



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Vliv kmenů *Escherichia coli* na genovou expresi cytokinů v buněčné
linii makrofágů THP1**

**The effect of the *Escherichia coli* strains on the gene expression of
cytokines in the cell line of macrophages THP1**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Janet Ježková

Kladno, květen 2019



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení:	Ježková	Jméno:	Janet	Osobní číslo:	469727
Fakulta:	Fakulta biomedicínského inženýrství				
Garantující katedra:	Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva				
Studijní program:	Specializace ve zdravotnictví				
Studijní obor:	Zdravotní laborant				

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Vliv kmenů *Escherichia coli* na genovou expresi cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1

Název bakalářské práce anglicky:

The Effect of the *Escherichia Coli* Strains on the Gene Expression of Cytokines in the Cell Line of Macrophages THP1

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude porovnání exprese cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1 vlivem několika kmenů bakterie *Escherichia coli*. Budou testovány dva kmeny známých probiotických *E. coli*, jeden patogenní kmen a jeden neškodný kmen. Obecná část bude zaměřena na probiotické bakterie a to hlavně na bakterie *Escherichia coli* (serotyp DB3.K24.H31 obsažený v probiotickém přípravku Colinfant Newborn a Nissle přítomný v probiotickém přípravku Mutaflor). Dále bude práce zaměřena na makrofágy a jimi produkované cytokiny. V praktické části bakalářské práce bude sledována genová exprese cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1 po stimulaci pěti různými kmeny *Escherichia coli* pro lepší pochopení mechanismů prospěšného působení probiotických kmenů. Budou sledovány tyto cytokiny: IL-10, IL-12, IL-6, TNF- α , IDO, IL-1 β . K dosažení vytčených cílů budou použity molekulárně biologické metody (kvantitativní PCR v reálném čase) a buněčné kultivace.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Hrdý J., Kocourková L., Lodinová-Žádníková R., Kolářová L., Prokešová L., The effect of a probiotic *Escherichia coli* strain on regulatory T-cells in six year-old children., *Benef Microbes*, 2016 Nov 30, 7(5):639-648. Epub 2016 Sep 16.
- [2] Súkeníková L., Černý V., Novotná O., Petrášková P., Boráková K., Kolářová L., Prokešová L., Hrdý J., Different capacity of in vitro generated myeloid dendritic cells of newborns of healthy and allergic mothers to respond to probiotic strain *E. coli*, O83.K24:H31., *Immunol Lett*, 2017 Sep. [Revidováno 189:82-89], doi: 10.1016/j.imlet.2017.05.013. Epub 2017 May 26. PMID: 28554713
- [3] Sarate P. J., Heini S., Poiriet S., Drnic M., Zwicker C., Schabussova I., Daniel C., Wiedermann U., *E. coli* Nissle 1917 is a safe mucosal delivery vector for a birch-grass pollen chimera to prevent allergic poly-sensitization., *Mucosal Immunol.*, 2018 Sep 21, doi: 10.1038/s41385-018-0084-6
- [4] Rodríguez-Nogales A., Algieri F., Garrido-Mesa J., Vezza T., Utrilla M.P., Chueca N., Fernández-Caballero J.A., García F., Rodríguez-Cabezas M.E., Gálvez J., The Administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 Ameliorates Development of DSS-Induced Colitis in Mice., *Front Pharmacol*, 2018 May 11;9:468. , doi: 10.3389/fphar.2018.00468. eCollection 2018.

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **28.09.2018**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2020**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
policis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkan(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student(ka) bere na vědomí, že je povinnen(a) vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

11. 2018

Datum převzetí zadání

J. Jeřábek
Podpis studenta(ky)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Vliv kmenů *Escherichia coli* na genovou expresi cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1 vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 16.05.2019

.....
podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady a připomínky při tvorbě této práce. Děkuji rovněž Mgr. Olze Novotné a Ing. Petře Petráskové za pomoc při zpracování praktické části. Nakonec děkuji všem pracovníkům Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN v Praze za ochotu a umožnění realizace praktické části této práce.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem probiotických, nepatogenních a patogenních kmenů *Escherichia coli* na genovou expresi cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1. V teoretické části jsou popsány probiotické bakterie, a to hlavně bakterie *E. coli* Nissle a *E. coli* O83. *E. coli* Nissle je obsažena v přípravku Mutaflor a *E. coli* O83 se nachází v přípravku Colinfant Newborn, který se používá pro kolonizaci novorozenců. Dále jsou zde definovány makrofágy a jimi produkované cytokiny, stejně jako jejich funkce.

Praktická část se zabývá buněčnými kultivacemi, při kterých se stimulují makrofágy pomocí kmenů *E. coli* Nissle (EcN), *E. coli* O83:K24:H31 (*E. coli* O83), *E. coli* O142:K86(B):H6 (*E. coli* O142) a *E. coli* ATCC9637 (*E. coli* W). Po stimulaci makrofágů byla změřena genová exprese cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12A, TNF- α) a Indolamin 2,3-dioxygenáza (IDO) pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.

Z výsledků práce je zřejmé, že kmeny *E. coli* (Nissle, O83, O142 a W) neovlivňují makrofágy THP1 ke zvýšené genové expresi u žádného pozorovaného cytokinu ani IDO v našem experimentálním uspořádání. Výsledky práce ukazují rozdílný vliv probiotických kmenů *E. coli* Nissle a *E. coli* O83 na genovou expresi cytokinů IL-6, TNF- α a IDO. Praktická část práce slouží pro lepší pochopení mechanismů prospěšného působení probiotických kmenů.

Klíčová slova

E. coli Nissle; *E. coli* O83; probiotické bakterie; makrofágy; cytokiny; IL-1 β ; IL-6; IL-10; IL-12A; TNF- α ; IDO; PCR-RT.

Abstract

This bachelor thesis deals with the effect of probiotic, nonpathogenic and pathogenic strains of *Escherichia coli* on the gene expression of cytokines in the cell line of macrophages THP1. The theoretic part describes the probiotic bacteria, mainly *E. coli* Nissle and *E. coli* O83 bacteria. *E. coli* Nissle is contained within the Mutaflor preparation and *E. coli* O83 can be found in the product called Colinfant Newborn used for colonisation of newborns. Furthermore, there macrophages are defined together with cytokines they produce as well as their functions.

The practical part focuses on cell culture of macrophages and their stimulation by strains of *E. coli* Nissle (EcN), *E. coli* O83:K24:H31 (*E. coli* O83) , *E. coli* O142:K86(B):H6 (*E. coli* O142) and *E. coli* ATCC9637 (*E. coli* W). After macrophage stimulation, the gene expression of cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12A, TNF- α) and Indoleamine 2,3-dioxygenase was measured using the quantitative real-time PCR.

The results show that *E. coli* stains (Nissle, O83, O142 and W) do not change gene expression of any tested cytokines and IDO in our experimental setup. The results point out different effect of probiotic strains of *E. coli* Nissle and *E. coli* O83 on the gene expression of cytokines IL-6, TNF- α a IDO. The practical part contributes to better understanding of the mechanisms of beneficial effect of the probiotic strains.

Keywords

E. coli Nissle; *E. coli* O83; probiotic bacteria; macrophages; cytokines; IL-1 β ; IL-6; IL-10; IL-12A; TNF- α ; IDO; PCR-RT.

Obsah

1	Úvod	10
2	Současný stav	11
2.1	<i>Escherichia coli</i>	11
2.1.1	Probiotické kmeny <i>Escherichia coli</i>	11
2.1.2	<i>Escherichia coli</i> Nissle	14
2.1.3	<i>Escherichia coli</i> O83:K24:H31.....	18
2.1.4	<i>Escherichia coli</i> O142:K86(B):H6.....	19
2.1.5	<i>Escherichia coli</i> W (ATCC 9637)	20
2.2	Makrofágy	21
2.1	Cytokiny	22
2.1.1	Vybrané cytokiny produkované makrofágy	23
3	Cíl práce	27
4	Metodika.....	28
4.1	Materiál a metody.....	28
4.1.1	Kultivace bakterií a makrofágů	28
4.1.2	Stimulace makrofágů THP1 pomocí kmenů <i>E. coli</i>	28
4.1.3	Kontrola životnosti makrofágů	29
4.1.4	Izolace RNA a reverzní transkripce	29
4.1.5	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT PCR) 30	
4.1.6	Statistické vyhodnocování výsledků.....	31
5	Výsledky	32
5.1	Životnosti stimulovaných makrofágů po 1 a 4 hodinách inkubace	32

5.2	Vliv kmenů <i>E. coli</i> na genovou expresi THP1.....	34
6	Diskuze	41
7	Závěr	49
8	Seznam použitých zkratek.....	50
9	Seznam použité literatury	52
10	Seznam použitých obrázků	62
11	Seznamu použitých tabulek	63

1 ÚVOD

Probiotické bakterie jsou nepatogenní mikroorganismy, které příznivě ovlivňují organismus hostitele. Mechanismus účinků probiotických bakterií není jednotný, ale liší se u každého probiotického kmene. Jedním z mechanismů prospěšných účinků probiotických bakterií je ovlivnění sekrece cytokinů v buňkách imunitního systému. Produkce cytokinů vlivem probiotických bakterií se liší také podle konkrétního kmene. Zjištění, které cytokiny mohou být ovlivněny stimulací bakteriemi, pomáhá odhalit mechanismy prospěšného účinku na organismus.

Probiotické bakterie jsou nejčastěji používány při nemocech spojených s idiopatickými střevními záněty, akutními infekčními průjmy a syndromem dráždivého tračníku. V poslední době však získaly zájem vědecké komunity ve spojení s léčbou autoimunitních onemocnění, psychického zdraví a obezity [23]. Používání probiotických bakterií při léčbě střevních nemocí by mohlo vést ke snížení používání antibiotik.

Bakalářská práce se zaměřuje na dva probiotické kmeny *E. coli* Nissle a *E. coli* O83. Kmen *E. coli* Nissle se nejčastěji používá při léčbě idiopatických střevních zánětů. Kmen *E. coli* O83 se hojně používá pro kolonizaci novorozenců ke snížení rizika vzniku alergie. Práce se zabývá vlivem těchto dvou probiotických bakterií na genovou expresi určitých cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1. V praktické části byla pozorována schopnost probiotických bakterií ovlivnit genovou expresi cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1 pomocí kvantitativní polymerázové reakce v reálném čase.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (dále jen *E. coli*) je gramnegativní tyčka, která patří do kmenu *Proteobacteria*, třídy *Gammaproteobacteria*, řádu *Enterobacteriales* a čeledi *Enterobacteriaceae*. Poprvé ji popsal v roce 1885 německý pediatr Theodor Escherich. Jedná se o nejprozkoumanější bakterii, která slouží jako model pro mnohé studie a současně je to první bakteriální druh, u kterého byla pozorována konjugace a výměna genetického materiálu [1].

E. coli se dělí na patogenní, nepatogenní a probiotické kmeny. Některé *E. coli* kmeny se mohou vyskytovat v trávicím traktu teplokrevných živočichů a tvoří vitamíny B1, K1 a K2. Nepatogenní kmeny *E. coli* jsou důležitou součástí fyziologické mikrobioty, zejména díky svému značnému antagonistickému účinku proti invazi patogenů. Osídlení nepatogenními kmeny *E. coli* nastává už několik hodin po porodu a to nejčastěji orálním přenosem od matky. Patogenní kmeny *E. coli* způsobují intestinální onemocnění, která jsou často doprovázena průjmy, a extraintestinální onemocnění týkající se nejčastěji močových cest a infekcí ran. Kmeny *E. coli* můžeme rozdělit do čtyř fylogenetických skupin: A, B1, B2 a D [1].

2.1.1 Probiotické kmeny *Escherichia coli*

Probiotické bakterie se řadí mezi nepatogenní mikroorganismy, které, když jsou podané v adekvátním množství, přinášejí zdravotní benefity hostiteli a pomáhají předcházet nebo zmírnit určitá onemocnění. Probiotické bakterie mohou být považovány za důležitou komenzální mikrobiotu [2].

Mechanismus působení probiotických bakterií není jednotný, protože existuje mnoho různých probiotických kmenů a jejich metabolitů. Manipulace imunitního

systemu probiotickými bakteriemi je složitá na vyhodnocení a obecné závěry. Stejný kmen bakterií může zlepšit antimikrobiální aktivitu a Th1 odpověď stejně jako snížit protizánětlivou Th2 odpověď nebo regulovat její aktivitu. Jaký účinek na organismus bude mít daný probiotický kmen, záleží na hostiteli a pravděpodobně na způsobu porodu daného jedince (císařský řez nebo vaginální porod) v případě časného postnatálního podání [3].

U mikroorganismů zařazených mezi probiotika musí být prokázána především jejich bezpečnost a účinnost na základě doporučených podmínek pro užívání v rámci cílové populace (novorozenci versus dospělí), způsobu aplikace a dávkování. Dále musejí probiotika splňovat následující požadavky: detailní definici a typizaci, absenci jakékoli patogenní charakteristiky (včetně produkce enterotoxinů, cytotoxinů, enteroinvazivity, patogenní adheze, hemolýzy, přítomnosti genů antibiotické rezistence apod.), odolnost vůči žaludeční šťávě a žluči, schopnost adherovat ke střevnímu epitelu a kolonizovat tlusté střevo. Nakonec musí být klinicky dokázané, že působí prospěšně na lidské zdraví [2].

Efekt probiotických bakterií se zakládá na několika vlastnostech, kterými jsou: soutěžení s patogenními kmeny bakterií o adhezi ke střevnímu epitelu, syntéza peptidů s bakteriostatickou a bakteriocidní aktivitou, regulace funkce střevní bariéry a mikrobiální translokace, modulace funkce střevního epitelu a dendritických buněk, vliv na lokální a celkovou imunitní odpověď, inhibice přerůstání patogenních bakterií ve střevě, stimulace eliminace toxinů, syntéza steroidní formy cholesterolu a vliv na sekreci slizu, absorpci, motilitu a průtok krve v útrobních orgánech [2].

Existuje více než 25 různých onemocnění a patologických zdravotních stavů, které jsou spojené s osídlením mikrobů v gastrointestinálním traktu. Mikrobiota vytvořená v gastrointestinálním traktu neovlivňuje jedince pouze lokálně (v místě osídlení těchto mikrobů), ale také působí na celou škálu jiných systémů.

Působením těchto mikrobů mohou vznikat různé nemoci, mezi které patří některá autoimunitní onemocnění, či mohou mít neblahý vliv na psychiku jedince. Na druhou stranu bylo zjištěno, že osídlení střev probiotickými kmeny bakterií má terapeutický účinek právě na tyto nemoci ale i na jiné. Zajímavostí je, že by probiotika mohla být využita jako jeden z podpůrných prostředků při léčbě obezity. Efekt probiotických bakterií byl nejvíce studován při gastrointestinálních potížích, kterými jsou akutní infekční průjemy, idiopatické střevní záněty (dále jen ISZ) a syndrom dráždivého tračníku [23].

Základ probiotických přípravků většinou tvoří konkrétní kmeny bakterií z rodu *Lactobacillus* nebo *Bifidobacterium*. Méně často se používají ostatní rody bakterií (nebo dokonce i kvasinek) včetně *E. coli*. Skutečnost, že se *E. coli* používá jako probiotikum, souvisí s její předpokládanou všudypřítomností ve střevě. Domněnka, že je *E. coli* všudypřítomná ve střevě, byla však minimálně zpochybněna studií, která dokazuje, že *E. coli* nebyla přítomná ani mezi 56 nejhojnějšími druhy bakterií ve výkalech testovaných lidských subjektů. *E. coli* se typicky vyskytuje v ileu (poslední třetina tenkého střeva) a také v tlustém střevě, ale nepřevyšuje počet ostatních četnějších druhů bakterií. Tlusté střevo obsahuje přibližně 1,5 kg mokré váhy bakteriálních buněk, zatímco výkaly obsahují okolo 10^{12} bakterií na gram. *E. coli* se jako jediná z mnoha enterobakterií typicky vyskytuje ve střevě člověka. V poměru je osídlení enterobakteriemi převyšeno stokrát až tisíckrát bakteriemi rodu *Bacteroides* a gram-pozitivními nesporelujícími anaeroby [4].

Podle velkého množství literatury se *E. coli* vyskytuje v lidském střevě, ačkoliv v relativně nízkém počtu. Navzdory tomu *E. coli* tvoří základ třech komerčně dostupných probiotických přípravků, známých jako Mutaflor, Symbioflor 2 a Colinfant Newborn. Mutaflor produkovaný farmaceutickou firmou Ardeypharm GmbH (založenou v roce 1970) se sídlem v německém městě Herdecke obsahuje životaschopné buňky z jediného kmene *E. coli* Nissle 1917. Symbioflor 2 (DSM

17252) se vyrábí ve firmě SymbioPharm GmbH, která byla založena roku 1954 se stejným sídlem jako Mutaflor. Symbiolor 2 obsahuje šest genotypů *E. coli*. Colinfant Newborn je prodáván firmou Dyntec, která sídlí v Terezíně v České republice a obsahuje jediný kmen *E. coli*. Colinfant Newborn se prodává jako přípravek pro novorozence [4].

Denní dávky probiotických přípravků Mutaflor, Colinfant Newborn a Symbioflor 2 se liší. Doporučuje se podávat 1-2 tablety Mutafloru denně, což odpovídá $2,5-50 \times 10^9$ CFU. Denní dávka Symbiofloru odpovídá $3-18 \times 10^7$ CFU. Doporučená dávka Colifantu Newbron se pohybuje v rozmezí $0,8-1,6 \times 10^8$ CFU a radí se přípravek užívat třikrát týdně. Doporučená dávka bakterií je tedy nejvyšší v případě Mutafloru. Ohledně Mutafloru se také spekuluje o jeho schopnosti kolonizovat střeva. Na tuto otázku bylo provedeno několik studií. Jedním příkladem je studie, ve které bylo stimulováno sedm dobrovolníků kmenem EcN po dobu jednoho týdne. Po ukončení experimentu byla EcN detekována pouze u čtyř stimulovaných jedinců. Tento objev ukazuje, že EcN není velmi účinná jako dlouhodobý kolonizátor lidských střev [4].

2.1.2 *Escherichia coli* Nissle

E. coli Nissle 1917 (dále jen EcN) dostala své jméno podle profesora Alfreda Nissla (1874-1965), německého lékaře, který vypočetl, že různé kmeny *E. coli* se odlišují ve své schopnosti potlačovat růst patogenů způsobujících tyfus. Při studiích v německém institutu pro hygienu úspěšně vyléčil pacienty trpící průjmami právě pomocí kmene EcN. Na základě úspěšné léčby začal plnit želatinové kapsle touto bakterií, kterou pěstoval na agaru, a v roce 1917 zažádal o patent pro Mutaflor. Od té doby se Mutaflor nezměnil ve svém složení a obsahu $2,5-25 \times 10^9$ CFU lyofilizovaných životaschopných bakterií kmene EcN. Dodnes je vyráběn a prodáván jako podpůrný přípravek při gastrointestinálních potížích. [5]

Navzdory desetiletí od výzkumu nejsou plně pochopeny základní mechanismy, kterými EcN působí jako prospěšná bakterie. Ke kolonizaci gastrointestinálního traktu a k projevení prospěšných probiotických účinků musí bakterie mít určité fitness faktory zvýhodňující je oproti dalším bakteriím přítomným ve střevě. Tyto fitness faktory zahrnují schopnost produkovat mikrociny, adheziny a proteázy [5]. Mikrociny jsou genově kódované antibakteriální peptidy, produkované některými enerobakteriálními kmeny, hlavně z druhu *E. coli* [24].

EcN má sérotyp O6:K5:H1, tím se tedy řadí mezi ostatní bakterii ze skupiny O6, která obsahuje nepatogenní komenzály i patogenní kmeny. H skupina je určena flagelinovým antigenem. Mezi další vlastnosti EcN patří schopnost produkce beta-defensinu 2. Beta-defensin spadá mezi peptidy s antimikrobiální funkcí a přispívá k ochraně sliznic proti invazi patogenních bakteriálních kmenů (*Salmonella*, *Shigella* atd.). Samotný bičík potom slouží k lepší adhezi. Díky těmto fitness faktorům je EcN dobře vybavená na přežití ve střevě. EcN využívá metabolické dráhy pro získávání nutričních složek, které umožňují bakterii (pomocí sideroforů) přesun železa z gastrointestinálního traktu hostitele do buňky bakterie. Tento proces poskytuje EcN potenciální výhodu k přežití, protože železo je důležitou živinou pro mikroorganismy. Výše zmíněný systém nejenže zajišťuje lepší kolonizaci, ale také představuje hlavní mechanismus prospěšného působení EcN v průběhu léčby kolitid způsobených *Salmonelou* [5, 6].

Předcházející informace podtrhují fakt, že je EcN pozoruhodné probiotikum, které obsahuje velký počet fitness faktorů. Tyto fitness faktory umožňují EcN alespoň dočasnou kolonizaci gastrointestinálního traktu s naprostou absencí jakýchkoliv virulentních faktorů. EcN má mnoho prospěšných probiotických vlastností vedoucí k úspěšné klinické aplikaci [5].

EcN dokáže regulovat slizniční zánětlivou odpověď ovlivněním produkce určitých cytokinů v T-lymfocytech, a to jejich aktivací přes Toll-like receptory. Vliv

EcN na T-lymfocyty umožňuje snížit produkci prozánětlivých cytokinů (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1) a zvýšit produkci cytokinu IL-10 [6, 22].

EcN byla použita v několika klinických studiích pro léčbu gastrointestinálních onemocnění včetně ISZ. ISZ jsou běžně děleny do dvou skupin reprezentovaných ulcerózní kolitidou (UC) a Crohnovou nemocí (CN). Existuje několik studií, které porovnávají léčbu UC pomocí EcN oproti konvenční léčbě. Standardní léčba UC je reprezentována podáváním léčiva mesalazinu [6]. Mesalazin obsahuje protizánětlivou látku určenou k léčbě zánětlivých střevních onemocněních [30]. Z těchto studií vyplývá, že pacienti léčení EcN a pacienti léčení standardem dosáhli podobných klinických výsledků. V jedné z těchto studií byla EcN ještě porovnána s placebem. Výsledek této studie popisuje lepší výsledky u pacientů léčených EcN než při podání placebo [6]. Dále bylo zjištěno, že když se podává EcN současně s mesalazinem, nezvýší se u pacientů s UC pravděpodobnost vyvolání remise. Léčba pomocí EcN by mohla mít podobný účinek na udržení remise pacientů s UC jako právě mesalazin. Mechanismy EcN při léčbě UC jsou spojovány s její schopností regulovat produkci cytokinů v některých imunitních buňkách a také v antibakteriálních vlastnostech EcN [25].

Další studie porovnává preventivní podání ciprofloxacinu s placebem oproti ciprofloxacinu s EcN. [4] Ciprofloxain je antibiotikum (dále jen ATB) patřící do skupiny fluorochinolonů. [7] Touto studií se dá zpochybňovat účinnost EcN, protože její výsledek ukazuje na to, že pacienti, kteří byli léčení ciprofloxacinem následovaným placebem, dosáhli vyšší remise oproti pacientům, kterým byla po ciprofloxacinu podána EcN [4].

Crohnova nemoc patřící mezi ISZ a je spojována s kolonizací invazivním typem *E. coli*. Není tedy překvapivé, že se CN neléčí pomocí EcN a jsou radši vybírány jiné typy probiotik [4]. V roce 2016 byla vytvořena nová hypotéza ohledně léčby CN, která je založená na aplikaci geneticky modifikovaného kmene EcN jako

nosiče kolicinů pro specifickou adherentní invazivní *E. coli* (dále jen AIEC). Kmeny AIEC se běžně izolují u pacientů s UC a CN [26]. Koliciny patří mezi bakteriocidní molekuly, které jsou produkovány některými kmeny bakterií z rodu *Enterobacteriaceae* [27]. Tato nová hypotéza byla vytvořena, protože léčba UC a CN pomocí ATB a léčba UC pomocí EcN je příliš pomalá a často se u léčených pacientů nemoc znovu projevuje. Stávající léčba není zcela efektivní, protože ATB není schopné kompletně odstranit patogenní bakterie ze střev, a protože EcN neobsahuje specifický kolicin toxický pro AIEC způsobující UC a CN. Aplikace nové léčby by teoreticky mohla fungovat nejen jako dlouhotrvající lék pro pacienty s ISZ infikovaných kmeny AIEC, ale také by mohla být řešením ke snížení používání ATB při léčbě střevních nemocí [26].

Účinnost EcN byla také potvrzena ve dvojité slepé randomizované klinické studii zahrnujících novorozence. Při této studii byla zdravým novorozencům v průběhu jejich prvních 5 dnů života podána EcN. Stolice těchto subjektů byla pozitivní na EcN ve více než 90 % po dobu 6 měsíců, a dokonce v několika případech byl poté pozorován pokles nebo absence patogenních kmenů bakterií ve stolici těchto dětí. Stejný výzkumný tým realizoval další klinickou studii, a to na kojencích a batolatech, kde prokazovali efekt EcN na dětské průjemy. Výsledek této studie ukázal, že EcN vykazuje schopnost snížit délku trvání průjemového onemocnění o 2,3 dne [4].

Mezi další kladné účinky EcN můžeme zařadit zvýšení četnosti stolice u pacientů trpících zácpami. Také byl pozorován příznivý účinek u pacientů s jaterní cirhózou, u kterých EcN vyvolala zlepšení jaterní funkce a pomohla redukovat hladiny endotoxinu, ačkoli žádné jiné zlepšení prokázáno nebylo. Následující méně úspěšný experiment popsal neefektivní léčbu senné rýmy pomocí EcN. Mutaflor také nebyl schopný redukovat nemoci způsobené kmeny *E. coli* rezistentními na antibiotika u starších osob, které jsou dlouhodobě v lékařském zařízení [4].

Jako vedlejší účinek léčby EcN bylo popsáno nadýmání. Ve snaze vyvrátit toto tvrzení byla uskutečněna další studie. Ta byla zaměřená na zdravé jedince a z výsledků vychází, že léčba pomocí EcN nezpůsobuje nepříznivé ovlivnění funkce střev, tj. frekvenci stolice a její konzistenci, ale také nemá žádný efekt na plynatost [4].

Některé kmeny bakterií (včetně EcN) jsou schopné kolonizovat nádorové buňky a replikovat se v nich. Na základě této informace vznikly studie, které se zabývají potenciálním použitím těchto kmenů bakterií k přenosu léčiv do místa nádoru, či jako producentů cytotoxických proteinů, cytokinů, nádorově specifických protilátek apod. Výsledky studie z roku 2018 ukázaly, že právě EcN by mohla být ideálním prostředníkem pro přenos cytotoxických sloučenin cílených ke zničení nádorů [28].

2.1.3 *Escherichia coli* O83:K24:H31

E. coli O83 se řadí mezi probiotické kmene bakterie *E. coli*. *E. coli* O83 je obsažena v probiotickém přípravku Colinfant Newborn. Původ *E. coli* O83 není úplně jasný, ale pravděpodobně byla poprvé izolována z prasečích výkalů. Kmen *E. coli* O83 byl popsán jako nepatogenní pro bezmikrobní selata [4]. Bylo zjištěno, že genom *E. coli* O83 je bohatý na geny, které kódují fimbriální adheziny, systém příjmu železa, toxiny, mikrocinu, proteázy a autotransportéry. Fenotypově se projevuje jako hladký lipopolysacharid (dále jen LPS). Všechny tyto fitness faktory jsou výhodou v soutěži s ostatními mikroorganismy a v přizpůsobení se na prostředí ve střevě [9]. *E. coli* O83:K24:H31 nevytváří termolabilní ani termostabilní enterotoxiny, ale produkuje α -haemolysin (dále jen hlyA). HlyA je virulentním faktorem patogenních kmenů *E. coli* [10]. Tento překvapující fenotyp by mohl zpochybňovat bezpečnost přípravku [4]. Přesto je Colinfant Newborn považován za bezpečné a účinné léčivo, které se používá jako orální vakcína pro novorozence [10].

Colinfant Newborn byl v minulosti porovnáván s Mutaflowem a výsledkem byla informace, že oba typy probiotických kmenů jsou vhodné pro kolonizaci novorozenců [4]. Při osídlení gastrointestinálního traktu tato bakterie stimuluje produkci specifických a nespecifických protilátek jak na lokální úrovni, tak ve slinách a krvi. Colinfant snižuje počet nozokomiálních infekcí, úmrtnost ve spojení s infekcí a potřebu ATB [8]. Bylo zjištěno, že novorozenci kolonizováni kmenem *E. coli* O83 jsou méně náchylní k opakovaným infekcím a k rozvoji alergií [10]. Z dalších studií vyplývá, že *E. coli* O83 snižuje pouze pravděpodobnost vzniku určitých projevů alergie např. atopického ekzému, ale nesnižuje pravděpodobnost vzniku respirační alergie [29].

Studie týkající se Colinfantu Newborn se často zaměřují na prospěšný efekt bakterie *E. coli* O83 na novorozence a předčasně narozené děti. Bylo zjištěno, že má pozitivní efekt na potlačení patogenních bakterií ve střevě a na snížení výskytu infekcí u předčasně narozených dětí [4].

2.1.4 *Escherichia coli* O142:K86(B):H6

E. coli O142:K86:H6 (dále jen *E. coli* O142) byla poprvé izolována z kojenců s průjmou v Indonésii a následně po vypuknutí průjmových onemocnění u předčasně narozených dětí v Mexiku. V několika případech nakažení tímto kmenem byly děti vážně nemocné. Došlo k úmrtí v případech, které byly zkomplikované ještě další vážnou nemocí [12].

E. coli O142 spadá do skupiny enteropatogenních *E. coli* (dále jen EPEC). EPEC rozdělujeme na typické a atypické. Typické EPEC lidského původu obsahují specifický virulentní plazmid, který kóduje lokální adhezi bakterie na epitelové buňky. Sérotyp *E. coli* O142 spadá pod typické EPEC, které jsou si podobné ve virulenci. Kromě několika výjimek, do kterých nespadá sérotyp O142, produkují typické EPEC pouze virulentní faktor produkovaný již zmíněným plazmidem [13].

Typické sérotypy EPEC jsou spojovány s průjmy u dětí do 1 roku. V této věkové skupině se podle několika studií v Brazílii našly bakterie, identifikované jako typické EPEC. Typické EPEC bývají označovány za hlavní původce endemických průjmů. Infekce dospělých jedinců kmene EPEC vzniká pouze vzácně a často se spojuje s dalším onemocněním. Zvýšená rezistence na EPEC u dospělých a starších dětí se vysvětluje rozvojem imunitního systému nebo ztrátou některých receptorů pro specifický adhezin. Typické EPEC se nevyskytují u zvířat, a tím vzniká předpoklad, že jejich jediným rezervoárem jsou lidé [13].

2.1.5 *Escherichia coli* W (ATCC 9637)

E. coli se obecně považuje za důležitý a populární organismus pro použití v biotechnologiích. Ze všech známých kmenů *E. coli* jsou pouze 4 kmene a jejich deriváty zařazeny do 1. rizikové skupiny organismů v biologické bezpečnostní příručce. Jsou to kmene K-12, B, C a W [11].

Kmen *E. coli* W (ATCC 9637) byl pojmenován podle pána Selmana A. Waksmana, který ho poprvé izoloval z půdy hřbitova v roce 1943. Písmeno „W“ v názvu označuje Waksmanův kmen. Ve stejné době, kdy poprvé kmen izoloval, objevil Waksman ještě s Alanem Schatzem antibiotikum streptomycin, na které je W kmen vysoce citlivý. První užitek tohoto kmene byl v použití kmene W jako standardu v testu senzitivity na streptomycin a další ATB [11].

Geneticky upravený kmen *E. coli* W se také používá k produkci chemikálií např. etanolu, kyselině mléčné a alaninu. Používání *E. coli* W v biotechnologickém průmyslu nesouvisí pouze s jeho bezpečností, ale také protože produkuje malé množství acetátu a není náročný na kultivaci. Kmen *E. coli* W velmi dobře odpovídá na stresové podmínky z okolního prostředí, jakými jsou vysoké koncentrace etanolu, kyselé prostředí, vysoká teplota a osmotický stres. Další výhodnou kmenem *E. coli* W je, že patří mezi kmene *E. coli*, které dokáží využít

sacharózu jako zdroj energie, a zároveň roste stejně kvalitně při přísunu glukózy i sacharózy. Všechny zmíněné vlastnosti dělají kmen *E. coli* W atraktivní zejména pro použití při mikrobiálních experimentech a v biotechnologickém průmyslu [11].

2.2 Makrofágy

Makrofágy jsou tkáňovou formou monocytů a jde o tzv. profesionální fagocyty, což znamená, že zprostředkovávají obranyschopnost organismu prostřednictvím fagocytózy. Patří do přirozené imunity a řadí se mezi buňky hrající významnou roli při zánětlivé reakci. U lidí představují 5–10 % ze všech buněk imunitního systému. Makrofágy spadají do skupiny buněk prezentující antigen (dále jen APC). Na rozdíl od jiných fagocytujících buněk se stále nacházejí ve tkáních. V případě výskytu infekčního zánětu se podílejí na jeho vyléčení, a v jeho nepřítomnosti fagocytují odpadní částice (zejména buňky zahynulé apoptózou). Kromě toho také participují v boji proti extracelulárním a intracelulárním parazitům. Makrofágy mají schopnost sekretovat cytokiny, které se významně podílejí na zahájení či ukončení zánětlivé reakce a při reparaci poškozené tkáně. Dále produkují složky komplementu C3 a metabolity kyseliny arachidonové, což jsou látky řadící se do základních mediátorů zánětlivé reakce [15].

Makrofágy se v průběhu svého života mohou transformovat a procházet různými aktivačními fázemi. Aby byl makrofág plně funkční, musí být předem aktivován signály, které produkují T lymfocyty ve formě cytokinů hlavně IFN- γ a TNF. Makrofágy žijí v průměru delší dobu než jiné fagocytující buňky a proces fagocytózy mohou vícekrát opakovat [15].

2.1 Cytokiny

„Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému, tkáňové hormony – proteiny sekretované leukocyty a jinými buňkami, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj.“ [15, str. 102]. Kromě cirkulujících cytokinů známe i cytokiny vázané na buněčném povrchu. Ty jsou umístěny v cytoplazmatické membráně buňky a mají tu výhodou, že působí zejména lokálně a nejsou odplavovány. Další cytokiny jsou schopné vázat se na proteoglykany některých buněk [15].

U zdravých jedinců způsobuje kolísání určitých cytokinů hlavně jejich genetika, nedědičné faktory (např. věk, váha a životní prostředí) a mikrobiota. Genetika jedince je zodpovědná za různorodost produkce cytokinů. Mikroorganismy a produkty vzniklé jejich metabolismem mají velký imunomodulační efekt, mohou podporovat vznik regulačních T lymfocytů (dále jen Treg) a vedou k obměně B lymfocytů a také k sekreci specifických protilátek. Především kvůli přítomnosti některých střevních bakterií jsou produkovány cytokiny TNF- α a IFN- γ . Cytokiny jsou sekretovány z makrofágů, B lymfocytů a žírných buněk. Ale také mohou být produkovány buňkami endotelií, fibroblasty a stromálními buňkami. Mezi cytokiny patří chemokiny, interferony, interleukiny a také faktory nekrotizující nádory [14].

Receptory cytokinů jsou složeny ze dvou až tří podjednotek. První z nich vždy zajišťuje jedinečnou vazbu cytokinu. Druhá, případně třetí, zprostředkovává spojení se signalizačními intracelulárními molekulami. Na základě toho, že je signalizační podjednotka často sdílena různými cytokinovými receptory, mohou být sdruženy do skupin tzv. receptorových rodin [15].

2.1.1 Vybrané cytokiny produkované makrofágy

2.1.1.1 Interleukin-1

Hlavní biologickou rolí interleukinu-1 (dále jen IL-1) je jeho schopnost fungovat jako endogenní pyrogen. IL-1 a jemu podobné cytokiny hrají roli při reparaci tkání, při růstu buňky a také při chronických zánětlivých onemocněních. Rodina cytokinů IL-1 obsahuje dvě prozánětlivé izoformy IL-1 α a IL-1 β , a jednu protizánětlivou formu IL-1Ra (receptorový antagonist). Isoformy IL-1 α a IL-1 β nejsou kódovány stejnými geny, ale jsou strukturně příbuzné, a váží se na stejný receptor [16]. IL-1 α může být tvořen i buňkami nehematopoetického původu, a také vzniká v různých typech tkáních (plíce, játra, ledviny). IL-1 α není běžně přítomný v krevním oběhu či v tělních tekutinách, nicméně jeho produkce se výrazně zvyšuje při zánětlivých onemocněních. Hlavním zdrojem IL-1 β jsou monocyty, makrofágy, dendritické buňky, neutrofilové, B lymfocyty a NK [31].

Skupina cytokinů IL-1 ovlivňuje rychlost metabolismu glukózy v krvi, krevní tlak, metabolismu železa a remodelaci kostí. Mimoto se zjistilo, že IL-1 zprostředkovává spojení mezi imunitním a neuroendokrinním systémem. IL-1 zastává klíčovou roli v procesu termostatické regulace, při vnímání bolesti a ovlivňuje chuť k jídlu. IL-1 je produkovaný některými typy buněk na základě zánětlivých podnětů, které vznikají při výskytu produktů určitých bakterií (zejména LPS), na podkladě sekrece cytokinů (hlavně TNF- α) nebo bioaktivními lipidy (např. aktivační faktory trombocytů) [16].

2.1.1.2 Interleukin-10

Interleukin-10 (dále jen IL-10) má neuroprotektivní funkci a vzniká sekrecí z buněk přirozené imunity konkrétně dendritickými buňkami, makrofágy, žírnými buňkami a eozinofily. Sekretován ovšem může být i buňkami adaptivní imunity,

např. Treg. IL-10 může být také produkován mikroglie, astrocyty a neurony, což jsou buňky centrálního nervového systému [17].

Často vzniká v průběhu zánětlivé kaskády společně s typickými prozánětlivými cytokiny. Aktivace IL-10 vede k inhibici TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8 a IL-12 a k uvolnění IL-23 a některých protizánětlivých mediátorů. IL-10 je cytokin, který potlačuje schopnost makrofágů prezentovat antigen tím, že redukuje povrchovou expresi hlavního histokompatibilního komplexu II (dále jen MHC II) [17].

2.1.1.3 Interleukin-6

Kolísání hladin cytokinů IL-6 a IL-6Ra bývá významně ovlivněno dědičností [14]. IL-6, též známý jako hepatální růstový faktor a IFN- β 2, je glykopeptid, který stimuluje B buňky. IL-6 může být sekretován monocyty, T a B buňkami, fibroblasty a adipocyty. Bylo zjištěno, že IL-6 může být také produkován některými nádorovými buňkami. IL-6 dokáže regulovat různé imunitní a fyziologické procesy v organismu, např. zánětlivou antigenně specifickou imunitní odpověď, krvetvorbu a metabolismus buňky [20].

IL-6 se nachází ve zvýšené koncentraci v organismu po vystavení podnětu, který způsobuje zánětlivou odpověď. Podnětem mohou být třeba různé interferony, IL-1, TNF- α , TNF- β , ale také bakteriální endotoxiny, LPS nebo virové infekce. Bez větší stimulace vykazuje vyšší hodnoty IL-6 normální tkáň ledvin či nádory ledvin [21].

2.1.1.4 TNF- α

TNF- α a IL-12 jsou dva hlavní mediátory zánětlivých reakcí a mají důležitou roli při spojení přirozené a adaptivní imunity. TNF- α má schopnost inhibovat produkci IL-12 u lidských makrofágů. Vzájemná regulace těchto cytokinů má účinek na aktivaci makrofágů a na rozvoj antigenně specifické imunitní odpovědi [18].

TNF- α vzniká ve velkém spektru buněk; v makrofázích, polymorfonukleárních leukocytech, astrocytech, Langerhansových buňkách a gliových buňkách. TNF- α je klíčovým mediátorem při regulaci exprese MHC typu I a II. Při nedávné studii byla zjištěna snížená produkce TNF- α při chronických zánětech a bylo prokázáno jeho spojení s autoimunitními chorobami, např. u roztroušené sklerózy. Makrofágy, které se potkávají se zánětlivými podněty jako s LPS, produkují TNF- α po několika minutách od setkání s podnětem. Vrchol produkce nastává po 90 minutách po setkání s antigenem či po stimulaci a na základní hladinu se TNF- α vrací po 4-6 hodinách [18].

Systematické vystavení TNF- α způsobuje šokový syndrom a poškozuje tkáň. Tato odpověď organismu je nerozeznatelná od septického šoku. Při intravenózní či intraarteriální aplikaci TNF- α v množství, které by mohlo být vytvořeno při bakteriální infekci, může dojít nejen k šokovému syndromu a poruše tkání, ale také k hypoxii, k plicnímu edému a k orgánovému selhání s vysokou mortalitou [18].

2.1.1.5 Interleukin 12

Rodinu cytokinů IL-12 tvoří čtyři členy; IL-12, IL-23, IL-27 a IL-35. Každý z těchto členů obsahuje dvě podjednotky, a to α a β [19]. Mezi hlavní buňky tvořící IL-12 řadíme fagocyty a APC. Podle některých studií jsou právě fagocyty při infekcích největšími producenty IL-12 [18].

Při stimulaci makrofágů infekčním agens, včetně gram negativních bakterií a jejich produktů (např. LPS), dochází k tvorbě vysokých hladin IL-12. IL-12 nevzniká ihned po stimulaci. Největší koncentrace IL-12 se vyskytuje po osmi hodinách od stimulace. Při experimentu na lidských imunitních buňkách bylo dokázáno, že IL-12 aktivuje TNF- α a spouští jiných zánětlivých cytokinů. Mezi další zánětlivé cytokiny patří IL-1 β , IL-6, IFN- γ , což může vést k aktivaci T a B buněk, monocytů, makrofágů a přirozených zabíječů (NK) i k regulaci imunitní odpovědi [18].

IL-12 je složen ze dvou podjednotek z lehkého řetězce proteinu s molekulovou hmotností 35kDa IL-12A (p35) a z těžkého řetězce proteinu s molekulovou hmotností 40KDa IL-12B (p40) [32]. IL-12A aktivuje B buňky a podporuje zánětlivou odpověď organismu potlačením transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β) [33].

2.1.1.6 Indolamin 2,3-dioxygenáza

Indolamin 2,3-dioxygenáza (dále jen IDO) je enzym ovlivňující metabolismus tryptofanu. Protein IDO vytváří velké množství tkání a buněk např. nádorové buňky a makrofágy. Jeho exprese v imunitních buňkách může být ovlivněná některými cytokiny, mezi které patří i IL-10 [34]. Metabolismus tryptofanu ovlivňuje tím, že reguluje jeho degradaci na N-formylkynurenin. Existují dva typy enzymu IDO (IDO1 a IDO2), oba dva regulují metabolismus tryptofanu ovšem každý jinou mírou aktivity. IDO2 bývá oproti IDO1 produkován pouze zřídka a vykazuje pouze 3-5 % jeho enzymatické aktivity. Bylo zjištěno, že některé nádorové tkáně vykazují expresi IDO, zatímco ty stejné zdravé tkáně nikoliv. IDO hraje důležitou roli při vzniku a projevu zhoubného bujení a podporuje vznik infekce v okolí nádoru [35]

IDO se podílí na imunitní odpovědi při chronických infekcích, zánětech tkáně, u transplantacích a také při autoimunitních onemocněních. Má pozitivní vliv na toleranci plodu u těhotných matek. Prokázalo se, že některé interferony a TNF- α dokáží regulovat genovou expresi IDO [36].

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo v teoretické části popsat vybrané kmeny *E. coli* (Nissle, O83, O142 a W) s podrobnějším zaměřením na probiotické kmeny *E. coli* Nissle a *E. coli* O83 a dále charakterizovat sledované cytokiny (IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-12A, TNF- α) aIDO produkované makrofágy.

Cílem experimentální části bylo porovnání vlivu čtyř bakteriálních kmenů *E. coli* (Nissle, O83, O142 a W) na genovou expresi cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1 pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase.

4 METODIKA

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Kultivace bakterií a makrofágů

Kultivace bakterií i makrofágů proběhla podle standartního postupu laboratoře. Pro všechny experimenty byla použita lidská buněčná linie makrofágů THP1 a tyto kmeny *E. coli*; Nissle prodávány v přípravku Mutaflor (Ardeypharm GmbH, Německo), O83 prodávány v přípravku Colinfant Newborn (Dyntec, ČR), O142 (Státní zdravotní ústav, ČR) a W (Státní zdravotní ústav, ČR).

4.1.2 Stimulace makrofágů THP1 pomocí kmenů *E. coli*

Makrofágy odebrané z kultivační láhve byly centrifugované při 20 °C po dobu 10 minut při 300G na centrifuze Universal 30 RF (Hettich, Německo). Po centrifugaci byl slit supernatant a bylo přidáno médium na makrofágy bez ATB. Kultivační médium pro makrofágy bylo složeno z roztoku RPMI LONZA (BioWhittaker®, Švýcarsko), fetálního telecího séra FTS (GIBCO, USA), L-glutaminu (SIGMA, USA) a pufru HEPES (SIGMA, USA) a připraveno podle návodu laboratoře. Objemové zastoupení roztoků použitých k přípravě média na makrofágy bylo do 500ml; RPMI LONZA 427,5ml, FTS 50ml, L-Glutamin 5ml a HEPES 12,5ml. Dle návodu laboratoře by do média mělo ještě patřit 5ml ATB Peu-Strep (GIBCO, USA), které bylo použito v pokusu až později.

Ke stimulaci makrofágů byly použity 12-jamkové kultivační destičky. Do všech jamek byly přidány 2ml rozsuspendovaných makrofágů THP1 v médiu v počtu 2×10^6 buněk. Do jednotlivých jamek kultivační destičky byly dále přidány kmeny *E. coli*; Nissle, O83, O83 bez hlyA, O142 a W v počtu 2×10^7 . V jamkách byly tedy vždy makrofágy s jedním kmenem *E. coli* v poměru 1:10 (1 makrofág : 10 bakteriím). Do jedné z jamek byl přidán LPS (SIGMA-ALDRICH, USA) jako pozitivní kontrola a jedna jamka byla ponechána bez stimulace jako kontrolní vzorek. Takto byly

připraveny dvě kultivační destičky. Obě destičky byly inkubované v termostatu při 37 °C 30 minut a poté do každé jamky bylo přidáno ATB Pen-Strep. Celkově byla jedna kultivační deska inkubována 1 hodinu, a to 30 minut bez ATB a 30 minut s ATB. Druhá deska byla celkově inkubována 4 hodiny opět 30 minut bez ATB a 3 a půl hodiny s ATB. Po inkubaci byl z každé jamky odebrán vzorek na kontrolu životnosti makrofágů (tabulka 2, 3). Po této kontrole byl z jamek odebrán celý objem vzorků a byl přepipetován do mikrozkušavek eppendorf. Zkušavky byly centrifugovány při 22 °C 10 minut při 300 G. Ze vzorku byl slit supernatant a peleta buněk byla využita pro následnou izolaci RNA, která byla skladována při -20°C.

4.1.3 Kontrola životnosti makrofágů

Vzorek (přibližně 5 μ l) určený pro kontrolu životnosti makrofágů byl vložen na podložní sklíčko a bylo k němu přidáno přibližně 20 μ l trypanové modři. Následně byl pod mikroskopem pozorován charakter makrofágů a spočítalo se celkově 100 buněk (živých i mrtvých). Výsledkem životnosti makrofágů je poměr živých buněk a mrtvých buněk. Životnost je udávána v procentech.

4.1.4 Izolace RNA a reverzní transkripce

Buňky byly po předešlé stimulaci lyzovány přidáním 350 μ l lyzačního roztoku k peletě buněk, vzniklého smícháním 5 μ l β -merkapt ethanolu a 495 μ l lyzačního pufru (QIAGEN, Německo), a inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Dále bylo do zkušavek přidáno 350 μ l 70% ethanolu a celý objem 700 μ l byl z mikrozkušavky přenesen do izolační kolonky RNeasy mini spin (QIAGEN, Německo). Izolační kolonky byly centrifugovány na centrifuze Mikro 22 R (Hettich, Německo) 15 sekund při 300G. Po stočení na centrifuze se přidaly roztoky z kitu RNeasy® Mini Kit (250) (QIAGEN, Německo). Po přidání jednotlivých roztoků byly vždy zkušavky centrifugovány 15 sekund při 300G. Roztoky se aplikovaly do izolační kolonky v tomto pořadí; 350 μ l RW1, 80 μ l roztoku DNáza vzniklého smícháním 70 μ l RDD pufru a 10 μ l Dnázy po tomto kroku následovala

15minutová inkubace při pokojové teplotě, 500 μ l RPE a nakonec 30 μ l vody bez RNáz, která byla aplikovaná přímo na membránu izolační kolonky, a materiál prošlý po centrifugaci se ponechal k dalšímu postupu. Koncentrace RNA byla měřena na přístroji NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA).

Izolovaná RNA byla použita k přepisu do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). V první řadě byl namíchán Master mix dle návodu přiloženému ke kitu (směs nukleotidů, náhodných hexamerů, roztoku s hořčičnými ionty, enzymu reverzní transkriptázy a inhibitoru RNáz – celkový objem 10 μ l/1 reakce). Ke vzorkům RNA v mikrozkušavkách bylo přidáno 10 μ l master mixu a vzorek byl doplněn do 20 μ l vodou pro PCR. Reakční směs ve zkumavkách byla promíchána na vortexu, zcentrifugována a vložena do gradientového cykleru (Bio-Rad, USA) a byla provedena reverzní transkripce v následujících 3 krocích; 10minut při 25 °C, 120minut při 37 °C, 5minut při 85 °C. Do takto získaných vzorků cDNA bylo přidáno 80 μ l vody bez DNáz a byly zamrazeny při -20 °C do dalšího postupu.

4.1.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT PCR)

qRT PCR byla provedena pomocí sond pro genovou expresi TaqMan® (Applied Biosystems, USA) a pomocí kitu Xceed qPCR Probe 2x Mix Hi-ROX (Biotech Praha). V první řadě byl připraven mix na qRT PCR, který obsahuje sondy pro genovou expresi (viz. Tabulka 1), vodu bez DNáz a master mix v poměru uvedeném v návodu. Vzorky cDNA vzniklé reverzní transkripcí se napipetovaly v objemu 5 μ l do desky na PCR MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, USA) a bylo k nim přidáno 20 μ l vytvořeného mixu. Vzorky byly vloženy do přístroje 7300 Real Time PCR System (SeqGen, USA). qRT PCR byla prováděna za těchto podmínek: 2 minuty při 50 °C, 10 minut při 95 °C, 15 sekund při 95 °C a 1 minutu při 60 °C v 40 cyklech. Jako referenční gen byla

použita peptidylprolyl-izomeráza A (dále jen PPIA). K vyhodnocení výsledků byla použita delta-delta Ct metoda pro relativní kvantifikaci.

Tabulka 1 - Seznam použitých sond pro genovou expresi TaqMan®

Taq sondy	Identifikace použité sondy
IL-1 β	Hs00174097_m1
IL-6	Hs01174131_m1
IL-10	Hs00174086_m1
IL-12A	Hs00168405_m1
TNF- α	Hs00174128_m1
IDO1	Hs00984148_m1
PPIA	Hs99999904_m1

4.1.6 Statistické vyhodnocování výsledků

Experiment byl třikrát opakován. Rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny pomocí neparametrického Mann-Whitney testu. Statistická signifikance testu byla nastavená na $p=0,05$. Výsledky jsou graficky vyjádřeny jako mediány se směrodatnou odchylkou $\pm\sigma$.

5 VÝSLEDKY

5.1 Životnosti stimulovaných makrofágů po 1 a 4 hodinách inkubace

Makrofágy THP1 byly stimulované bakteriemi v poměru 1:10. Hodnoty životnosti makrofágů (Tabulka 2) byly vypočteny jako průměry ze tří individuálních experimentů. Výsledky životností po jedné hodině stimulace kmeny *E. coli* Nissle a O83 byly nejvíce podobné nestimulované kontrole. Nižší životnost makrofágů byla zjištěna po stimulaci kmeny *E. coli* HLY⁻, O142 a W. Zvýšená životnost makrofágů oproti kontrole byla nalezena u LPS. Žádné hodnoty se ovšem od kontroly výrazně nelišily.

Tabulka 2- Průměrné hodnoty životnosti makrofágů po jedné hodině stimulace

	K	LPS	Nissle	O83	HLY ⁻	O142	W
Životnost [%]	78	85	79	79	70	68	70

Použité zkratky v Tabulce 2:

K-kontrola

LPS-lipopolysacharid

Nissle – *E. coli* Nissle

O83 – *E. coli* O83

HLY⁻ - *E. coli* O83 bez hlyA

O142 – *E. coli* O142

W – *E. coli* W

Hodnoty životnosti makrofágů po čtyřech hodinách stimulace byly vypočteny stejně jako hodnoty po jedné hodině stimulace. Výsledky životnosti makrofágů po čtyřech hodinách stimulace (Tabulka 3) poukazují na pokles životnosti makrofágů u stimulace kmeny *E. coli* Nissle, O83 a HLY⁻. Nejvýraznější pokles životnosti byl nalezen u *E. coli* Nissle, u kterého životnost poklesla o 21 %. Dále je také viditelný pokles životnosti po stimulaci LPS.

Tabulka 3- Průměrné hodnoty životnosti makrofágů po čtyřech hodinách stimulace

	K	LPS	Nissle	O83	HLY-	O142	W
Životnost [%]	75	74	58	69	70	67	71

Použité zkratky v Tabulce 3:

K-kontrola

LPS-lipopolysacharid

Nissle – *E. coli* Nissle

O83 – *E. coli* O83

HLY- - *E. coli* O83 bez hlyA

O142 – *E. coli* O142

W – *E. coli* W

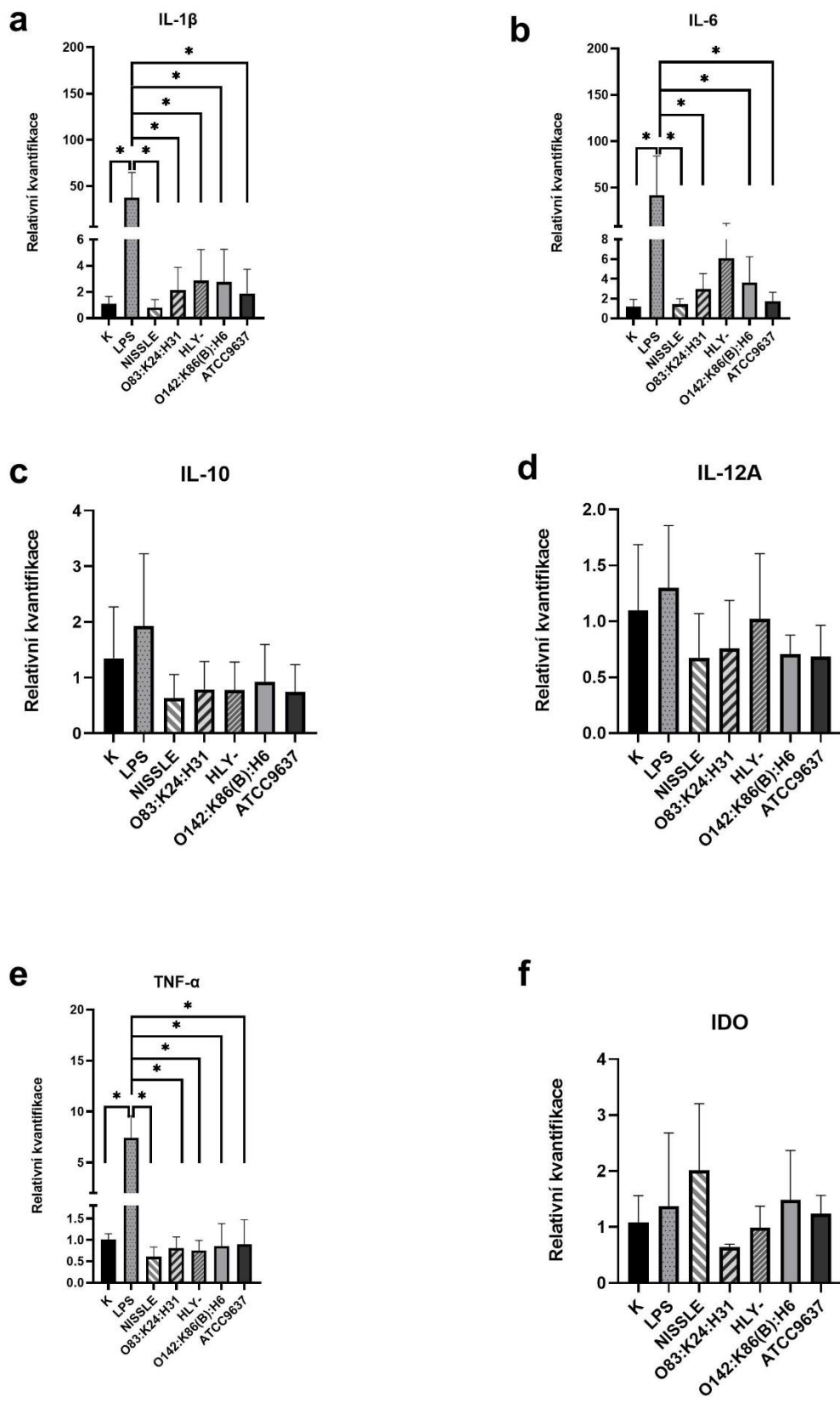
5.2 Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi THP1

K porovnání rozdílů genové exprese cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12A, TNF- α) aIDO v buněčné linii makrofágů THP1 po stimulaci různými kmeny *E. coli* (Nissle, O83, O142 a W) byla využita metoda PCR v reálném čase. Genová exprese zmíněných cytokinů se měřila po jedné hodině stimulace (Obrázek 1) a následně po čtyřech hodinách stimulace (Obrázek 2).

Genová exprese IL-1 β (Obrázek 1a) byla signifikantně snižena oproti LPS u všech použitých kmenů *E. coli*. Genová exprese IL-1 β u makrofágů stimulovaných různými kmeny *E. coli* byla podobná jako u nestimulované kontroly. U IL-6 (Obrázek 1b) byla naměřena snížená genová exprese u makrofágů stimulovaných kmeny *E. coli*; Nissle, O83, O142 a W oproti makrofágům stimulovaných LPS. Genová exprese IL-6 byla signifikantně vyšší u makrofágů stimulovaných LPS oproti nestimulované kontrole. Zvýšená genová exprese IL-6 u *E. coli* HLY nedosáhla statisticky signifikantního rozdílu. Při porovnání hladiny genové exprese IL-6 u buněk stimulovaných kmeny *E. coli* ke kontrolním buňkám nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly.

Hladiny genové exprese IL-10 (Obrázek 1c) byly u všech kmenů *E. coli* podobné a nebyl u nich nalezen žádný signifikantní rozdíl v porovnání s genovou expresí IL-10 u makrofágů stimulovaných LPS či kontrolním nestimulovaným vzorkem. Mezi skupinami kmenů *E. coli*, kontrolou a LPS nebyly u genové exprese IL-12A v makrofázích (Obrázek 1d) nalezeny žádné signifikantní rozdíly. U genové exprese TNF- α (Obrázek 1e) byl zjištěn signifikantní rozdíl při porovnání všech použitých kmenů *E. coli* v porovnání s makrofágy stimulovanými LPS. Statisticky signifikantní rozdíl genové exprese TNF- α byl také mezi nestimulovanou kontrolou a LPS.

U genové exprese IDO (Obrázek 1f) byla naměřena vyšší hodnota genové exprese u buněk stimulovaných *E. coli* Nissle než u buněk stimulovaných LPS, ale nebyl mezi nimi nalezen signifikantní rozdíl. Všechny ostatní kmeny *E. coli* vykazovaly nižší hladiny exprese IDO než u buněk stimulovaných LPS, ale opět nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi jednotlivými kmeny *E. coli*.



Obrázek 1 - Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi cytokinů a IDO v buněčné linii makrofágů THP1 po jedné hodině stimulace.

- a) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi IL-1 β v buněčné linii makrofágů THP1
- b) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi IL-6 v buněčné linii makrofágů THP1
- c) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi IL-10 v buněčné linii makrofágů THP1
- d) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi IL-12A v buněčné linii makrofágů THP1
- e) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi TNF- α v buněčné linii makrofágů THP1
- f) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresiIDO v buněčné linii makrofágů THP1

Použité zkratky:

K – kontrola

LPS – lipopolysacharid (použitý jako pozitivní kontrola)

NISSLE – *E. coli* Nissle

O83:K24:H31 – *E. coli* O83

HLY – *E. coli* O83 bez hlyA

O142:K86(B):H6 – *E. coli* O142

ATCC9637 – *E. coli* W

IDO – Indolamin 2,3-dioxygenáza

* $p \leq 0,05$

n=3 (n - počet opakování pokusu)

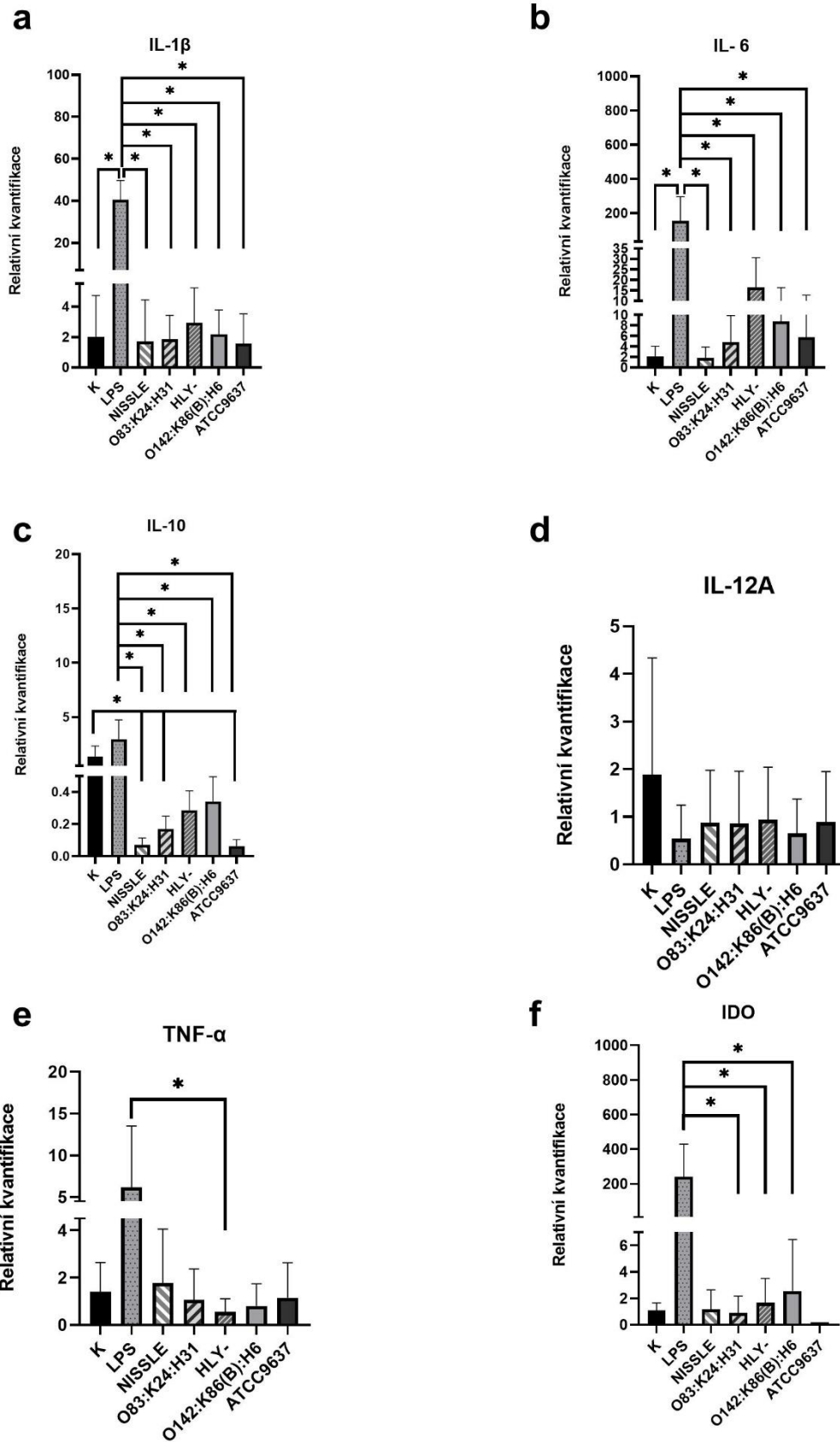
Genová exprese jednotlivých cytokinů a IDO u stimulovaných vzorků byla statisticky vyhodnocena k hodnotám genové exprese cytokinů a IDO u nestimulovaných kontrolních vzorků a k hodnotám pozitivní kontroly stimulace pomocí LPS.

Hodnoty genové exprese IL-1 β (Obrázek 2a) po čtyřhodinové stimulaci makrofágů měly u všech kmenů *E. coli* podobné výsledky relativní kvantifikace genové exprese jako po jedné hodině stimulace. U genové exprese IL-1 β byl opět nalezen signifikantní rozdíl u buněk stimulovaných kmeny *E. coli* a u nestimulované kontroly oproti buňkám stimulovaným LPS. Hladiny genové exprese IL-6 (Obrázek 2b) u buněk stimulovaných kmeny *E. coli* byly po čtyřech hodinách stimulace zvýšené oproti jednohodinové stimulaci. Hodnoty genové exprese IL-6 u makrofágů stimulovaných LPS byly stále signifikantně zvýšené oproti genové expresi IL-6 u buněk stimulovaných kmeny *E. coli* a také u kontrolních nestimulovaných buněk. Nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl v genové expresi

IL-6 při porovnání kmenů *E. coli* s kontrolou. Všechny hladiny genové exprese IL-10 u makrofágů stimulovaných kmeny *E. coli* vykazovaly nižší hodnoty než hodnoty kontroly.

U buněk stimulovaných kmeny *E. coli* Nissle, O83 a W byl zjištěn signifikantní rozdíl v genové expresi IL-10 (Obrázek 2c) oproti kontrolním nestimulovaným buňkám. Buňky stimulované kmeny *E. coli* měly také signifikantně snížené hodnoty genové exprese IL-10 oproti buňkám stimulovaným pomocí LPS. U hodnot genové exprese IL-12A (Obrázek 2d) opět nebyly nalezeny žádné signifikantní výsledky. Genová exprese TNF- α u buněk stimulovaných kmeny *E. coli* (Obrázek 2e) byla snížena ve srovnání s buňkami stimulovanými LPS, ale pouze u buněk stimulovaných *E. coli* HLY⁻ dosáhl rozdíl statistické významnosti. Hodnoty genové exprese TNF- α u buněk stimulovaných kmeny *E. coli* nebyly signifikantně rozdílné oproti hodnotám genové exprese buněk nestimulované kontroly.

Po čtyřech hodinách stimulace byla dále zjištěna statisticky významně zvýšená genová expreseIDO (Obrázek 2f) u buněk stimulovaných LPS oproti buňkám stimulovaných kmeny *E. coli*: O83, HLY⁻ a O142. U genové expreseIDO v makrofázích po čtyřech hodinách stimulace kmenem *E. coli* W byla metodou PCR v reálném čase naměřena hodnota genové exprese pouze v jednom experimentu. V ostatních dvou experimentech se hodnoty genové exprese nacházely pod detekčním limitem.



Obrázek 2- Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1 po čtyřech hodinách stimulace.

- a) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi IL-1 β v buněčné linii makrofágů THP1
- b) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi IL-6 v buněčné linii makrofágů THP1
- c) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi IL-10 v buněčné linii makrofágů THP1
- d) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi IL-12A v buněčné linii makrofágů THP1
- e) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresi TNF- α v buněčné linii makrofágů THP1
- f) Vliv kmenů *E. coli* na genovou expresiIDO v buněčné linii makrofágů THP1

Použité zkratky:

K – kontrola

LPS – lipopolysacharid (použitý jako pozitivní kontrola)

NISSLE – *E. coli* Nissle

O83:K24:H31 – *E. coli* O83

HLY – *E. coli* O83 bez hlyA

O142:K86(B):H6 – *E. coli* O142

ATCC9637 – *E. coli* W

IDO – Indolamin 2,3-dioxygenáza

* $p \leq 0,05$

n=3 (počet opakování pokusu)

Hodnoty genové exprese cytokinů aIDO u stimulovaných buněk THP1 byly porovnávány k hodnotám genové exprese cytokinů aIDO u kontrolních nestimulovaných vzorků a k hodnotám pozitivní kontroly LPS.

6 DISKUZE

Z výsledků této bakalářské práce je patrné, že po stimulaci makrofágů THP1 kmeny EcN, *E. coli* O83, *E. coli* O142 a *E. coli* W nedošlo ke zvýšené genové expresi žádného pozorovaného cytokinu (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12A, TNF- α), aniIDO. Žádný použitý kmen *E. coli* neovlivňuje tedy stimulované makrofágy THP1 ke zvýšení genové exprese žádného pozorovaného cytokinu aniIDO v našem experimentálním uspořádání.

Probiotická EcN byla popsána jako prospěšná při léčbě gastrointestinálních onemocnění, jakým je např. UC. Mechanismy působení EcN jsou spojovány hlavně s její antibakteriální vlastností a s regulací produkce určitých cytokinů v imunitních buňkách [25]. EcN se také stala předmětem diskuze, ve které figuruje jako prostředník nové léčby ISZ u pacientů infikovaných kmeny AIEC [26]. V případě cytokinů IL-1 β a IL-6 byly naměřeny signifikantně nižší výsledky genové exprese oproti hodnotám získaných u makrofágů stimulovaných LPS. Produkce obou těchto cytokinů se podobají hodnotám genové exprese nestimulované kontroly jak po jedné tak po čtyřech hodinách stimulace makrofágů kmeny *E. coli*. Cytokin IL-1 β je prozánětlivý a zastává důležitou schopnost fungovat jako endogenní pyrogen [31]. IL-1 β se tvoří na podkladě zánětlivých podnětů (např. při výskytu LPS) a také v odpovědi na sekreci cytokinu TNF- α [16]. V publikaci Ulfa Helwinga z roku 2006 [45] byl proveden experiment, zda *E. coli* Nissle stimuluje mononukleární buňky z periferní krve k sekreci IL-1 β . V této práci byly použity mononukleární buňky zdravých dárců a byly k nim přidány bakterie EcN, *Lactobacilli* a *Bifidobacteria*. Bakterie byly inkubovány s mononukleárními buňkami po dobu 36 hodin a následně byla z odebraného supernatantu provedena metoda ELISA. Výsledky popisují lepší schopnost EcN stimulovat buňky k sekreci IL-1 β než bakterie *Lactobacilli* a *Bifidobacteria*. Fakt, že EcN dokáže stimulovat T-lymfocyty k produkci IL-1 β [6], poukazuje, že za zvýšenou sekrecí IL-1 β stimulovanými

mononukleárními buňkami budou zodpovědné pravděpodobně T-lymfocyty, nikoli makrofágy.

IL-6 se podílí na regulaci akutního zánětu a v případě chronického zánětu může hrát negativní roli podporou sekrece chemokinu MCP-1 (monocytární chemoatraktivní protein 1), a tím způsobit nakumulování mononukleárních fagocytů do místa poškození [37]. Výsledky sekrece cytokinu IL-6 po stimulaci makrofágů probiotickým kmenem EcN jsou tedy v souladu s teorií, že EcN funguje jako prospěšný přípravek při ISZ, tím pádem tedy nestimuluje makrofágy k sekreci cytokinu škodlivého při chronických onemocněních.

TNF- α je spolu s IL-12 hlavním mediátorem zánětlivých reakcí a byla prokázána jeho snížená produkce při chronických zánětech [18]. Zvýšená sekrece TNF- α může vést k patologické zánětlivé imunitní odpovědi. Snížením genové exprese TNF- α se dá docílit zvýšením hladiny IL-10, protože IL-10 ovlivňuje buňky imunitního systému právě k regulaci jeho genové exprese [44]. Ve výsledcích u genové exprese TNF- α po hodinové stimulaci buněk kmenem EcN pozorujeme sníženou expresi oproti buňkám stimulovaných LPS. Hladiny IL-12A po stimulaci makrofágů kmenem EcN jsou podobné s genovou expresí v buňkách nestimulované kontroly. IL-12 vzniká mimo jiné po stimulaci LPS a jeho nejvyšší hladina se vyskytuje po osmi hodinách [18]. Ve výsledcích této práce byla hladina IL-12A po stimulaci LPS nižší po čtyřech hodinách stimulace než po jedné hodině.

Genová exprese cytokinu IL-10 byla po čtyřhodinové stimulaci kmenem EcN signifikantně nižší oproti stimulaci LPS i oproti nestimulované kontrole. Snížené hodnoty genové exprese IL-10 u buněk stimulovaných EcN oproti nestimulované kontrole by mohly vypovídat o efektu EcN na regulaci genové exprese tohoto cytokinu v buněčné linii makrofágů THP1. IL-10 se řadí mezi imunoregulační cytokiny a využívá imunosupresivní funkce k redukci poškození tkáně po nadměrné a nekontrolované efektorové zánětlivé odpovědi. Po zjištění

imunosupresivní funkce cytokinu IL-10 bylo zvažováno jeho použití pro navrácení tkáňové homeostázy při zánětlivých onemocněních, zejména při ISZ [41]. Podle předchozí informace jsou tedy výsledky hladiny genové exprese IL-10 po stimulaci buněk kmenem EcN překvapivé, právě protože EcN se používá jako probiotický přípravek při léčbě ISZ. Výsledky genové exprese IL-10 můžeme diskutovat na základě informace, že hladiny IL-10 jsou nejvyšší po 12 hodinách od setkání s podnětem, který genovou expresi vyvolal [42]. Je tedy možné, že kdyby se prodloužila doba inkubace na 12 hodin, byl by IL-10 již dostatečně exprimován.

Probiotický kmen *E. coli* O83 se používá jako orální vakcína pro novorozence ke snížení incidence opakovaných infekcí a ke snížení rizika rozvoje alergií [10]. *E. coli* O83 obsahuje hlyA [10]. V této bakalářské práci byl použit jeden kmen *E. coli* O83 s hlyA a jeden kmen *E. coli* O83 bez hlyA. HlyA napomáhá bakteriálním buňkám způsobit poškození a smrt buňky (zejména erytrocytů a epiteliálních buněk), a tím působí jako nástroj pro bakterie k získání živin z rozpadlých buněk [43]. V publikaci z roku 2016 [4] bylo popsáno, že kolonie bakterií z přípravku Colinfant Newborn vykazují nízkou hemolytickou aktivitu na krevním agaru. Porovnávání *E. coli* O83 a *E. coli* O83 bez hlyA se provádí kvůli snaze odhalit, zda má *E. coli* O83 bez hlyA stejné žádoucí vlastnosti jako *E. coli* O83. Pokud by vlastnosti obou variant kmenů *E. coli* O83 byly stejné, mohl by současný kmen používaný v přípravku Colinfant Newborn nahradit bezpečnější mutantní kmen *E. coli* O83 bez hlyA.

Hladiny genové exprese prozánětlivého IL-1 β byly signifikantně sníženy po stimulaci *E. coli* O83 s hlyA i bez hlyA. Obě varianty probiotického kmene nestimulují makrofágy k produkci prozánětlivého IL-1 β . U IL-6 byly hodnoty signifikantně nižší než LPS u *E. coli* O83, ale u *E. coli* O83 hlyA⁻ byly signifikantně nižší pouze po čtyřhodinové stimulaci. Nicméně stejně jako EcN probiotický kmen *E. coli* O83 nestimuluje makrofágy ke zvýšené genové expresi jak IL-1 β tak ani IL-6.

Po jedné hodině stimulace makrofágů kmeny *E. coli* O83 a *E. coli* hlyA⁻ nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v genové expresi IL-10 oproti buňkám stimulovaných LPS ani oproti kontrolním buňkám. U hodnot genové exprese IL-10 po čtyřhodinové stimulaci makrofágů kmeny *E. coli* O83 a *E. coli* O83 hlyA⁻ byla naměřena snížená signifikance oproti buňkám stimulovaných pomocí LPS. Po čtyřech hodinách stimulace byla zjištěna signifikantně snížená genová exprese IL-10 oproti kontrole pouze po stimulaci buněk kmenem *E. coli* O83 s hlyA. Hladiny genové exprese IL-10 po stimulaci *E. coli* O83 bez hlyA nejsou sice signifikantně snížené oproti nestimulované kontrole, ale jsou stále nižší než u buněk stimulovaných LPS. U výsledků genové exprese IL-10 u stimulace buněk kmenem EcN můžeme konstatovat, že IL-10 dosahuje nejvyšších hladin po 12 hodinách od setkání s podnětem, a výsledky by tedy mohly po prodloužení inkubace ukazovat vyšší genovou expresi IL-10.

Z publikace roku 2019 [38] vyplývá, že *E. coli* O83 je probiotický kmen schopný vyvolat produkci IL-10, a tím se podílet na udržení tolerance proti neškodným antigenům vnějšího prostředí jedince. Tato publikace se nicméně nezaměřuje přímo na makrofágy, ale pozoruje sekreci určitých cytokinů z buněk periferní krve devítiletých dětí osídlených *E. coli* O83 časně postnatálně [38]. Stejný závěr, že *E. coli* O83 podporuje produkci IL-10 byl popsán v publikaci z roku 2018 [47], ve kterém byla provedena stimulace mononukleárních buněk z pupečnickové krve novorozenců kmenem *E. coli* O83 a kmenem EcN *in vitro*. Genová exprese IL-10 byla zvýšená po stimulaci kmeny *E. coli* O83 i EcN oproti nestimulované kontrole a oproti stimulovaným buňkám pomocí LPS. Nicméně po stimulaci buněk kmenem *E. coli* O83 byly naměřeny signifikantně vyšší hodnoty v porovnání s kontrolním vzorkem než po stimulaci EcN. Z výsledků této bakalářské práce vychází, že kmeny EcN a *E. coli* 83 nezvyšují hladiny genové exprese IL-10. Je tedy pravděpodobné, že sekreci IL-10 *E. coli* O83 nevyvolává prostřednictvím makrofágů, ale např. pomocí indukovaných Tregs, které jsou definovány právě

schopností produkovat vysoké hladiny IL-10, přirozených Tregs či tolerogenních DC [46].

TNF- α byl signifikantně snížen po jedné hodině stimulace oproti LPS u obou variant *E. coli* O83, nicméně po čtyřhodinové stimulaci byly nalezeny signifikantně snížené výsledky pouze u *E. coli* O83 hlyA⁻ oproti LPS. U genové exprese enzymuIDO byly detekovány signifikantní rozdíly oproti makrofágům stimulovaných LPS po čtyřech hodinách inkubace u obou variant *E. coli* O83.

E. coli O142 patří mezi typické EPEC kmeny [13]. Po stimulaci makrofágů kmenem *E. coli* O142 byl detekován signifikantně snížený efekt oproti stimulaci pomocí LPS u cytokinů; IL-1 β , IL-6, IL-10 (pouze po čtyřech hodinách), TNF- α (pouze po jedné hodině) a u IDO (pouze po čtyřech hodinách).

Kmen *E. coli* W se hojně používá v biotechnologickém průmyslu [11]. Stimulací makrofágů kmenem *E. coli* W byl nalezen signifikantně snížený rozdíl oproti stimulaci LPS po jedné i čtyřech hodinách stimulace u cytokinů IL-1 β , IL-6, dále pouze po jedné hodině u TNF- α a pouze po čtyřech hodinách u IL-10.

Při porovnání efektu dvou probiotických kmenů *E. coli* Nissle a *E. coli* O83 bylo zjištěno, že se liší v hodnotách genové exprese těchto cytokinů: IL-6, TNF- α a IDO. V případě IL-6 po jednohodinové stimulaci byly signifikantně nižší hodnoty pouze u makrofágů stimulovaných EcN a *E. coli* O83, nikoli u *E. coli* hlyA⁻. Na tomto příkladu je zřejmé, že *E. coli* O83 s hlyA má odlišný efekt na makrofágy než *E. coli* bez hlyA. U genové exprese TNF- α byly po čtyřech hodinách nižší signifikantní rozdíly oproti LPS jen u *E. coli* HLY⁻ a u IDO pouze *E. coli* O83 a *E. coli* O83 hlyA⁻, nikoli EcN.

K porovnání výsledků této práce byl vybrán článek z roku 2017 [39], který modeluje odpověď organismu po stimulaci kmenem *E. coli* O83 u novorozenců narozených zdravým matkám a u novorozenců narozených alergickým matkám.

Z pupečnickové krve byly získány DC a stimulovány kmenem *E. coli* O83 a LPS (Sigma). Buňky moDC (z monocytů odvozené DC) byly stimulovány bakteriemi v poměru 1:10 [39], tedy ve stejném poměru jako makrofágy s bakteriemi v této bakalářské práci. Po pětihodinové stimulaci byla stanovena genová exprese [39] podobně jako v naší práci. Výsledky genové exprese výzkumu ukázaly, že *E. coli* O83 podporuje genovou expresi IDO v DC novorozenců zdravých i alergických matek. Dále také zvyšuje hladinu IL-10 opět u obou skupin ku nestimulovaným kontrolám, pouze u stimulace novorozenců zdravých matek byla genová exprese signifikantně vyšší u IL-10 v poměru s kontrolou [39]. Výsledky bakalářské práce sledující genovou expresi IDO neukázaly žádné signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolou. U IL-10 byla po čtyřhodinové stimulaci naměřena snížená genová exprese, tudíž přesný opak než u moDC, kde byla hladina IL-10 zvýšená [39]. Dá se tedy předpokládat, že *E. coli* O83 nemá stejný efekt na makrofágy THP1 jako na moDC.

Dále byla v publikaci [39] také poměřována sekrece cytokinů v moDC po 24hodinové stimulaci pomocí metody ELISA [39]. Tyto výsledky popisují signifikantní sekreci cytokinů IL-10, TNF- α a IL-6 oproti nestimulovaným kontrolám u obou skupin novorozenců zdravých i alergických matek [39]. Na základě této informace by bylo vhodné detekovat cytokiny v supernatantu kultur THP1 pomocí ELISA metody i v naší práci. K doměření koncentrace cytokinů v supernatantu kultur metodou ELISA by bylo potřeba více času určeného k vypracování experimentální části práce.

Další porovnání výsledků bylo provedeno s článkem z roku 2018 [25], který se zaměřuje na informaci, jestli je podávání EcN prospěšné při DSS vyvolané kolitidě u myši [25]. DSS se řadí mezi chemické látky, které dokáží vyvolat kolitidu [25]. Experiment byl proveden na skupině myši, která byla rozdělena do tří podskupin. Dvě podskupiny myši bez kolitidy a myši s kolitidou vyvolanou DSS dostávaly pouze roztok pufru PBS. Jedné podskupině byla podávána EcN v koncentraci 5×10^8

CFU pomocí katedru zavedeného do jícnu. Myši byly po pokusu usmrčeny a mimo jiné jim byly odebrány vzorky tlustého střeva na izolaci RNA. Vzorky RNA byly použity na analýzu genové exprese cytokinu pomocí metody qRT PCR. Mimo jiné byla poměřována genová exprese IL-1 β a IL-12, u kterých byly zjištěny nižší hladiny po podání EcN než u DSS-vyvolané kolitidy [25]. V bakalářské práci nebyla po stimulaci kmenem EcN dokázána zvýšená genová exprese IL-1 β , ani IL-12A, tudíž ve srovnání s publikací 2018 [25] můžeme potvrdit, že EcN nezvyšuje genovou expresi těchto cytokinů v makrofázích ani u zdravých myši stimulovaných pomocí EcN.

Další publikace [40] použitá k porovnání výsledků se zabývá biotechnologickým upravením EcN k prevenci nepřiměřené alergické reakce u alergií vyvolaných pyly břízy a trav. V této práci se mimo jiné stimulovaly epiteliální buňky MLE-12 a MODE-K upraveným kmenem EcN v poměru 1:10 a byla pozorována produkce určitých cytokinů. Například cytokiny IL-10 a IL-6 vykazovaly vysoké hodnoty produkce oproti nestimulovaným kontrolám [40]. Tato práce nebyla v souladu s výsledky naší práce, ve které stimulace kmenem EcN nevedla ke zvýšené genové exprese cytokinu IL-10 ani IL-6. Můžeme opět tedy říci, že EcN pravděpodobně účinkuje jiným způsobem na epiteliální buňky a makrofágy ve smyslu indukce genové exprese cytokinů IL-10 a IL-6.

Poměr použitých bakterií při stimulaci makrofágů by mohl mít významný efekt na metabolismus makrofágů, tedy i na genovou expresi cytokinů jimi produkováných. V naší bakalářské práci byl použit poměr makrofágů a bakterií 1:10 jako v publikaci Súkeníkové z roku 2017 [39], kde byla použita 1 moDC na 10 bakterií a v publikaci Rodríguez-Noagalese z roku 2018 [25], ve které se stimulovaly MLE-12 a MODE-K buňky 1 ku 10 bakteriím. V naší práci je ve výsledcích (Tabulka 1, 2) popsána snížená životnost makrofágů po delší stimulaci. Na tento fakt, že makrofágy ztrácely životnost po delší době stimulace, by mohl mít efekt právě poměr buněk při stimulaci. V laboratoři, kde byl experiment

bakalářské práce vypracován, je nyní realizován jiný podobný experiment, při kterém jsou makrofágy stimulovány bakteriemi v poměru 1:1 a makrofágy prospívají lépe.

Experimentální část práce by se tedy dala zlepšit úpravou poměru makrofágů ku bakteriím na poměr 1:1. Pokud by se změnou poměru zlepšila životnost makrofágů, dala by se inkubace stimulovaných vzorků prodloužit na osm a dvacet čtyři hodin. Zvýšení časového intervalu inkubace by mohlo mít pozitivní vliv na výsledky, zejména protože jednotlivé cytokiny jsou tvořeny individuálně v určitém množství podle časového intervalu od setkání s podnětem, který tuto produkci vyvolal. Například TNF- α je po stimulaci makrofágů LPS produkován ihned a vrchol jeho produkce je přibližně po hodině a půl po stimulaci [18]. Zatímco hladina IL-12 není nejvyšší po hodině a půl, ale vzniká okolo osmé hodiny po setkání s podnětem [18]. Prodloužení doby inkubace by tedy mohlo pomoci odhalit více signifikantně zvýšených či snížených hladin cytokinů. Delší stimulace makrofágů kmeny *E. coli* v poměru 1:1 by mohla rovněž vést k pozorování odlišností v imunomodulačních vlastnostech jednotlivých kmenů. Zejména charakterizace odlišné tvorby cytokinů u probiotických a patogenních kmenů *E. coli*. Dále by ke zlepšení kvality experimentální části práce mohlo přispět stanovení koncentrace cytokinů v supernatantu buněčných kultur metodou ELISA.

7 ZÁVĚR

Bakalářská práce v teoretické části popisuje možné mechanismy prospěšných účinků probiotických bakterií, využití přípravků Mutaflor a Colinfant Newborn, Symbioflor 2 a vybrané kmeny *E. coli* kmeny (Nissle, O83, O142 a W). Dále jsou v teoretické části popsány makrofágy a některé cytokiny jimi produkované. V praktické části je porovnán vliv kmenů *E. coli* (Nissle, O83, O142 a W) na genovou expresi cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1. Experiment praktické části byl vypracován pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase. Pozorování vlivu probiotických bakterií na genovou expresi v imunitních buňkách je důležité k odhalení jejich možných mechanismů působení na imunitní systém kolonizovaného jedince.

Vybrané probiotické kmeny *E. coli* Nissle a *E. coli* O83 významně nezvyšovaly genovou expresi žádného vybraného cytokinu aniIDO. Z výsledků práce vyplývá, že EcN a *E. coli* O83 mají rozdílný vliv na genovou expresi cytokinů v buněčné linii THP1. *E. coli* O83 se nejčastěji používá jako přípravek pro novorozence ke snížení rizika vývoje alergií. Je tedy překvapujícím výsledkem snížená genová exprese IL-10, který se podílí na udržení tolerance proti neškodným antigenům z okolí jedince. Výsledky práce nevylučují prospěšný efekt probiotických kmenů *E. coli* Nissle a *E. coli* O83.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIEC	adherentně invazivní <i>Escherichia coli</i>
ATB	antibiotikum
APC	antigen prezentující buňka
CFU	colony forming units (kolonie tvořící jednotky)
CN	Crohnova nemoc
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>E. coli</i> O83	<i>Escherichia coli</i> O83:K24:H31
<i>E. coli</i> O142	<i>Escherichia coli</i> O142:K86(B):H6
<i>E. coli</i> W	<i>Escherichia coli</i> ATCC9637
HLY-	<i>Escherichia coli</i> O83 bez α -haemolysinu
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ISZ	idiopatické střevní záněty
IDO	Indolamin-2,3-dioxogenáza
IL-1Ra	interleukin 1 receptorový antagonist
IL	interleukin
INF	interferon
PCR-RT	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
LPS	lipopolysacharid
TNF	tumor nekrotizující faktor
UC	ulcerózní kolitida
hlyA	α -haemolysin
EPEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
NK	přirozený zabiják
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
INF- β 2	hepatární růstový faktor
TGF	transformující růstový faktor

PCR	polymerázová řetězová reakce
PPIA	peptidylpropyl izomeráza A
MCP-1	monocytární chemoatraktivní protein 1
moDC	z monocytů odvozené dendritické buňky
DSS	dextran sulfát sodný
Treg	regulační T lymfocyt
MHC	hlavní histokompatibilní komplex

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TOMÁŠOVÁ, Zuzana. *Rozdělení kmenů Escherichia coli izolovaných z potravin do fylogenetických skupin*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012, 95 s. (130 063) [cit. 2019-03-13]. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/21763>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Doležalová, Magda.
- [2] FRIC, Premysl. Probiotics and prebiotics — renaissance of a therapeutic principle. *Open Medicine* [online]. 2007, 2(3), 237-270 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.2478/s11536-007-0031-5. ISSN 2391-5463. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/med.2007.2.issue-3/s11536-007-0031-5/s11536-007-0031-5.xml>
- [3] REID, Gregor. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* [online]. 2016, 30(1), 17-25 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.bpg.2015.12.001. ISSN: 15216918. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691815001651>
- [4] WASSENAAR, Trudy M. Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli*. *European Journal of Microbiology and Immunology* [online]. 2016, 6(3), 147-162 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1556/1886.2016.00029. ISSN 2062-509X. Dostupné z: <http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/1886.2016.00029>
- [5] FLOCH, Martin H., Yehud RINGEL a W. Allan WALKER. *The microbiota in gastrointestinal pathophysiology: implications for human health, prebiotics, probiotics, and dysbiosis* [online]. Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, [2017], s. 59-69 [cit. 2019-05-08]. ISBN 978-0-12-804024-9. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128040249000057>
- [6] LOSURDO, Giuseppe, Andrea IANNONE, Antonella CONTALDO, Enzo IERARDI, Alfredo DI LEO a Mariabeatrice PRINCIPI. *Escherichia coli* Nissle

1917 in ulcerative colitis treatment: systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* [online]. 2015, **24**(4), 499-505 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.15403/jgld.2014.1121.244.ecn. ISSN 18418724.

Dostupné z: <http://www.jgld.ro/wp/archive/y2015/n4/a15>

- [7] Cipla (UK) Ltd. *Souhrn údajů o přípravku: Ciplox 500 mg potahované tablety*. Velká Británie, 2017. Dostupné také z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC112360.pdf&type=spc&as=ciplox-spc>
- [8] AGNIHOTRI, Geetanjali a Anup Kumar MISRA. Synthesis of a di- and a trisaccharide related to the O-antigen of *Escherichia coli* O83:K24. *Carbohydrate Research* [online]. 2006, **341**(14), 2420-2425 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1016/j.carres.2006.07.007. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621506003569>
- [9] HEJNOVA, Jana, Delphine PAGES, Christophe RUSNIOK, Philippe GLASER, Peter SEBO a Carmen BUCHRIESER. Specific regions of genome plasticity and genetic diversity of the commensal *Escherichia coli* A034/86. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2006, **296**(8), 541-546 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1016/j.ijmm.2006.06.007. ISSN 14384221. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422106001834>
- [10] HEJNOVA, J. Characterization of the flexible genome complement of the commensal *Escherichia coli* strain A034/86 (O83:K24:H31):K24. *Microbiology* [online]. 2005, **151**(2), 385–398 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1099/mic.0.27469-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/151/2/385.pdf?expires=1557079068&id=id&accname=guest&checksum=46B3C237E6F4F9D2358F93061BE66BEF>

- [11] ARCHER, Colin T, Jihyun F KIM, Haeyoung JEONG, Jin Hwan PARK, Claudia E VICKERS, Sang Yup LEE a Lars K NIELSEN. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics* [online]. 2011, **12**(1), 1-20 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1186/1471-2164-12-9. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-9>
- [12] KENNEDY, D. H., G. H. WALKER, R. J. FALLON, J. F. BOYD, R. J. GROSS a B. ROWE. An outbreak of infantile gastroenteritis due to *E. coli* 0142. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 1973, **26**, 731-737 [cit. 2019-05-05]. ISSN 1472-4146. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC477872/pdf/jclinpath00120-0003.pdf>
- [13] TRABULSI, Luiz R., Rogéria KELLER a Tânia A. Tardelli GOMES. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2002, **8**(5), 508-513 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.3201/eid0805.010385. ISSN 1080-6040. Dostupné z: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/5/01-0385_article.htm
- [14] SCHIRMER, Melanie, Vinod KUMAR, Mihai G NETEA a Ramnik J XAVIER. The causes and consequences of variation in human cytokine production in health. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2018, **54**, 50-58 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.coi.2018.05.012. ISSN 09527915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791517301735>
- [15] HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.

- [16] BANERJEE, Monisha a Madhukar SAXENA. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2012, **413**(15-16), 1163-1170 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.cca.2012.03.021. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898112001659>
- [17] KWILASZ, A.J., P.M. GRACE, P. SERBEDZIJA, S.F. MAIER a L.R. WATKINS. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology* [online]. 2015, **96**, 55-69 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.020. ISSN 00283908. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390814003955>
- [18] MA, Xiaojing. TNF- α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning: a balancing act in macrophage functioning. *Microbes and Infection* [online]. 2001, **3**(2), 121-129 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01359-9. ISSN 12864579. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457900013599>
- [19] SUN, Lin, Chang HE, Lekha NAIR, Justine YEUNG a Charles E. EGWUAGU. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine* [online]. 2015, **75**(2), 249-255 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.01.030. ISSN 10434666. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466615000496>
- [20] MASJEDI, Ali, Vida HASHEMI, Mohammad HOJJAT-FARSANGI, Ghasem GHALAMFARSA, Gholamreza AZIZI, Mehdi YOUSEFI a Farhad JADIDI-NIARAGH. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2018, **108**, 1415-1424 [cit. 2019-05-05]. DOI:

10.1016/j.biopha.2018.09.177. ISSN 07533322. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S075333221835114X>

- [21] KAMIŃSKA, Katarzyna, Anna M. CZARNECKA, Bernard ESCUDIER, Fei LIAN a Cezary SZCZYLIK. Interleukin-6 as an emerging regulator of renal cell cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* [online]. 2015, 33(11), 476-485 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.urolonc.2015.07.010. ISSN 10781439. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078143915003531>
- [22] STURM, A., K. RILLING, D. C. BAUMGART, et al. Escherichia coli Nissle 1917 Distinctively Modulates T-Cell Cycling and Expansion via Toll-Like Receptor 2 Signaling. *Infection and Immunity* [online]. 2005, 73(3), 1452 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1128/IAI.73.3.1452-1465.2005. ISSN 0019-9567. Dostupné z:
<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.73.3.1452-1465.2005>
- [23] PARKER, Elizabeth A., Tina ROY, Christopher R. D'ADAMO a L. Susan WIELAND. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. *Nutrition* [online]. 2018, 45, 125-134.e11 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.nut.2017.06.024. ISSN 08999007. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900717301351>
- [24] AZPIROZ, María F., María Eloisa POEY a Magela LAVIÑA. Microcins and urovirulence in Escherichia coli. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2009, 47(5), 274-280 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.micpath.2009.09.003. ISSN 08824010. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401009001387>
- [25] RODRÍGUEZ-NOGALES, Alba, Francesca ALGIERI, José GARRIDO-MESA, et al. The Administration of Escherichia coli Nissle 1917 Ameliorates Development of DSS-Induced Colitis in Mice. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2018, 9, 1-12 [cit. 2019-05-05]. DOI:

- 10.3389/fphar.2018.00468. ISSN 1663-9812. Dostupné z:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00468/full>
- [26] KOTŁOWSKI, Roman. Use of Escherichia coli Nissle 1917 producing recombinant colicins for treatment of IBD patients. *Medical Hypotheses* [online]. 2016, **93**, 8-10 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.mehy.2016.05.002. ISSN 03069877. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987716300913>
- [27] Genetics of Resistance to Colicins in Escherichia coli K-12: Cross-Resistance Among Colicins of Group A. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* [online]. U.S.A., 1975, **123**(1), 102-117 [cit. 2019-05-05]. ISSN 1098-5530. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC235696/pdf/jbacter00326-0114.pdf>
- [28] LI, Ruijuan, Linda HELBIG, Jun FU, et al. Expressing cytotoxic compounds in Escherichia coli Nissle 1917 for tumor-targeting therapy. *Research in Microbiology* [online]. 2019, **170**(2), 74-79 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.resmic.2018.11.001. ISSN 09232508. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250818301475>
- [29] ZWICKER, Christian, Priya SARATE, Mirjana DRINIĆ, et al. Prophylactic and therapeutic inhibition of allergic airway inflammation by probiotic Escherichia coli O83. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2018, **142**(6), 1987-1990.e7 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.07.029. ISSN 00916749. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674918311448>
- [30] Dr. Falk Pharma GmbH. *Příbalová informace: Salofalk 1000 mg enterosolventní granule s prodlouženým uvolňováním*. Německo, 2017. Dostupné také z:

<http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=PII17889.pdf&type=pil&as=salofalk-pil>

- [31] PFEILER, Susanne, Holger WINKELS, Malte KELM a Norbert GERDES. IL-1 family cytokines in cardiovascular disease. *Cytokine* [online]. 2017, 1-11 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.11.009. ISSN 10434666. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466617303514>
- [32] NAMKUNG, Jung-Hyun, Jong-Eun LEE, Eugene KIM, Song KIM, Sook KIM, Eun-Soon SHIN, Eun-Young CHO a Jun-Mo. YANG. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-12 (IL-12A and B) and IL-12 receptor (IL-12Rb1 and b2) genes and gene–gene interactions with atopic dermatitis in Koreans. *Journal of Dermatological Science* [online]. 2010, 57(3), 199–206 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2009.12.003. ISSN 09231811. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181109003624>
- [33] HOBL, E.-L., R.M. MADER, L. ERLACHER, et al. The influence of methotrexate on the gene expression of the pro-inflammatory cytokine IL-12A in the therapy of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* [online]. 2011, 29, 963-969 [cit. 2019-05-08]. ISSN 1593-098X. Dostupné z: <https://www.clinexprheumatol.org/article.asp?a=4832>
- [34] XU, Hui, Guang-Xian ZHANG, Bogoljub CIRIC a Abdolmohamad ROSTAMI. IDO: A double-edged sword for TH1/TH2 regulation. *Immunology Letters* [online]. 2008, 121(1), 1-6 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.imlet.2008.08.008. ISSN 01652478. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247808002113>
- [35] BILIR, Cemil a Can SARISOZEN. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): Only an enzyme or a checkpoint controller?. *Journal of Oncological*

- Sciences* [online]. 2017, 3(2), 52-56 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1016/j.jons.2017.04.001. ISSN 24523364. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452336417300201>
- [36] SCHMIDT, Susanne V. a Joachim L. SCHULTZE. New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. *Frontiers in Immunology* [online]. 2014, 5, 1-12 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00384. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00384/abstract>
- [37] GABAY, Cem. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2006, 8(Suppl 2), 1-6 [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1186/ar1917. ISSN 14786354. Dostupné z: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar1917>
- [38] HRDÝ, Jiří, Olga NOVOTNÁ, Petra PETRÁSKOVÁ, Kristýna BORÁKOVÁ, Rája LODINOVÁ-ŽÁDNÍKOVÁ a Ludmila PROKEŠOVÁ. Vliv časného postnatálního podání probiotického kmene *Escherichia coli* O83:K24:H31 na rozvoj alergických onemocnění a vybrané imunologické charakteristiky. *Alergie: časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii* [online]. 2019, 1, 17-22 [cit. 2019-05-11]. ISSN 1212-687X. Dostupné z: http://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2019/1_2019/Alergie_1_19-hrd.pdf
- [39] SÚKENÍKOVÁ, Lenka, Viktor ČERNÝ, Olga NOVOTNÁ, Petra PETRÁSKOVÁ, Kristýna BORÁKOVÁ, Libuše KOLÁŘOVÁ, Ludmila PROKEŠOVÁ a Jiří HRDÝ. Different capacity of in vitro generated myeloid dendritic cells of newborns of healthy and allergic mothers to respond to probiotic strain *E. coli* O83: K24. *Immunology Letters* [online]. 2017, 189, 82-89 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.05.013. ISSN 01652478. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247817301104>

- [40] SARATE, P. J., S. HEINL, S. POIRET, M. DRINIĆ, C. ZWICKER, I. SCHABUSSOVA, C. DANIEL a U. WIEDERMANN. E. coli Nissle 1917 is a safe mucosal delivery vector for a birch-grass pollen chimera to prevent allergic poly-sensitization. *Mucosal Immunology* [online]. 2019, **12**(1), 132-144 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1038/s41385-018-0084-6. ISSN 1933-0219. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41385-018-0084-6>
- [41] OUYANG, Wenjun a Anne O'GARRA. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* [online]. 2019, **50**(4), 871-891 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.020. ISSN 10747613. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761319301372>
- [42] SAIKI, Papawee, Yoshihiro NAKAJIMA, Leo J.L.D. VAN GRIENSVEN a Koyomi MIYAZAKI. Real-time monitoring of IL-6 and IL-10 reporter expression for anti-inflammation activity in live RAW 264.7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2018, **505**(3), 885-890 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.173. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X18321120>
- [43] ZHOU, Yonglin, Chengzhen CHEN, Juan PAN, Xuming DENG a Jianfeng WANG. Epigallocatechin gallate can attenuate human alveolar epithelial cell injury induced by alpha-haemolysin. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2018, **115**, 222-226 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.054. ISSN 08824010. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017315000>
- [44] TREBICHAUSKÝ, I. a I. ŠPLÍCHAL. Probiotics manipulate host cytokine response and induce antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica* [online]. 2006, **51**(5), 507-510 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1007/BF02931599. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02931599>

- [45] HELWIG, Ulf. Lactobacilli, bifidobacteria and E. coli nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World Journal of Gastroenterology*[online]. 2006, **12**(37), 5978–5986 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.3748/wjg.v12.i37.5978. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v12/i37/5978.htm>
- [46] BOKS, Martine A., Judith R. KAGER-GROENLAND, S. Marieke VAN HAM a Anja TEN BRINKE. IL-10/IFN γ co-expressing CD4+ T cells induced by IL-10 DC display a regulatory gene profile and downmodulate T cell responses. *Clinical Immunology* [online]. 2016, **162**, 91-99 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.clim.2015.11.011. ISSN 15216616. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661615300681>
- [47] HRDÝ, Jiří, Kateřina VLASÁKOVÁ, Viktor ČERNÝ, et al. Decreased allergy incidence in children supplemented with E. coli O83: K24. *European Journal of Immunology* [online]. 2018, **48**(12), 2015-2030 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1002/eji.201847636. ISSN 00142980. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201847636>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Vliv kmenů <i>E. coli</i> na genovou expresi cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1 po jedné hodině stimulace.....	36
Obrázek 2- Vliv kmenů <i>E. coli</i> na genovou expresi cytokinů v buněčné linii makrofágů THP1 po čtyřech hodinách stimulace.	39

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - Seznam použitých sond pro genovou expresi TaqMan®	31
Tabulka 2- Průměrné hodnoty životnosti makrofágů po jedné hodině stimulace	32
Tabulka 3- Průměrné hodnoty životnosti makrofágů po čtyřech hodinách stimulace	33