogenní Ca $^{2+}$  a Mg $^{2+}$  dependentní jaderné endonukleasy, která selektivně štěpí DNA v místech mezi nukleosomálními jednotkami a generuje mono- a oligonukleosomální DNA fragmenty (DUKE, 1983).

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

---

#### **3.1 Chemikálie**

- agaróza (*Fluka Chemie AG, Švýcarsko*)
  - Alsieverův roztok (*Biotest s.r.o., ČR*)
  - anti-myší sérum IgG (*Sigma Chemical Co., USA*)
  - azid sodný (*Sigma Chemical Co., USA*)
  - $^{51}\text{Cr}$ , chroman sodný (*Amersham Pharmacia Biochemicals, USA*)
  - fetální telecí sérum (*BioClot Ltd., SRN*)
  - gentamycin (*Lek Pharmaceutical and Chemical Co., Slovensko*)
  - komplement morčecí (*Fyziologický ústav AV, ČR*)
  - médium H MEMd (*Sebac Co., SRN*)
  - médium RPMI 1640 (*Sebac Co., SRN*)
  - L glutamin (*Sevac a.s., ČR*)
  - laminarin ( $\beta$ -glukan) (*Goemar Laboratories, St. Malo, Francie*)
  - ovčí erytrocyty (*Biotest s.r.o., ČR*)
  - scintilační roztok SuperMix (*Wallac Oy., Finsko*)
  - Triton X 100 (*Sigma Aldrich Chemical Co., USA*)
  - Türk (*Sigma Aldrich Chemical Co., USA*)
  - želatina (*Sigma Aldrich Chemical Co., USA*)
  - chemikálie pro přípravu roztoků (*Lachema s.r.o., ČR*)
- HCl; KCl;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; NaCl;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaHCO}_3$ ; NaOH

#### **3.2 Materiál**

- 96-jamkové destičky s kulatým dnem (*Costar Inc., USA*)
- mikrozkumavky (*Alpha Inc., Velká Británie*)
- Petriho misky pro tkáňové kultury (*Gama Group s.r.o., ČR*)
- centrifugační zkumavky 15 ml (*Roth Inc., USA*)

#### **3.3 Přístroje**

- analytické váhy (*Precisa Instrument AG, Švýcarsko*)
- automatické pipety 10–5000  $\mu\text{l}$  (*Gilson Inc., USA*)
- biohazard box (*Jouan Inc., Francie*)
- Bürkerova komůrka (*Meopta a.s., ČR*)
- $\text{CO}_2$  termostat (*Jouan Inc., Francie*)

- ▶ dávkovací pipeta HandyStep (*Brand, Německo*)
- ▶ elektronická pipeta Finipette (*Thermo Labsystems, USA*)
- ▶ průtokový cytometr BD LSR II (*Becton Dickinson, USA*)
- ▶ scintilační počítač MicroBeta Trilux (*Wallac Oy, Finsko*)
- ▶ skleněný homogenizátor (*Pyrex Ltd., USA*)
- ▶ světelný mikroskop (*Opton Inc., Německo*)
- ▶ třepačka (*Ika Inc., USA*)
- ▶ univerzální chlazená centrifuga (*Hermle AG, Francie*)

### 3.4 Roztoky a média

▶ **Fosfát-fyziologický roztok (PBS)**

na 1 l dH <sub>2</sub> O:	NaCl .....	9,00 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O.....	1,20 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	0,23 g
upravit pH na 7,2–7,4 přidáním HCl nebo NaOH		

▶ **Roztok pro průtokovou cytometrii (FPBS)**

na 1 l PBS	želatina .....	1 g
	azid sodný (NaN <sub>3</sub> ) .....	0,2 g

▶ **Türkův roztok pro počítání buněk**

naředit Türkův roztok destilovanou vodou 1:5

▶ **Médium H-MEMd**

na 1 l roztoku:	H-MEMd (10× konc.).....	100 ml
	gentamycin 50 mg/ml.....	2 ml
doplňit do 1000 ml dH <sub>2</sub> O		
upravit pH na 7,0 přidáním 7,5% NaHCO <sub>3</sub>		

▶ **Kultivační médium RPMI 1640**

na 1 l roztoku	RPMI 1640 (5× konc.) .....	200 ml
	L glutamin (3%) .....	10 ml
	gentamycin 50 mg/ml.....	2 ml
	doplňit do 1000 ml dH <sub>2</sub> O	
fetální telecí sérum (2,5%) .....		
upravit pH na 7,4 přidáním 7,5% NaHCO <sub>3</sub>		

► Detekční agarózová směs

agaróza ..... 0,2 g  
dH<sub>2</sub>O ..... 16 ml  
autoklávovat  
před použitím rozvařit 10 min. ve vodní lázni

### 3.5 Linie cílových buněk pro test cytotoxicity

NK senzitivní myší nádorová linie YAC-1. Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI 1640 v CO<sub>2</sub> inkubátoru (37°C, 100% relativní vlhkost, 5 % CO<sub>2</sub>) a pasážovány po 48 hodinách.

### 3.6 Experimentální model

Samice myšího inbredního kmene BALB/c (AnLab s.r.o., Praha), stáří 3 měsíce, byly chovány v akreditovaném chovu Sektoru imunologie a gnotobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR (25 ± 2 °C, rel. vlhkost 50–70 %; osvit 12 h (8–20 hod.), standardní myší dieta *ad libitum*).

#### 3.6.1 Skupiny experimentálních zvířat

Zvířata byla rozdělena podle následujícího schématu do čtyř skupin.

	bez imunizace	imunizace
bez suplementace	6 jedinců	6 jedinců
suplementace laminarinem (1,47 g/1 H <sub>2</sub> O)	6 jedinců	6 jedinců

### 3.7 Časové rozvržení experimentů

Suplementace laminarinem v preventivním pitném programu trvala 28 dnů. Imunizace příslušných skupin ovčími erytrocyty byla provedena 5. den před ukončením pokusu.

### 3.8 Příprava ovčích erytrocytů a imunizace

Erytrocyty byly dvakrát promyty v PBS (4800G, 5 min., 21 °C). Myši byly imunizovány 0,5 ml 0,5 % suspenzí ovčích erytrocytů intraperitoneálně.

### 3.9 Příprava inaktivovaného blokačního séra pro FACS

Buňky pro průtokovou cytometrii musí být zablokovány inaktivovaným sérem, které zabrání nespecifické vazbě protilátek způsobující falešnou pozitivitu. Pro přípravu inaktivovaného myšího séra byla odebraná krev třikrát centrifugována (10 000G, 10 min.), aby byly odstraněny všechny buněčné komponenty. Získané sérum bylo poté inaktivováno teplem (56 °C, 30 min.).

### 3.10 Ředění monoklonálních protilátek pro FACS

Všechny použité monoklonální protilátky byly naředěny v FPBS do směsi potřebných pro detekci jednotlivých buněčných populací v následujícím ředícím poměru.

► **Skupina 1**

CD3-FITC	1:40	<i>Pharmingen, USA</i>
CD4-PE-A647	1:200	<i>ÚMG AVČR</i>
CD8-biotin	1:400	<i>Pharmingen, USA</i>
CD49b (DX5)-PE	1:100	<i>Pharmingen, USA</i>

► **Skupina 2**

CD19-biotin	1:2000	<i>BD, USA</i>
IgM-FITC	1:200	<i>Sigma, USA</i>

► **Skupina 3**

CD19-biotine	1:2000	<i>BD, USA</i>
CD49b (DX5)-PE	1:100	<i>Pharmingen, USA</i>

► **Sekundární značení**

Streptavidin	1:200	<i>Caltag, USA</i>
Annexin V-FITC	1:100	<i>Exbio, ČR</i>

(ředěno ve vazebném pufru pro Annexin V, přidáno ke skupině 3)

### 3.11 Statistické vyhodnocení dat

Získaná data byla zpracována a převedena do grafické podoby pomocí MS Excel 2003. Byly vypočítány průměrné hodnoty všech měřených parametrů a jejich směrodatné odchylky. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v aplikaci STATGRAPHICS Plus 5.0 pomocí t-testu za použití nulové hypotézy, že oba soubory dat se významně neliší. K rozhodnutí o platnosti nulové hypotézy byl použit 95% interval spolehlivosti ( $p < 0,05$ ).

## **4. METODIKA**

---

### **4.1 Izolace a příprava slezinných buněk**

Myši byly usmrceny cervikální dislokací a byly odebrány sleziny, které byly přemístěny do zkumavky s 5 ml média H-MEMd. V tomto médiu byly sleziny zhomogenizovány ve skleněném homogenizátoru. Vzniklá buněčná suspenze byla krátce zcentrifugována na 2000G, tím došlo k odstranění velkých nečistot a buněčná suspenze zůstala v supernatantu. Tato suspenze byla přelita do čistých zkumavek a dvakrát promyta v médiu H-MEMd. Z každého vzorku (každé zkumavky) bylo odebráno 100 µl a doplněno do 2ml Türkovým barvicím roztokem. Odtud pak byly obarvené buňky pipetovány do Bürkerových komůrek a počítány pod světelným mikroskopem. Další ředění vzorků záviselo na konkrétních potřebách jednotlivých metod.

### **4.2 Průtoková cytometrie (FACS)**

Průtoková cytometrie (FACS) je laboratorní metoda schopná současně charakterizovat několik parametrů na velkém množství částic v suspenzi, a to na základě jejich fyzikálních a chemických a morfologických vlastností. Využití našla zejména v biomedicínských oborech pro charakterizaci buněčných populací (odtud cytometrie).

Průtokový cytometr je zařízení spojené s výkonným počítačem, který zprostředkovává ovládání celého přístroje. Charakterizace buněk průtokovým cytometrem je založena na principu měření světelných rozptylů a intenzit fluorescence. Z toho vyplývá, že příprava buněk pro měření průtokovým cytometrem spočívá především ve fluorescenčním značení extracelulárních nebo intracelulárních znaků. Naředěná suspenze buněk je poté v přístroji vystřikována kalibrovanou tryskou a buňky jsou jedna za druhou unášeny vysokou rychlostí vzduchem (systém jet-in-air) v laminárním proudu média (PBS). V určitém místě prochází proudem média s buňkami několik laserových paprsků o různých vlnových délkách, které excitují různá fluorescenční barviva navázaná na značených antigenech měřených buněk. Tím, že je buněčná suspenze dostatečně naředěná, je vysoká pravděpodobnost, že laserovým paprskem prochází vždy jen jedna buňka. Kromě samotných fluorescencí se měří rozptyl světla a to ve dvou směrech. Senzor FSC měří přímý rozptyl a senzor SSC boční rozptyl (je umístěn v úhlu 90° k laserovému paprsku). Intenzitu přímého rozptylu lze interpretovat

jako velikost procházející buňky, zatímco intenzita bočního rozptylu vyjadřuje fyzikální vlastnosti povrchu buňky, její vnitřní členitost (granularitu) a optické vlastnosti jádra a cytoplasmy.

Emitované fluorescenční světlo je měřeno FL detektory umístěnými na výstupech optické dráhy cytometru. Jde o fotonásobiče, které registrují přicházející záblesky (v momentě průchodu buňky laserovým paprskem) a mění je v elektrické impulsy zaznamenávané počítačem. Vzhledem k tomu, že fotonásobič je schopen registrovat pouze záblesk a jeho intenzitu, ale není schopen rozlišit jeho barvu (vlnovou délku), je třeba přivést k jednotlivým detektorům už pouze jeden typ (barvu) záblesků. Toho je docíleno systémem filtrů a polopropustných zrcadel zařazených do optické dráhy tak, aby se ke každému fotonásobiči dostaly pouze záblesky o požadované vlnové délce. Tento systém pak zaručuje, že každý detektor bude počítat pouze záblesky emitované jedním konkrétním fluorescenčním barvivem (fluorochromem), respektive více barvivy emitujícími světlo o stejné nebo blízké vlnové délce.

Ke značení buněčných povrchových nebo intracelulárních antigenů se většinou používají monoklonální protilátky konjugované s příslušných fluorochromem. Díky jejich specifické afinitě k danému antigenu je možné zjistit nejen počet buněk, které daný antigen nesou (počet záblesků na detektoru), ale i intenzitu exprese daného antigenu (síla záblesku). Většinou se využívá vícebarevného značení, kdy kombinace přítomných antigenů ukazují přesněji na buněčný typ než jeden samostatný antigen. V případě takového značení je z pochopitelných důvodů nezbytné, aby byl každý antigen značen jiným fluorochromem tak, aby se nepřekrývala jejich emisní spektra. Mezi nejčastěji používané fluorochromy patří fluoroisothiocyanát (FITC), který má absorpční maximum při vlnové délce 490–495 nm a emituje světlo o vlnové délce 520 nm a fykoerythrin (PE), který nejvíce absorbuje při vlnových délkách 485–575 nm a emituje světlo v červené oblasti o vlnové délce 575 nm.

Kromě monoklonálních protilátek konjugovaných přímo s fluorochromem se využívá i dvoustupňové značení, kdy je s fluorochromem konjugována až druhá protilátku vázající se na první nebo lze využít protilátek konjugovaných například se biotinem, kdy je pak fluorochrom vázán na streptavidin, který se na biotin specificky váže. Takovýchto specifických vazeb zprostředkováných jinak než protilátkami se dá využít i při přímém značení, kdy se například Annexin V specificky váže na fosfatidylserin ve vnější vrstvě membrány apoptotických buněk.

#### 4.2.1 Značení buněk pro FACS

Ze suspenze splenocytů v médiu bylo odebráno  $5 \cdot 10^5$ – $7,5 \cdot 10^5$  buněk do každé jamky mikrotitrační destičky a kulatým dnem. Destička byla zcentrifugována na 3600G po dobu dvou minut. Peleta z buněk na dně byla roztřepána na třepačce a promyta 200 µl FPBS. Tento postup byl opakován třikrát, aby buněčná suspenze obsahovala co nejméně zbytků média, a jiných nečistot. Po poslední centrifugaci byla z jamek vylita voda a pelety byly roztřepány. Destičky byly umístěny na led a k buňkám bylo na dvacet minut přidáno 10 µl 10%, teplem inaktivovaného myšího blokačního séra. Tento postup brání nespecifické vazbě značených protilátek. Po blokování byly buňky jednou promyty v 200 µl FPBS a byl proveden první stupeň značení monoklonální protilátkou. Všechny primární značené protilátky byly naředěny v FPBS do směsi v příslušném ředícím poměru (viz výše) a přidány v množství 10 µl na roztřepanou peletu po odlití promývacího roztoku. Buňky byly inkubovány s přidanými protilátkami 30 minut ve tmě na ledě. Po třiceti minutách bylo do jamek přidáno 200 µl FPBS a buňky byly třikrát promyty, aby došlo k dokonalému odmytí všech nenavázaných protilátek. Po promytí nastává druhý stupeň značení. Do všech jamek, kde se vyskytovala primární protilátku značená biotinem bylo přidáno 10 µl příslušně naředěného značeného streptavidinu, který se specificky váže na biotin. Tento druhý značící stupeň trval opět 30 minut a destička byla umístěna na ledě ve tmě. Do jamek, do kterých se v daném kroku nepřidávala protilátku ani streptavidin bylo přidáno stejné množství (10 µl) FPBS. Po sekundárním značení byly buňky opět třikrát promyty.

V případě sledování apoptózy pomocí Annexinu V, který se specificky váže na fosfatidylserin byly v posledním promývacím kroku takto značené buňky promývány pufrem pro vazbu Annexinu V. Annexin V se ředí v příslušném poměru ve speciálním pufru a byl přidán stejně jako protilátky v množství 10 µl na promyté buňky. Inkubace trvala 15 minut. Po tomto posledním kroku bylo do všech jamek doplněno množství FPBS nebo vazebného pufru pro Annexin V požadované pro analýzu na průtokovém cytometru (20 µl). Deset minut před měřením bylo ke všem buňkám přidáno 10 µl barviva HOECHST 33258 ředěného na výslednou koncentraci 0,1 µg/ml, které se váže do jádra poškozených buněk a umožňuje vyloučit z analýzy poškozené nebo nekrotické buňky.

Získaná data z průtokového cytometru byla zpracována v softwaru FlowJo a statisticky vyhodnocena (viz výše).

## 4.3 Test cytotoxicity

Test cytotoxicity je metoda zjišťující lytickou aktivitu efektorových buněk proti buňkám cílovým. Cílovými buňkami jsou buňky nádorové linie, které se 1,5 hodiny před přidáním efektorových buněk kultivují v přítomnosti radioaktivního chromu  $^{51}\text{Cr}$ , který je buňkami inkorporován. Samotné stanovení pak probíhá na základě zjištění množství radioaktivního chromu uvolněného z poškozených cílových buněk.

Při testu cytotoxicity jsou k efektorovým buňkám přidány radioaktivně značené cílové buňky v konstantním množství a v přesně stanoveném poměru (případně více různých poměrů). Následně jsou buňky kultivovány po dobu 3,5 a 18 hodin. Pro následný výpočet procenta cytotoxicity je zároveň nutné znát pozadí, tj. intenzitu samovolného rozpadu cílových buněk a celkové množství radioaktivnosti inkorporované buňkami. Tento, tzv. maximální rozpad je zaručen přidáním detergentu Triton X 100 k příslušným vzorkům. Množství uvolněného radioaktivního chromu je stanovováno v odebraném supernatantu, ke kterému je přidán scintilační roztok. Radioaktivita odebraných vzorků je spočítána na scintilačním počítači. Intenzita radioaktivnosti v supernatantu následně odpovídá množství lyzovaných cílových buněk a tedy intenzitě cytotoxicity efektorových lymfocytů. Samotné procento cytotoxicity se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\% \text{ctx} = \frac{\text{cpm}_{\text{exp}} - \text{cpm}_{\text{spont}}}{\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{spont}}} \cdot 100$$

- $\text{cpm}_{\text{exp}}$  - množství  $^{51}\text{Cr}$  uvolněného nádorovými buňkami pod vlivem efektorových T lymfocytů  
 $\text{cpm}_{\text{spont}}$  - množství  $^{51}\text{Cr}$  uvolněného spontánně samotnými nádorovými buňkami  
 $\text{cpm}_{\text{max}}$  - množství  $^{51}\text{Cr}$  uvolněného po úplném rozpadu cílových nádorových buněk vlivem detergentu Triton X 100

### 4.3.1 Příprava cílových buněk pro test cytotoxicity

Suspenze cílových buněk nádorové linie YAC-1 byla značena po dobu 90 minut radioaktivním chromem  $^{51}\text{Cr}$ . Značení probíhalo při  $37^\circ\text{C}$  v  $\text{CO}_2$  inkubátoru se 4 MBq  $\text{Na}^{51}\text{Cr}$ . Poté byly buňky třikrát promyty a spočítány.

#### 4.3.2 Příprava efektorových buněk a provedení testu

Suspenze splenocytů v médiu H-MEMd byla naředěna na koncentraci  $6,4 \cdot 10^6$  buněk/ml. Do příslušných jamek mikrotitrační destičky s kulatým dnem bylo napipetováno 100 µl buněčné suspenze. Destička byla centrifugována při 3000G po dobu pěti minut. Poté bylo původní médium vylito a buňky byly resuspendovány v kultivačním médiu RPMI 1640. K testovaným efektorovým buňkám (E) byly přidány radioaktivně značené cílové buňky nádorové linie (T) v poměrech E:T = 64:1 a 32:1. Každý vzorek byl inkubován v tetrapletu. Do jamek se vzorky pro měření spontánního rozpadu bylo napipetováno 150 µl kultivačního média RPMI 1640 a 100 µl cílových buněk ( $10^4$  buněk). Vzorky pro měření celkového obsahu radioaktivního izotopu obsahovaly 100 µl RPMI 1640, 100 µl cílových buněk a 50 µl 10% detergentu Triton X 100.

Buňky na destičkách byly uloženy do CO<sub>2</sub> inkubátoru a inkubovány po dobu 3,5 a 18 hodin. Vždy po ukončení inkubace byly destičky centrifugovány na 3000G po dobu pěti minut. Po centrifugaci bylo z každé jamky odebráno 25 µl supernatantu do speciální destičky pro měření scintilace. K supernatantu bylo do každé jamky přidáno 100 µl scintilačního roztoku a destička byla zalepena průhlednou lepící páskou. Poté byly destičky s odebranými vzorky protřepány a zcentrifugovány po dobu jedné minuty na 3600G. Scintilace v jednotlivých vzorcích byla následně stanovena na scintilačním počítači Microbeta.

#### 4.4 Kvantifikace buněk tvořících hemolytické protilátky

Kvantifikace buněk tvořících hemolytické protilátky třídy IgM a IgG byla provedena modifikovanou Jerneho plakovou metodou. Protilátky izotypu IgM hrají hlavní roli při nástupu primární imunitní reakce. V pozdějších fázích humorální imunitní odpovědi se uplatňují především protilátky IgG. Kvantifikaci buněk tvořících tyto protilátky lze získat přehled o diferenciaci prekursorových lymfocytů, ale i o dynamice izotypového přesmyku IgM na IgG v průběhu primární imunitní reakce.

Tato metoda je založena na schopnosti komplementu lyzovat protilátkou opsonizované krvinky. Pokud lymfocyt produkuje protilátky izotypu IgM, které jsou specifické pro antigeny na povrchu erytrocytu, budou erytrocyty v blízkosti tohoto B lymfocytu opsonizovány a v přítomnosti komplementu lyzovány. Pro kvantifikaci buněk tvořících protilátky IgG se využívá postupu, kde je před přidáním komplementu přidána protilátna izotypu IgM proti myšímu IgG a ta

pak umožňuje aktivaci komplementu. Aby bylo možné udržet suspenzi buněk ve stabilní poloze za účelem produkce ohraničených plaků, je celá směs smíchána s agarózovým médiem.

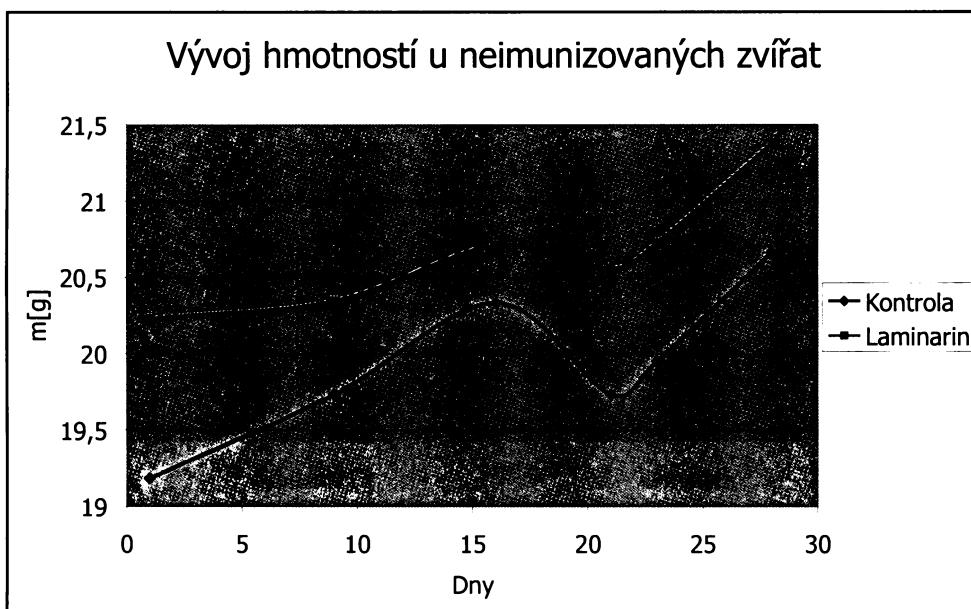
Z výše uvedeného vyplývá, že pro tuto metodu je třeba použít splenocyty (lymfocyty) ze zvířat imunizovaných před smrtí erytrocyty. Při tomto pokusu byly k imunizaci použity ovčí erytrocyty, které byly třikrát promyty v RPMI 1640 (4800G, 5 min., 21 °C) a smíchány s RPMI 1640 v poměru 1:25 (4% ovčí erytrocyty), dále byly v poměru 1:3 smíchány s agarózovou směsí a neustále temperovány při 46 °C. K 0,4 ml buněčné suspenze splenocytů bylo přidáno 0,8 ml směsi agarózy a erytrocytů. 0,5 ml vzniklé směsi bylo kapáno z výšky 60 cm na polystyrénové Petriho misky (průměr 9 cm). Misky byly následně inkubovány 60–120 min. při 37 °C a 100% relativní vlhkosti. Poté byla buněčná suspenze na miskách převrstvena morčecím komplementem (ředěným ve veronalovém pufru) a inkubována dalších 30 minut. Následně byly spočítány hemolytické zóny, udávající počet buněk tvořících protilátky IgM. Počty buněk tvořících protilátky IgG byly stanoveny analogicky po vazbě anti-myšího séra anti-IgG (ředěno 1:50 v PBS).

## 5. VÝSLEDKY

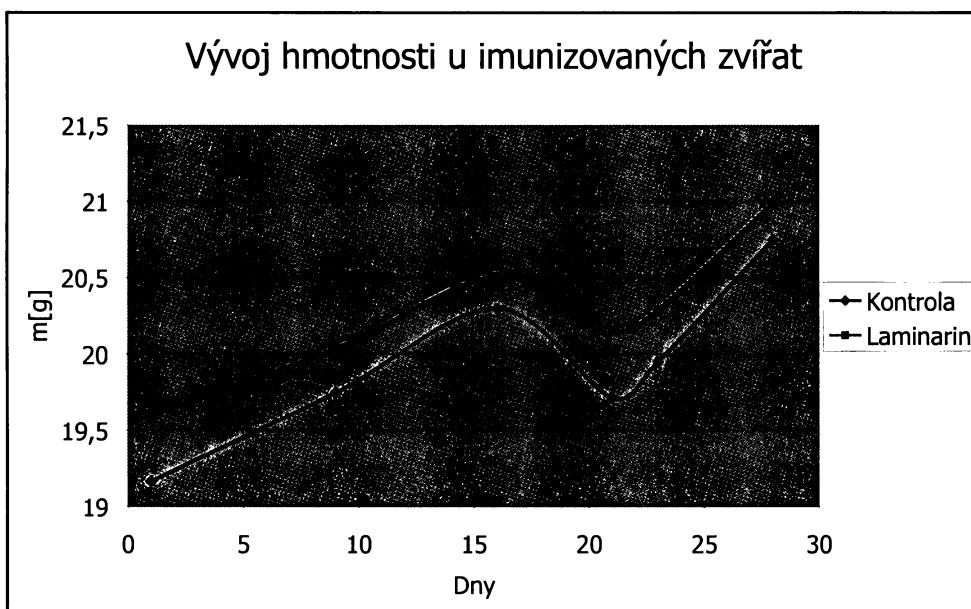
### 5.1 Stanovení změn hmotností experimentálních zvířat v průběhu experimentu

V průběhu experimentu nebyl zjištěn rozdíl ve vývoji hmotnosti mezi kontrolami a zvířaty suplementovanými laminarinem, a to jak v případě imunizovaných, tak i neimunizovaných skupin.

► **Graf 1**



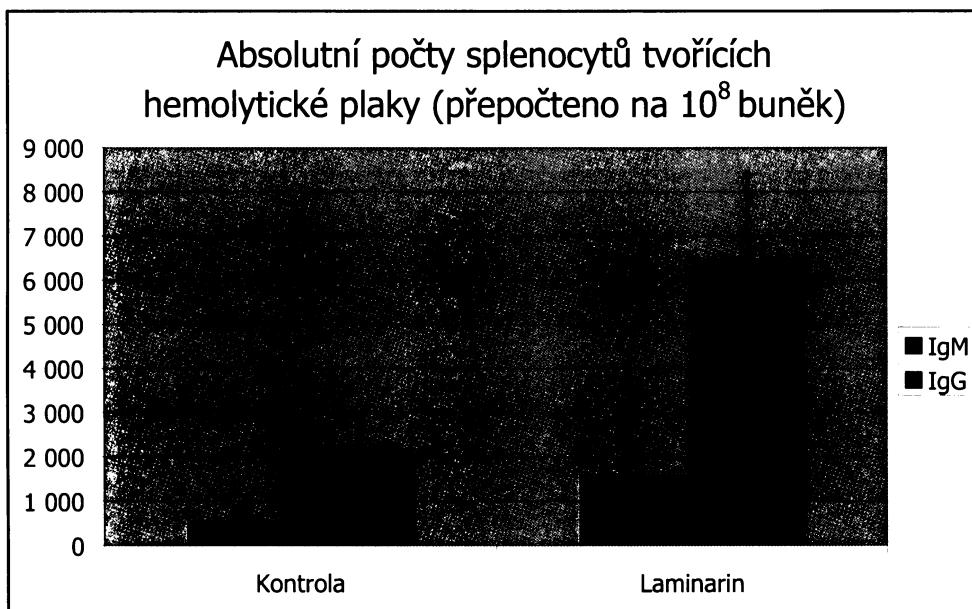
► **Graf 2**



## 5.2 Stanovení absolutního počtu splenocytů, tvořících hemolytické protilátky typu IgM a IgG

Absolutní počet splenocytů tvořících primární protilátky typu IgM i IgG byl po intraperitoneální imunizaci ovčími erytrocyty ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky průkazně zvýšen (IgM:  $p = 0,031$ ; IgG:  $p = 0,002$ ).

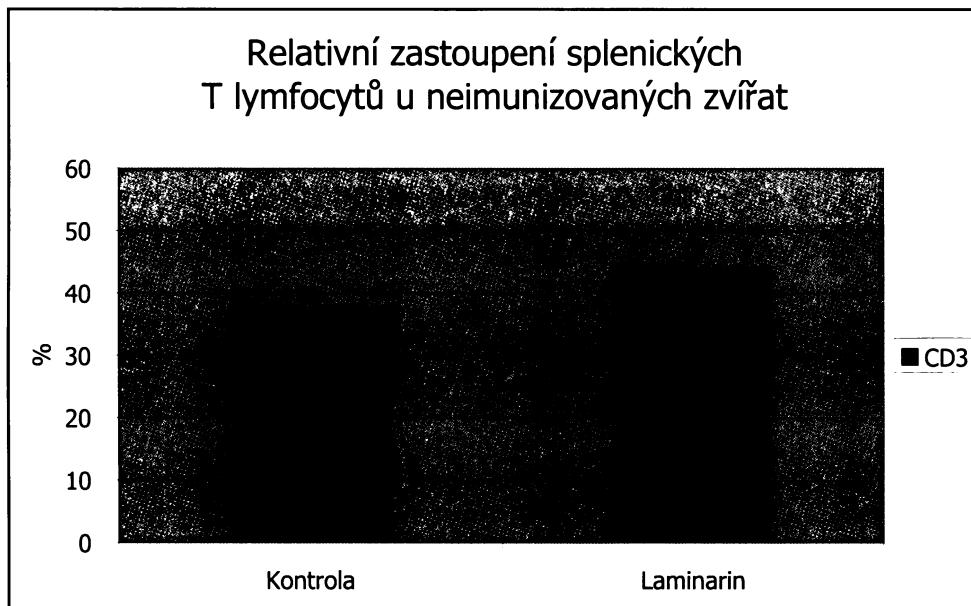
### ► Graf 3



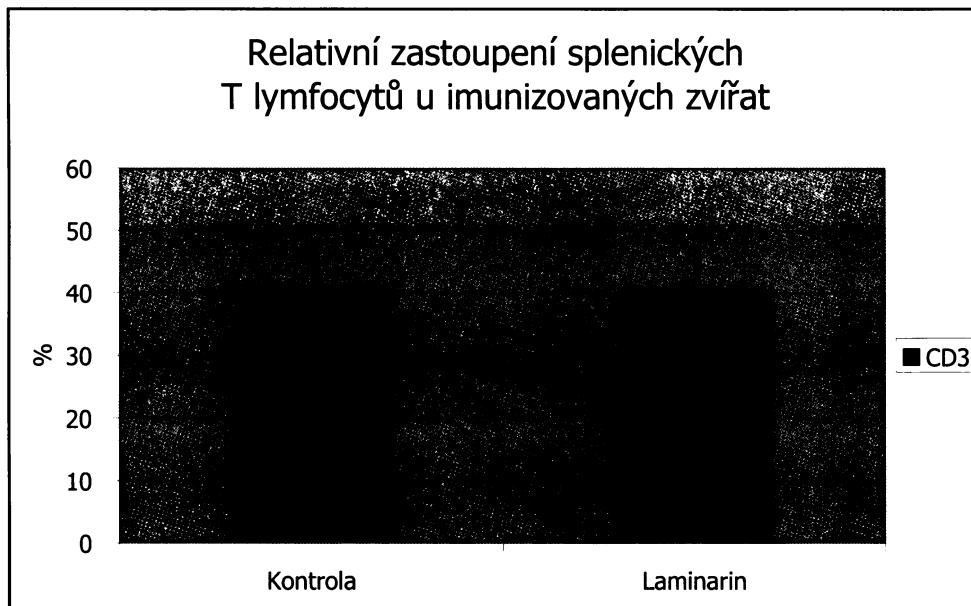
### 5.3 Stanovení relativního zastoupení splenických T lymfocytů

U neimunizovaných zvířat bylo zjištěno nesignifikantní zvýšení relativního zastoupení populace splenických T lymfocytů ( $p = 0,086$ ). U imunizované skupiny nebylo toto zvýšení zaznamenáno.

► **Graf 4**



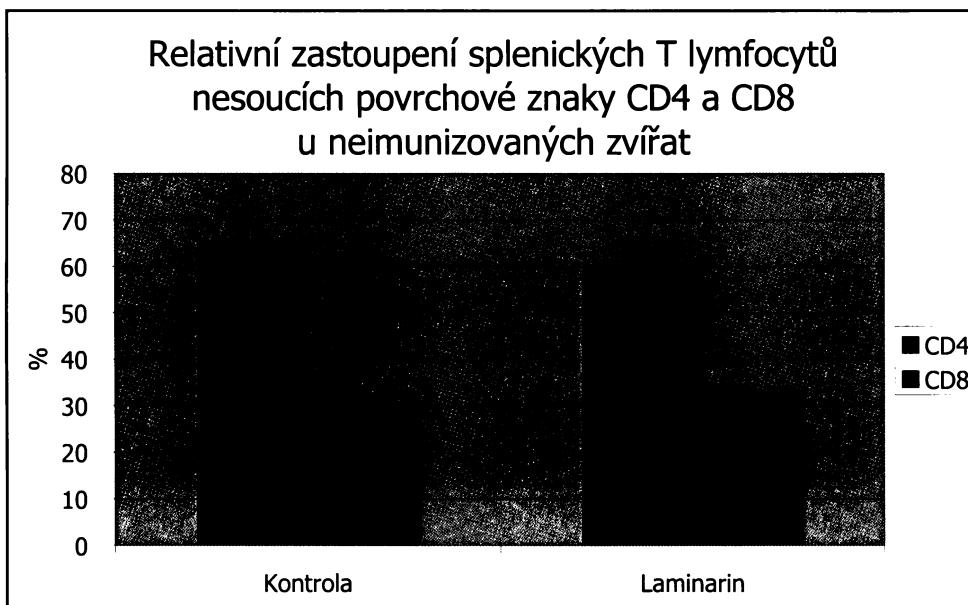
► **Graf 5**



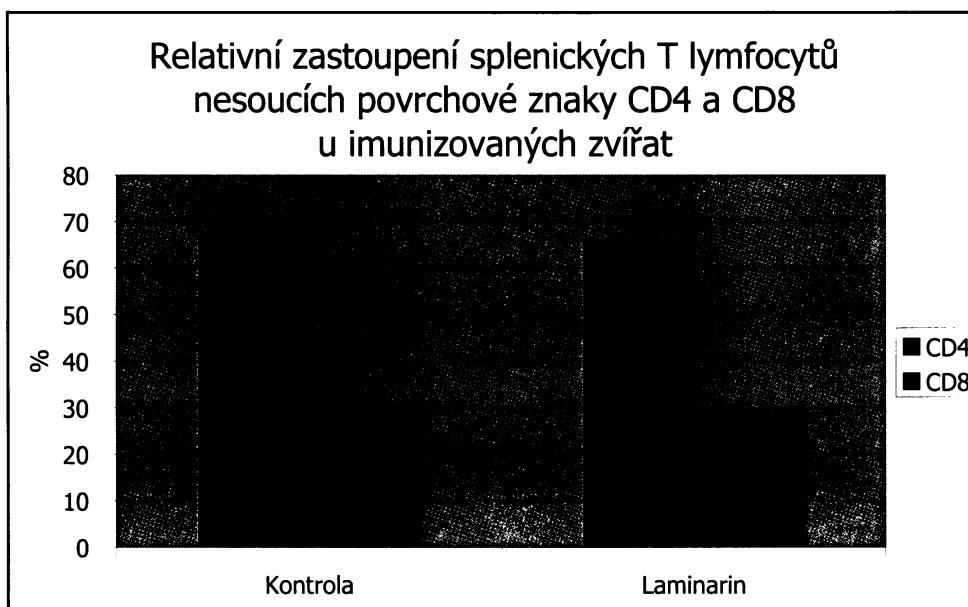
## 5.4 Stanovení relativního zastoupení splenických T lymfocytů nesoucích znaky CD4 a CD8

Byl zjištěn statisticky neprůkazný pokles ( $p = 0,20$ ) relativního počtu splenických T lymfocytů nesoucích povrchový znak CD4, a to zejména u skupiny neimunizovaných zvířat. U buněk nesoucích znak CD8 došlo naopak k neprůkaznému zvýšení relativního zastoupení ( $p = 0,23$ ).

### ► Graf 6



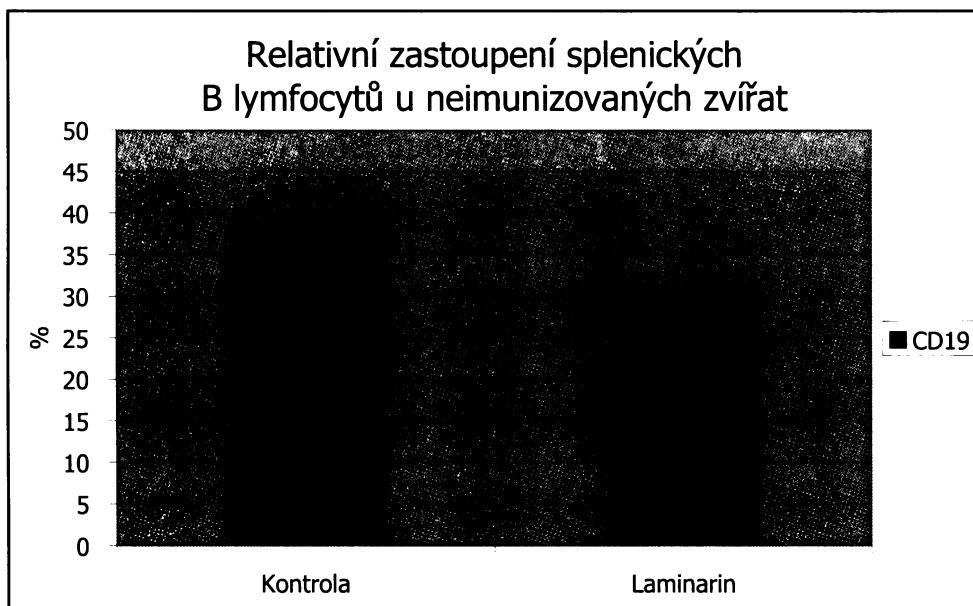
### ► Graf 7



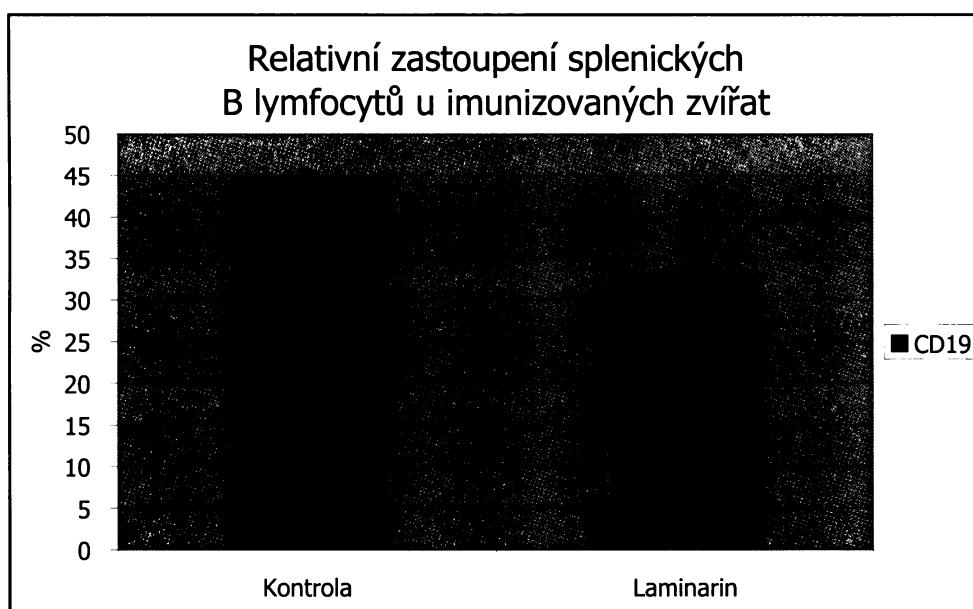
## 5.5 Stanovení relativního zastoupení splenických B lymfocytů

U imunizovaných zvířat byl zjištěn statisticky průkazný pokles relativního zastoupení splenických B lymfocytů ( $p = 0,016$ ). U neimunizovaných zvířat se pokles průkaznosti blíží ( $p = 0,063$ ).

### ► Graf 8



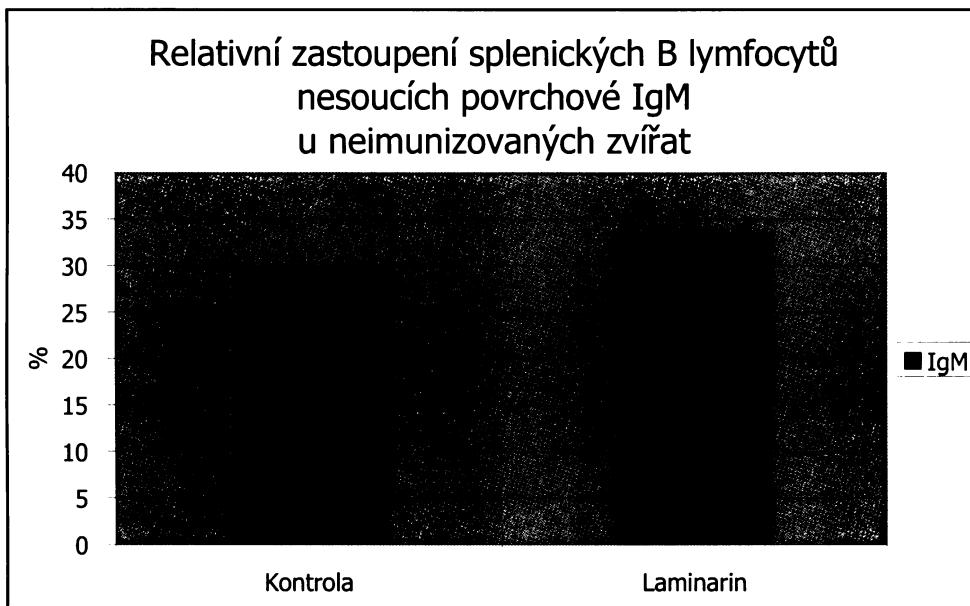
### ► Graf 9



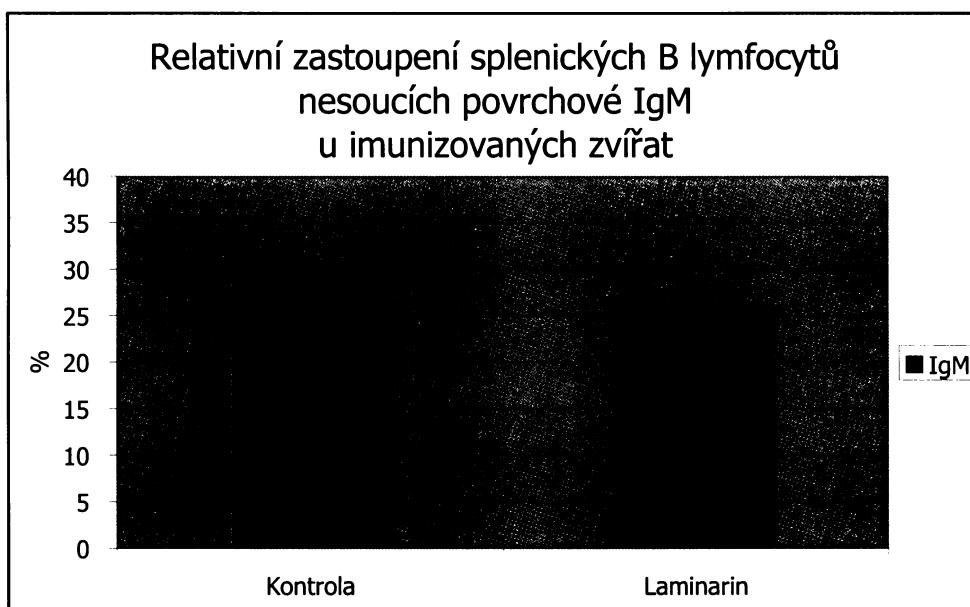
## 5.6 Stanovení relativního zastoupení splenických B lymfocytů nesoucích povrchové IgM

U neimunizovaných zvířat bylo zjištěno statisticky neprůkazné zvýšení relativního zastoupení splenických B lymfocytů nesoucích povrchové IgM ( $p = 0,10$ ), u imunizovaných zvířat došlo naopak k neprůkaznému snížení ( $p = 0,17$ ).

### ► Graf 10



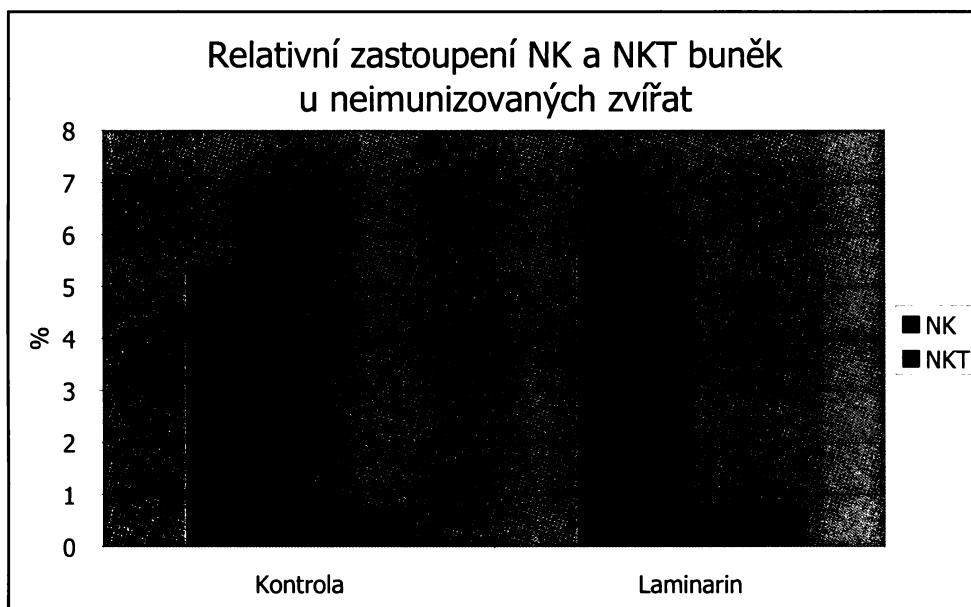
### ► Graf 11



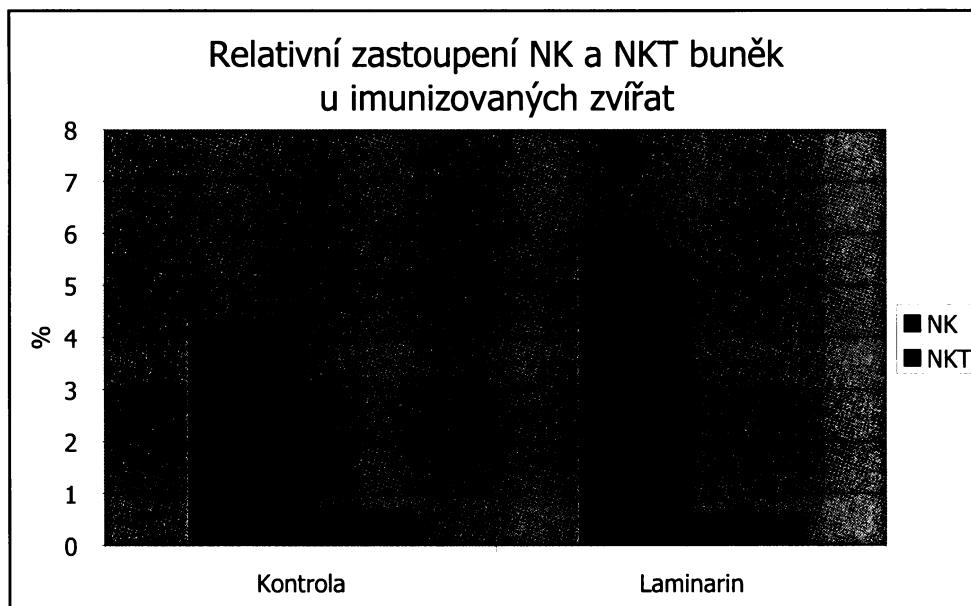
## 5.7 Stanovení relativního zastoupení splenických NK a NKT buněk

V případě imunizovaných i neimunizovaných zvířat bylo zjištěno statisticky neprůkazné zvýšení relativního zastoupení splenocytů nesoucích znak CD49b (NK buňky) ( $p = 0,69$ ;  $p = 0,07$ ). U splenocytů nesoucích znak CD49b spolu s CD3 (NKT buňky) nebyla změna relativního zastoupení pozorována.

► **Graf 12**



► **Graf 13**



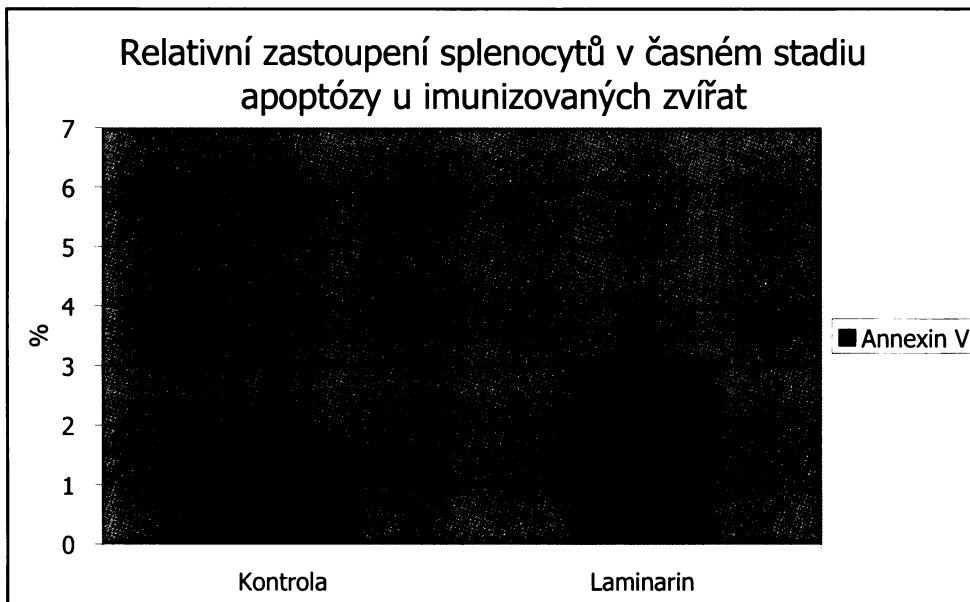
## 5.8 Stanovení relativního zastoupení splenocytů v časném stadiu apoptózy

Byl zjištěn signifikantní rozdíl v relativním zastoupení apoptotických buněk ve slezině. U neimunizovaných zvířat vedla suplementace laminarinem ke statisticky významnému snížení jejich relativního zastoupení ( $p = 0,002$ ) zatímco u imunizovaných zvířat došlo ke statisticky významnému zvýšení ( $p = 0,03$ ).

### ► Graf 14



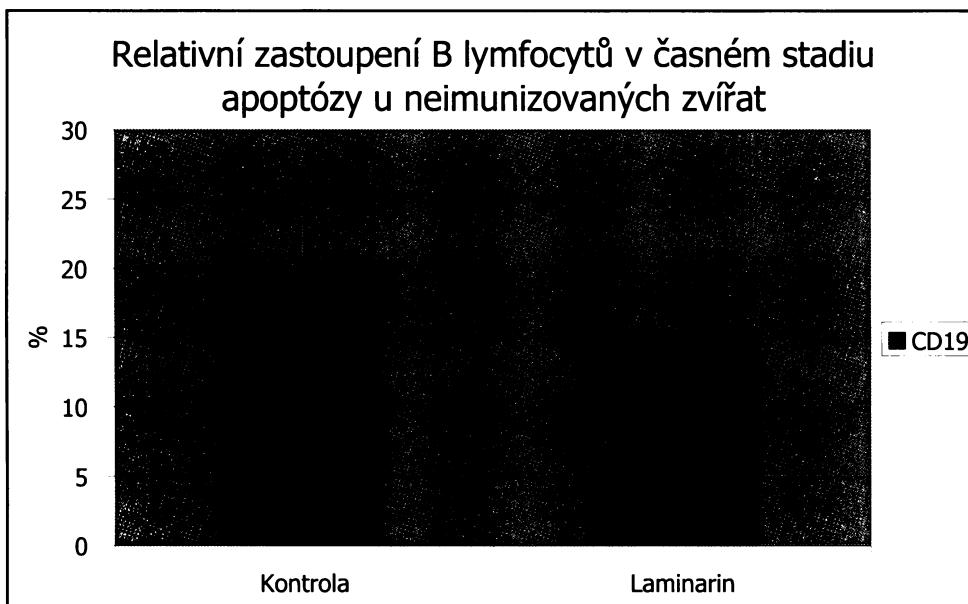
### ► Graf 15



## 5.9 Stanovení relativního zastoupení B lymfocytů v časném stadiu apoptózy

U imunizovaných zvířat bylo zjištěno statisticky významné zvýšení ( $p=0,004$ ) relativního zastoupení splenických B lymfocytů v časném stadiu apoptózy. U neimunizovaných zvířat byl zjištěn statisticky neprůkazný pokles ( $p=0,3$ ).

### ► Graf 16



### ► Graf 17



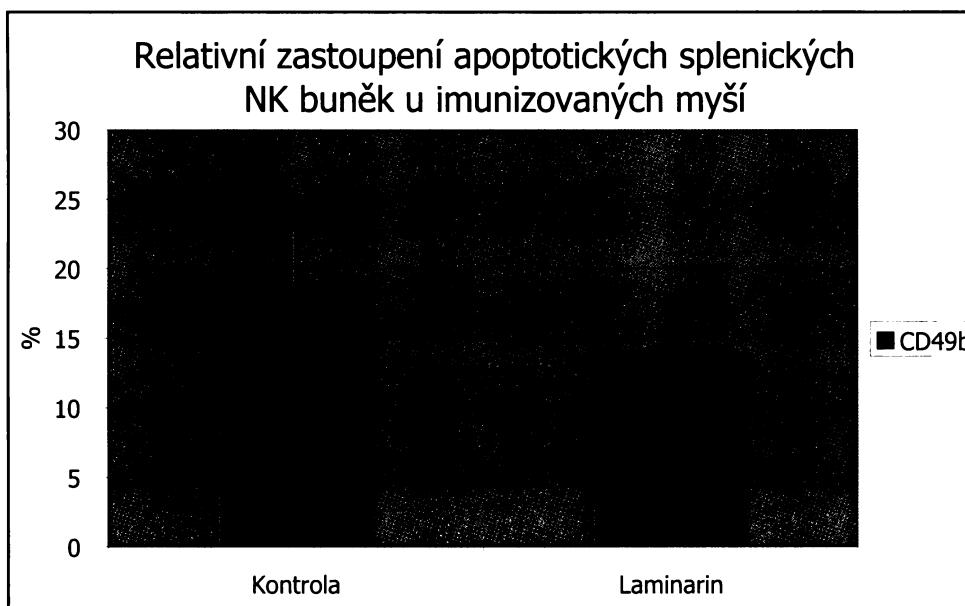
## 5.10 Stanovení relativního zastoupení splenických NK buněk v časném stadiu apoptózy

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v relativním zastoupení apoptotických splenocytů nesoucích znak CD49b, a to jak u imunizovaných, tak i neimunizovaných zvířat ( $p = 0,24$ ;  $p = 0,68$ ). U neimunizovaných zvířat bylo pouze zjištěno statisticky neprůkazné zvýšení.

### ► Graf 18



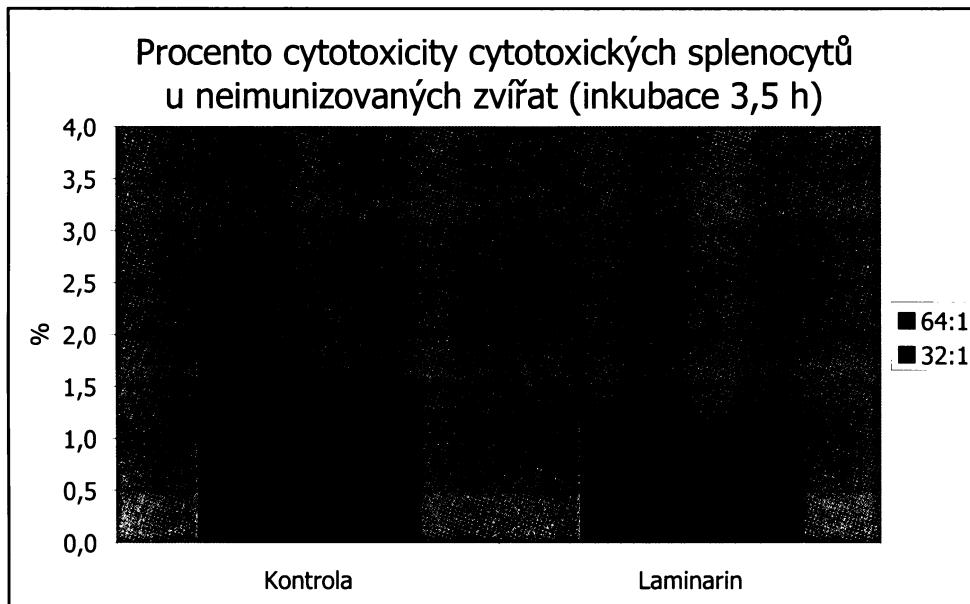
### ► Graf 19



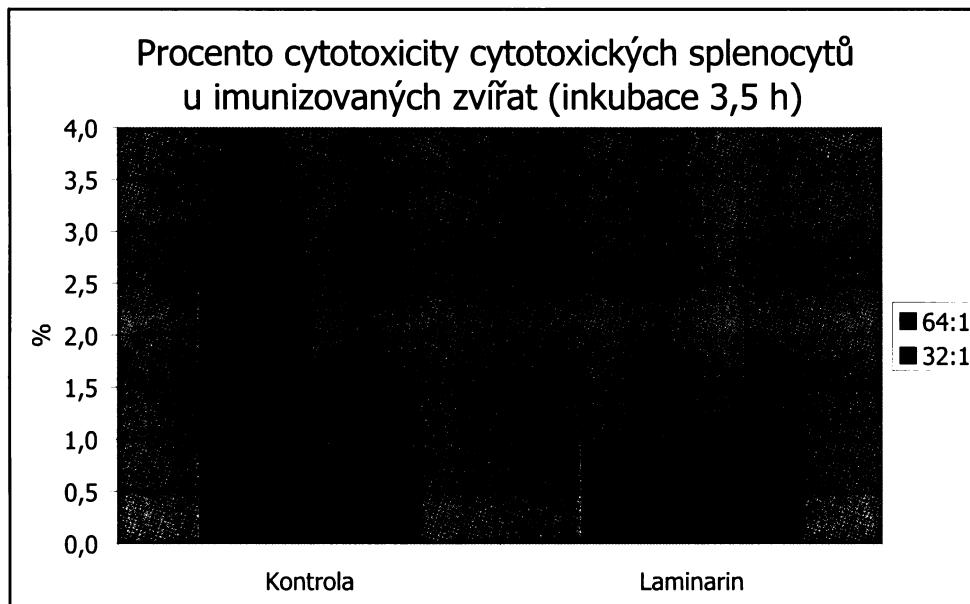
## 5.11 Stanovení aktivity cytotoxických splenocytů

U neimunizovaných zvířat nebyl po 3,5h inkubaci zjištěn průkazný rozdíl v cytotoxické aktivitě testovaných splenocytů. U imunizovaných zvířat byl zjištěn statisticky průkazný pokles úrovně cytotoxicity v případě poměru E:T = 64:1 ( $p = 0,0001$ ).

### ► Graf 20

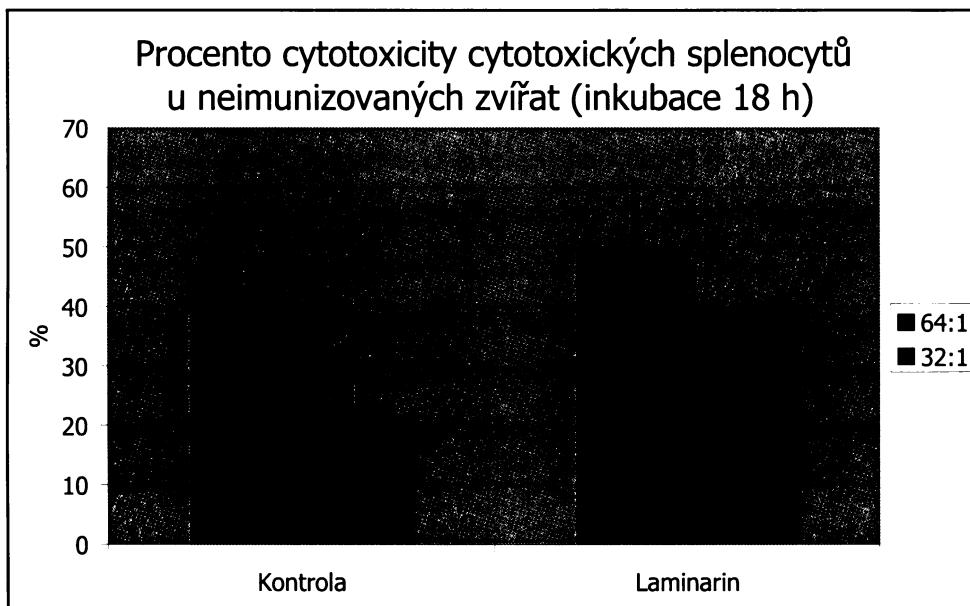


### ► Graf 21

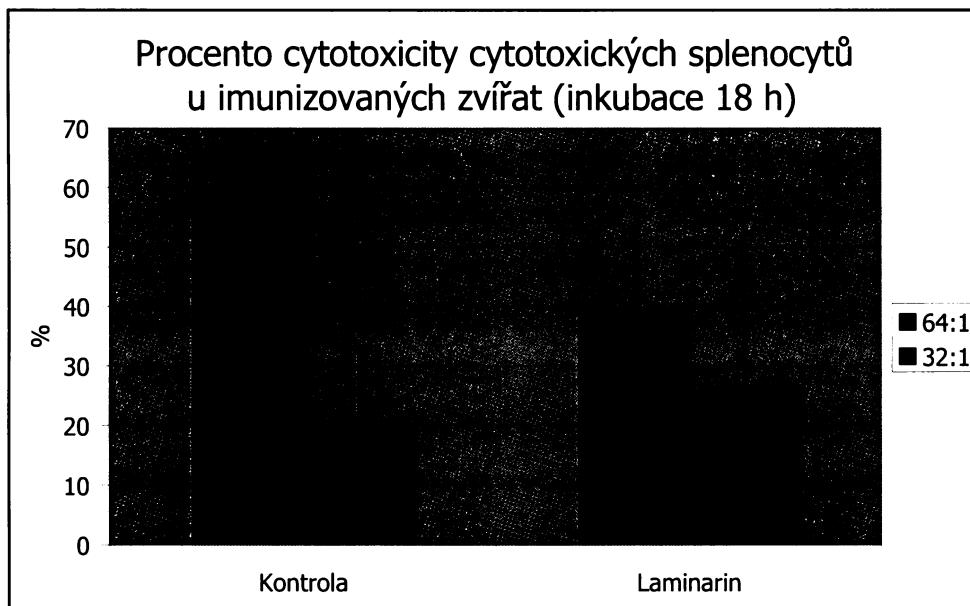


U neimunizovaných zvířat bylo pomocí testu cytotoxicity po 18h inkubaci zjištěno průkazné zvýšení cytotoxické aktivity testovaných splenocytů při poměru E:T = 32:1 ( $p = 0,0005$ ). U imunizovaných zvířat nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl úrovně cytotoxicity ani při jednom z poměrů E:T.

► **Graf 22**



► **Graf 23**



## **6. DISKUSE**

---

$\beta$ -glukany patří s dalšími příbuznými polysacharidovými sloučeninami jako jsou inulin nebo fruktany (BLAUT, 2002; MODRIANSKÝ, 2003) mezi prebiotika, která jsou nejen nutnou součástí nutrice, ale také se předpokládá, že přes GALT mohou ovlivňovat průběh imunitních reakcí.

Pro svou práci jsem zvolil  $\beta$ -glukan izolovaný z mořské řasy *Laminaria digitata* (laminarin). Je popisován jeho výrazný imunomodulační efekt, který je dán jeho strukturou ( $\beta$ -(1,3)-glukan s nízkou frekvencí  $\beta$ -(1,6) větvení) (VĚTVIČKA, YVÍN, 2004). Laminarin je rozpustný  $\beta$ -glukan, což umožňuje jeho využití jako nutriční doplněk v pitných programech, které jsou zaměřeny na preventivní podporu imunity v obdobích očekávaných infekcí (podzim-jaro), anebo podporu imunity obyvatel v průmyslově znečistěných oblastech, případně pracovníků ve zdraví ohrožujících provozech, a dále jako podpora rekovalessence po úrazech a operačních zákrocích.

Vliv  $\beta$ -glukanů na imunitní systém je předmětem dlouholetého výzkumu. Velké množství prací je věnováno jeho působení na makrofágy a granulocyty (FERENČÍK ET AL., 1986; ABEL ET AL., 1989; LEBLANC ET AL., 2006; TAYLOR ET AL., 2002; PALIC ET AL., 2005), méně je známo o lymfoidních buňkách. Proto jsem se v této práci zaměřil na studium některých lymfocytárních populací, NK buňky a jejich apoptózu.

Na experimentálním modelu (myši kmene BALB/c, samice, 3 měsíce) jsem sledoval vliv dlouhodobého pitného programu v délce 28 dnů suplementovaného laminarinem (1,47 g/l). Na začátku pokusu, v jeho průběhu a na jeho konci byla stanovena hmotnost všech experimentálních zvířat. Růst hmotnosti byl během experimentu u všech skupin totožný (viz grafy 1 a 2), což svědčí o tom, že takto aplikovaný  $\beta$ -glukan neovlivňuje využitelnost nutričního energetického přísunu.

Vliv suplementace laminarinem na vybrané imunitní parametry byl porovnáván u neimunizovaných a imunizovaných zvířat. Bylo sledováno ovlivnění relativního zastoupení sleziných subpopulací  $T_H$  a  $T_C$  lymfocytů, NK a NKT buněk, B lymfocytů, a exprese povrchového IgM. Dále byly stanoveny absolutní počty buněk tvořících protilátky IgM a IgG, cytotoxická aktivita efektorových splenocytů a jejich relativní zastoupení v časném stadiu apoptózy.

## 6.1 Buněčná imunita – T lymfocyty, $T_H$ , $T_C$ , NK, NKT

T lymfocyty byly identifikovány pomocí průtokové cytometrie monoklonální protilátkou proti myšímu membránovému antigenu CD3, který je součástí receptorově-signalačního komplexu TCR. K odlišení subpopulací  $T_H$  a  $T_C$  lymfocytů byly použity monoklonální protilátky proti myším T-lymfocytárním koreceptorům CD4 ( $T_H$ ) a CD8 ( $T_C$ ), které hrají zásadní roli při rozpoznávání antigenů prezentovaných MHCgp a jsou specifické pro daný buněčný typ.

U supplementovaných neimunizovaných zvířat došlo k nesignifikantnímu zvýšení relativního zastoupení celkové populace T lymfocytů, zatímco u subpopulace  $T_H$  ( $CD4^+$ ) došlo u neimunizované i imunizované skupiny k nesignifikantnímu poklesu relativního zastoupení. Relativní zastoupení T lymfocytů nesoucích koreceptor CD8 nebylo supplementací laminarinem ovlivněno (viz grafy 4-7). Tyto nálezy nelze porovnat s literárními údaji, protože doposud nebyly publikovány práce zabývající se podobnou problematikou, ojedinělá je práce TSUKADY ET AL. (2003), kde se referuje o zvýšení počtu intraepiteliálních CD4 i CD8 pozitivních T lymfocytů u myší kmene C57BL/6, kterým byl 7 dní perorálně podáván  $\beta$ -glukan (Norwegian  $\beta$ 1; 25 mg/myš/den). Potvrzují však dřívější výsledky zjištěné v naší laboratoři, kdy byl ve stejném experimentálním uspořádání signifikantní pokles relativního zastoupení  $T_H$  lymfocytů popsán (KŘÍŽAN, 2004).

Co se týče relativního zastoupení NK a NKT buněk, u obou skupin bylo zjištěno nesignifikantní zvýšení relativního zastoupení NK buněk, i když u imunizovaných zvířat bylo výraznější. U subpopulace NKT buněk, nebyly zaznamenány žádné změny. Jednoznačný závěr z těchto výsledků nelze odvodit, ale lze usuzovat, že pozorované tendenze nejsou náhodné. Je možné, že při jiném uspořádání pokusu nebo jiném dávkování (způsob aplikace nebo zvýšení dávek) by změny v relativním zastoupení těchto subpopulací byly výraznější.  $\beta$ -glukan se váže na receptor CR3, který nesou NK buňky na svém povrchu a jak prokázaly práce Větvičky a Yvina (2004), prokazatelně zvyšuje jejich cytotoxickou aktivitu.

## 6.2 Humorální imunita – B lymfocyty, IgM

Ke zjištění relativního zastoupení B lymfocytů byla použita průtoková cytometrie a značení monoklonální protilátkou proti povrchovému antigenu CD19. Molekula CD19 je důležitou součástí komplexu asociovaného s receptorem BCR a je specifická pro B lymfocyty. U těchto lymfocytů jsem stanovoval ještě relativní zastoupení subpopulace exprimujících povrchové IgM.

Relativní zastoupení celkové populace B lymfocytů u imunizovaných a suplementovaných zvířat bylo signifikantně nižší. U skupiny neimunizovaných zvířat bylo rovněž zjištěno nižší relativní zastoupení B lymfocytů, které však bylo statisticky neprůkazné (viz grafy 8 a 9). Z toho lze usuzovat, že laminarin působí na antigenem indukované B lymfocyty tak, že urychluje jejich terminální diferenciaci do stadia protilátky produkujících buněk. Vliv suplementace laminarinem na relativní zastoupení subpopulace CD19<sup>+</sup> B lymfocytů nesoucích navíc povrchové IgM nebyl prokázán.

Narodíl od makrofágů, neutrofilů, T lymfocytů a NK buněk nenesou B lymfocyty povrchové receptory pro  $\beta$ -glukan. K ovlivnění této populace dochází pravděpodobně nepřímo, a to působením cytokinů, které jsou produkovány jinými typy buněk. V úvahu připadá IL-6, protože bylo prokázáno, že  $\beta$ -glukany indukují jeho tvorbu u makrofágů (VĚTVIČKA, YVIN, 2004). Makrofágy jsou v těchto procesech pravděpodobně klíčovými buňkami. Bylo prokázáno, že laminarin se ze střeva dostává i do relativně anatomicky vzdálených orgánů jako jsou játra nebo ledviny (VĚTVIČKA ET AL., 2006). Lze proto předpokládat, že makrofágy v GALT, v peritoneu i v regionálních lymfatických uzlinách (mezenteriu) jsou aktivovány laminarinem k tvorbě cytokinů bezprostředně při jeho translokaci z trávicího traktu do vnitřního prostředí organismu.

### 6.3 Stanovení absolutního počtu buněk produkujících hemolytické protilátky IgM a IgG

Pro potvrzení výše uvedené hypotézy, že laminarin ovlivňuje diferenciaci B lymfocytů, byly stanovovány absolutní počty buněk produkujících hemolytické protilátky IgM a IgG u kontrolních a suplementovaných zvířat na vrcholu protilátkové odpovědi (5. den po imunizaci). Absolutní počty buněk tvořících IgM i IgG protilátky se u zvířat suplementovaných laminarinem třikrát signifikantně zvýšily oproti kontrolám (viz graf 3). Z toho lze usuzovat, že laminarin určitým způsobem stimuluje terminální funkční diferenciaci B lymfocytů (tvorbu protilátek), tento efekt však nelze jednoznačně přisoudit makrofágovému IL-6. Vzhledem k tomu, že se absolutní počty buněk produkujících IgG protilátky (oproti IgM produkujícím buňkám) zvýšily daleko markantněji, lze předpokládat, že laminarin může aktivovat mechanismy, které urychlují izotypový přesmyk z IgM na IgG. Rovněž tyto nálezy není možné porovnat šířeji s literárními zdroji, protože vliv  $\beta$ -glukanu na B lymfocyty nebyl rovněž detailněji zkoumán.

Pouze práce AGOSTINO BIELLY ET AL., (2006) popisuje stimulační účinek polysacharidové frakce (obsahuje mimo jiné i  $\beta$ -1,3-glukan) buněčné stěny patogenní houby *Paracoccidioides brasiliensis* na zvýšení produkce protilátek typu IgG u myší, které vysvětluje vazbou komplementových složek na fragmeny buněčné stěny, které se následně váží na specifické receptory (CR1, CR2) na povrchu B lymfocytů.

## 6.4 Stanovení časného stadia apoptózy u vybraných populací imunokompetentních buněk

U neimunizovaných zvířat vedla suplementace laminarinem k signifikantnímu snížení procenta apoptotických buněk, zatímco u imunizovaných ke statisticky průkaznému zvýšení (viz grafy 14 a 15). Zvýšení relativního zastoupení splenocytů v časném stadiu apoptózy po podání laminarINU u imunizovaných zvířat lze připsat jeho imunokostimulačním účinkům na B lymfocyty (viz výše), které tvoří ve slezině majoritní populaci (LANGEVELD, 2006). Zvýšení relativního zastoupení celkové populace apoptotických splenocytů je pravděpodobně způsobeno zánikem terminálně funkčně diferencovaných B lymfocytů (DEFRANCE ET AL., 2002). Tuto hypotézu potvrzuje i výsledek stanovení relativního zastoupení subpopulace apoptotických B lymfocytů. U neimunizovaných zvířat vedla suplementace k nesignifikantnímu snížení, zatímco u imunizované skupiny došlo k signifikantnímu zvýšení relativního zastoupení odpovídajícímu zvýšení u celkové populace splenocytů (viz grafy 16 a 17).

Suplementace laminarinem neovlivnila relativní zastoupení apoptotických splenických NK buněk (exprimujících specifický povrchový antigen CD49b) (viz grafy 18 a 19). U neimunizovaných zvířat došlo sice k výraznému zvýšení relativního počtu časně apoptotických buněk, ale nebylo statisticky průkazné.

## 6.5 Stanovení míry cytotoxicity efektorových splenocytů

Ovlivnění cytotoxicke aktivity efektorových NK buněk (E) laminarinem bylo sledováno na *in vitro* systému proti cílovým (T) buňkám myší nádorové linie YAC-1. U neimunizovaných zvířat došlo po 3,5h inkubaci k nesignifikantnímu poklesu cytotoxicke aktivity v obou poměrech E:T (viz graf 20), u imunizovaných myší byl pokles v poměru E:T = 64:1 signifikantní (viz graf 21). U neimunizovaných zvířat bylo zjištěno signifikantní zvýšení úrovně cytotoxicity v poměru E:T = 32:1 až po 18h inkubaci. Ostatní rozdíly zjištěné po 18h inkubaci byly nesignifikantní (viz grafy 22 a 23).

Podobné rozporuplné údaje týkající se ovlivnění cytotoxické aktivity NK buněk  $\beta$ -glukanem byly publikovány i jinými autory. Zatímco DAVIS ET AL. (2004) nezjistil žádný vliv, v práci VĚTVIČKY ET AL. (1996)  $\beta$ -glukan výrazně zvyšoval cytotoxickou aktivitu proti buňkám linie YAC-1 opsonizovaným iC3b. Je tedy pravděpodobné, že  $\beta$ -glukan NK buňky dostatečně nestimuluje tak, aby přímo jejich cytotoxickou aktivitu zvyšoval, ale spíše stimuluje reaktivitu NK buněk na iC3b opsonizované nádorové buňky. Jak bylo již zmíněno, v úvahu připadá receptor CR3, na který se kromě iC3b váže i  $\beta$ -glukan (THORNTON, 1996; ROSS, 1993). Ze těchto údajů vyplývá, že zavedené využití  $\beta$ -glukanu jako podpůrného prostředku při klasické léčbě nádorových onemocnění je opodstatněné.

## **7. ZÁVĚR**

---

Ve své diplomové práci jsem se zabýval studiem vlivu  $\beta$ -glukanu – laminarinu na vývoj hmotnosti, T lymfocytární subpopulace  $T_H$  a  $T_C$ , populace B lymfocytů, produkci protilátek, NK a NKT buňky, cytotoxickou aktivitu a apoptózu imunokompetentních buněk. Jako experimentální model byly použity myši kmene BALB/c. Sledované parametry byly stanoveny na imunizovaných a neimunizovaných zvířatech. Laminarin byl aplikován v dlouhodobém pitném programu *ad libitum* (28 dnů).

**Získané výsledky ukázaly, že:**

- ▶ hmotnost experimentálních zvířat nebyla ovlivněna
- ▶ relativní zastoupení splenických NK, NKT a T buněčných subpopulací nebylo ovlivněno, ale v přítomnosti antigenu došlo ke snížení relativního zastoupení B lymfocytů
- ▶ došlo ke zvýšení počtu buněk tvořících protilátky třídy IgM a IgG proti T-závislému antigenu (ovčí erytrocyty)
- ▶ NK buněčná cytotoxická funkce nebyla ovlivněna
- ▶ po současném podání antigenu došlo ke zvýšení počtu apoptotických splenocytů, které byly identifikovány jako B lymfocyty

## 8. LITERATURA

---

1. ABBAS, A. K., MURPHY, K. M., SHER, A.: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787–793, 1996
2. ABEL, G., SZOLOSI, J., CHIHARA, G., FACHET, J.: Effect of lentinan and mannan on phagocytosis of fluorescent latex microbeads by mouse peritoneal macrophages: a flow cytometric study. *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 615–621, 1989
3. AGOSTINO BIELLA, C., UFECKER, M., DA SILVA, M. F., BARBOSA, J. E., SILVA, C. L., PEREIRE CROTT, L. S.: Investigation of the role of complement and complement receptors in the modulation of B cell activation by a *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction. *Clinical Immunology* 118, 327–331, 2006
4. AL TUWAIJRI, A. S., MAHMOUD, A. A., AL MOFLEH, I. A., AL KHUWAITIR, S. A.: Effect of glucan on Leishmania major infection in BALB/c mice. *J. Med. Microbiol.* 23, 363–365, 1987
5. ALLISON, T.J., WINTER, C. C., FOURNIE, J. J., BONNEVILLE, M., GARBOCZI, D. N.: Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 411, 820–824, 2001
6. AMINO, M., NOGUCHI, R., YATA, J., MATSUMURA, J., HIRAYAMA, R., ABE, O., ENOMOTO, K., ASATO, Y.: Studies on the effect of lentinan on human immune system. II. In vivo effect on NK activity, MLR induced killer activity and PHA induced blastic response of lymphocytes in cancer patients. *Jpn. J. Cancer Chemother.* 10, 2000–2006, 1983
7. ANDERSON, E., MATSUNAGA, T.: Jaw, adaptive immunity and phylogeny of vertebrate antibody VH gene family. *Res. Immunol.* 147, 233–240, 1996
8. ANDERSON, K. V.: Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 13–19, 2000
9. AOYAGI, K., ITOH, N., ABE, F., UCHIDA, K., ISHIZUKA, M., TAKEUCHI, T., YAMAGUCHI, H.: Enhancement by ubenimex (bestatin) of host resistance to *Candida albicans* infections. *J. Antibiot.* 45, 1778–1784, 1992
10. ARIIZUMI, K., SHEN, G. L., SHIKANO, S., XU, S., RITTER, R., 3<sup>RD</sup>, KUMAMOTO, T., EDELBAUM, D., MORITA, A., BERGSTRESSER, P. R., TAKASHIM, A.: Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 275, 20157–20167, 2000
11. ARMSTRONG, J. S.: Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* 28, 253–260, 2006
12. BENGMARK, S.: Immunonutrition: Role of biosurfactants, fiber, and probiotic bacteria. *Nutrition* 14, 585–594, 1998
13. BERKE, G.: Unlocking the secret of CTL and NK cells. *Immunol. Today* 16, 343–346, 1995
14. BIN, L. H., XU, L.G., SHU, H. B.: TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 24526–24532, 2003
15. BJORCK, P., AXELSSON, B., PAULIE, S.: Expression of CD40 and CD43 during activation of human B lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 33, 211–218, 1991
16. BLACKMAN, M., KAPPLER, J., MARRACK, P.: The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248, 1335–1341, 1990
17. BLAUT, M.: Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur. J. Nutr.* 41, 11–16, 2002
18. BOURKE, E., BOSISIO, D., GOLAY, J., POLENTARUTTI, N., MANTOVANI, A.: The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 102, 956–963, 2003

19. BOUSQUET, M., ESCOULA, L., PIPPY, B., BESSIERES, M. H., CHAVANT, L., SEGUELA, J. P.: Enhancement of resistance of mice *Toxoplasma gondii* by 2 polysaccharides beta 1-3, beta 1-6 (PSAT and Scleroglucan). *Annu. Parasitol. Hum. comp.* 63, 398–409, 1988
20. BROWN, G. D., GORDON, S.: Fungal  $\beta$ -Glucans and Mammalian Immunity. *Immunity* 19, 311–315, 2003
21. BROWN, G. D., HERRE, J., WILLIAMS, D. L., WILLMENT, J. A., MARSHALL, A. S. J., GORDON, S.: Dectin-1 mediates the biological effects of  $\beta$ -glucans. *J. Exp. Med.* 197, 1119–1124, 2003
22. BROWN, G. D., TAYLOR, P. R., REID, D. M., WILLMENT, J. A., WILLIAMS, D. L., MARTINEZ-POMARES, L., WONG, S. Y. C., GORDON, S.: Dectin-1 is a major  $\beta$ -glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 196, 407–412, 2002
23. BROWN, G. D., AND GORDON, S.: Immune recognition: a new receptor for beta-glucans. *Nature* 413, 36–37, 2001
24. BURNS, K., CLATWORTHY, J., MARTIN, L., MARTINON, F., PLUMPTON, C., MASCHERA, B., LEWIS, A., RAY, K., TSCHOPP, J., VOLPE, F.: Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol.* 2, 346–351, 2000
25. CALL, M. E., PYRDOL, J., WIEDMANN, M., WUCHERPENNIG, K. W.: The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111, 967–979, 2002
26. CARDING, S. R., EGAN P. J. ET AL.: Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 336–342, 2002
27. CARTER, R. H., DOODY, G. M., BOLEN, J. B., FEARON, D. T.: Membrane IgM-induced tyrosine phosphorylation of CD19 requires a CD19 domain that mediates association with components of the B cell antigen receptor complex. *J. Immunol.* 158, 3062–3069, 1997
28. CARTER, R. H., TUVESON, D. A., PARK, D. J., RHEE, S. G., FEARON, D. T.: The CD19 complex of B lymphocytes: activation of phosphofunctionally lipase C by a protein tyrosine kinase-dependent pathway that can be enhanced by the membrane IgM complex. *J. Immunol.* 147, 3663–3671, 1991
29. CERWENKA, A., LANIER, L. L.: Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Rev. Immunol.* 1, 41–49, 2001
30. CISNEROS, R. L., GIBSON, F. C., TZIANABOS, A. O.: Passive transfer of poly-(1-6)-beta-D-glucotriosyl-(1-3)-beta-D-glucopyranose glucan protection against lethal infection in an animal model of intra-abdominal sepsis. *Infect. Immun.* 64, 2201–2205, 1996
31. COOK, J. A., TAYLOR, D., COHEN, C., HOFFMANN, E. O., RODRIQUE, J., MALSHET, V., DI LUZIO, N. R.: Evaluation of effector cells mediating the antitumor action of glucan. *J. Reticuloendothel Soc.* 22, 21–34, 1977
32. CUMANO, A., DIETERLEN-LIEVRE, F., GODIN, I.: Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907–916, 1996
33. CZOP, J. K., AUSTEN, K. F.: Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte beta-glucan receptor. *J. Immunol.* 135, 3388–3393, 1985
34. DAVIS, J. M., MURPHY, E. A., BROWN, A. S., CARMICHAEL, M. D., GHAFFAR, A., MAYER, E. P.: Effects of oat beta-glucan on innate immunity and infection after exercise stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36, 1321–1327, 2004
35. DEFRENCE, T., CASAMAYOR-PALLEJA, M., KRAMMER, P. H.: The life and death of a B cell. *Adv. Cancer Res.* 86, 195–225, 2002
36. DEFRESCO, A. L.: B-cell activation. *Immunol. Rev.* 176, 5–9, 2000
37. DEMPSEY, P. W., ALLISON, M. E. D., AKKARAJU, S., GOODNOW, C. C., FEARON, D. T.: C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271, 348–350, 1996

38. DIEFENBACH, A., RAULET, D. H.: Natural killer cells: stress out, turn on, tune in. *Curr. Biol.* 9, 851–853, 1999
39. DUKE, R. C., CHERVENAK, R., COHEN, J. J.: Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6361–6365, 1983
40. DUSHA, M. S., ELDON, E. D.: Drosophila immune response as models for human immunity. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 10–14, 1998
41. EDELMAN, G. M.: The structure and function of antibodies. *Sci. Am.* 223, 34–42, 1970
42. ESSER, C., RADBRUCH, A.: Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 717–735, 1990
43. EXLEY, M., TERHORST, C., WILEMAN, T.: Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. *Semin. Immunol.* 3, 283–297, 1991
44. FADOK, V. A., VOELKER, D. R., CAMPBELL, P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L., HENSON, P. M.: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207–2216, 1992
45. FEARON, D. T., CARROLL, M. C.: Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 393–422, 2000
46. FEARON, D. T., LOCKSLEY, R. M.: The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50–53, 1996
47. FERENČÍK, M., KOTULOVÁ, D., MASLER, L., BERGENDI, L., SANDULA, J.: Modulatory effect of glucans on the functional and biochemical activities of guinea-pig macrophages. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 8, 163–166, 1986
48. FINKEL, T. H., KUBO, R. T., CAMBIER, J. C.: T-cell development and transmembrane signaling: changing biological responses through an unchanging receptor. *Immunol. Today* 12, 79–85, 1991
49. FITZGERALD, K. A., PALSSON-MCDERMOTT, E. M., BOWIE, A. G., JEFFERIES, C. A., MANSELL, A. S., BRADY, G., BRINT, E., DUNNE, A., GRAY, P., HARTE, M. T., McMURRAY, D., SMITH, D.E., SIMS, J. E., BIRD, T.A., O'NEILL, L.A.: Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78–83, 2001
50. FRIC, P.: Probiotics in gastroenterology. *Z. Gastroenterol.* 40, 197–201, 2002
51. GERRARD, J. E., GEDDES, C. A., REGGIN, P. L., GERRARD, C. D., HORNE, S.: Serum IgE levels in white and metis communities in Saskatchewan. *Ann. Allergy* 37, 91–100, 1976
52. GIBSON, G. R., ROBERFROID, M. B.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412, 1995
53. GLAS, R., FRANKSSON, L., UNE, C., ELORANTA, M. L., OHLEN, C., ORN, A., KARRE, K.: Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J. Exp. Med.* 191, 129–138, 2000
54. GOLD, R., SCHMIED, M., GIEGERICH, G., BREITSCHOPF, H., HARTUNG, H. P., TOYKA, K. V., LASSMANN, H.: Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* 70, 219–225, 1994
55. GOLDMAN, R.: Characteristics of the beta-glucan receptor of murine macrophages. *Exp. Cell Res.* 174, 481–490, 1988
56. GRIFFITHS, G. M.: The cell biology of CTL killing. *Current Opinion in Immunology* 7, 343–348, 1995
57. GUARNER, F., MALAGELADA, J. R.: Bacterial flora of the digestive tract. *Gastroenterol. Hepatol.* 26, 1–5, 2003
58. GUHA, M., MACKMAN, N.: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signalling* 13, 85–94, 2001

59. GUMPERZ, J E., PARHAM, P.: The enigma of the natural killer cells. *Nature* 378, 245–248, 1995
60. HAEN, P. J.: Principles of hematology. Wm. Communication, Inc., Dubuque, USA, 1995
61. HAYASHI, F., SMITH, K. D., OZINSKY, A., HAWN, T. R., YI, E. C., GOODLET, D. R., ENG, J. K., AKIRAK, S., UNDERHILL, D. M., ADEREM, A.: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103, 2001
62. HAYDAY, A.:  $\gamma\delta$  cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 975–1026, 2000
63. HAYNES, B. F.: The human thymic microenvironment. *Adv. Immunol.* 36, 87–142, 1984
64. HERRE, J., GORDON, S., BROWN, G. D.: Dectin-1 and its role in the recognition of  $\beta$ -glucans by macrophages. *Molecular Immunology* 40, 869–876, 2004
65. HORNG, T., BARTON, G. M., MEDZHITOV, R.: TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2, 835, 2001
66. HUA, C., BOYER, C., GUIMEZANES, A., ALBERT, F., SCHMITT-VERHULST, A. M.: Analysis of T cell activation requirements with the use of alloantigens or an anti-clonotypic monoclonal antibody. *J. Immunol.* 136, 1927–1936, 1986
67. ITO, T., AMAKAWA, R., KAISHO, T., HEMMI H., TAJIMA, K., UEHIRA, K., OZAKI, Y., TOMIZAWA, H., AKIRA, S., FUKUHARA, S.: Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* 195, 1507–1512, 2002
68. JANEWAY, C. A. JR.: The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today* 13, 11–16, 1992
69. JARROSSAY, D., NAPOLITANI, G., COLONNA, M., SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A.: Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 3388–3393, 2001
70. KATAOKA, K., MUTA, T., YAMAZAKI, S., TAKESHIGE, K.: Activation of macrophages by linear (1right-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J. Biol. Chem.* 277, 36825–36831, 2002
71. KEARSE, K. P., ROBERTS, J. L., SINGER, A.: TCR $\alpha$ -CD3 $\delta\epsilon$  association is the initial step in  $\alpha\beta$  dimer formation in murine T cells and is limiting in immature CD4+CD8+ thymocytes. *Immunity* 2, 391–399, 1995
72. KINCADE, P. W., LEE, G., WATANABE, T., SUN, L., SCHEID, M. P.: Antigens displayed on murine B lymphocyte precursors. *J. Immunol.* 127, 2262–2268, 1981
73. KOSHLAND, M. R.: The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annu. Rev. Immunol.* 3, 425–453, 1985
74. KRÍŽAN, J.: Studium účinku perorálně podávaných prebiotik. Diplomová práce, UK PřF, 2004
75. KROP, I., DE FOUGEROLLES, A. R., HARDY, R. R., ALLISON, M., SCHLISSEL, M. S., FEARON, D. T.: Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19. *Eur. J. Immunol.* 26, 238–442, 1996
76. KRUG, A., TOWAROWSKI, A., BRITSCH, S., ROTHENFUSSER, S., HORNUNG V., BALS, R., GIESE, T., ENGELMANN, H., ENDRES, S., KRIEG, A.M., HARTMANN, G.: Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 31, 3026–3037, 2001
77. KUBY, J., FREEMAN W.H.: Immunology, New York, 1997
78. LANGEVELD, M., GAMADIA, L. E., TEN BERGE, I. J.: T-lymphocyte subset distribution in human spleen. *Eur. J. Clin. Invest* 36, 250–256, 2006

79. LANIER, L. L., PHILLIPS J. N.: Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol. Today* 17, 86–91, 1996
80. LANIER, L. L.: NK cell receptors. *Rev. Immunol.* 16, 359–393, 1998
81. LANIER, L. L.: On guard-activating NK cell receptors. *Nature Immunol.* 2, 23–27, 2001
82. LEBLANC, B. W., ALBINA, J. E., REICHNER, J. S.: The effect of PGG- $\{\beta\}$ -glucan on neutrophil chemotaxis in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 79, 667–675, 2006
83. LIANG, J., MELICAN, D., CAFRO, L., PALACE, G., FISSETTE, L., ARMSTRONG, R., PATCHEN, M. L.: Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increase leukocyte counts and increased neutrophils oxidative burst activity. *Int. J. Immunopharmacol.* 20, 595–614, 1998
84. LIU, Y. J., KANZLER, H., SOUMELIS, V., GILLIET, M.: Dendritic cells, plasticity and crossregulation. *Nat. Immunol.* 2, 585–589, 2001
85. LOKEN, M. R., SHAH, V. O., HOLLANDER, Z., CIVIN, C. I.: Flow cytometric analysis of normal B lymphoid development. *Pathol. Immunopathol. Res.* 7, 357–370, 1988
86. LUO, C., ZHENG, L.: Independent evolution of Toll and related genes in insects and mammals. *Immunogenetics* 51, 92–98, 2000
87. MACFARLANE, G. T., CUMMINGS, J. H.: Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Brit. Med. J.* 318, 999, 1999.
88. MACFARLANE, G. T., CUMMINGS, J. H.: The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: Phillips, S. F., Pemberton, J. H., Shorter, R. G.: *The large intestine: physiology, pathophysiology, and disease*. New York, Raven Press 51, 1991
89. MACKMAN, N.: Lipopolysaccharide induction of gene expression in human monocytic cells. *Immunological Research* 21, 247–251, 2000
90. MANDELBOIM, D., MALIK, P., DAVIS, D. M., JO, C. H., BOYSON, J. E., STROMINGER, J. L.: Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Immunology* 96, 5640–5644, 1999
91. MARIE-CARDINE, A., SCHRAVEN, B.: Coupling the TCR to Downstream Signalling Pathways – The Role of Cytoplasmic and Transmembrane Adaptor Proteins. *Cellular Signalling* 11, 705–712, 1999
92. MEDVINSKY, A., DZIERZAK, E.: Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897–906, 1996
93. MEDZHITOV, R., JANEWAY, JR. CH. A.: Innate Immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295–308, 1997
94. MESTECKY, J., RUSSELL, M. W.: Mucosal immunoglobulins and their contribution to defence mechanisms: an overview. *Biochem. Soc. Trans.* 2, 457–462, 1997
95. METCALF, D., BRUMBY, M.: The role of the thymus in the ontogeny of the immune system. *J. Cell Physiol.* 67, 149–168, 1966
96. MILLER, J. F., WATSON, J. D.: Intracellular recognition events eliminate self-reactive T cells. *Scand. J. Immunol.* 28, 389–395, 1988
97. MODRIANSKÝ, M., VALENTOVÁ, K., PŘÍKRYLOVÁ, V., WALTEROVÁ, D.: Přírodní látky v prevenci onemocnění trávícího traktu. *Chem. Listy* 97, 540–547, 2003
98. MOND, J. J., LEES, A., SNAPPER, C. M.: T-cell independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 655–692, 1995
99. MOND, J. J., SEGHAI, E., KUNG, J., FINKELMAN, F. D.: Increased expression of I-region-associated antigen (Ia) on B cells after cross-linking of surface immunoglobulin. *J. Immunol.* 127, 881–888, 1981

100. MORETTA, A., BIASSONI L., BOTTINO, C., MINGARI, M. C., MORETTA, L.: Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis. *Immunol. Today*, 21, 228-234, 2000
101. MORIKAWA, K., NOGUCHI, T., YAMAZAKI, M., MIZUNO, D.: Calcium-dependent and -independent tumoricidal activities of polymorphonuclear leukocytes induced by a linear  $\beta$ -1,3-D-glucan and phorbol myristate acetate in mice. *Cancer Res.* 46, 66, 1986
102. MOSMANN, T. R., COFFINAN, R. L.: TH1 and TH2 cells different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7, 145-173, 1989
103. MUTO, S., VĚTVIČKA, V., ROSS, G. D.: CR3 (CD11b/CD18) expressed by cytotoxic T cells and natural killer cells is upregulated in a manner similar to neutrophil CR3 following stimulation with various activating agents. *J. Clin. Immunol.* 13, 175-184, 1993
104. MUZIO, M., BOSISIO, D., POLENTARUTTI, N., D'AMICO, G., STOPPACCIARO, A., MANCINELLI, R., VAN'T VEER, C., PENTON-ROL, G., RUCCO, L. P., ALLAVENA, P., MANTOVANI, A.: Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *Immunol.* 164, 5998-6004, 2000
105. NISHIKAWA, S., KINA, T., AMAGAI, T., KATSURA, Y.: Early B cell precursors in long-term bone marrow culture: selective development in the bone marrow of irradiated recipients. *Eur. J. Immunol.* 15, 696-701, 1985
106. NUNEZ, C., NISHIMOTO, N., GARTLAND, G. L., BILLIPS, L. G., BURROWS, P. D., KUBAGAWA, H., COOPER, M. D.: B cells are generated throughout life in humans. *J. Immunol.* 156, 866-872, 1996
107. OHNO, N.: Chemistry and Biology of Angiitis Inducer, *Candida albicans* Water-Soluble Mannoprotein- $\beta$ -Glucan Complex (CAWS). *Microbiol. Immunol.* 47, 479-790, 2003
108. OHNO, S., MATSUNAGA, T., LEE, A. D.: The invariably present tryptophan loop as the core of all divergent antigen-binding pockets. *Scand. J. Immunol.* 20, 377-388, 1984
109. OZINSKY, A., UNDERHILL, D. M., FONTENOT, J. D., HAJJAR, A. M., SMITH, K. D., WILSON, C. B., SCHROEDER, S., ADEREM, A.: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13766-13771, 2000
110. PALIC, D., ANDREASEN, C. B., HEROLT, D. M., MENZEL, B. W., ROTH, J. A.: Immunomodulatory effects of beta-glucan on neutrophil function in fathead minnows. *Dev. Comp. Immunol.* in press, 2005
111. PARKE, J. A., AVIS, P. J.: The effect of digestion with papain and pepsin upon the antitoxic activity of rabbit antibody. *Immunology* 19, 248-260, 1964
112. PASTORET, P. P., GRIEBEL, P., BAZIN, H., GOVAERTS, A.: *Handbook of vertebrate immunology*, Acad. Press, San Diego, 1998
113. PORTER, R. R.: Active fragments of antibody. *Brookhaven Symp. Biol.* 13, 203-212, 1960
114. RAJAGOPALAN, S., WINTER, C. C., WAGTMANN, N., LONG, E. O.: The Ig-related killer cell inhibitory receptor binds zinc and requires zinc for recognition of HLA-C on target cell. *J. Immunol.* 155, 4143-4146, 1995
115. REIS E SOUSA, C., STAHL, P. D., AUSTYN, J. M.: Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178, 509-519, 1993
116. RISSOAN, M.-C., SOUMELIS, V., KADOWAKI, N., GROUARD, G., BRIERE, F., DE WAAL MALEFYT, R., LIU, Y.J.: Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186, 1999
117. ROCK, F. L., HARDIMAN, G., TIMANS, J. C., KASTELEIN, R., BAZAN, F. J.: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 588-593, 1998
118. ROSS, G. D., CAIN, J. A., MYONES, B. L., NEWMAN, S. L., LACHMANN, P. J.: Specificity of membrane complement receptor type three (CR3) for  $\beta$ -glucans. *Complement Inflamm.* 3, 61-74, 1987

119. Ross, G. D.: Membrane complement receptors. In LACHMANN, P. J., PETERS, D. K., ROSEN, F. S., WALPORT, M. J.: Clinical Aspects of Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 241–264, 1993
120. Ross, G.D., VĚTVIČKA, V., YAN, J., XIA, Y., AND VĚTVIČKOVÁ, J.: Therapeutic intervention with complement and  $\beta$ -glucan in cancer. *Immunopharmacology* 42, 61–74, 1999
121. SALMINEN, S., BOULEY, C., BOUTRON-RUAULT, M. C., CUMMINGS, J. H., FRANCK, A., GIBSON, G. R., ISOLAURI, E., MOREAU, M. C., ROBERFROID, M., ROWLAND, I.: Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Functional Food science in Europe*. 1, European Commision Bruselles 147–171, 1998
122. SANDERSON, C. J.: The mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Bio. Rev. Camb. Philos. Soc.* 56, 153–197, 1981
123. SCHAEDEL, O., REITER, Y.: Antibodies and their fragments as anti-cancer agents. *Curr. Pharm. Des.* 12, 363–378, 2006
124. SELJELID, R., BOGWALD, J., HOFFMAN, J., LARM, O.: A soluble  $\beta$ -1,3-D-glucan derivative potentiates the cytostatic and cytolytic capacity of mouse peritoneal macrophages in vitro. *Immunopharmacology* 7, 69, 1984
125. SHERWOOD, E. R., WILLIAMS, D. L., McNAMEE, R. B., JONES, E. L., BROWDER, I. W., DI LUZIO, N. R.: In vitro tumoricidal activity of resting and glucan-activated Kupffer cells. *J. Leukoc. Biol.* 42, 69–75, 1987
126. SIMISTER, N. E.: Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21, 3365–3369, 2003
127. SMYTH, M., HAYAKAWA, I., TAKEDA, K., YAGITA, H.: New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Rev.* 2, 850–861, 2002
128. ŠTERZL, J.: Imunitní systém a jeho fyziologická funkce. Česká imunologická společnost – ČIS, Praha, 1993
129. STOREY, M. L.: Regulatory issues of functional foods, feeds, and nutraceuticals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 34, 329–338, 2004
130. SU, I., TARAKHOVSKY, A.: B-1 cells: orthodox or conformist? *Curr. Opin. Immunol.* 12, 191–194, 2000
131. SU, R.C., KUNG, S.K., GARIEPY, J., BARBER, B. H., MILLER, R. G.: NK cells can recognize different forms of class I MHC. *J. Immunol.* 161, 755–766, 1998
132. SUGAWARA, I., LEE, K. C., WONG, M.: Schizophyllan (SPG)-treated macrophages and antitumor activities against syngeneic and allogeneic tumor cells. I. Characteristics of SPG-treated macrophages. *Cancer Immunol. Immunother.* 16, 137, 1984
133. TAYLOR, P. R., BROWN, G. D., REID, D. M., WILLMENT, J. A., MARTINEZ-POMARES, L., GORDON, S., WONG, S. Y.: The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.* 169, 3876–3882, 2002
134. TAYLOR, P.R., BROWN, G.D., REID, D.M., WILLMENT, J.A., MARTINEZ-POMARES, L., GORDON, S., AND WONG, S.Y.C.: The  $\beta$ -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.* 169, 3876–3882, 2002
135. TEDDER, T. F., INAOKI, M., SATO, S.: The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral comimunity and autoimmunity. *Immunity* 6, 107–118, 1997
136. THORNBERRY, N. A.: Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem. Biol.* 5, 97–103, 1998
137. THORNBERRY, N. A.: The caspase family of cysteine proteases. *Br. Med. Bull.* 53, 478–490, 1997

138. THORNTON, B. P., VĚTVIČKA, V., PITMAN, M., GOLDMAN R. C., ROSS, G. D.: Analysis of the sugar specificity and molecular location of the  $\beta$ -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* 156, 1235–1246, 1996
139. TONEGAWA, S.: Antibody and T-cell receptors. *JAMA*. 259, 1845–1847, 1988
140. TRIENCHIERI, G.: Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47, 187–386, 1989
141. TSUKADA, C., YOKOYAMA, H., MIYAJI, C., ISHIMOTO, Y., KAWAMURA, H., ABO, T.: Immunopotentiation of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of beta-glucan. *Cell Immunol.* 221, 1–5, 2003
142. VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H., REUTELINGSPERGER, C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*. 184, 39–51, 1995
143. VĚTVIČKA, V., DVOŘÁK, B., VĚTVIČKOVÁ, J., RICHTER, J., KRÍŽAN, J., ŠÍMA, P., YVIN, J. C.: Orally-administered marine  $\beta$ -1,3-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity, submitted to *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006
144. VĚTVIČKA, V., ŠÍMA, P.: Evolutionary mechanisms of defence reactions. *Birkhäuser*, Basel, Switzerland, 1998
145. VĚTVIČKA, V., TERAYAMA, K., MANDEVILLE, R., BROUSSEAU, P., KOURNIKAKIS, B., OSTROFF, G.: Pilot study: Orally-administered yeast  $\beta$ -1,3-glucan prophylactically protects against Anthrax infection and cancer in mice. *JANA* 5, 1–6, 2002
146. VĚTVIČKA, V., THORNTON, B. P., ROSS, G. D.: Soluble  $\beta$ -glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J. Clin. Invest.* 98, 50–61, 1996
147. VĚTVIČKA, V., YVIN, J. C.: Effects of marine  $\beta$ -1,3-glucan on immune reactions. *International Immunopharmacology* 4, 721–730, 2004
148. VISINTIN, A., MAZZONI, A., SPITZER, J.H., WYLIE, D.H., DOWER, S.K., SEGAL, D.M.: Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 249–255, 2001
149. VON BOEHMER, H.: The developmental biology of T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 309–326, 1986
150. WAKSHULL, E., BRUNKE-REESE, D., LINDERMUTH, J., FISSETTE, L., NATHANS, R. S., CROWLEY, J. J., TUFTS, J. C., ZIMMERMAN, J., MACKIN, W., ADAMS, D. S.: PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor. *Immunopharmacology* 41, 89–107, 1999
151. WILLIAMS, D. L., YAEGER, R. G., PRETUS, H. A., BROWDER, I. W., MCNAMEE, R. B., JONES, E. L.: Immunization against *Trypanosoma cruzi*: adjuvant effect of glucan. *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 403–410, 1989
152. WILLIAMS, D. L.: Overview of (1,3)-beta-D-glucan immunobiology. *Mediators Inflamm.* 6, 247–250, 1997
153. WILLMENT, J.A., GORDON, S., BROWN, G.D.: Characterisation of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 43818–43823, 2001
154. YOKOYAMA, W. M., SEAMAN, W. E.: The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells – the NK gene complex. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 613–635, 1993
155. YOUINOU, P., JAMIN, C., LYDYARD, P. M.: CD5 expression in human B-cells populations. *Immunol. Today* 20, 312–316, 1999
156. YOUNG, S. H., YE, J., FRAZER, D. G., SHI, X., CASTRANOVA, V.: Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha production in 1-->3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages. *J. Biol. Chem.* 276, 20781–20787, 2001