

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Obor pediatrie



Význam stanovení pupečnickového imunoglobulinu E ve vztahu k rodinné anamnéze alergie  
Kolonizace nepatogenním E.coli v léčbě a prevenci morbidit a alergie u novorozenců s vysokou  
hodnotou pupečnickového IgE

The importance of Immunoglobulin E in cord serum from the aspect of a family history of allergy  
Non-pathological E.coli colonisation as a treatment and prevention of morbidity and allergy in  
newborn children with high umbilical IgE

MUDr. Jiří Liška, CSc.

Mulačova nemocnice

Fakulta zdravotnických studií Západočeské univerzity

2016

# PODĚKOVÁNÍ

Rád bych vyjádřil poděkování všem, kteří mě podporovali v mém profesionálním vývoji v oblasti pediatrie a pediatrické imunologie.

Právě proto si dovoluji vzpomenout mého učitele z doby mé klinické práce, pana profesora MUDr. Vladimíra Zavázala, DrSc., na jehož počest se letos na podzim koná v Plzni imunologický kongres. Prvé klinické práce v pediatrii s tématem imunologie byly vždy z jeho iniciativy. Velmi si vážím jeho podpory při obhajobě kandidatury na I. LF v Praze.

Právě jeho práce o imunoglobulinu E mě směřovali na cestu v oblasti neonatologicko-pediatrické imunologie. Rád bych danou práci panu profesorovi věnoval jako vzpomínku na léta spolupráce.

Za cenné rady musím poděkovat jeho nástupci panu profesorovi MUDr. Petru Panznerovi, CSc., přednostovi oddělení klinické imunologie a alergologie v Plzni.

Za aktivní dvacetiletou spolupráci na porodních sálech při sběru materiálu bych chtěl poděkovat kolektivům porodnicko-gynekologického oddělení Mulačovy nemocnice pod vedením primářů MUDr. Z. Kestřánka a MUDr. Zdeňka Knaizla, kolektivu neonatologického oddělení a oddělení odborných ordinací, laboratoří Mulačovy nemocnice pod vedením prim. V. Holečka, CSc. a prim. MUDr. Š. Sobotové.

V neposlední řadě ředitelům Mulačovy nemocnice MUDr. P. Weishäuplovi a Ing. J. Zimmermannovi, děkance Fakulty zdravotnických studií Západočeské univerzity paní doc. PaedDr. Iloně Mauritzové, Ph.D., pracovníkům laboratoří firmy Dyntec Terezín pod vedením ředitele MVDr. Mgr. L. Pažouta, pracovníkovi statistického oddělení FN v Plzni RNDr. F. Šefrnovi a panu Ing. P. Hadrabovi za technické zpracování habilitační práce.

Své poznatky se snažím předávat studentům Fakulty zdravotnických studií v Plzni.

Zároveň bych chtěl poděkovat všem členům své rodiny za pochopení pro své pracovní nasazení.

## ABSTRAKT

V dlouhodobé studii 1998- 2015 jsme chtěli stanovit, zda hladiny imunoglobulinu E v pupečnickové krvi jsou predikací pro alergická onemocnění do 3- 4 let věku.

V průběhu uvedených let jsme vyšetřili více než 4000 vzorků pupečnickové krve z rodin s alergologickou anamnézou. Náběry i vyšetření byly prováděny celoročně. Z hlediska hodnot se ukázaly rozdíly v sezónnosti, v závislosti na době trvání pylových sezón a daném počasí.

Výsledky byly graficky dokumentovány za léta 2001- 2010. Z výsledků je dále patrné, že alergie se sdružuje s rodinnou anamnézou. Prvé příznaky alergických projevů se v posledních desetiletích posunují do prvních let života. Dominující role obou rodičů jsou statisticky významné na hladině 1 promile. Došli jsme k hodnocení, že vysoké hodnoty pupečnickového IgE jsou důvodem spolu s rodinnou anamnézou k preventivní intervenci ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu. Jsme si vědomi současného zdůrazňování převažujícího vlivu střevního mikrobiomu na imuno-alergologický stav každého organismu.

Od roku 2005 používáme proto lyofilizovaný nepatogenní kmen E.coli ve formě perorální vakcíny v době do konce prvních 6 týdnů života v rodinách se zvýšenými hodnotami IgE a pozitivní rodinnou anamnézou.

Z výsledků následných 10 let vyplývá, že u léčených pacientů s primárně zvýšenými hodnotami IgE z pupečnickové krve se tyto hodnoty v 1. a 3. roce z 90 % normalizovaly. Také nemocnost, stupeň i počty alergií u léčených pacientů v daných létech výrazně poklesly. Proto jsme vyšetřovali i hodnoty imunoglobulinů G a A v těchto skupinách. Vše jsme porovnávali s kontrolními skupinami nemocných dětí. Vliv léčby se statisticky zpracovával. V období po 1. roce byly nalezeny významné korelace pupečnickového IgE se sérovým IgE, IgG a IgA a korelace sérového IgG s IgA. Korelace v 1. i ve 3. roce věku je patrná na hladině významnosti 1 promile. Ve všech skupinách byla zjištěna zcela zanedbatelná nemocnost těchto léčených pacientů. IgE se normalizovalo ve své většině na zcela normální hodnoty v rámci předpokládaného protialergického efektu léčby. Velmi příznivý efekt terapie na nemocnost dětí oproti kontrolní skupině je opakovaně graficky znázorněn. Tato živá perorální vakcína, která je fyziologickou součástí střevní mikroflóry, probiotikem, s genovou typizací, zřejmě umožňuje přesměrování imunologické paměti alergického charakteru od Th2 fenotypu ještě dříve než je ustavena imunitní odpověď na antigeny zevního prostředí.

## ABSTRACT

In a long-term study from 1998-2015 we endeavoured to ascertain if newborn Immunoglobulin E (IgE) in cord blood was predictive for allergic disease from 3-4years of life.

We examined more than 4000 samples of cord blood in those families with a history of allergy. Samples were taken throughout the year. Significant differences were observed in seasonality, duration of pollen exposure and the weather.

The results were presented graphically from years 2001-2010. From the results it is evident that allergies were concomitant in families with a history of allergy. Allergic symptoms have seen a shift in the last decade, into the first year of life. The dominant role of both parents is significant at the level of one promile. We found that high IgE levels, together with a positive family history, are strong reasons for preventive intervention using gastrointestinal microflora. We are aware of the current emphasis regarding the effects of microbiome on the immune-allergic state of all organisms.

From 2005 we therefore use a per oral vaccine containing a lyophilised non-pathogenic E.coli strain up to the end of the sixth week of life in families with elevated IgE and a positive family history of allergy. In the following 10 years it became evident that in 90% of treated patients, the concentration of IgE decreased to normal levels. Furthermore, the morbidity, levels and numbers of allergic events in treated patients was also observed to be significantly reduced. We therefore then began evaluating Immunoglobulin G and A (IgG, IgA) in these groups, compared the values with controls, and then processed the results statistically.

During the period after the first year of life there were significant correlations between cord IgE and serum levels of IgE, IgG and IgA, and between IgG with IgA. The correlations at one and three years were significant at the level of one promile. In all treated individuals illness rates were very low. As expected, IgE levels normalised in the majority of cases. The highly beneficial effect of therapy on illness rates compared with the control group is repeatedly apparent in the graphical representation of results. This live probiotic per oral vaccine, which is a physiological part of the gastrointestinal microflora, may well redirect immunologic memory of the Th2 allergy phenotype sooner than the immunologic response to the external environment.

## OBSAH

<b>1 Imunologický vývoj u novorozence .....</b>	<b>8</b>
1.1 Cytokiny.....	9
1.2 Genetika alergie .....	9
1.3 Ontogeneze imunity plodu u novorozence.....	9
1.4 Ovlivnění vývoje imunity v prenatálním a perinatálním období .....	10
1.4.1 Ontogeneze imunitního systému.....	10
1.4.2 Mikrobiální expozice .....	11
1.4.3 Nutriční faktory.....	11
1.4.4 Environmentální faktory .....	11
1.5 Některé faktory humorální a celulární imunity u novorozenců .....	12
1.6 Imunita na sliznicích .....	12
1.7 Imunologická nezralost novorozence a kojence .....	13
1.8 Podpora přirozené obranyschopnosti kojenců modulací střevní mikroflory .....	13
1.9 Poruchy regulace imunity - alergie a autoimunitní onemocnění .....	14
1.10 Střevní mikroflora .....	14
1.11 Střevní imunitní systém a komensální bakterie .....	15
1.12 Alergické stavy a mechanismy jejich vzniku.....	15
1.13 Převaha Th2 imunitní odpovědi.....	16
1.14 Koncentrace eosinofilního kationického proteinu v séru donošených novorozenců	16
1.15 Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii.....	17
1.16 Mezinárodní publikace věnované problematice pupečnickového IgE .....	17
<b>2 Střevní mikrobiom .....</b>	<b>19</b>
2.1 Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita .....	20
2.1.1 Klinické aplikace probiotik.....	20
2.2 Probiotika, prebiotika a atopie .....	22
2.2.1 Gastrointestinální ekosystém .....	22
2.2.2 Hygienická hypotéza.....	22
2.2.3 Střevní MF a atopie.....	23
2.2.4 Probiotika, prebiotika a atopické choroby .....	24
2.2.5 Terapie .....	24
2.2.6 Primární prevence .....	25
2.3 Slizniční imunita u dětí, možnosti imunomodulace.....	25
2.3.1 Střevní bakteriální mikroflóra.....	25
2.3.2 Probiotika a prebiotika .....	26
2.4 Využití složek střevní mikroflóry .....	27
2.5 Využití probiotik.....	28

2.5.1 Využití probiotik v klinické praxi .....	28
2.6 Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů .....	29
2.7 Mikroflora střevní v raném dětství .....	31
2.8 Přípomínky k hladinám imunoglobulinů v dětské populaci .....	32
2.9 Imunoglobulin IgE .....	32
<b>3 Probiotika .....</b>	<b>33</b>
3.1 Prvé realizované experimentální studie s perorálním osídlením .....	34
3.2 Racionální užití probiotik v pediatrii .....	34
3.3 Potravinová alergie .....	35
3.4 Diagnostický algoritmus potravinové alergie v dětském věku .....	36
3.4.1 Klinické příznaky potravinové alergie .....	36
3.5 Potravinová alergie v dětském věku .....	36
3.6 Probiotika a slizniční IgA .....	37
3.7 Environmentálně rizikové faktory vývoje atopie u dětí .....	37
3.8 Role časně výživy pro ustanovení vyvážené slizniční imunity zažívacího traktu .....	38
3.9 Možné příčiny nárůstu alergie .....	38
3.10 Probiotika a prebiotika .....	39
3.10.1 Charakteristiky probiotik .....	39
3.10.2 Mikrobiologické bezpečnostní požadavky .....	40
3.10.3 Průmyslové parametry .....	40
3.10.4 Mechanismus působení .....	40
3.11 Využití probiotik v pediatrii .....	40
3.12 Využití probiotik v pediatrii v návaznosti na vliv na střevní mikroflóru .....	41
3.13 Výživa a alergie .....	42
3.14 Léčebné účinky probiotika Colinfant u extrémně nezralých .....	42
3.15 Spektrum užití probiotik v pediatrii .....	42
3.16 Přehled doplňkové imunomodulace v pediatrii .....	44
3.17 Mutaflor E.Coli – varianta pro dospělé .....	45
3.18 Imunomodulace – historie .....	45
3.19 Probiotika v primární prevenci .....	46
3.20 Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi .....	46
3.20.1 Mechanismus působení bakteriálních imunomodulátorů .....	46
<b>4 Významné publikace o IgE a o probiotikách .....</b>	<b>48</b>
<b>5 Význam stanovení pupečnickového imunoglobulinu E ve vztahu k rodinné anamnéze alergie .....</b>	<b>51</b>
5.1 Metodika stanovení .....	52
5.2 Soubor a výsledky .....	52

5.3 Diskuze.....	53
5.4 Imunoglobulin E .....	54
<b>6 Kolonizace nepatogenním E.coli v léčbě a prevenci morbidity a alergie u novorozenců s vysokou hodnotou pupečnickového IgE .....</b>	<b>55</b>
6.1 Soubor a výsledky.....	57
6.2 IgE.....	57
6.3 Vlastní terapie .....	59
6.4 Nemocnost .....	60
6.5 Imunoglobulin IgE.....	60
6.6 Imunoglobulin G.....	60
6.7 Imunoglobulin A .....	60
<b>7 Závěry .....</b>	<b>61</b>
7.1 1. část studie (1998-2010) - diagnostická .....	61
7.2 2. část studie (2005-2015) - převážně terapeutická.....	61
<b>8 Použitá literatura.....</b>	<b>65</b>
<b>9 Publikované práce k habilitačnímu tématu .....</b>	<b>73</b>
<b>10 Přílohy.....</b>	<b>74 - 134</b>

# 1 Imunologický vývoj u novorozence

- ontogeneze imunity plodu u novorozence včetně genetiky
- vývoj imunity v prenatálním a perinatálním období
- pupečnicková krev, cytokiny
- některé faktory humorální a celulární imunity novorozenců
- faktory imunologické nezralosti
- podpora přirozené imunity novorozenců a kojenců modulací střevní mikroflóry
- poruchy regulace imunity a střevní morfologie a mikroflóra
- střevní imunitní systém a komensální bakterie
- úloha imunoglobulinu E, alergenů a eosinofilního kationického proteinu



## 1.1 Cytokiny <sup>[1]</sup>

Jako vhodný znak prognostický, ukazující na zvýšené riziko vzniku alergie se jeví exprese cytokinů v buňkách pupečnickové krve.

Sledovali zastoupení cytokinů hrajících důležitou roli při vzniku a rozvoji alergických onemocnění, zodpovědných za Th versus Th2 polarizaci imunitní odpovědi, ovlivňujících tvorbu IgE a vyzrávání střevního epitelu.

U dětí alergických matek byla exprese cytokinů IL4, IL8, INF-Gama a TGF nižší a IL10 vyšší ve srovnání s dětmi zdravých matek. Snížená exprese INF-Gama u dětí alergických matek ukazuje na méně výrazný Th1 typ buněčné odpovědi a tím snazší rozvoj Th2 buněčné odpovědi podporující rozvoj alergie. Rovněž zvýšená exprese IL-10 v buňkách pupečnickové krve dětí alergických matek ukazuje na převahu Th2. Snížená exprese cytokinů TGF -Beta u dětí alergických matek může přispívat k pomalejšímu vyzrávání střevního epitelu novorozenců a tím usnadňovat průchod alergenů. TGF -beta je klíčovým cytokinem izotopového přesmyku protilátek na třídu IgA ,která plní ochrannou funkci na slizničním povrchu střeva. Metodou ELISA bylo naměřeno vyšší zastoupení cytokinů EGF u dětí zdravých matek. Již na úrovni buněk pupečnickové krve je zřejmý alergický fenotyp, který upozorňuje na zvýšenou možnost pozdějšího vzniku alergie. TGF-B byl jediným cytokinem se statisticky významným rozdílem v množství v plodové vodě dětí zdravých a alergických matek.

Kolostrum: Vyšší množství interleukinů (IL 5 a IL 10) v kolostru alergických matek a také v pupečnickovém séru jejich dětí naznačuje převažující Th2 naladění imunitního systému ve skupině matek i dětí ještě bez klinických příznaků.

## 1.2 Genetika alergie <sup>[2]</sup>

Genetická výbava jedince výrazně ovlivňuje vznik a průběh alergických reakcí. Ve studiu vlivu genů na vznik a rozvoj alergického onemocnění hraje systém HLA prioritní úlohu. Z hlediska alergie hraje důležitou roli chromosom 5, kde je celá oblast obsahující geny pro řadu cytokinů. Hledaly se souvislosti mezi hladinou IgE a genetickou výbavou. V těchto studiích se ukázalo, že hladina IgE není konstantní, ale liší se nejenom podle věku a pohlaví, ale i v jednotlivých rodinách. Hladina IgE není pod kontrolou jen jednoho genu. IgE mediovaná imunitní odpověď závisí na receptoru, na který se IgE váže. Existuje vysoce afinní receptor a nízko afinní receptor. Prvý je exprimován na basofílech a žírných buňkách, vazba s monomerním je vysoce afinní. Oproti tomu IgE s menší afinitou se vyskytuje na jiných buňkách, tj. lymfocyty, makrofágy, destičky, eosinofily a váže IgE s daleko menší afinitou.

## 1.3 Ontogeneze imunity plodu u novorozence <sup>[3]</sup>

I když se hlavní zásoby imunoglobulinů dostávají do plodu z cirkulace matky (IgG), není sporu o tom, že plod aktivně syntetizuje nejen IgG, ale i s imunoglobuliny dalších tříd. Byla prokázána aktivní syntéza IgM ve fetální slezině v 10. týdnu gestace. Produkce IgG byla zjištěna v 11. týdnu v játrech a ve střevě, IgE v plicích v 11. týdnu a IgA ve střevě ve 13. týdnu gestace. Dojde-li k intenzivní antigenní stimulaci plodu např. intrauterinní infekcí, tato basální syntéza imunoglobulinů (IgM,IgA) se několikanásobně zvýší a v lymfatických tkáních se objeví plazmatické buňky secernující protilátky. B lymfocyty s povrchovými membránovými imunoglobuliny (receptory) se objeví v 8. týdnu gestace v játrech a ve 14. týdnu je jejich počet stejný jako u dospělých jedinců. Významným obranným mechanismem ve fetálním a časném postnatálním období je pasivní přenos

IgG placentou z mateřského séra. Tím se plodu dostávají protilátky třídy IgG, především proti bakteriálním toxinům.

Ve 26. gestačním týdnu obsahuje sérum plodu stejnou hladinu jako sérum matky. V období porodu může být dokonce vyšší o 10 %. Přenos se děje výlučně placentou. Ze všech imunoglobulinových tříd je transplacentárně přenášeno pouze IgG. Předpokládá se, že jde o aktivní transport molekul IgG.

Úlohu zde hrají specifické buněčné receptory pro Fc fragment IgG molekuly. Z hlediska buněčné imunity se T lymfocyty objevují poprvé v 15. týdnu gestace, jejich relativní počet nedosáhne hodnot krve dospělých ani koncem gestace.

## 1.4 Ovlivnění vývoje imunity v prenatálním a perinatálním období <sup>[4]</sup>

Vývoj imunity, zejména přirozené, je u dítěte formován na základě endogenních faktorů, zahrnujících především genetickou dispozici.

Je známo, že alterace vyvíjejícího se imunitního systému mohou vést v pozdějším věku ke vzniku imunopatologických či alergických chorob, chronických zánětlivých procesů (metabolicky syndrom) či kardiovaskulárních chorob a diabetu I. typu.

### 1.4.1 Ontogeneze imunitního systému

Imunitní systém dítěte prochází v průběhu embryonálního vývoje a po narození velmi dynamickým vývojem. Začátek vývoje imunitních buněk je v časném embryonálním období spojen s tvorbou krvinek, která začíná ve žloutkovém váčku (extraembryonální fáze). V 18. dni gestace se objevuje krvinek v paraaortální splanchopleurální oblasti embrya a po 6.–8. týdnu gestace se hematopoéza přesouvá do jater a přetrvává zde během celého nitroděložního vývoje. V daných lokalitách dochází k tvorbě pluripotentních hematopoetických kmenových buněk, které osidlují kostní dřev okolo 5. týdne gestace, od 20. týdne je kostní dřev hlavním místem krvinek. Fetální slezina se tranzitorně účastní na hematopoézi ve 3.–5. měsíci gestace [Holt 2000]. Mezi první imunitní buňky patří B-lymfocyty, které nacházíme ve fetálních játrech okolo 9. týdne gestace. Během vývoje B-lymfocytů dochází především ke změnám genomu, kódujícího protilátky.

Vývoj zralých B-lymfocytů je dokončen v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, lymfatické uzliny aj.). Vlivem antigenní stimulace se z části B-lymfocytů vyvíjejí plazmatické buňky, schopné od 12. týdne gestace syntézy IgM, která je vystupňována při intrauterinní infekci plodu. Po 20. týdnu gestace se část aktivovaných B-lymfocytů mění v paměťové buňky [Holt 2000]. Tvorba IgA není přítomna do 30. týdne gestace.

Novorozenecká syntéza IgM je významná a prodloužená.

Hladiny imunoglobulinu IgG jsou u plodu jako jediné z pěti tříd imunoglobulinů zajišťovány transplacentárním transportem v podstatném množství. Specifický transport IgG je prováděn pomocí neonatálního receptoru (FcRn).

Hladina celkového IgG u novorozenců je dependentní na délce gestace. Transfer IgG od matky k fetu začíná již ve 13. týdnu gestace, ve 28.–32. týdnu gestace dosahují fetální hladiny IgG 50 % mateřských hladin. Většina IgG je do fetální cirkulace přenesena během posledních čtyř týdnů gravidity, takže v době termínu porodu mohou hladiny IgG plodu převyšovat o 20–30 % mateřské hodnoty.

Subpopulace T-lymfocytů CD4 a CD 8 jsou identifikovatelné od 14. týdne gestace. Počet T-lymfocytů narůstá ještě v období do 6 měsíců po porodu. I když jsou fetální T-lymfocyty schopny odpovědi *in vitro* na mitogeny (fytohemaglutinin) již v 10.–12. týdnu gestace, jejich imunitní funkce vyvrává až po narození dítěte [Mebius 2003].

Buňky NK jsou detekovány u fétu v 6. týdnu gestace a v době porodu mají 10–15% podíl na počtu všech lymfocytů v pupečnickové krvi. Mají značně sníženou cytolytickou aktivitu [Uksila 1983].

Vývoj monocyto-makrofágového systému začíná v 3.–4. týdnu gestace ve žlutkovém vaku a pokračuje ve fetálních játrech.

Zralé formy neutrofilů jsou detekovatelné v 12.–14. týdnu gestace.

Dendritické buňky (DC), které reprezentují spojení mezi přirozenou a specifickou imunitou, se objevují okolo 6. týdne gestace.

Při zpracování apoptotických či nekrotických buněk fetálními DC dochází k navození tolerance a jen k minimálnímu zvýšení prozánětlivých cytokinů (např. TNF  $\alpha$ , IL-12), kostimulačních molekul a aktivačních markerů. Tyto odlišnosti jsou zodpovědné za menší odolnost plodu a posléze i novorozence proti infekcím [Levy 2007].

#### **1.4.2 Mikrobiální expozice**

Během intrauterinního vývoje dochází k těsné interakci mezi fětem a matkou, na placentárním rozhraní je upřednostňována Th2 buněčná odpověď. Th2 typ reaktivity je charakteristický pro novorozence i v postnatálním období. Modulace imunitního systému mikrobiální zátěží začíná již prenatálně a má za následek stimulaci Th1 orientované imunitní odpovědi, zvýšení regulačních T-lymfocytů v pupečnickové krvi a změny ve vrozené imunitě v pozdějším věku.

Mikrobiální stimulace v časném životě má dle hygienické hypotézy za následek urychlení maturace imunitního systému a indukci regulačních mechanismů, které mají protektivní charakter před zánětlivými procesy v pozdějším životě [Okada 2010].

Imunomodulační efekt na vyvíjející se imunitní systém plodu má i parazitární infekce matky

#### **1.4.3 Nutriční faktory**

Nedostatečná výživa plodu může být spojena se snížením NK a fagocytujících buněk. Dostatečný příjem vitamínu D matkou má za následek indukci tvorby antigen prezentujících buněk a T-regulačních lymfocytů u plodu.

#### **1.4.4 Environmentální faktory**

Na plod i novorozence působí imunomodulačně také faktory vnějšího prostředí.

Expozice plodu nikotinu byla spojena s elevací IgE hladiny v pupečnickové krvi, zvýšením produkce IL-4 a IL-13 a snížením hladiny interferonu gama. Postnatální expozice nikotinu je u dětí spojena se snížením hladin IgG a IgM a snížením proliferačních schopností T-lymfocytů a aktivity NK buněk. Vliv maternálního stresu se prenatálně u plodu projevuje ovlivněním hypotalamicko-hypofyzární-adrenální osy a následným zvýšením Th2 buněčné predominance a zvýšením produkce IgE [Marques 2013]. Podobné dopady na fetální imunitní systém má i expozice matek některým inhalačním alergenům (roztoči) v těhotenství, rovněž zvyšující hladinu IgE v pupečnickové krvi [Peters 2012].

Hlavní komponentou imunitního slizničního systému je slizniční lymfatický systém (MALT – mucous associated lymphoid tissue), v neonatálním období hraje důležitou roli GALT (gut associated lymphoid tissue). Po porodu dochází k rychlé kolonizaci neonatálního GI traktu, primárně je novorozenec exponován bakteriálním kmenům přítomným v rektovaginální floře matky. Kolonizace je dále závislá na gestačním stáří novorozence, způsobu porodu a jeho výživě. U kojených dětí je primární kolonizace mateřskou fekální mikroflórou nahrazena bakteriální mikroflórou, tvořenou z 90 % bifidobakteriemi a laktobacily, které mechanismem kompetitivní inhibice zabraňují adhezi patogenních mikroorganismů ve střevě. Současně produkcí látek fyziologickou střevní mikroflórou, ke kterým patří např. mastné kyseliny s krátkým řetězcem, dekonjugované žlučové kyseliny,

bakteriociny, defenziny aj. se zvyšuje baktericidní schopnost střeva [Sjogren 2009]. Mikroflora rovněž přispívá k přesmyku od postnatálně dominujícího Th2 typu imunitní odpovědi na Th1 typ. Opožděná kolonizace komenzálními kmeny je přítomna u dětí porozených císařským řezem, u nedonošených dětí či u novorozenců s přítomností perinatální infekce, vyžadující terapii antibiotiky. V případě absence adekvátní střevní kolonizace může perzistovat predominance Th2 imunitní odpovědi, spojovaná se zvýšenou prevalencí autoimunitních či alergických chorob.

K důležitým složkám MM patří imunokompetentní buňky, z nichž největší část tvoří makrofágy (cca 60 %), dále neutrofilní leukocyty (30–40 %) a lymfocyty (5–10 %). Produkty mléčného kvašení laktózy MM jsou zdrojem kyselého prostředí ve střevě novorozence a stimulují tak osídlení GIT optimální mikrobiální florou.

## 1.5 Některé faktory humorální a celulární imunity u novorozenců [5]

Zjištěno, že opsonizační aktivita novorozeneckých sér je snížena vůči pyogenu stafylokoků a gram negativním mikrobům, jež jsou častou příčinou těžkých novorozeneckých infekcí. V posledních desetiletích dominuje streptokok skupiny B. Nízké hodnoty IgM a snížená aktivita komplementového systému, jež představují nejdůležitější složky opsonizačního děje, tento fakt zčásti vysvětluje. Nalezeny nižší hodnoty v aktivitě celkového komplementu u dětí donošených a významné rozdíly v aktivitě komplementu u dětí nižšího gestačního věku. Vysoké hodnoty nukleolárního testu ve skupině novorozenců nízké porodní hmotnosti 20 x více oproti dospělým a u zdravých donošených novorozenců 10 x více oproti dospělým jsou výrazem celulární imunity a známkami lymfocytární aktivity, vlastně nálezem stimulovaných lymfocytů.

## 1.6 Imunita na sliznicích [6]

Jedním z fyziologicky velice důležitých oddílů imunitního systému jsou tkáně kryté epitelii. Jsou to především slizniční povrchy trávicího, dýchacího a urogenitálního traktu. Zde je kontakt organismu na uvedených sliznicích tj. 300 m<sup>2</sup>. Nejmohtnější součástí imunitního systému je lymfoidní tkáň trávicího traktu. Denní produkce IgA ve střevě je 2-5 g. Volné intraepitelové lymfocyty se dosud neobjasněným mechanismem účastní vzniku tzv. orální tolerance, tj. útlumu systémové odpovědi na neinfekční antigen podaný především perorálně. Tímto fyziologickým mechanismem omezuje organismus imunní breaktivitu proti těm složkám potravy, které nejsou v zažívacím traktu enzymaticky rozštěpeny na malé neimunogenní fragmenty. Při její poruše mohou vzniknout patologické procesy např. potravinové alergie.

Sekreční imunoglobuliny: u lidí nejčastěji dimer A monomerní IgA kostní dřeň

polymerní IgA plasmatické buňky

IgA a IgM jsou přenášeny přes epitelové buňky sliznic.

Sekreční IgA blokuje adhezi bakterií na slizniční povrch a brání průniku antigenů do vnitřního prostředí. IgA má též schopnost reagovat s některými baktericidními látkami a přivést je na povrch bakterií. IgA má schopnost neutralizovat viry přítomné v epitelových buňkách a eliminovat v podobě imunitních komplexů nežádoucí antigeny přítomné pod epitelovou vrstvou. IgA má dvě podtřídy, IgA 1 v cirkulaci, v tlustém střevě převaha buněk produkujících IgA2.

Využití sliznic pro indukci imunity proti infekcím (vakcinace) a pro indukci tolerance (léčba autoimunitních chorob).

## 1.7 Imunologická nezralost novorozence a kojence <sup>[7]</sup>

Imunitní systém novorozenců a malých kojenců se funkčně liší od větších dětí ve všech složkách. U novorozence a kojence je absolutní počet lymfocytů srovnatelný se starším dítětem, avšak je výraznější zastoupení CD4+ T lymfocytů na úkor cytotoxických T buněk. Současně je snižena tvorba některých cytokinů, zejména IFN $\gamma$  a IL4, která negativně ovlivňuje imunitní odpověď zvláště proti intracelulárním patogenům. Nižší je také aktivita NK buněk. Funkční schopnosti komplementového systému představují asi 50 % starších dětí. To spolu s omezenou fagocytární aktivitou vede ke zvýšené vnímavosti k bakteriálním infekcím.

Plod je schopný vytvářet protilátky od 20. gestačního týdne. Nedojde-li k intrauterinní antigenní stimulaci, má novorozenec pouze imunoglobuliny, které v průběhu posledního trimestru gestace přenesly transplacentárně od matky. Posléze dochází k rozvoji fyziologické hypogamaglobulinémie, když produkce vlastních imunoglobulinů nestačí kompenzovat úbytek mateřských protilátek.

## 1.8 Podpora přirozené obranyschopnosti kojenců modulací střevní mikroflory <sup>[8]</sup>

Střevní mikroflora je tvořena u dospělých  $10^{14}$  mikroby a je tvořena 500 druhy. Vykazuje velkou metabolickou aktivitu shodnou s aktivitou jater. Střevní mikroflora hraje zásadní roli při zachování našeho zdraví.

Hlavním přínosem vyvážené střevní mikroflory je zajištění rezistence vůči kolonizaci. U kojenců ještě není vytvořena stabilní mikroflora, není ještě plně vyvinuta schopnost rezistence této mikroflory vůči kolonizaci [Favier 2002]. Normální mikroflora zajišťuje důležitou stimulaci vývoje imunitního systému. Nedostatečná expozice mikrobiálním antigenům se považuje za faktor, který přispívá k rozvoji alergie [Yazdanbakhsh 2002]. Faktory jako v nějakém směru odlišné složení střevní mikroflory, nízké hladiny bifidobakterií a vysoké hladiny clostridií představují indikátor pozdějšího vývoje alergie [Kalliomäki 2001 J.Allergy]. U malých dětí trpících alergiemi jsou rovněž ve střevech přítomny odlišné druhy bifidobakterií v porovnání se zdravými kontrolními skupinami v odpovídajícím věku [Ouweland 2001]. Při narození je v těle přítomno malé množství B buněk, které produkují IgA. Jejich počet postupně stoupá, až přibližně ve věku jednoho roku dosáhne hladiny odpovídající dospělým jedincům [Helgeland 2000]. Tato skutečnost jasně ilustruje význam mikroflory při vývoji imunitního systému. Střevní mikroflora hraje svou roli i ve výživě. Napomáhá trávení a získávání energie z potravinových složek, které se nestráví v důsledku produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, jež mají významný trofický účinek na střevní epitel [Pruzzo 2009].

Složení mikroflory typické pro dospělé jedince se dosahuje ve věku 1-2 let [Benno 1986]. Na kolonizaci a vývoj střevní mikroflory má u dítěte vliv řada faktorů. Jedná se o způsob porodu, medikace a způsob krmení. U dětí, které se narodily císařským řezem, byla pozorována kolonizace menším počtem bifidobakterií a druhem *Bacteroides*. Rozdíl ve složení střevní mikroflory lze pozorovat ještě po 6 měsících života [Grönlund 1999]. Medikace, zejména pomocí antimikrobiálních látek má významný rušivý vliv na složení, aktivitu a vývoj střevní mikroflory.

Pro kojence krmené pomocí přípravků je charakteristická spíše nízká kolonizace bifidobakteriemi. Rozdíl se ale snižují [Orrhage 1999]. Vysvětlení je ve zlepšení složení kojeneckých přípravků, které se více blíží složení mateřského mléka. Děti krmené mateřským mlékem a děti krmené pomocí přípravků vykazují rovněž kolonizaci odlišnými typy bifidobakterií [Benno 1986]. Probiotika a prebiotika představují možnost zlepšení jejího složení. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které po požití v určitém množství vykazují prospěšné účinky na zdraví přesahující účinky základní výživy.

Terapie probiotiky představuje možnost zavést speciálně vybrané mikroby do gastrointestinálního traktu.

Nevýhodou tohoto přístupu je skutečnost, že mikroby musí zůstat životaschopné během jejich produkce a skladování a také během průchodu gastrointestinálním traktem. I když se řada prospěšných účinků na zdraví přičítá vybraným kmenům probiotik [Grubb 1989], jsou pouze některé z těchto účinků podložené.

Prebiotika jsou definována jako nestravitelné potravinové složky, které vykazují prospěšný účinek na zdraví hostitele prostřednictvím stimulace růstu nebo aktivity omezeného počtu prospěšných bakterií v tlustém střevě [Gibson 1995]. Nejčastěji používanými prebiotiky jsou fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy. Dostávají se do tlustého střeva, kde mohou sloužit jako zdroj energie pro mikroby zde přítomné.

## **1.9 Poruchy regulace imunity - alergie a autoimunitní onemocnění <sup>[9]</sup>**

Na vzniku a rozvoji alergických a autoimunitních onemocnění se jasně podílí genetická dispozice. Genetická komponenta obou imunopatologií je velmi komplexní. Nejvíce studovaným regionem genomu ve spojitosti s alergickým onemocněním je úsek na chromosomu 5, kde jsou kódovány mnohé mediátory Th2 imunitní reakce: IL 4, IL5, IL9, IL13. Mnohé studie potvrdily asociaci SNP těchto genů s rozvojem astmatu a atopickou dermatitidou i stupněm závažnosti atopické dermatitidy. V imunopatogenezi alergických a autoimunitních onemocnění jsou za hlavní efektorové buňky považovány hlavně suppopulace jednotlivých typů T lymfocytů. Alergen specifické TH2 lymfocyty byly identifikovány v periferní krvi u alergických pacientů [Romagnini 1991]. Th1, Th2 nerovnováha patří mezi nejdůležitější imunoregulační mechanismy a je podkladem hygienické hypotézy. Role B lymfocytů v patogenezi alergických onemocnění je dána především produkcí IgE [Burrows 1989, Platts-Mills 2002].

Pro aktivaci specifické imunitní odpovědi jsou ale nezbytné buňky imunitní odpovědi, hlavně dendritické buňky.

Dendritické buňky se nacházejí na sliznici dýchacích cest, GIT i v kůži. Jsou jedinečnou populací antigen prezentujících buněk. Hlavní funkcí DC je schopnost aktivovat adaptivní imunitní odpověď a spouštět různou reakci na různé patogeny. Na druhé straně hrají důležitou roli v indukci antigen specifické tolerance.

Studie u dětí s těžkou formou AD potvrdila asociaci genů pro cytokiny s rozvojem AD a zároveň vliv genů na vývoj alergického pochodu v průběhu dětství. Prokázána korelace hladiny volných lehkých řetězců u dětí s aktivitou atopické dermatitidy. Jedním z nových možných terapeutických postupů se jeví vhodným podání monoklonální protilátky proti B lymfocytům-anti bCD 20 Rituximab.

## **1.10 Střevní mikroflora <sup>[10]</sup>**

Bakterie užívají různé mechanismy, kterými se navazují na buněčné povrchy.

Adherence zahrnuje interakci mezi strukturami na povrchu bakterie (adheziny) a receptory na eukaryotické buňce. Jako receptory slouží většinou membránové glykoproteiny nebo glykolipidy. Adheziny mohou tvořit souvislou vrstvu na povrchu bakterie nebo morfologicky zřetelné výběžky v podobě fimbrií. Specifická adherence znamená, že např. gram neg. tyčky mají afinitu k enterocytům tlustého střeva. Tvorba receptorů je kódována geneticky, takže defekt specifických receptorů vysvětluje rezistenci některých jedinců proti kolonizaci určitým bakteriálním druhem. Receptory některých enterocytů mohou být přítomny jen v některých věkových obdobích. Při kolonizaci gastrointestinálního traktu bakterie nejprve musí adherovat na receptory mikrovilózní

membrány. Obsazení fyziologických receptorů usnadňuje průnik bakterie do organismu hostitele. Jakmile dojde k adhezenci, bakterie mohou dále proliferovat. Interakce mezi bakterií a epiteliálními buňkami bývá nazývána „bacterial-epithelial cross talk“, což znamená, že kolonizující bakterie komunikují s buňkou hostitele (enterocytem) a využívají její nitrobuněčný aparát k usnadnění translokace. Základní výzkum v této oblasti se zaměřuje především na patologické mikroorganismy. Ale je i jasné, že i fyziologická střevní flora je v interakci s enterocyty a může zvyšovat obranu střeva hostitele proti bakteriím, které vyvolávají klinická onemocnění.

Probiotika mohou chránit hostitele od patologické kolonizace mnoha mechanismy. Např. probiotické bakterie mohou preferovat receptory, které jsou společně i pro patogeny (bifidobakterie nebo coli). Jistá nezralost interakce bakterie-enterocyt může přispívat k působení patogenů u dětí v těchto věkových skupinách. Protože antiadhezivní terapie není spojena s žádným zásadním zásahem do metabolismu buněk, nebezpečí vzniku rezistence na tuto terapii je nepravděpodobné. To je v ostrém protikladu se současným rozvojem rezistence

bakterií na antibiotika a velkým příslibem do budoucna! Experimentální modely z minulosti na zvířatech umožnily studovat reakce organismu na jeho „řízené“ osídlování definovanými mikroby. Významným světovým pracovištěm je od konce padesátých let 20. století Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR.

## 1.11 Střevní imunitní systém a komensální bakterie <sup>[11]</sup>

Kontakt s vnějším prostředím se odehrává především na epitelových površích sliznic vybavených vyvinutým systémem přirozené imunity a specializovaným systémem adaptivní imunity. Slizniční imunitní systém zabraňuje pronikání infekčních a imunogenních složek ze sliznic do cirkulace (barierová funkce), zajišťuje obranu proti patogenním mikroorganismům (antiinfekční úloha), orální nebo slizniční tolerance a přispívá k udržení homeostazy (barierová funkce). Střevní sliznice 200m<sup>2</sup> má charakteristický rys, obměňuje se 1x za 3-4 dny. Na sliznicích se vyskytují základní buňky přirozené imunity, t-neutrofilů a makrofágy, dále NK, dendritické, žírné a další buňky. K nim se přiřazují i epitelové buňky, které chrání hostitele v prvních minutách po vystavení podnětu. Epitelové buňky jsou zapojené do cytokinové sítě. Hlavním úkolem buněk přirozené imunity je rozpoznat, pohlcovat, zpracovávat a předkládat antigeny buňkám adaptivní imunity, tzn. lymfocytům.

Lymfatická tkáň zažívacího traktu s denní produkcí IgA ve střevě 2-5 g. Lymfatická tkáň střeva je tvořena převážně Peyerskými pláty, jednak lymfocyty. Jeden z hlavních obranných faktorů na sliznicích je IgA, který má dvě podtřídy (1,2). V sekretech je polymerní forma IgA, zatímco v cirkulaci je IgA monomerní. Sekreční IgA má funkci blokovat adhezenci bakterií na slizniční povrch. Antigeny jsou u zdravých jedinců tolerovány (orální tolerance), nevyvolávají výraznou systémovou odpověď.

Významná je funkce dendritických buněk, mechanismus orální tolerance je pak realizován lymfokiny.

Efekty podávání probiotik: Jeden z výkladů chronické hypotézy spočívá v nálezech nízké diverzity střevní mikroflory v postnatálních období u dětí v hygienicky vyspělých oblastech. Tláskalová popisuje výrazné efekty mikroflory na vývoj imunity v postnatálním období u zvířat. Efekty podávání prebiotik i probiotik se u nás stále zkoumají.

## 1.12 Alergické stavy a mechanismy jejich vzniku <sup>[12]</sup>

Choroby z přecitlivělosti nejsou zdaleka homogenním celkem. Nejsou jen projevy patologické, ale i projevy obranné. Předchází je různě dlouhá fáze sensibilizace a změny v imunitních reakcích. Často

již za těhotenství se připravuje půda pro budoucí alergii. Jestliže těhotná kouří, konzumuje vysoce alergenní potraviny, žije v silně alergizujícím prostředí či sama či její rodina je alergická, pak se vytváří pro alergii předurčený jedinec. Pak se rodí s hyperprodukcí IgE v pupečnickové krvi. Nedostatek IgA na povrchu sliznic, určité fenotypy HLA zapříčiňující přestřelující reakce jsou příklady příčin proč jinak obecně mobilizující imunita mediovaná IgE začne svůj organismus poškozovat. Podle situace se může u některých jedinců vyvinout obraz určité alergie, zatímco u jiných navzdory vytvoření specifických protilátek izotypu IgE a třeba i pozitivita v kožních testech k onemocnění nedochází. Podle zkušeností Zavázala se manifestuje pouze polovina latentních alergií během 3 let.

U zbývajících zřejmě nedojde za tuto dobu ke zboření jakési přirozené rezistence. Děti s podnormálními hladinami IgE měly vyšší nemocnost běžnými infekcemi než děti s průměrnou hladinou IgE. Stále je otázka, zda existuje rozdíl mezi imunitním a alergizujícím IgE. Přes neexistenci podtříd IgE bývá stále častěji prokazována jeho značná funkční heterogenost. Hovořilo se o formě atopického IgE majícího schopnost vázat histamin. Přínosem pro diagnostiku alergií může být možnost sledování faktoru nekrotizujícího nádory TNF alfa a příbuzného aktivačního faktoru T lymfocytů. Klasická antihistaminika působí až na samém konci procesu. Potřebujeme preparáty ovlivňující samotný začátek alergické odpovědi. Sem řadil cromoglykát, ketotifen, cyclosporin A, které blokádu aktivace genů snižují sekreci mediátorů a inhibují chemotaxi eosinofilů v časně i pozdní fázi alergie.

### **1.13 Převaha Th2 imunitní odpovědi [13]**

Převaha Th2 imunitní odpovědi se ustavuje již koncem gestačního období. S tím souhlasí i průkaz snížené tvorby IFN gama mononukleárními buňkami periferní krve novorozenců, u nichž se později rozvíjí atopie. Iniciátor, inhalovaný alergen, při asthmatu aktivuje žírné buňky a makrofágy, které začnou tvořit a uvolňovat prozánětlivé mediátory – leukotrieny, cytokiny a chemotaktické faktory. Antigen zpracováváný makrofágy je předkládán pomocným Th lymfocytům, u nichž vyvolá tvorbu IL4 a IL5, které pak navedou B lymfocyty k tvorbě IgE a způsobí eosinofilii. Makrofágy tvořené cytokiny, IL1, TNF alfa a TNF gama aktivují endotelové buňky a vyvolají v nich zvýšenou tvorbu adhesivních molekul. Zvýšená přilnavost k endotelu umožní vycestování leukocytů z oběhu do sliznice dýchacích cest. Nervová zakončení jsou vystavena mediátorům zánětu, důsledkem je cholinergní bronchokonstrikce a hyperreaktivita hladkých svalů bronchů. Eosinofily jsou významný faktor v etiopatogenezi asthmatu.

### **1.14 Koncentrace eosinofilního kationického proteinu v séru**

#### **donošených novorozenců [14]**

Zvýšené koncentrace eosinofilního kationického proteinu (ECP) v séru nebo v tracheálních aspirátech se u novorozenců dávají do vztahu k následnému vývoji bronchopulmonální dysplázie. Bylo provedeno vyšetření koncentrace ECP v séru z pupečnickové a kapilární krve zdravých donošených novorozenců. Koncentrace ECP u zdravých donošených novorozenců jsou oproti hodnotám u dospělých vysoké a rovnají se nálezům popisovaným např. v souvislosti se závažnými alergickými záněty. Koncentrace ECP v pupečnicku může odrážet stres matky nebo plodu před a po porodu, může být odezvou na komplex exogenních stimulů z prvních hodin života novorozence po porodu.



## 1.15 Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii <sup>[15]</sup>

Slizniční mikrobiota (mikroflora) spolu s antigeny zevního prostředí jsou hlavními podněty přispívajícími k vývoji a stimulaci celého imunitního systému. Ústřední roli hrají T regulační buňky, které svými produkty ovlivní protilátkovou odpověď různých izotypů a expresí receptorů s následnou aktivací buněk, které se účastní alergických reakcí. Lze najít takovou mikrobiální komponentu, jejíž aplikace přinese nové přístupy. Naprostá většina podnětů, které stimulují v každodenním životě náš imunitní systém, pochází z antigenů vnějšího prostředí. Velké plochy sliznic (300 m<sup>2</sup>) jsou vystaveny různorodému spektru antigenů, mikrobiálních patogenů, antigenů potravy a vzduchu, včetně alergenů. Naprostá většina mikroorganismů vstupuje do našeho organismu sliznicemi. Následkem toho dochází na sliznicích k indukci humorálních a buněčných imunitních reakcí zahrnujících tvorbu specifických protilátek různých izotypů i T buňkami mediovaných odpovědí ovlivňujících imunoregulační mechanismy. Slizniční a přídružené tkáně obsahují největší kvantum imunitních buněk (80 %) různých fenotypů. Hlavními buňkami zprostředkujícími interakci přirozené imunity s imunitou adaptivní jsou dendritické buňky, které jsou schopné nejúčinněji prezentovat antigeny. Výsledná odpověď, tj. aktivace T buněk vedoucí ke stimulaci slizniční imunity nebo indukce tolerance závisí na účasti různých populací dendritických buněk. Jedním z hlavních humorálních mechanismů zabezpečujících barierovou funkci sliznic je sekreční IgA (S-IgA). U jedinců s IgA deficiencí je díky nedostatečné barierové funkci sliznic vyšší výskyt alergií a jiných chronických chorob.

Úloha barierové funkce epitelu je v poslední době zdůrazňována i u alergických chorob dýchacího traktu. Atopické stavy jsou spojovány s dysfunkcí epitelu dýchacích cest a změnami v přirozené imunitě. Tyto nálezy i mění pohled na terapii alergických chorob. Místo tlumení zánětlivých procesů se doporučuje zvýšit rezistenci dýchacích cest podnětům z prostředí modulací přirozené a adaptivní imunity.

## 1.16 Mezinárodní publikace věnované problematice pupečnickového IgE

Lilja, G., et al.: IgE levels in cord blood and at 4-5 days of age: relation to clinical symptoms of atopic disease up to 18 months of age. *Allergy*. 1990, 45, 436-444.

Karmaus, W., et al.: Does the sibling effect have its origin in utero? Investigating birth order, cord blood immunoglobulin E concentration, and allergic sensitization at age 4 years. *Am. J. Epidemiol.* 2001, 154, 909-915.

Sadeghnejad, A., et al.: Raised cord serum immunoglobulin E increases the risk of allergic sensitisation at ages 4 and 10 and asthma at age 10. *Thorax*. 2004, 59, 936-942.

Chan-Yeung, M., et al.: Umbilical cord blood mononuclear cellproliferative response to house dust mite does not predict the development of allergic rhinitis and asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* 1999, 104, 317-321.

Smillie, FI., et al.: Lymphoproliferative responses in cord blood and at one year: no evidence for the effect of in utero exposure to dust mite allergens. *Clin Exp Allergy*. 2001, 31, 1194-1204.

Miles, EA., et al.: Peripheral blood mononuclear cell proliferative responses in the first year of life in babies born to allergic parents. *Clin Exp Allergy*. 1996, 26, 780-788.

Prescott, SL., et al.: The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy*. 2003, 58, 1187-1194.

Thornton, CA., et al.: Functional maturation of CD4+CD25+CTLA4+CD54RA+T regulatory cells in human neonatal T cells responses to environmental antigens/allergens. *J Immunol*. 2004, 173, 3084-3092.

Prescott, SL., et al.: Neonatal interleukin-12 capacity is associated with variations in allergen-specific immune responses in the neonatal and postnatal periods. *Clin Exp. Allergy*. 2003, 33, 566-572.

Lendor, C., et al.: Effects of winter birth season and prenatal cockroach and mouse allergen exposure on indoor allergen – specific cord blood mononuclear cell proliferation and cytokine production. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008, 101, 193-199.

Schaub, B., et al.: Impairment of T helper and T regulatory cell responses at birth. *Allergy*. 2008, 63, 1438-1447.

Prescott, SL., et al.: Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the TH2 cytokine profile. *J.Immunol*. 1998, 160, 4730-4737.

Ly, NP., et al.: Characterization of regulatory T cells in urban newborns. *Clin Moll Allergy*. 2009, 7.

Mold, JE., et al.: Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. 2008, 322, 1562-1565.

Holt, PG.: Primary allergic sensitization to environmental antigens: perinatal T cell priming as a determinant of responder phenotype in adulthood. *J. Exp. Med*. 1996, 183, 1297-1301.

Shaub, B., et al.: Fetal cord blood: aspects of heightened immune responses. *J Clin Immunol*. 2005, 25, 329-337.

## 2 Střevní mikrobiom

- lymfoidní systém spojený se sliznicemi
- mikrobiom-probiotické mikroorganismy
- gastrointestinální systém
- hygienická hypotéza
- mikrobiální flóra
- fyziologické a terapeutické účinky probiotik
- absence mikrobiální stimulace
- využití probiotik

## 2.1 Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita <sup>[16]</sup>

Lymfoidní systém spojený se sliznicemi (MALT, Mucosa Associated Lymphoid Tissue) je nepochybně svým rozsahem i funkcí nejvýznamnějším sekundárním orgánem imunitního systému.

Zde je obrana regulována tak, aby noxy vnějšího světa byly odstraňovány z povrchu, či jinak eliminovány ještě předtím, než budou stimulovat slizniční imunitu. K tomu je slizniční systém optimálně vybaven. Slizniční imunitní systém je regulován tak, aby na většinu podnětů, které nepředstavují jednoznačné signály nebezpečí, byla indukována tolerance. Na druhou stranu stimulace slizniční imunity má za důsledek ovlivnění centrálních mechanismů imunity. Z tohoto pohledu je role slizničního imunitního systému mimořádně důležitá zvláště pro rozvoj individuální imunitní reaktivity [Kudsk 2002]. Klíčové pro její optimální nastavení je období těsně po narození. Trávicí trubice embrya je sterilní. K jeho kolonizaci dochází bezprostředně po porodu. Střevní mikroflóra prodělává v tomto období rychlé proměny. První kolonizační vlnu představují především fekální mikroorganismy z rodu *Enterobacter*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Původ mají v mateřské vaginální a fekální bakteriální flóře. Zástupci uvedených bakteriálních rodů jsou schopni spotřebovat kyslík, a vytvářejí tak vhodné prostředí pro další vlnu mikroorganismů, jež kolonizuje zdravé dítě, které je kojeno, zhruba po týdnu po narození. Druhou kolonizační vlnu představují především bakterie z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Počáteční kolonizace má mimořádný význam nejenom pro rozvoj slizniční imunity, ale bakterie moduluji biologickou aktivitu epitelových buněk. Další klíčové období pro vývoj slizniční mikroflóry představuje odstavení kojence a přechod na pevnou stravu. Od tohoto období převládá striktně anaerobní mikroflóra. Pouze okolo 3 % střevní mikroflóry dospělého člověka jsou aerobní bakterie nebo fakultativně anaerobní bakterie.

V současnosti je definován nový termín mikrobiom, který je označován jako suma genů všech mikrobiálních druhů, které kolonizují střevo. Mikrobiom zahrnuje odhadem stokrát více genů, než má náš vlastní genom. Zajišťuje člověku využití pro něj nedostupných živin. Potlačuje kolonizaci a růst potenciálně patogenních mikroorganismů. Bakterie v trávicím traktu jsou schopny mezi sebou komunikovat.

Aktivované epitelové buňky jsou vydatným zdrojem cytokinů, které ovlivňují jak intraepitelové lymfocyty, tak buňky imunitního systému nacházející se v lamina propria. Specializované M buňky umožňují prostup podnětů do lamina propria. Významnou složkou slizniční imunity jsou dendritické buňky. Dendritické buňky, které se nacházejí v lami na propria, jsou schopny pronikat svými výběžky mezi epitelové buňky do střevního lumen. Zde jakoby vzorkují mikrobiální podněty a prezentují je potom specifické imunitě. Je pravděpodobné, že takovýto kontakt s fyziologickou mikroflórou vede k indukci regulačních T lymfocytů, které tvorbou cytokinů s protizánětlivým působením (IL-10) optimalizují slizniční odpověď a indukují slizniční toleranci [Schmidt-Weber 2005]. Opakovaná expozice sliznic antigenním podnětům nevede obvykle k zesílení slizniční odpovědi, ale naopak k utlumení imunitní reakce. Tento fenomén tzv. indukce slizniční tolerance je mimořádně komplexní. Konkrétně půjde o úlohu subsetu regulačních T lymfocytů (Treg).

Expozice antigenům na střevní sliznici vede k rozvoji antigen specifické imunologické tolerance (orální tolerance). Je jednoznačně určována subsetem Treg T lymfocytů. Ze studií na bezmikrobních zvířatech je zřetelně doloženo, že orální tolerance nemůže být indukována v bezmikrobních zvířatech.

### 2.1.1 Klinické aplikace probiotik

Použití probiotik prokazatelně snižuje výskyt a dobu některých průjemových onemocnění. Zvláště zřetelné je to v případě průjmů způsobených rotaviry. Nepřímé důkazy existují i pro pozitivní

ovlivnění průjmů bakteriálního původu, zvláště průjmů provázejících terapii antibiotiky a průjmových onemocnění cestovatelů. Probiotika podle některých studií pozitivně ovlivňují i průběh nekrotizující enterokolitidy u nedonošených dětí.

Mimořádná pozornost byla věnována pozitivnímu účinku podání probiotických mikroorganismů těhotným ženám a poté také kojencům. Takovéto podání *Lactobacillus rhamnosus GG* vedlo k redukcí IgE zprostředkovaných alergických nemocí u dětí. Zcela recentně bylo ve velké studii prokázáno, že kombinace tří probiotických druhů *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* a *Lactococcus lactis* (tzv. Ecologic Panda) prenatálně podaných matkám dětí s vysokým rizikem rozvoje atopické dermatitidy, potravních alergií a alergické rinitidy nebo astmatu s následnou aplikací těchto probiotik po dobu 12 měsíců jejich dětem významně snižovala výskyt atopické dermatitidy [Salvatore 2005]

V in vitro pokusech bylo prokázáno, že vybrané kmeny probiotických mikroorganismů jsou schopny stimulovat produkci IL-10 především v populaci monocytů. Interleukin-10 vykazuje významné imunoregulační charakteristiky a má obecně protizánětlivé působení. V uvedené práci tlumil tvorbu cytokinů subsetem TH2 T lymfocytů [Dunstan 2005, Niers 2005]. Tento subset je klíčový v rozvoji alergického zánětu. Bylo prokázáno, že podání probiotik zvyšuje dvojnásobně koncentraci TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) v mateřském mléce. Pozitivní výsledky podání probiotik nebyly potvrzeny jinými studiemi. Např. se nepodařilo ovlivnit průběh alergie na pyl břízy podáním probiotik. Zatím lze shrnout, že u dospělých jedinců s jasně vyjádřenými klinickými projevy atopické dermatitidy nepřináší probiotická terapie žádoucí klinický efekt. Naproti tomu výsledky několika studií především z Finska a Holandska jasně ukazují, že podání probiotik prenatálně matkám u dětí s vysokým rizikem rozvoje tohoto typu imunopatologie a následná aplikace probiotik po narození přináší klinický efekt, který se udržuje i v pozdějším věku dítěte. Údaje jsou zatím dostupné do věku 4 let [Baker 2006, Kalliomäki 2003, Rosenfeldt 2003].

V současnosti je definováno 38 bakteriálních druhů v rámci *Bifidobacterium*. Z nich je 6 využíváno pro své probiotické vlastnosti. Jejich podání je bezpečné jak u imunokompetentních osob, tak u osob s imunodeficiencí.

Dále je popsáno 128 druhů *Lactobacillus*, *L.rhamosus* je diskutabilní. Posledním druhem je *Lactococcus*, který tvoří vitamín K novorozence.

*L.rhamosus* vedl k redukcí IgE zprostředkovaných alergií u dětí.

Je prokázáno, že vybrané kmeny probiotických mikroorganismů jsou schopny stimulovat produkci IL 10, který vykazuje výborné imunoregulační charakteristiky. Ve výše uvedené práci Salvatore tlumil tvorbu cytokinů subsetem TH2 T lymfocytů. Tento subset je klíčový v rozvoji alergického zánětu. Bylo prokázáno, že podání probiotik zvyšuje dvojnásobně koncentraci TGF Beta (transforming Growth Factor B) v mateřském mléce.

Zatím se ale prokázalo, že u dospělých jedinců nepřináší probiotická terapie žádoucí výsledky.

Také se opakovaně uvažuje o negativně snížené expozici mikrobiálním podnětům, které vyžádají imunitní systém vyžaduje pro svoje diferenciací kroky. Paradoxně pozitivní změny, které vedly k dramatickému snížení mortality na alimentární nákazy, vedou k abnormálním procesům při nastavení individuální imunní reaktivity. Průmyslově vyráběné potraviny jsou v průběhu celého výrobního procesu debacilovány. Člověk je při takto připravené potravě zbaven expozice živým mikroorganismům (dříve 500, toho času 50 druhů potravy)! I to má nepochybně vliv na rozvoj individuální imunní reaktivity. Na druhé straně je člověk vystaven abnormálním podnětům. Vliv na rozvoj imunní reaktivity mají nepochybně i postupující aktivní imunizace. Je možné říci, že aktivní imunizace představuje další množství podnětů. Abnormity v individuální imunní reaktivitě mohou být základem pro vznik imunopatologických onemocnění. Zásadní měrou přibývá onemocnění, které mají charakteristiky alergií zprostředkovaných protilátkami IgE. Aplikace látek s prebiotickými

vlastnostmi a probiotických mikroorganismů by mohly pozitivně ovlivnit nežádoucí trend v prevalenci imunologických nemocí v populaci.

## 2.2 Probiotika, prebiotika a atopie <sup>[17]</sup>

Atopie je definována jako genetická dispozice k hypersenzitivním reakcím I. typu proti různým antigenům prostředí (atopická alergie). Nejčastějšími klinickými projevy jsou alergická rhinokonjunktivitida, bronchiální astma, atopická dermatitida/ekzém (ADE) a méně často potravinová alergie.

Postihuje 10–20 % dětské populace a v pubertě se k ní může přidružit respirační alergie [Červenková 2006]. Je jí možno považovat za portál pro IgE zprostředkované atopické choroby [Isolauri 2004].

Patogeneze a terapie atopických chorob se stávají znovu předmětem pozornosti s rozvojem poznatků o střevní mikroflóře (MF) a slizniční imunitě.

### 2.2.1 Gastrointestinální ekosystém

Střevní MF vytváří se střevním epitelem a slizničním imunitním systémem vysoce integrovaný celek, tzv. gastrointestinální ekosystém.

Fetální trávicí trubice je sterilní. Její mikrobiální osídlení začíná při spontánním porodu průchodem plodu porodním kanálem a pokračuje v průběhu prvního roku života z řady zdrojů. K nim patří typ porodu (spontánní, císařský řez), zralost plodu, typ výživy (kojení, umělá výživa), podávání antibiotik, celkový zdravotní stav a stres. První mikroby kolonizující střevo jsou aerobní a fakultativně anaerobní kmeny (*E. coli*, laktobacily a streptokoky), které snižují oxidoredukční potenciál a umožňují kolonizaci anaerobními kmeny (bifidobakterie, bacteroides). Kojený, plně vyvinutý novorozenec má výhodnější MF s převahou bifidobakterií [Dai 1999]. Po zavedení pevné stravy se složení MF přibližuje stále více definitivnímu stavu v dospělosti s převahou anaerobních kmenů. Hlavní lokalizací MF v trávicí trubici je tlusté střevo a konečník, v němž zastoupení anaerobů činí až 99 % [Frič 2005]. Kolonizace střeva MF je tedy programována časově (doba a pořadí kmenů), kvalitativně (definice kmenů) a kvantitativně (koncentrace kmenů). Komenzální MF časně po narození významně aktivuje procesy vrozené i získané imunity a podílí se na rozvoji imunitního systému střeva.

Komenzální MF je kritická pro rovnovážné vyžráním imunitního systému a vývoj orální tolerance, tj. tolerogenní nebo imunogenní reakce na antigenní podněty.

### 2.2.2 Hygienická hypotéza

Vysvětlení stoupající prevalence atopických chorob v rozvinutých zemích nabízí tzv. hygienická hypotéza, kterou v základní formě formuloval Strachan v roce 1989 [Strachan 1989]. U novorozenců jsou odpovědi na antigeny zevního prostředí vychýleny k Th2 cytokinovému profilu, který je charakteristický pro alergická onemocnění. V průběhu prvního roku života imunitní systém vyzrává v důsledku expozice různým mikrobiálním antigenům a imunitní odpovědi nabývají charakteru kontraregulačního Th1 profilu, který je typickou odpovědí na mikrobiální antigeny. U atopických dětí k této reorientaci imunitní odpovědi nedochází a dále přetrvává Th2 typ odpovědi. Vhodné podmínky pro takový vývoj vytváří nedostatečná expozice mikrobiálním antigenům v důsledku vysoké životní úrovně s přemrštěnou hygienou, očkováním, časným a opakovaným podáváním antibiotik a menším počtem členů rodiny.

Objevení další podskupiny T-buněk, tzv. regulačních T-buněk (Th3, Tr1) umožnilo rozšířit původní hygienickou hypotézu také na autoimunitní a infekční choroby [Rautava 2004].

Neschopnost vytvořit tolerogenní stav ve střevě a na ostatních sliznicích v časném dětství může zvýšit riziko ztráty tolerance a vznik chronického zánětu. Důsledkem celkově vychýlené imunity typu Th2 u novorozence může být atopické onemocnění v dětství, kdežto autoimunitní onemocnění s Th1 typem odpovědi se objeví později, když tyto odpovědi převládají.

Současnému novorozenci mohou chybět kritické interakce s mikrobiálními kmeny prostřednictvím toll-like receptorů a CD14, které umožňují vytvoření protizánětlivého, tolerogenního imunitního prostředí udržovaného mediátory, jako jsou transformační růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a IL-10. Vývoj střevní MF má klíčový význam pro vývoj a zachování funkcí slizniční střevní bariéry a zdraví hostitele. Střevní MF reguluje v časném období života ovlivňováním vývoje střevní lymfatické tkáně systémové a lokální imunitní odpovědi (včetně odpovědi na mikrobiální a potravinové antigeny) k tolerogennímu nezápětlivému stavu, při čemž současně udržuje schopnost přiměřené (fyziologické) zápětlivé odpovědi.

### 2.2.3 Střevní MF a atopie

Kalliomäki et al [Kalliomäki 2001 J Allergy] zjistili u třítydenních kojenců rozdíly ve spektru mikrobiálních mastných kyselin u těch, kteří se později stali atopiky ve srovnání s takto nepostíženými jedinci. U obou skupin se také lišilo složení MF: atopici měli více klostridií a méně bifidobakterií. Kmeny bifidobakterií atopiků produkují po stimulaci jiné cytokiny než neatopici [He 2002]. Kromě toho bylo zjištěno, že kmeny bifidobakterií atopických kojenců se podobají více složení bifidobakterií dospělých jedinců než zdravých dětí [Ouweland 2001]. Tyto nálezy dovolují předpokládat, že odchylky ve složení střevní MF předcházejí vznik atopie a zdůrazňují význam MF v patogenezi atopických chorob. Probiotika vykazují řadu prospěšných fyziologických a terapeutických vlastností v závislosti na dávce a metodě aplikace, viz tabulka 1.

Tabulka 1 - Fyziologické a terapeutické účinky probiotik

kompetice s patogenními mikroby v adhezi na střevní epitelie a potenciace imunitních odpovědí na patogeny
tvorba peptidů s bakteriostatickými a baktericidními účinky (mikrociny, koliciny)
regulace funkcí střevní bariéry a mikrobiální translokace
modulace funkcí střevních epitelii a vyzrávání slizničního imunitního systému
inhibice přerůstání patogenů
stimulace eliminace toxinů
tvorba steroidů z cholesterolu
ovlivnění střevních funkcí (vstřebávání, motility, splachnické cirkulace, tvorby a sekrece hlenu)

Výživa MF a střevní sliznice je komplexně zajištěna prostřednictvím prebiotik. To jsou látky nenatravitelné enzymy eukaryotických buněk, ale ve střevě se stávají substráty enzymů MF. Jsou to nejčastěji oligosacharidy (zejména fruktooligosacharidy, např. inulin), různé druhy vlákniny, pektiny, xylany a celulóza. Mikrobiální enzymy štěpí tyto substráty na látky významné pro MF i střevní sliznici (krátké mastné kyseliny, aminokyseliny, polyaminy, růstové faktory a antioxidantia). Tyto substance kryjí značnou část nutričních potřeb kolonické sliznice, která není schopna vyživit se pouze substráty z krevního oběhu.

#### 2.2.4 Probiotika, prebiotika a atopické choroby

Terapeutické použití probiotik u atopických chorob propracovala nejvíce skupina E. Isolauri z finského Turku. Isolauri et al [Isolauri 1993] publikovali v roce 1993 experimentální práci o ochranném účinku *Lactobacillus casei rhamnosus* (LGG) na poruchu střevní permeability způsobenou kravským mlékem u sajících mláďat potkana. V roce 1997 uveřejnili Majamaa a Isolauri [Majamaa 1997] studii o příznivém účinku LGG a hydrolyzátu syrovátky podávaného dětem s nesnášenlivostí kravského mléka. V druhé skupině podávali stejný kmen kojícím matkám dětí s atopickým ekzémem a intolerancí kravského mléka. Tyto práce odstartovaly další publikace zabývající se použitím probiotik u atopických chorob. Nejčastěji používanými probiotiky jsou vybrané kmeny laktobacilů a bifidobakterií, zejména LGG a *Bifidobacterium lactis Bb-12*. Tato a některá další probiotika mají výrazné antipatogenní a protizánětlivé vlastnosti. Je však třeba uvést, že Isolauri patří spíše jen prioritě aplikační a nikoliv metodická. Tato náleží české skupině R. Lodinové-Žadníkové. Tito autoři použili již v roce 1991 nepatogenní kmen *E. coli O83:K24:H1* a v pozdější práci *E. coli Nissle 1917* k řízené kolonizaci u kojených i nekojených novorozenců jako prevenci nosokomiálních nákaz [Cukrowska 2002, Lodinova-Zadnikova Adv.Exp 1991]. Prokázali také, že tento postup ovlivňuje příznivě slizniční i látkovou imunitu a má dlouhodobý preventivní účinek [Lodinova-Zadnikova 2003, Lodinova-Zadnikova 1991 Pediatr Res.].

#### 2.2.5 Terapie

Účinek LGG a *Bifidobacterium lactis Bb-12* u dětí s atopickým ekzémem prokázali definitivně Isolauri et al v roce 2000 [Isolauri 2000] v randomizované, dvojité slepé a placebem kontrolované studii. Výhradně kojené děti průměrného věku 4,6 měsíců s atopickým ekzémem byly převedeny na výživu vysoce hydrolyzovanou syrovátkou s probiotiky nebo bez nich. Po dvou měsících se výrazně zlepšila probiotická skupina podle SCORAD skóre, snížení sérového CD4 a eozinofilního proteinu X v moči. Lze tedy předpokládat, že některá probiotika jsou schopna modifikovat projevy alergického zánětu a že mohou ovlivnit zánětlivé odpovědi i mimo střevo samotné. Tato interpretace je ve shodě se změnami dalších indikátorů alergické odpovědi po podání probiotik. Perorální aplikace LGG a některých dalších laktobacilů u dětí s atopickou dermatitidou je provázána zvýšením sérového IL-10 [Pessi 2000] v důsledku stimulace regulačních T-buněk [Smits 2005]. Současně dochází k zvýšení imunitních odpovědí Th1 typu prostřednictvím IFN- $\gamma$  [Prescott 2005]. Bylo rovněž potvrzeno, že střevní MF u zdravých dětí a atopiků se liší během kojení i odstavu a že probiotika příznivě ovlivňují její složení. Atopici mají méně grampozitivních aerobních kmenů a celkově chudší MF. Při výraznějším postižení se zvyšují kmeny bacteroides a snižují se bifidobakterie [Kirjavainen 2001]. Podávání *Bifidobacterium lactis Bb-12* vede k snížení *E. coli* a zabraňuje zvýšení bacteroides, což může zmírnit alergický zánět [Kirjavainen 2002]. Ve shodě s tím dochází u atopiků k snížení zánětlivých markerů ve stolici a zvýšení IgA po stimulaci [Viljanen 2005 Ped. Allergy]. Účinek LGG u dětí s intolerancí kravského mléka a atopickým ekzémem předpokládá použití živé a nikoliv tepelně inaktivované kultury. Další studie potvrdily předchozí nálezy a významně je doplnily řadou poznatků. *Lactobacillus fermentum* (109 CFU 2x denně) podávaný po dobu 4 měsíců zlepšuje středně těžkou a těžkou atopickou dermatitidu dětí ve věku 6–18 měsíců [Weston 2005]. Rosenfeldt et al. sledovali účinky *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus reuteri* u 1–13letých dětí s atopickou dermatitidou. SCORAD skóre bylo významně sníženo u nemocných se zvýšením sérového IgE a



alespoň jedním pozitivním kožním testem. Během terapie rozsah ekzému a trávicí obtíže významně ustoupily, bariérová funkce stanovená testem propustnosti se zlepšila a sérová koncentrace eozinofilního kationického proteinu se snížila [Rosenfeldt 2003, Rosenfeldt 2004]. Účinnost probiotické terapie pravděpodobně klesá s věkem dítěte a omezuje se hlavně na IgE-senzibilizované jedince [Sistek 2006, Viljanen 2005 Allergy]. Laitinen et al [Laitinen 2005] prokázali prospektivním sledováním dětí s rodinnou anamnézou alergického onemocnění, že perinatální podávání probiotik v kombinaci s některými dalšími látkami (retinol, vápník, zinek) je bezpečné a snižuje riziko atopického ekzému. Považují proto takovou kombinaci za vhodnou pro prevenci i terapii alergických chorob. Kombinace probiotik a prebiotik působí synergicky v terapii atopické dermatitidy. Nejvhodnější se jeví směs galaktoa fruktooligosacharidů, která významně zvyšuje počet bifidobakterií ve stolici. Tento náález svědčí pro schopnost oligosacharidů měnit složení střevní MF a ovlivňovat příznivě postnatální vývoj slizniční imunity.

Na rozdíl od těchto sdělení nezjistili pouze Brouwer et al [Brouwer 2006] u dětí s atopickou dermatitidou (věk do 5 měsíců) po 3 měsících aplikace *LGG* a *Lactobacillus rhamnosus* významné změny SCORAD skóre, senzibilizačních testů, zánětlivých parametrů a produkce cytokinů.

### 2.2.6 Primární prevence

Kalliomäki a další [Kalliomäki 2001] podávali *LGG* prenatálně matkám, které měly alespoň jednoho příbuzného 1. stupně nebo partnera s atopickým ekzémem, rhinitidou nebo astmatem a postnatálně pokračovali v léčbě u 132 dětí do 6 měsíců. Výskyt atopického ekzému ve věku 2 let se snížil tímto postupem na polovinu ve srovnání s placebovou skupinou. Preventivní účinek přetrvával u těchto dětí také ve věku 4 let [Kalliomäki 2003]. *LGG* lze tedy považovat za účinný v prevenci časného atopického onemocnění nejspíše v důsledku jeho imunomodulačních vlastností. Ve shodě s tímto nálezem bylo zjištěno, že podávání *LGG* matkám 4 týdny před porodem a další 3 měsíce během kojení zvyšuje obsah TGF- $\beta$  v mateřském mléku [Rautava 2002]. TGF- $\beta$  přispívá významně k vývoji orální tolerance, potlačuje Th2 imunitní odpověď, stimuluje tvorbu IgA protilátek k potravinovým antigenům a chrání před vznikem atopické nemoci během kojení [Ogden 2005].

## 2.3 Slizniční imunita u dětí, možnosti imunomodulace <sup>[18]</sup>

### 2.3.1 Střevní bakteriální mikroflóra

Do okamžiku narození je zažívací i dýchací trakt plodu sterilní. Jeho osídlování bakteriální mikroflórou začíná za porodu při průchodu porodními cestami a velmi intenzivní je hlavně v prvních dnech po narození. Podstatným faktorem, určujícím složení střevní mikroflóry, je výživa novorozence a kojence. Kojené děti mají bakteriální mikroflóru složenou z 90 % z laktobacilů a bifidobakterií. U uměle živených dětí se v krátkém časovém období vytváří komplex téměř úplného spektra mikroflóry s dominancí anaerobních bakteroidů a enterobakterií. Fyziologická gastrointestinální bakteriální mikroflóra zahrnuje 400 až 1 000 bakteriálních druhů, z nichž kultivovatelných je 20–40 %. Obvykle bývá definována jako soubor mikroorganismů, které mohou být přítomny v zažívacím traktu zdravého člověka [Jeřábková 2008].

Při optimálním složení bakteriální mikroflóry dochází k indukci imunitní reakce, která vede k produkci cytokinů, navozujících vznik aktivní tolerance neškodných antigenů. Prenatálně nastavený typ dominance Th2 imunitní odpovědi se mění ve vyvážený typ imunitní reakce, které se adekvátně účastní lymfocyty Th1, Th2, Th3 a Treg.

Mechanismy slizniční imunity jsou proto balancovány spíše ke stavu udržení tolerance [Jeřábková 2008].

Opakovaná aktivace Th2 lymfocytů vede kromě stimulace tvorby IgE též ke zvýšené produkci sekrečních imunoglobulinů IgA a prostřednictvím interleukinu-4 pak tlumí aktivitu Th1 lymfocytů, čímž indukuje převahu regulačních lymfocytů Th3, které snižují systémovou zánětlivou odpověď [Jeřábková 2008]. Pro navození tolerance má velký význam i způsob prezentace antigenu imunitnímu systému prostřednictvím APC.

Faktem je, že snížená antigenní stimulace v časném poporodním a kojeneckém období obvykle nenavodí u zdravého jedince přeladění imunologické reaktivity z převahy stimulace Th2 (typické pro období intrauterinního života) na rovnováhu Th1/Th2, regulující imunologické procesy postnatálně. Přetrvávání stimulace Th2 pak může vést k snazší senzibilizaci, k vyšší tvorbě IgE a tím k následnému rozvoji alergie [Romangani 1999].

Na ustanovení rovnováhy mezi Th1 a Th2 lymfocyty v imunitním systému nemá vliv jen přítomnost či nepřítomnost antigenní stimulace, ale také vlastnosti stimulujícího antigenu, způsob jeho předložení imunokompetentním buňkám a současné působení dalších faktorů. Značný význam má též období, ve kterém ke kontaktu mezi antigenem a imunitním systémem dochází.

I když by tato hypotéza mohla částečně vysvětlit vzestup incidence alergických chorob v zemích žijících tzv. „západním“ stylem života, svědčí proti jejímu zjednodušenému chápání celá řada pozorování. Je totiž zřejmé, že současně s alergiemi, typickými dominancí odpovědi Th2, vzrůstá i výskyt autoimunitních onemocnění, asociovaných s genotypem Th1. Oba typy onemocnění se vyskytují u některých osob současně. Promoření populace parazity indukuje Th2 odpověď, přitom ale nezvyšuje incidenci alergických onemocnění a obyvatelé oblastí promořených parazitárními chorobami bývají obvykle před alergiemi chráněni. Z předešlého vyplývá, že vzestup incidence alergií není možné vysvětlit striktní dichotomií TH1/Th2 odpovědi. Základem současného pojetí nárůstu alergických chorob je teorie protizánětlivé imunitní odpovědi, založené na vývoji tolerance. Vznik tolerance je zřejmě řízen především aktivitou intestinálních regulačních T lymfocytů, které imunitní odpověď kontrolují a v součinnosti s dalšími složkami slizniční imunity modulují současně i imunitu systémovou.

Imunomodulací rozumíme terapeutické či preventivní zásahy do činnosti imunitního systému [Bartůňková 2003, Bystroň 2005].

Tato kritéria nám u dětí při indikaci imunomodulace příliš nepomohou, a proto budeme při indikaci této léčby poměrně zdrženliví.

### **2.3.2 Probiotika a prebiotika**

Podle definice WHO z r. 2001 jsou probiotika živé mikroorganismy, které v případě aplikace v přiměřeném množství příznivě ovlivňují stav hostitele. Účinek jejich působení je výsledkem komplexního působení na střevní bakteriální mikroflóru a příznivý efekt přesahuje oblast imunologie. Vedle podpory specifické i nespecifické slizniční imunity probiotika syntetizují některé vitaminy (B12, K) a zajišťují energetické zdroje pro činnost enterocytů [Frühauf 2006]. Probiotika jsou nestravitelné oligosacharidy, které podporují růst některých komenzálních bakterií ve střevě, a tím umožňují zlepšení kvality bakteriální mikroflóry trávicího traktu. Probiotika a prebiotika jsou souhrnně označována jako synbiotika a jejich příznivý vliv na slizniční imunitu je nyní obecně uznáván. Kromě obohacování kojenecké výživy je jejich podávání doporučováno v případě průjemových onemocnění kojenců a dětí a v případě antibiotické léčby. Podle některých studií snižuje jejich včasné a dlouhodobé podávání výskyt alergií u dětí [Lee 2008].

## 2.4 Využití složek střevní mikroflóry [19]

Interakce mezi střevní mikroflórou a slizničním imunitním systémem hostitele hraje klíčovou roli při udržování slizniční homeostázy. Bylo prokázáno, že dysbióza, změna ve složení mikrobiálních společenstev může vést k rozvoji civilizačních onemocnění, jakými jsou zánětlivá střevní onemocnění nebo alergie. V tomto ohledu jsou probiotika cenným nástrojem pro zmírnění nerovnováhy střevní mikroflóry s vhodnou stimulací imunitního systému. V práci se autoři zaměřili na sledování imunomodulačních vlastností vybraných bakterií bifidobacterium a lactobacillus a stanovení příznivého účinku vybraných bakterií. Ve zvířecím modelu alergie ukázali autoři, že neonatální kolonizace zabrání rozvoji alergické senzibilizace pravděpodobně aktivací T-regulační odpovědi.

Tato práce rozšiřuje naše znalosti o imunomodulačním potenciálu probiotických kmenů. Je nutné si uvědomit, že vlastní dysbióza vede ke zpožděnému vyzrání imunitního systému a narušení mechanismu imunologické tolerance, což vede ke vzniku zánětlivých a autoimunitních onemocnění a alergií [Belkaid 2014, Sartor 2008].

Podle tzv. hygienické nebo mikrobiální hypotézy se předpokládá, že za rozvoj alergických onemocnění je zodpovědná nedostatečná mikrobiální stimulace na počátku života a snížení bakteriální rozmanitosti v mikroflóře hostitele [Kaliomaki 2010, Toh 2012, Noverr 2005].

Absence mikrobiální stimulace v důsledku zvýšené hygieny nebo nadužívání antibiotik má za následek oslabení slizniční imunity, doprovázené častější senzibilizací k alergenům, které jsou zdravou populací tolerovány [Tlaskalová-Hogenová 2004]. Následné změny v TH1 mohou způsobit posun k TH2 imunologické odpovědi, která je zodpovědná za rozvoj alergií. Zánětlivá střevní onemocnění – ulcerózní kolitida a Crohnova choroba patří mezi chronická onemocnění spojená s nekontrolovaným zánětem GIT [Hanauer 2006]. Tato onemocnění jsou způsobena poruchou střevní homeostázy a deregulovanou imunitní odpovědí vůči rezidentním složkám mikroflóry v důsledku genetických poruch slizniční bariéry, nespecifické imunity a imunoregulace. Rozvoji střevního zánětu předchází zvýšení propustnosti epiteliální vrstvy v důsledku snížené exprese nebo reorganizace některých proteinů těsných spojů. Menší výskyt kvalitních bakterií a zvýšený počet patogenních je u těchto pacientů s chronickými GIT potížemi prokázán. Vybrané probiotické kmeny bifidobacterium, lactobacillus, E. coli nisle byly úspěšně použity při prevenci nebo léčbě zánětu nebo léčbě alergií. [Abrahamson 2007, Viljanen 2005 Allergy, Kukkonen 2007]. Je důležité ale brát v úvahu imunologický stav hostitele a i výběr probiotika [Ismail 2013]. Cílem této práce bylo stanovení imunomodulačních vlastností 9 bakteriálních kmenů lidského původu. Došli k závěru, že druhově a poddruhově specifické PCR a Rep-PCR ukázaly vysoký stupeň genetické homogenity analyzovaných kmenů. Také se zajímali, zda specifické imunomodulační vlastnosti probiotických kmenů mohou korelovat s jejich schopností prevence zánětlivého onemocnění. Studie prokázala, že imunostimulační vlastnosti probiotických kmenů, např. bifidobakteria, jsou jednoznačně kmenově specifické. Bylo ukázáno, že profilaktické podávání probiotického kmene zabránilo porušení proteinů těsných spojení. Proto také bakteriální kmen může hrát důležitou roli při regulaci střevní bariéry. Bylo prokázáno, že v modelu indukované colitidy závisí závažnost zánětlivých projevů na imunitní reakci hostitele. Podávání probiotika zabránilo porušení slizniční bariéry jak u imunodeficitních, tak u imunokompetentních zvířat. V testech neonatální kolonizace bakterií bifidobacterium přispěly ke snížení alergické senzibilizace jak na buněčné, tak na protilátkové úrovni. Z výsledků bylo prokázáno, že neonatální mono kolonizace bakterií bacterium longum snižuje alergickou senzibilizaci pravděpodobně aktivací regulačních reakcí. V další části práce analyzovali imunomodulační vlastnosti kmenů lactobacilla a potvrdili, že kolonizace myši v experimentálních modelech snížila alergickou senzibilizaci na buněčné i protilátkové úrovni. Dále indukovala systémovou a lokální produkci IgA protilátky a regulačního cytokinu TGF-B. Dále kolonizace zlepšila funkci střevní bariéry posílením komplexů apikálních spojů enterocytů. Jednotlivé kmeny stimulují různé hladiny

cytokinů. Stimulace mononukleárních buněk periferní krve s různými kmeny probiotika vedla ke specifické produkci regulačních cytokinů. Působky produkované mikroorganismy působí ve střevě jako zdroj energie pro colonocyty a moduluje oxidační stres. Tím zmírňuje vznik zánětlivých procesů. Závěrem autoři sdělují, že účinek probiotik na imunitní systém je závislý na použitém bakteriálním kmenu. Navrhli, aby probiotické kmeny byly selektovány na základě srovnávacích studií.

Závěrem dizertační práce je možné říci, že některé probiotické bakterie jsou schopné indukovat celkové potlačení T buněčné imunitní odpovědi spíše než posun z alergen specifické Th2 odpovědi směrem k Th 1 fenotypu [Feleszko 2007]. Ukazuje se také, že příznivé účinky probiotik jsou závislé na použitém bakteriálním kmenu a načasování léčby, což naznačuje vyšší účinnost probiotik spíše v prevenci než v léčbě alergie.

## **2.5 Využití probiotik [20]**

Střevní mikrobiota tvoří důležitý systém v těle člověka, jehož složení a funkce byly rozpoznány jen částečně. Probiotické bakterie, které mají uplatnění v klinické medicíně a splňují statut léčebného přípravku, zahrnují nepatogenní E.coli kmen Nissle 1917., Lactobacillus rthamnosus a rutei a Sacharomyces boulardii. Bakteriální kmeny jsou klasifikovány jako probiotika, když splňují příslušná kritéria. Na českém trhu je v současné době dostupných pouze pět preparátů, které splňují kritéria léčiva. Mutaflor a Colinfant New Born, obsahující nepatogenní kmen E.colli. Dále Lacidofil obsahující směs lactobacilů a Enterol obsahující Saccharomyces boullardii. Konečně VSL/3 obsahující osm bakteriálních kmenů.

### **2.5.1 Využití probiotik v klinické praxi**

#### **1. Infekční průjmy**

Terapie zkracuje délku trvání průjmů, snížení permeability střevní bariéry, významné zvýšení tvorby slizničních IgA

Děti léčené probiotiky vykazují během 5 dnů významnou eliminaci rotavirů v porovnání s neléčenou skupinou.

#### **2. Dále je zde léčba postantibiotických průjmů.**

Ve 30% jsou vyvolány infekcí Clostridium difficile. Současná léčba probiotikem snižuje výskyt postantibiotických průjmů.

#### **3. Pseudomembranózní colitida**

Zvláště u starých nemocných a u pacientů ve velmi těžkém stavu s přidruženými onemocněními s narušením celkového stavu pacienta, vědomí, zánětlivých parametrů. Také zde je příčinou přemnožení kmene Clostridium difficile, který produkuje toxiny A, B. Průkaz těchto toxinů ve stolici je potvrzením diagnózy. Dochází k recidivám. Určitým řešením je dlouhodobá terapie probiotiky. Možná je fekální transplantace od zdravého dárce. Eluát stolice 100-200 ml při koloskopickém vyšetření do pravého tračníku.

#### **4. Kolitida při divertikulární nemoci**

Kolitida při divertikulární nemoci (bolesti břicha, krvácení a nepravidelná stolice). ATB v kombinaci se salicyláty (metronidazol). Dlouhodobě Mutaflor.

#### **5. Alergická onemocnění**

Zvýšená incidence atopie je podle hygienické hypotézy vysvětlována sníženou expozicí lymfatické tkáně k mikrobiálním antigenům v časných fázích po narození.

Regulační význam probiotik u alergických onemocnění vychází z toho, že probiotika mají v pokusech in vitro imunopresivní vlastnosti na proliferaci lymfocytů a tvorbu IL4. Následná odpověď nejen k mikrobiálním, ale i dietním antigenům je zprostředkována zvýšenou tvorbou protizánětlivých cytokinů (IL10) a transformujícího růstového faktoru beta (TGFB). Zajímavé práce byly provedené u dětí s vysokým rizikem vzniku atopie. Výzkum ukázal signifikantní změnu mikrobiální střevní flory ve třetím týdnu života po narození u atopiků oproti zdravým dětem. Převažující florou u postižených dětí byly clostridia a malé procento bylo zastoupeno bifidobakteriemi [Pelech 1998]. Významného zlepšení klinického průběhu atopického ekzému bylo dosaženo i u kojenců, kteří dostávali terapii probiotiky. U těchto dětí došlo k úpravě i laboratorních markerů zánětu. V jiné práci Kalliomaki prokázal, že probiotika podávaná prenatálně i postnatálně po dobu 6 měsíců dětem s vysokým rizikem vznikem atopie významně snížila riziko a prevalenci atopického ekzému na polovinu v porovnání s dětmi, které dostávaly pouze placebo [Cukrowska 2002].

## **6. Průjmy cestovatelů**

Velmi praktické se jeví využití *Saccharomyces boulardii*

## **7. Idiopatické střevní záněty**

Antigenní stimulace je důležitá pro vyvržení imunitního systému, ale také pro vytváření orální tolerance. Její podstatou je, že slizniční imunitní systém se dokáže vyhnout odpovědi na antigenní stimulaci fyziologicky se vyskytujícímu mikrobioty, ale na druhé straně si zachovává schopnost mohutné odpovědi na patogeny. Idiopatické střevní záněty

vznikají v důsledku abnormální imunitní reaktivity k fyziologické střevní floře u geneticky disponovaných jedinců. Pelech 1998 publikoval výsledky studie, kdy první skupina pacientů užívala Mutaflor a placebo Mesalazin. Druhá skupina mesalazin a placebo Mutafloru. Nebylo větších rozdílů.

## **8. Funkční střevní dyspepsie**

Vlivem abnormální motility a sekrece v tlustém střevě dochází druhotně k poruše bakteriálního osídlení. Důsledkem je závažná porucha intraluminální fáze trávení. Funkční střevní dyspepsie a dráždivý tračník jsou proto vhodnou indikací k léčbě probiotiky (*E.coli*, Biolak).

## **9. Zácpa**

Příčiny sekundární zácpy

## **2.6 Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů [21,22]**

Nepatogenní *E.coli* (Mutaflor) má profylaktické účinky v remisi ulcerosní colitidy srovnatelné s mesalazinem. Skupina Laktobacilů a Bifidobakterií ve vyšších koncentracích je indikována v terapii ulcerosní colitidy při intoleranci aminosalicylátů a rovněž v léčbě pouchitid. Volné mastné kyseliny s krátkým řetězcem jako produkty části probiotické mikroflory mají prokazatelný léčebný efekt v lokální aplikaci u distálních tvarů ulcerosní colitidy. Dnes lze v léčbě ulcerosní colitidy a Crohnovy nemoci probiotickou terapii skupiny nepatogenních *E.coli*, laktobacilů a bifidobakterií považovat za metodu volby, viz. tabulka 2.

Tabulka 2 – Mikrobiologická terapie

Probiotika – fyziologické mikroorganismy	Mutaflor Colinfant New Born Paidoflor Omniflora Probioflora Santax Lacidofil BION3
Nefyziologické mikroorganismy	Perenterol Bactisubtil
Usmrcené / poškozené mikroorganismy	Urovaxom Omnisept Pro-symbioflor
Produkty mikroorganismů	Colibiogen Hylak
Směsi probiotik + usmrcených -poškozených mikroorganismů	Symbioflor 1, 2

U probiotik jsou vyloučeny faktory patogenity, především tvorba enterotoxinů a cytotoxinů, enteroinvazivita, hemolýza a sérorezistence.

I. Mečnikov publikoval v roce 2007 v Londýně práci, kde jako první upozornil, že konzumace fermentovaných mléčných výrobků zlepšuje zdravotní stav a proces stárnutí dával do souvislosti s chemickou intoxikací mikrobiální florou tračníku. Jeho práce vycházela z pozorování života bulharských venkovanů.

Alfred Nissle v roce 1916 publikoval základní práci, která se stala základem probiotického kmene *E.coli* k datu 1.3.1917. V téže roce převzala farmaceutická firma G. Pohl výrobu bakterie obsahujících kapsli pod názvem Mutaflor. Nissle sám je poprvé použil v roce 1930 v terapii idiopatických střevních zánětů. V roce 1987 byla vytvořena první genomová karta *E.coli*. Autoři během 15leté studie zjistili, že jedna bakterie *E.coli* K 12 může produkovat asi 1900 různých proteinů. Z možných vedlejších účinků terapie nepatogenními *E.coli* byl registrován pouze meteorismus jako známka příliš vysoké dávky Mutafloru. Průjmové stolice či jiné potíže v literatuře 1x sporně uváděné, jsme u Colinfantu nezaregistrovali.

Z jednotlivých v tabulce 2 uváděných preparátů je na našem trhu BION3-směs 3 probiotických kultur, *Lactobacilů* a *bifidobakterií*. *Lactobacily* jsou také součástí preparátu Lacidofil. Z dalších je zde k dispozici VSL 3 (*Streptococcus salivarius*) pak *Saccharomyces boulardii* (Santax S). Zmíníme-li se o zkušenostech s probiotickou terapií v léčbě idiopatických střevních zánětů, autor konstatuje velmi dobré zkušenosti s Mutaforem. Na druhé straně uvádějí, že *Lactobacilová* probiotika se neosvědčila v prevenci rekurencí po operacích Crohnovy choroby.

Pro terapeutickou úplnost přikládáme tabulku 3 s nejčastěji používanými probiotiky od prof.

Nevorala [Nevoral 2012].

Tabulka 3 - Nejčastěji používaná probiotika

<b>Lactobacily</b>
L. acidophilus L. casei, spec. rhamnosus (Lactobacillus GG) L. casei Shirota L. delbrueckii subsp. bulggaricus L. reuteri L. brevis L. cellobiosus L. curvatus L. fermentum L. plantarum 299v
<b>Grampozitivní koky</b>
Lactococcus lactis subsp. cremoris Streptococcus salivarius subsp. thermophilus Enterococcus faecium S. diacetylactis S. intermedius
<b>Enterobakterie</b>
E. coli (serotyp O83:K24:H1) E. coli Nissle 1917 (serotyp O6:K5:H1)
<b>Bifidobakterie</b>
B. bifidum B. adolescentis B. animalis B. infantis B. longum B. thermophilum
<b>Kvasinky</b>
Saccharomyces boulardii

## 2.7 Mikroflora střevní v raném dětství <sup>[23]</sup>

Je již všeobecně známé a uznávané, že tzv. mikrobiální deprivace má v rozvinutých zemích za následek nevyváženost přirozené antigenní stimulace s důsledkem redukce expozice lipopolysacharidy. Probiotika mohou imunitní odpověď modifikovat. Aerobní a potenciálně anaerobní bakterie jakmile expandují, spotřebovávají kyslík a tím umožňují anaerobním kmenům dynamicky střevo kolonizovat (bacterioides). U novorozenců porozených císařským řezem je tato kolonizace opožděna. Ale laktobacily, které kyslík tolerují, nemusí být dokonce zachyceny během prvního měsíce života. Mnohdy může být dokonce zdrojem kolonizace střevní flóra matky. Nejintenzivnější kolonizace je v prvních měsících života. Se sliznicemi asociovaný imunitní systém (MALT, Mucosa associated lymphoid tissue). Nutno podotknout, že v anatomické lokalitě zažívacího traktu se označuje zkratkou GALT (Gut associated lymphoid tissue). Jak známo, normální mikroflora zabráňuje adhezenci a invazi patogenů přes epiteliální bariéru a také střevo se podílí tvorbou mucinu na nespecifické obraně organismu. Buněčná spojení epitelové bariery jsou regulována neuropeptidy.

Mechanismů přirozené imunity se zúčastní fagocytující buňky (makrofágy, neutrofilů, dendritické buňky), jež svými cytokiny regulují zánětlivou odpověď. Signál nebezpečí rozeznávají TLR – like receptory. Antigeny ze střevního lumen transportují M buňky. Dendritické buňky prezentují antigeny T lymfocytům. Tyto jsou právě významné v indukci tolerance v interakci s regulačními T-lymfocyty. Právě produkce IL -10 a TGF-beta vede k aktivaci regulačních T lymfocytů a k indukci orální tolerance [Barnes 2009].

Současně však patogenní mikroorganismy stimulují dendritické buňky k vyzrání. Humorální složku specifické imunitní reakce na sliznicích představují především sekreční IgA protilátky.

Distribuce struktur GALT je především v Peyerských plátech. Unikátní český kmen E.coli O83:K24:H31 se vyznačuje vysokou adhesivní schopností díky fimbriím typu 1, dokáže sliznici osídlit a střevní flóru normalizovat. Jeho bezpečnost a imunomodulační aktivita byla testována na bezmikrobních modelech. Je jisté toto možné prodloužit i na atopickou populaci. Z imunologického hlediska a fenomenu orální tolerance je vhodné preventivní podání včas, dokud ještě není slizniční tolerance prolomena [Thon 2010, Parracho 2007, Saavedra 2007].

## 2.8 Připomínky k hladinám imunoglobulinů v dětské populaci

Podle prací Zavázala ze šedesátých let 20. stol. se hodnoty IgG pohybovaly v hodnotách dospělých, IgM až kolem 6. měsíce dosahoval hodnot dospělých, IGA neměl detekovatelné hladiny. IgE po narození v dané skupině měl těžko detekovatelné hodnoty. Obsah IgE v novorozenecko kojeneckém období mnohdy stoupal, znamenalo to, že tvorba tohoto imunoglobulinu mohla začít již v době před porodem. Dosahovala vrcholu v časně dospělosti a poté opět mnohdy klesla. Obsah tohoto imunoglobulinu jde paralelně s vývojem dispozice k atopickým onemocněním. V práci byly patrné velké směrodatné odchylky při malém počtu vyšetřených.

Hladina IgA byla nulová a začala se objevovat až kolem 14. dne života. Hodnoty dospělých byly dosaženy nejdříve u IgM a to do konce prvního roku života. Hladiny IgG dosáhly 94% hodnot dospělých ve věku 3 let a v témže období hodnoty IgA dosáhly 67 % hodnot zdravé dospělé populace.

## 2.9 Imunoglobulin IgE [24]

Je typ protilátek, který se vyskytuje jenom u savců. Je produkován plazmatickými buňkami a následně se váže na povrch basofilů, mastocytů a eosinofilů. Hraje hlavní úlohu při vzniku alergií. Má relativní molekulovou hmotnost 197000 s poločasem katabolismu v séru 2-3 dny. IgE vázané na receptorech žírných buněk ale přetrvává i několik měsíců [Lochman 2002].

Syntéza je ovlivňována T lymfocyty, interleukinem 4 a genetickým vybavením jedince. Tvoří asi 0.004 % celkových imunoglobulinů. Hraje roli v patogenezi přecitlivělosti 1. typu.

V Acta Scandinavica je uváděno v minulosti - syntéza IgE v embryonálním stadiu byla bezpečně prokázána již od 11. týdne. Proto hladina IgE v pupečnickové krvi a u novorozence je výslednicí vlastní produkce a nikoliv pasivního přenosu. To odráží také zkušenost, že hladiny i u novorozence a matky nijak nekorelují a že už v pupečnickové krvi je značné množství lymfocytů nesoucích IgE molekuly. Stanovení IgE v pupečnickové krvi i u novorozence nemá ovšem jen teoretický význam pro poznání životní dynamiky IgE. Má totiž především nepříznivý prognostický význam pro ohrožení atopií v dalším období několika let a to v případě, jestliže obsah IgE překračuje o dvě směrodatné odchylky nad stanovený normální průměr.



## 3 Probiotika

- racionální využití probiotik
- potravinová alergie a orální tolerance
- probiotika a IgA
- IgE, faktory alergie
- probiotika, imunomodulace
- non – pathogenic E.coli
- rizikové faktory atopie v dětství
- charakteristika probiotik
- využití probiotik v praxi
- shrnutí využití probiotik v pediatrii
- doplňková imunomodulace v pediatrii

### 3.1 Prvé realizované experimentální studie s perorálním osídlením [25]

Nahrazení přirozeného, leč náhodného osídlení střeva cíleným osídlením probiotickým kmenem *E.coli* s výhodnými vlastnostmi snížilo u nedonošených dětí významně počet nosokomiálních infekcí.

Ještě údajně po 10 letech byl u této skupiny prokázán nižší výskyt opakovaných infekcí (23 %) než u dětí kontrolních (58 %). Cílené osídlení po narození kmenem *E.coli* mělo též dlouhodobý vliv na výskyt alergických onemocnění – významně nižší počet byl prokázán po 10 a 20 letech (12 % po 10 letech, 16 % po 20 letech) u osídlených dětí. A u kontrolních dětí 33 % po 10 letech a 32 % po 20 letech. Výsledky jsou v souladu s údaji ve světové literatuře o významu střevní flory, která je důležitým modulátorem vývoje imunitních funkcí. Tato zpráva však neodpovídá současným tendencím medicíny založené na důkazech. Vychází z dotazníkové akce na pacienta 10 a 20 let po narození, odpovídají laici. Nelze zmapovat výtěžnost podle místa bydliště před 10 a 20 léty, když je nám známo, jak často lidé mění bydliště. Odpovědi laiků na zdravotnické otázky jsou však velmi zavádějící, zvláště když odpovídají na jejich problematiku z novorozeneckého a raného školního věku! Lidé mnohdy nevědí, co bylo v minulém roce.

U bezmikrobních zvířat chybí indukce vývoje tolerance. Specifické kmény střevní mikroflory podporují ochranu hostitele proti senzibilizaci. Po obnovení střevní flory (avšak pouze stane-li se tak v neonatálním období), obnoví se vnímavost Th1 a Th2 odpovědi k orální indukci tolerance [Sudo 1997].

Ontogeneze alergické slizniční odpovědi není dosud plně objasněna. Ovlivněna je kojením, aktivací dendritických buněk, které představují primární antigen prezentující buňky a za třetí determinující úlohou cytokinů. Fetální Th2 cytokiny u zdravých dětí rychle klesají v průběhu prvního roku života, avšak u alergických dětí jejich hladina stoupá [Jones 2000].

#### **Dítě donošené je vybaveno:**

- 1. transplacentárně přenesenými protilátkami od matky
- 2. humorálními a celulárními ochrannými složkami mateřského mléka
- 3. plně vyvinutým vlastním imunitním systémem

U nedonošených pomáháme probiotiky, což jsou mono nebo smíšené kultury živých mikroorganismů, které kladně působí na hostitele vytvářením vyrovnaného a správného složení střevní mikroflory.

Kmen *E.coli* byl ve stolici sledovaných dětí v naprosté převaze po dobu 16 týdnů. Přítomnost kmene ve stolici vyvolala lokální imunitní odpověď. IgA protilátky ve filtrátech stolice přítomny. Časná indukce vlastní tvorby sekrečního IgA je u těchto dětí zvláště významná, protože nahrazuje chybění tohoto imunoglobulinu obsaženého v MM.

Pomocí dotazníků obsahujících 18 otázek byl zhodnocen výskyt opakovaných infekcí a alergických onemocnění po 10 a po 20 letech.

### 3.2 Racionální užití probiotik v pediatrii [26]

Po narození je gastrointestinální trakt osidlován bakteriemi z porodních cest a trávicího traktu matky za podpory oligosacharidů mateřského mléka (prebiotik). Tyto podporují růst probiotických bakterií.

Probiotické bakterie jsou nacházeny i v mateřském mléce, jak dokumentují práce z poslední doby. Účinek probiotik je udáván v několika oblastech.

- normalizace střevní flory, která spočívá ve zvýšení odolnosti k patogenům a úpravě střevní flory při poruchách motility,
- imunomodulační působení, které spočívá ve vlivu na snížení manifestace alergií (atopická dermatitis, potravinové alergie), nespecifické střevní záněty, rozvoj imunity v novorozenecko-kojeneckém věku
- metabolické účinky produkce enzymu laktázy a tím lepší tolerance mléčných výrobků, produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem. Je popisovaná i odlišná střevní flóra u kojenců s nadváhou.
- prevence a terapie průjemových onemocnění, především virové etiologie
- příznivý účinek na redukci postantibiotického průjmu
- evidentní vliv na snížení výskytu nekrotizující enterocolitidy u nedonošených dětí
- příznivý účinek u ulcerosní proktokolitidy
- studie prokazující účinnost probiotik v prevenci respiračních onemocnění

### 3.3 Potravinová alergie <sup>[27]</sup>

Může být zprostředkována protilátkami typu IgE, ale také buněčnou opožděnou reakcí i imunokomplexy. Uvádí údaje o vyšším výskytu pylové alergie u lidí narozených přímo do pylové sezony. Projevy mohou být orgánové i systémové. PA alergii můžeme rozdělit z hlediska patofyziologického – imunopatologická reakce 1. typu, kdy pacient si vyrábí více alergických protilátek typu imunoglobulinu E, která po setkání s příčinným alergenem vyvolá klasické cesty aktivace alergického zánětu. Vyplavují se mediátory časně i pozdní fáze. Složitější je situace u těch mechanismů, kde IgE zprostředkovanou přecitlivělost nenacházíme, a přesto následný proces splňuje všechna kritéria alergického zánětu. V těchto případech je nositelem antigenní specifity buněčná imunita reprezentovaná především T lymfocyty. Jedná se o čtvrtý typ imunopatologické reakce. Není možné opomenout ani možnou existenci specifických protilátek třídy IgG s tvorbou imunokomplexů. IgE mediovanou alergii prokazujeme kožními testy nebo přímým průkazem specifických IgE v laboratoři, je diagnostika non – IgE alergie velmi obtížná. Často je indikován preventivní preparát v perorální formě (Nalcrom). Preventivně se používá Hylak.

## 3.4 Diagnostický algoritmus potravinové alergie v dětském věku [28]

### Diagnostický algoritmus potravinové alergie

- stanovení specifických IgE
- kožní prick testy
- epikutánní atopické patch testy
- diagnostická eliminační léčba
- orální expoziční zátěžový test

#### 3.4.1 Klinické příznaky potravinové alergie

**gastrointestinální:** průjem, zácpa, nechutenství, dyspeptický syndrom, bolesti břicha, sideropenická anaemie, enterorhagie, MAS, aft. stomatitida, orální alergický syndrom, gastrooesophageální reflux, mapovitý jazyk

**kožní:** urticarie, atopická dermatitida, erytém, purpura, dermatitis herpetiformis Duhring, recidivující exantémy

**respirační:** rhinoconjunctivitis, laryngo a bronchospasmus, kašel, hemoptýza, Quinckeho edém, otitis, anafylaktická reakce

méně časté příznaky potravinové alergie: artralgie, migréna, vulvovaginitida,

**dále:** laktulozo-manitolový test  
eosinofilní kationický protein v séru  
histamin v séru  
tryptáza ve stolici  
IgE ve stolici

## 3.5 Potravinová alergie v dětském věku [29]

U dětí do 3 let je postiženo asi 8 % dětí. Nežádoucí reakce je možné rozdělit do dvou skupin. První je podmíněna imunologickými mechanismy. Druhá se rozvíjí bez účasti imunitního systému. Alergie může být zprostředkována protilátkami IgE (I. typ), tak protilátkami IgG, IgA a imunokompetentními buňkami, jako je tomu u II., III., a IV. typu přecitlivělosti. Do této druhé skupiny jsou řazeny reakce zprostředkované neimunologickými mechanismy. Tyto reakce se zařazují pod pojem potravinová intolerance. V prvních 6 měsících života je riziko senzibilizace dítěte dosti značné. Je dáno nízkou hladinou trávicích enzymů v zažívacím traktu, nezralým slizničním imunitním systémem s nedostatečně vyvinutou schopností tzv. orální tolerance a relativně neomezenou absorpcí makromolekul ze střevního lumina [Kniker 1999].

Slizniční orální tolerance je aktivní proces probíhající v oblasti slizničního imunitního systému. Jde o specifickou inhibici imunitní odpovědi po jejím předchozím navození kontaktem určitého antigenu s regulačními buňkami T, usídlenými v oblasti sliznice střeva. Na sliznici dýchacích cest k indukci tolerance nedochází, v této oblasti vyvolá stejný antigen aktivaci, tedy obrannou odpověď. Tolerance

je jedna z aktivních funkcí imunitního systému zprostředkovaná supresorovým mechanismem a realizovaná prostřednictvím inhibičně působících lymfokinů, produkovaných regulačními lymfocyty T. K prolomení orální tolerance a tím i k manifestaci alergie dochází vzácně.

### **3.6 Probiotika a slizniční IgA [30]**

Všeobecně uznávaný je antiinfekční efekt probiotik a zásadním mechanismem může být stimulace nespecifické imunity. Bifidobakterie byly podávány 7 zdravým japonským dětem ve stáří od 15 do 30 měsíců po dobu 21 dnů. Podávaný kmen byl detekován ve stolici v 71 % a také totální fekální bifidobakterie byly zvýšeny. Fekální hladiny celkového IgA a anti-polioviru IgA během příjmu formule byly také výrazně vyšší. Sekreční imunoglobulin A hraje důležitou roli v lokální imunitě a tvoří součást obrany proti infekci patogeními bakteriemi nebo viry.

O stimulaci IgA bifidobakteriemi informovali jiní autoři [Yasui 1992]. Bifidobakterie se uplatňují u akutního průjmu, rotavirové infekce. V testech na zvířatech informují autoři [Perdigon 1986 a 1990], o aktivaci makrofágové aktivity u myši. Stimulují protilátkovou odpověď na specifické antigeny.

### **3.7 Environmentálně rizikové faktory vývoje atopie u dětí [31]**

Faktory vnitřního prostředí (alergeny roztočů a zvířat, plísni)

Faktory vnějšího prostředí (polinosis, ovzduší, kouření)

Faktory související s mikrobiální stimulací (RS, atypické pneumonie)

Dietní faktory (proteiny kravského mléka)

Zjistili pozitivní asociaci mezi kontaminací placenty organochlorovými sloučeninami a zvýšením IgE v pupečnickové krvi ve SR.

Alergeny vnějšího prostředí: extrémně vysoké koncentrace pylu břízy v minulosti ve Švédsku měly za následek dvojnásobný nárůst senzibilizace na alergen břízy. Měsíc narození v souvislosti se sezonou pylovou může ovlivňovat riziko atopických chorob. U dětí s pravidelnými kontakty s polnohospodářskými zvířaty je nižší prevalence atopie. Také již tehdy strava bohatá na probiotika snižovala riziko atopie v dětství. Nízká konzumace rybího oleje se ukázala jako rizikový faktor asthmy. Děvčata, která se stala obézní mezi 6-11 lety měla až 7 násobné riziko asthmatu.

Mnohé studie ukázaly, že k ovlivnění vývoje imunitního systému může dojít již intrauterinně, kdy některé alergeny a škodlivé látky mají schopnost procházet placentou. Za kritické období, kdy vlivem vnějších faktorů může dojít k imunologickým změnám a následnému vývoji atopie, se považují prvé měsíce života.

Moderní příbytky vytvářejí vhodné podmínky pro rozmnožování domácích roztočů, plísni a akumulaci alergenů a toxinů. Studie ukázaly, že více než 65 % dětí nad 3 roky je alergických na bytové alergeny. U dětí s pravidelnými kontakty se zvířaty byl pozorován protektivní vliv v přítomnosti psa a kočky v domácnosti.

### **3.8 Role časné výživy pro ustanovení vyvážené slizniční imunity zažívacího traktu <sup>[32]</sup>**

Není doporučováno vyhýbat se alergenům v době těhotenství. Doporučuje se výlučné kojení po dobu 4 měsíců. Zavádění příkrmů mezi 4.-6. měsícem. Když nelze kojit, doporučují extensivně nebo částečně hydrolisované formule. Z pokynů roku 2008 nedochází k omezování alergenů jak u matek v době těhotenství, tak u kojenců. Doporučováno kojení po dobu 4 měsíců. Zdrojem probiotických bakterií je matka. K osídlení dochází v porodních cestách a později se uplatňuje mateřské mléko. Velmi důležitým jevem je navození orální tolerance, při které dochází k tomu, že se imunitní systém naučí reagovat na naši střevní mikrofloru a na potravinové alergeny. Tento jev se navodí v prvním půlroce života a pro jeho správný průběh je nutná stimulace imunitního systému, na které se probiotika podílí. V případě, že není možné kojit, je nutné zajistit v prvních 6 měsících pro slizniční imunitu co nejšetrnější stravu s prokázanou hypoalergenicitou. Pro prevenci alergie je odůvodněné přidávání probiotik do hydrolyzovaných formulí.

### **3.9 Možné příčiny nárůstu alergie**

Statistiky WHO ukazují, že mezi 20.-21. stoletím nastal u chorob dýchacích cest přesun od přenosných k nepřenositelným. Na kongresech patří problematika „hygienické hypotézy“ k trvalým bodům programu [Špičák 2005]. Objevila se pozorování, toto potvrzující, jako je počet dětí, ochranný vliv expozice k mykobakteriím, o významu střevní flory, zrání imunitního systému, protektivní vliv spalniček a hepatitidy A [Hoffjan 2004]. Tomu odpovídal nízký počet alergiků v prostředí zemědělských farem s kontaktem se zvířaty v raném věku [Strachan 1989]. Zdůrazňuje se úloha regulačních T lymfocytů.

Někteří autoři [Platts-Mills 2005] se domnívají, že se musí uvažovat o třech variantách (hypotézách) příčin nárůstu astmatu a alergie:

1. zvýšená expozice celoročně působícím alergenům
2. změny imunologické odpovědi v důsledku zmenšení bakteriálního břemene zvýšeného používání antibiotik, rozvojem očkování, vlivem vystupňované hygieny (přesuny od Th1 k Th2 vlivu)
3. ztráta respiračně specifického ochranného účinku (výživa, životní styl)

Většina alergologů se domnívá, že se zúčastní všechny tři mechanismy.

- A. hypotéza o vlivu expozice k celoročně působícím alergenům je nutné uvádět, že pobyt v interiérech se prodloužil, mění se teplotní a vlhkostní podmínky, mění se vybavení nábytkem, textiliemi, v bytech se zvyšuje přítomnost zvířat i kuřáků. Sensibilisace k alergenům roztočů a trav, která se vyvine již v období prvních let života, se projeví zvýšeným rizikem astmatu v tomto období. U domácích zvířat jsme svědky velmi odlišných výsledků, kdy toto v některých případech může navodit specifickou toleranci, ale neovlivňuje senzibilizaci k jiným např. roztočovým alergenům.

- B. hypotéza změny imunologické odpovědi. Sklon k senzibilizaci je geneticky závislý, senzibilizace sama se nemusí ještě klinicky projevit. Ale při expozici inhalovaných endotoxinů v raném věku a v nízkých dávkách se pozorovala nižší prevalence alergie asthmatu a alergické rýmy. Možná je zde úloha T regulačních lymfocytů.
- C. hypotéza ztráty respiračně – specifického ochranného účinku: přednost počítačům před sportem. Dále sem patří těhotenství ženy starší let, antibiotika v prvním roce života a život v blízkosti velkého dopravního zatížení.

**Alergologové se domnívali v daném roce (2005), že významné údaje budou přinášet studie o významu slizniční imunity a jejího imunomodulačního vlivu. V návaznosti na toto se snažíme předložit názory na využití i efekt probiotik z nejrůznějších klinických studií a zdůraznit tak širší současného pohledu.**

### **3.10 Probiotika a prebiotika <sup>[33]</sup>**

Horní část zažívacího ústrojí je poměrně sterilní, v tlustém střevě je bakterií velké množství. U starších dětí a dospělých je možné v tlustém střevě nalézt až 500 bakteriálních kmenů. Během nitroděložního života je prostředí novorozence sterilní. Osídlování začíná v okamžiku protržení vaku blan.

Hlavním zdrojem mikroflory pro dítě je matka (vaginální a fetální mikroflora). Osídlení ovlivňuje mikroflora matky a způsob porodu tj. vaginální porod nebo císařský řez, při kterém je osídlování zpožděno asi o 10 dní. O měsíc později osidlují zažívací trakt laktobacily a bifidobakterie. Kde je vysoká úroveň porodnic, může být přenos ochranné mikroflory omezený. Složení střevní mikroflory je významně ovlivněno způsobem výživy. U novorozenců, kteří jsou výlučně kojeni, je intestinální mikroflora složena z 90 % bifidobakterií a laktobacilů. Bifidogenní faktor je prakticky oligosacharid v mateřském mléce.

Vlivem jeho účinku je mikroflora s převahou laktobacilů a bifidobakterií vytvořena během jednoho měsíce. Vytvořená kyselina mléčná přispívá k tvorbě prostředí, ve kterém tyto dobře rostou, což trvá přibližně do 2 let. Fyziologická funkce normální střevní mikroflory spočívá v ničení patogenních bakterií, inhibici bakteriální adheze a konzumací živin pro růst patogenů. Právě tímto působením na střevní lymfatickou tkáň v prvních měsících života přímo reguluje systémovou i lokální imunitní odpověď, včetně odpovědi na antigeny mikroorganismů a potravinové antigeny. Tyto mikroorganismy pomáhají vytvořit rovnováhu mezi Th1 a Th2 imunitní odpovědi a stimulují navození tolerance pravděpodobně prostřednictvím stimulace dalších podtříd T pomocných buněk produkujících transformující faktor beta (TGF beta a interleukin 10 (IL10)). Vhodné osídlení vede také k urychlené tvorbě sekrečního IgA.

Obohacením kojeneckých přípravků směsí oligosacharidů se střevní mikroflora blíží mikroflorě kojených dětí.

#### **3.10.1 Charakteristiky probiotik**

- schopnost kolonizace, adherence
- antagonistický vliv na patogenní floru
- schopnost tvorby antimikrobiálních substancí

- schopnost imunomodulace

### 3.10.2 Mikrobiologické bezpečnostní požadavky

- humánní původ
- netoxické a nepatogenní
- geneticky stabilní
- schopnost přežít, růst a být metabolicky aktivní v trávicím ústrojí příjemce
- potenciálně rezistentní proti antimikrobiálním substancím původní mikroflory příjemce
- rezistentní proti žaludeční kyselině a žlučovým kyselinám
- možnost přesného taxonomického zařazení

### 3.10.3 Průmyslové parametry

- stabilita žádaných vlastností během výroby, transportu a skladování
- příznivé organoleptické vlastnosti

### 3.10.4 Mechanismus působení

Probiotika jsou směsné kultury nebo monokultury živých mikroorganismů, které po aplikaci prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením vlastností jeho vlastní mikroflory. Mikroorganismy používané jako probiotika jsou humánního původu s jedinou výjimkou kvasinky *Saccharomyces boulardii*.

Povrch zažívacího ústrojí kolem 200m<sup>2</sup>. Zažívací ústrojí dospělého člověka obsahuje 10<sup>14</sup> živých bakterií. Po SC je osidlování zpožděno asi o 10 dní. Téměř o jeden měsíc později osidlují zažívací trakt laktobacily a bifidobakterie. Hovoříme o prebiotické funkci mateřského mléka. Tento bifidogenní faktor je tvořen oligosacharidy. Fyziologická funkce normální střevní mikroflory je součástí obranného mechanismu, který spočívá v kompetitivní inhibici bakteriální adheze patogenních bakterií na sliznici zažívacího traktu, v syntéze sloučenin, které inhibují a ničí patogenní bakterie a v kompetitivní konzumaci živin potřebných pro růst patogenních mikroorganismů.

## 3.11 Využití probiotik v pediatrii <sup>[34]</sup>

Mečnikov prokázal, že některé mikroorganismy jsou schopné v experimentu stimulovat růst *Vibrio cholerae*, zatímco jiné mají opačný účinek. Dával do souvislosti dlouhověkost bulharských horalů s jejich pravidelnou konzumací fermentovaných mléčných produktů.

Střevní mikroflora se dělí na složku stálou, autochtou a přechodnou. Během těhotenství je GIT trakt sterilní. Dále pak jen z porodních cest a z okolí po S. Caesarea. Byl zaveden pojem bioterapeutické agens. Je otázka, zda je možno mezi probiotika řadit subcelulární složky bakterií, např. části bakteriální stěny.



### **Klinické využití probiotik musí splnit:**

- organismy musí být připraveny a skladovány i podávány v živé formě
- musí být bezpečné při podávání ve vysokých dávkách
- musí přežít v GIT traktu, zejména rezistence k žaludeční kyselině, žluči a pankreatickému sekretu
- musí být rezistentní k většině podávaných antibiotik
- klinický efekt by měl být multifaktoriální, např. inhibice adheze patogenů, působení jako antibakteriální substance, imunomodulace působením na toxiny nebo jejich receptory, kompetice o živiny s patogenními kmeny.
- bakterie střevní mikroflory produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem a hrají roli v syntéze vitaminů B, K

Mimo nejruznější sledované efekty u dospělých se předpokládá, že některé bakteriální kmeny jsou schopné modifikovat aktivitu fagocytů a snížit aktivitu Th2 lymfocytů. Výsledkem je snížení sekrece IgE. Velmi málo popsanych vedlejších příznaků u extrémně oslabených jedinců - případy katetrových sepsí u pacientů léčených S.boulardii.

## **3.12 Využití probiotik v pediatrii v návaznosti na vliv na střevní mikroflóru [35]**

V roce 1965 Lilly a Stilwell poprvé definovali probiotika jako faktory, které jsou produkovány mikroorganismy, a které mají příznivý účinek na podporu růstu zvířat. Zvířata živěná zakysanými mléčnými výrobky, které tyto faktory obsahovaly, byla celkově zdravější a lépe rostla. V roce 1974 použil Parker termín probiotika pro organismy a substance, které mají příznivý vliv na střevní mikroflóru. V současnosti můžeme probiotika definovat jako mono či polykultury živých mikroorganismů, které mají příznivý účinek na mikrofloru člověka.

Mezi probiotika patří především některé mléčné bakterie, většinou 3 skupiny: Lactobacillus, Bifidobacterium a Streptococcus. V každé skupině jsou specifikovány různé druhy bakterií, které se navzájem potencují. K prvnímu osídlení dochází při porodu dítěte. V trávicím traktu musí mikroorganismy překonat bariéru, kterou tvoří kyselé prostředí žaludku. Za žaludkem vytváří tzv. střevní mikrofloru. Spontánně porozené a kojené dítě je osidlováno především bifidobakteriemi. Mikrofloru tvoří více než 500 druhů bakterií. V souvislosti s mikroorganismy hovoříme i o mikrobiomu [Turnbaugh 2007]. Tato se mění fyziologicky s věkem a s onemocněními. Probiotika iniciují aktivaci některých genů lokalizovaných v buňkách [Walker 2006]. Perdigon [Perdigon 1999] hodnotil aktivaci imunitního systému po požití různých typů mléčných bakterií. Tato byla různá od stimulace humorální a celulární imunity až k indukci IgA. Účinek probiotických bakterií je pevně spojen s jejich metabolismem. Probiotika zlepšují trávení bílkovin a štěpení laktozy, modifikují toxiny [Szajewska 2006].

Probiotika se uplatňují v prevenci rozvoje nekrotizující enterokolitidy, k ochraně před průjmovými onemocněními, v prevenci rozvoje alergických onemocnění - střevní mikroflora iniciuje střevní lymfatickou tkáň, zvláště plasmocyty, navozují rovnováhu Th1 a Th2. Posilují imunoregulaci. Tvoří

mastné kyseliny s krátkým řetězcem, uplatňují se při intoleranci laktózy a u pacientů s hypercholesterolémií.

### **3.13 Výživa a alergie [36]**

Za rizikové faktory pro vývoj alergického onemocnění hned po narození je pokládána rodinná dispozice, vysoká koncentrace IgE v prvních týdnech života novorozence, snížení hladiny CD8T lymfocytů v jeho krvi a eosinofilie v krvi či nosním sekretu. V nálezech z pupečnickové krve je rizikovým faktorem zvýšená celková hladina IgE. Souvislost s hladinou IgE v séru matky ani v amniové tekutině prokázána nebyla.

Studovanými faktory jsou v současnosti u alergického asthmatu volné kyslíkové radikály. Antigenní podnět vede k uvolnění reaktivních kyslíkových radikálů. Pokud jsou tyto látky dále metabolizovány, dojde vlivem těchto produktů k poškození bronchiální sliznice.

### **3.14 Léčebné účinky probiotika Colinfant u extrémně nezralých [37]**

Podávání a účinky aplikace Colinfantu u nedonošených dětí prokazovala ve svém sdělení Sochorová. U novorozence se jako první objevují fakultativně anaerobní kmeny, hlavně kmeny E.coli. U kojených dětí postupně převládne bifidogenní flora. Sekreční IgA kolostra a mléka začne vykonávat svoji funkci, brání kontaktu a adhezi patogenních mikrobů na střevní sliznici. Mateřské mléko obsahuje specifické protilátky proti bakteriálním kmenům, které má matka ve stolici. Má-li dítě stejné bakteriální kmeny jako matka, je mléčnými protilátkami proti těmto kmenům chráněno. Situace je horší u nedonošených dětí, které mají omezený přenos protilátek od matky jak přímo, tak vlivem toho, že většinou nejsou kojené, jejich imunitní systém je nezralý. Častou aplikací antibiotik dochází k narušení složení střevní mikroflóry. Vzniká prostor pro uplatnění nosocomiální infekce. Proto nahradila přirozené, ale náhodné osídlení trávicích ústrojí cíleným perorálním osídlením nepatogenním kmenem E.coli, vakcínou Colinfant Newborn. Tento obsahuje lyofilizovanou suspenzi živých bakteriálních buněk nepatogenního kmene E.coli obsahem  $0,8 \times 10^9$  živých zárodků v jedné dávce přípravku. Přípravek podávala dětem, které se rodily v 29. týdnu gravidity s hmotností kolem 1200g. Snášenlivost preparátu byla velmi dobrá. Nebyla zaznamenána žádná intolerance. Přípravek byl podáván 3x v týdnu. Významný statistický rozdíl byl ve spotřebě antibiotik, u dětí se zkrátala doba hospitalizace. Neobjevily se nekrotizující enterokolitidy.

### **3.15 Spektrum užití probiotik v pediatrii [38]**

V zažívacím traktu je prakticky 80 % imunologicky aktivních buněk z organismu.

Rozebrána jednotlivá probiotika a jejich hlavní účinky. Role střevní mikroflory u novorozenců a kojenců. Bifidobacterie a Lactobacily zvyšují produkci T helper buněk. Střevní bakterie zvyšují sekreční imunní funkci, zvláště sekreční imunoglobulin A je důležitým predominantním imunoglobulinem povrchu mucosální sliznice. Zařizuje protekci proti antigenům, potenciálním patogenům, toxinům.

Alterace střevní mikroflory u nemocí. Již po týdnu suplementace podávání bifidovských probiotik je patrné signifikantní zvýšení fekálních bifidobakterií. Tyto počty pak mnohdy dosahují počtů jako u kojených dětí. Bifidobakteria, Lactobacily, stejně dobře jako B.lactis vykazují zvýšení fagocyt. aktivity proti E.coli stejně dobře tak zvýšení aktivity přirozených zabíječů. Některé probiotické bakterie vykazují efekty na cytokinovou sekreci. Pokles fekálního alfa 1 antitrypsinu, močového eosinofilního proteinu X, TNF a dalších ukazují na regulační efekt na zánětlivé mediátory, zvláště u

děti s odlišnou zánětlivou nebo alergickou odpovědí. Tyto odpovědi jsou důležité pro vývoj imunní tolerance. Tehdy probiotika vedou k poklesu změn pro abnormální imunní hyperreaktivitu.

#### **Efekt na nespecifickou imunitu:**

- zvyšují mucinovou produkci
- inhibují růst potenciálních patogenů
- pokles střevní permeability
- zvýšení aktivity přirozených zabíječů, aktivity makrofágů a fagocytozy

#### **Efekt na adaptivní imunitu:**

- zvyšují sekreci IgA, IgG a IgM
- zvyšují totální a specifický sekreční IgA v séru a v intestinálním lumen
- moduluji zánětlivou imunní odpověď střevní

Nejlepší efekty sledovány u akutní diarhey s *L.rhamnosus* nebo bifidobakterie.

Rešerže nejznámějších publikací o aplikaci probiotik v dětském věku.

Table 4 - Probiotic clinical trials in infants and children: immune protective marker outcomes

reference	population	probiotics	protective immunity
Kaila 1992	infants rotaviral diarrhea	<i>L.rhamnosus</i>	↑total IgG,IgA,IgM ↑rotavirus spec.IgA
Saavedra1994	healthy inf.	<i>B.lactis</i>	↓rotavirus shedding
Isolauri 1995	healthy inf.	<i>L.casei</i>	↑rotavirus IgA
Fukushima 1997	healthy inf.	<i>B.lactis</i>	↑fecal bifidobacterie
Fukushima 1998	healthy	<i>B.lactis</i>	↑total fecal IgA
Gupta 2000	Crohn	<i>L.rhamnosus</i>	↓intestinal permeability
Cukrowska 2002	preterm infants	<i>E.coli Nissle</i>	↑anti- <i>E coli</i> Nissle,IgA,IgM
Kirjavainen 2002	atopic infants	<i>B.lactis</i>	↑fecal lactobacilli ↓fecal bacteroides
Mullie 2004	healthy infants	<i>B.breve</i>	↑antipolio fecal IgA
Rinne 2005	infants with risk atopy	<i>L.rhamnosus</i>	↑total IgA,IgM,IgG
Viljanen 2005	atopic infants	<i>L.rhamnosus</i>	↑fecal IgA
Bakker-Zierkzee 2006	healthy infants	<i>B.lactis</i>	↑fecal IgA
Kukkonen 2006	atopic infants	<i>L.rhamnosus</i>	↑number of infants with high anti-Hib IgG
Mohan 2006	preterm infants	<i>B.lactis</i>	↑fecal bifidobacterie

			↓ fecal enterobacteriaceae
Rautava 2006	healthy infants	B.lactis L.rhamnosus	↑ milk specific IgA
Stratiki 2007	preterm infants	B.lactis	improved intestinal permeability, ↑ Bifidobacterial count

Table 5 - Probiotic clinical trials in infants and children: reported immune modulatory outcomes

Majamaa 1997	atopic infants	L.rhamnosus	↓ fecal $\alpha$ -1 antitrypsin
Isolauri 2000	breastfed atopic infants	B.lactis	↓ serum sCD4
Pessi 2000	atopic infants	L.rhamnosus	↑ IL-10
Arvola 2002	atopic infants	B.lactis	↓ urinary eosinophil
Kirjavainen 2002	atopic infants	B.lactis	
Rosenfeld 2003	atopic infants	L.rhamnosus	↓ serum eosinophil cationic protein
Pohjavouri 2004	atopic infants	L.rhamnosus	↑ IFN- $\gamma$
Viljanen 2005	atopic infants	L.rhamnosus	↓ fecal $\alpha$ -1 antitrypsin
Fujji 2006	preterm infants	B.breve	↑ serum TGF- $\beta$ 1
Rautava 2006	healthy infants	B.lactis	↑ serum CD14

### 3.16 Přehled doplňkové imunomodulace v pediatrii [39]

Nespecifická imunostimulace se používá zejména v případech sekundárních poruch buněčné imunity. V praxi se s požadavkem nespecifické imunostimulace setkáváme nejčastěji u opakovaných infekcí dýchacích cest, i když dotazy pacientů se mohou týkat i alergických nebo onkologických onemocnění. Nespecifické imunomodulátory jsou velmi často látky, jejichž struktura odpovídá tzv. *s patogenem asociovaným molekulárním vzorům* (PAMPs – pathogen-associated molecular patterns). Tyto struktury jsou rozeznávány zejména složkami nespecifické imunity (makrofágy a komplement) receptory rozpoznávající vzory (PRR – pattern recognition receptor) [Chen 2007]. Podání těchto látek tak do určité míry mimikuje napadení organismu infekčním agens, ovšem bez průvodních patogenních projevů (nespecifická vakcinace) [Eyles 2007]. Protože se nejedná o protilátkovou imunitu, není zesílení imunitní odpovědi specifické jen vůči aktivátoru, ale vůči všem podnětům.

Beta-glukany patří k dalším přirozeným imunomodulátorům lidského imunitního systému. Vyskytují se zejména jako typická stavební složka bunčových membrán hub (Fungi).

Rostliny rodu Echinacea patřily mezi tradiční prostředky severoamerických indiánů používané při infekčních onemocnění. Obsahuje komplex různých látek s imunomodulačním působením [Spilková 2006].

Omega-3/omega-6 nenasycené mastné kyseliny

Polynenasycené mastné kyseliny jsou prekurzory vícerych mediátorů imunitního systému (prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny). Při jejich podávání se snižuje tvorba prozánětlivých mediátorů (TNF-alfa, IL-1), a dobré zkušenosti jsou proto pozorovány zejména při podávání u autoimunitních zánětlivých onemocnění (například revmatoidní artritida, lupus, ulcerativní kolitida, Crohnova choroba) [Calder 2008, Damsgaard 2007].

### **3.17 Mutaflor E.Coli – varianta pro dospělé <sup>[40]</sup>**

- antagonismus vůči patogenním zárodkům
- imunomodulace
- podpora normálního způsobu trávení a vyměšování
- fyziologicky jasně definovaný kmen E.coli
- fyziologická adheze colon
- apatogenita: neinvazivní, žádná tvorba enterotoxinů či cytotoxinů
- úprava prostředí, spotřeba kyslíku, snížení redox potenciálu, regenerace anaerobní flory
- ochrana anaerobní flory proti kyslíku
- podpora metabolismu kolonocytů
- fermentativní odbourávání uhlohydrátů
- kyseliny mravenčí, octové, propionové a máselné
- snížení hodnot pH
- živiny pro kolonocyty
- tvorba vitamínu K
- lyofilizované množení schopné esch.coli

Mutaflor otevření až v distální části tenkého střeva

### **3.18 Imunomodulace – historie <sup>[41]</sup>**

Snížil se antigenní tlak patogenních mikrobů. Dříve k ukojení hladu používali 500 druhů rostlin, dnes jen 50 druhů. Téměř nulová stimulace dozrávajícího imunitního slizničního systému u malých dětí. Slabý mikrobiální antigenní tlak.

Vliv probiotik na imunitní systém je klinicky doložen zejména v oblasti Th1 a Th2 lymfocytů, kdy je působením probiotik zesílena aktivita Th1 buněk a zeslabena aktivita alergií podporujících Th2 buněk. Stimulací Th1 buněk dochází ke zvýšení produkce Th1 cytokinů / (IL12, IL18, INF gama) v monocytech a v periferních mononukleárních buňkách charakteristických pro specifický imunitní

system. Probiotika nebo symbiotika jsou doporučována u nemocných v prevenci clostridiové kolitidy, při léčbě gastrointestinální alergie, u recidivující divertikulitidy i ulcerosní colitidy. Známe je využití v prevenci nekrotisující enterocolitidy u nedonošených novorozenců. Připravuje se využití při idiopatických střevních zánětech. Zkouší se využít synergie probiotik a B-glukanů.

### **3.19 Probiotika v primární prevenci [42]**

Ohodnotili efekt *Lactobacillus* na atopické nemoci. Podávali dané probiotikum budoucím matkám, které měly v poslední době atopický ekzém, alergickou rhinitis nebo asthma a postnatálně i po 6 měsících jejich novorozencům. Atopický ekzém byl jako hlavní ukazatel efektu terapie. Atopický ekzém byl diagnostikován u 35 % dětí ve věku 2 let tzn. 35 ze 132. Asthma bylo diagnostikováno u 6 a alergická rhinitida u jednoho. Frekvence atopického ekzému v probiotické skupině byla poloviční než v placebové skupině. *Lactobacillus* byl efektivní v prevenci včasného atopického onemocnění u dětí s vysokým rizikem. Kvalitní mikroflora je zdrojem přirozené imunomodulace. Gastrointestinální mikroflora podporuje potenciální antialergenní procesy: T helper 1 typ imunity, tvorbu transformujícího růstového faktoru Beta, který má důležitou roli v supresi T2 lymfocytů a indukci orální tolerance a za třetí IgA produkci. Závažnost ekzému hodnotili podle SCORAD indexu. Laktobacily zřejmě navyšují růstový faktor Beta a produkci interleukinu 10. Je popisována produkce anti IgE protilátek.

### **3.20 Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi [43]**

#### **3.20.1 Mechanismus působení bakteriálních imunomodulátorů**

Publikace z posledních let dokládají velmi příznivý vliv bakteriální antigenní stimulace na správný vývoj imunitního systému již po narození, např. působení nepatogenních kmenů *Escherichia coli* nebo *Lactobacillus*. Působením bakteriálních antigenů včetně antigenů obsažených v bakteriálních imunomodulátorech dochází ke zvýšené produkci interferonu gama ( $INF\gamma$ ) a selektivní aktivaci Th1 typu imunitní odpovědi.

Z výše uvedených skutečností celkem jednoznačně vyplývá, že bakteriální imunomodulátory vůbec nepatří k obsoletním léčebným přípravkům, které máme k dispozici v klinické praxi. Patří naopak k nejpřirozenějším modulátorům lidského imunitního systému. Liší se především zastoupením bakteriálních kmenů v jednotlivých přípravcích. Viz. tabulka 6. Bakteriální imunomodulátory se především uplatňují na sliznicích, se kterými přicházejí do kontaktu, aktivací nespecifických imunitních mechanismů.

Tabulka 6 - Bakteriální imunomodulátory na lékařský předpis

Název přípravku	Složení přípravku	Léková forma	Způsob aplikace	Indikace	Vlastní zkušenosti
Broncho-Vaxom	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella ozaenae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Neisseria catarrhalis</i>	Tobolky obsahující lyzáty minimálně 109 bakteriálních těl jednotlivých druhů Celkem 7 mg Pro děti poloviční dávka	10–30 denní kúra s následnou 3týdenní pauzou 1 tob. ráno nalačno	Prevence a léčba chronických a recidivujících infekcí dýchacích cest	Po základní 10denní kúře možno další kúry a pauzy upravit dle individuální odpovědávosti pacienta
Luivac	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Mechanická destrukce bakterií	Tablety obsahující lyzáty minim. 109 bakteriálních těl jednotlivých druhů Celkem 3 mg Stejná dávka pro děti i dospělé	1 tableta denně ráno nalačno ve 28denních kúrách s 28denními pauzami	Prevence a léčba recidivujících a chronických infekcí dýchacích cest	Po základní 28denní kúře je možno další kúry a pauzy volit dle individuální odpovědávosti pacienta
Ribomunyl	Směs glykoproteidů bakteriální stěny <i>Klebsiella pneumoniae</i> a směs purifikovaných ribozomů bakteriálních druhů <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sáčky nebo tablety Pro děti i dospělé stejná dávka Celkem 2 mg	1 tableta či sáček ráno nalačno 4 dny v týdnu v prvních 3 týdnech, následně týden pauza a pokračování 1× měsíčně 4denní kúrou	Prevence a léčba recidivujících a chronických infekcí dýchacích cest a středouší	Tablety je možno taky rozpouštět v ústech – nejlépe na noc před spaním
Uro-Vaxom	Purifikovaný extrakt <i>Escherichia coli</i>	Kapsle 6 mg	1 kapsle 10–30 dnů ráno nalačno	Doplňková léčba opakovaných moč. infekcí	U chronických infekcí možno podávat 90 dnů

## 4 Významné publikace o IgE a o probiotikách

Rautava, V., et al.: Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy - a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr.* 2009 Jun, 101, 11, 1722-1726.

Skupiny kojenců byly suplementovány uvedenými kmeny probiotik Lactob. rhamnosus a Bifidobacterium lactis v době od 2-12 měsíců. Ve skupině onemocnělo 22 % dětí dostávajících probiotika a 50 % ve skupině dostávající placebo a to v době od 2 do 12 měsíců. Sledovali otitis media a respirační infekty.

Fabrizio, P., et al.: Long term use of probiotics and synbiotics reduce the incidence and severity of respiratory diseases during the cold season. *Carcinogenesis.* 2008, May, 29, 5, 1049-1056.

Autoři se rozhodli dát během zimních měsíců novou šanci dětem ve věku předškolním a zjistili, že při 4 roky po sobě podávaných probiotikách byly statisticky podstatně zdravější a průběh onemocnění byl lehčí.

Bonnelykke, K., et al.: Transfer of maternal IgE can be a common cause of increased IgE levels in cord blood. *Journal of allergy and Clinical Immunology.* 2010, 126, 3, 657-663.

Polovina testovaných dětí podle autorů měla zvýšené IgE v krvi od matek. Domnívají se, že je třeba v diferenci jiných vyšetřovacích metod.

Naše poznámka: k odlišení vždy používáme současně vyšetřovaného IgA v pupeční krvi, které musí být jen v nedetekovatelných hodnotách, abychom vyloučili příměs krve od matky.

Ferguson, A., et al.: Elevated cord blood IgE is associated with recurrent wheeze and atopy at 7 years in a high risk cohort. *Pediatric Allergy and Immunology.* 2009, Vol.20, 8, 710-713.

V práci 19 % novorozenců mělo vyšší hodnoty pupečnickové krve. Atopie matky a porod v zimních měsících v době infekcí byl rizikovým faktorem. Hodnota pupečnickového IgE byla v signifikantní asociaci s alergickou sensibilizací a s dráždivým hvízdavým kašlem v 7 letech věku.

Peters, JL., et al.: Prenatal negative life events increases cord blood IgE: interactions with dust mite allergen and maternal atopy. *Allergy.* 2012, Vol.67, 4, 545-551.

Prenatální expozice stresu a vzdušným alergenům mohou modulovat fetální imunitní systém, zvláště přítomnost prachu. Vyšetřili spojitost mezi mateřským prenatálním stresem a pupečnickovou krví a 403 novorozenců matek zařazených v astmatické komunitě. Výrazný prenatální mateřský stres byl statisticky významně asociován se zvýšením hodnot pupečnickového IgE. Stejně tak stres a přítomnost prachu byla statisticky významně odlišena pro děti atopických a neatopických matek.

Bergmann, RL., et al.: Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history. *Clin Exp Allergy.* 1997, 27, 752-760.

Bylo vyšetřeno 1314 novorozenců od roku 1990 po dobu 2 let. 499 mělo anamnesticky vysoké riziko atopie i hodnotami IgE v pupečnickové krvi. Zjistilo se, že 31 % kojenců bylo sensibilisováno proti



jednomu z potravinových nebo inhalačních alergenů a toto bylo v signifikantní asociaci k hodnotám IgE z pupečnickové krve. Nelze zatím nalézat spojitosti pro primární prevenci.

Kimpen, J., et al.: Cord blood IgE and month of birth. *Arch Dis. Child.* 1987, 62, 478-482.

Analyzovali 5353 vzorků pupečnickové krve na hodnoty IgE. Nejvyšší hodnoty IgE nalezeny ke konci dubna a koncem října.

Nabavi, M., et al.: Factors associated with cord blood IgE levels. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology.* 2013, 31, 2, 157-62.

Vycházeli ze zodpovězení otázky, zda hodnoty pupečnickového IgE jsou prediktorem alergické dispozice u dětí. Není stále dobře známo, jak tento marker ovlivňuje fetální vývoj. Vyšetřili celkem 181 novorozenců a jejich matek. Zjistili, že přítomnost nějakého druhu alergického onemocnění u matky nebo v její rodině a zvýšení hodnoty mateřského IgE jsou v asociaci s pupečnickovým IgE u novorozence. Věk matky a kouření, sezonnost doby porodu jsou pravděpodobní prediktoři alergie.

Sternthal, MJ., et al.: Associations among maternal childhood socioeconomic status, cord blood IgE levels and repeated wheeze in urban children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011, Vol. 128, 2, 337-345.

Nízké sociálně ekonomické postavení matek bylo v přímé relaci ke zvýšeným hodnotám pupečnickového IgE. Nebylo však v přímé souvislosti po stránce medicínské. Pravděpodobně pobyt matek, budoucích rodiček ve velmi znečištěném prostředí přispívá k porodům dětí s vysokými hodnotami pupečnickové krve.

Herr, CE., et al.: Exposure to air pollution in critical prenatal time windows and IgE levels in newborns. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011, 22, 75-84.

Kuitunen, M., et al.: Probiotics prevent IgE –associated allergy until age 5 years in cesarean-delivered children but not in the total cohort. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009, Feb. 123, 2, 335-341.

Málo mikrobiální expozice ve včasném dětství je spojeno s větším kvantem alergií v pozdější době. Alergické děti mají fekální mikroflóru s redukcí lactobacillů a bifidobakterií. Ve studii vybrali 1223 matek s vysokými alergiemi, u kterých v posledních měsících gravidity podávali probiotickou mixturu a stejně tak těmto novorozencům po dobu prvních 6 měsíců života. Nebyl pozorován žádný efekt při perinatální suplementaci ani při postnatální suplementaci, pokud kontrola byla prováděna v 5 letech věku. Ale u dětí s IgE asociovanými alergiemi a narozených císařským řezem byl efekt probiotik popisován. 24% : 40 % výskytu alergií u dětí nedostávajících probiotika.

Arroyo, R., et al.: Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases.* 2010, 50, 12, 1551-1558.

Probiotikum *L.fermentum* a *L.salivarius* jsou v léčbě mastitis úspěšnější během trvající laktace než antibiotika

Savino, F., et al.: Molecular identification of coliform bacteria from colicky breastfed infants. *Acta Paediatrica*. 2009, 98, 1582-1588.

Porovnávali skupinu kojenců s kolikami a skupinu stejného počtu (40) zdravých kojenců. Ve skupině s kolikami našli daleko se častěji vyskytující kmeny clostridií.

Lee, J., et al.: Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J. Allergy Clin Immunol.* 2008, 121, 116-121.

Efekt je ve více než 10 studiích patrný více v prevenci než v léčbě pediatrické atopické dermatitidy a to většinou ve skupině s vyššími hodnotami pupečnickového IgE.

Amrahamsson, TR.: Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2007, 119, 1174-1180.

Ačkoliv preventivní efekt není u probiotik potvrzen, léčené děti mají nižší hodnoty IgE i s tím asociovaného ekzému a zřejmě tím i redukované riziko vývoje respiračního onemocnění.

V prevenci ekzému byl u dětí s rodinnou historií ekzému podáván *Lactobacillus reuteri*. Do studie bylo vzato 232 rodin s alergickým onemocněním. Léčené děti měly méně nálezů s IgE asociovaným ekzémem pod 2 roky života a zřejmě i toto podávání prospělo k redukcii pozdějšího vývoje alergických onemocnění.

Edenharter, G., et al.: Cord blood-IgE as risk factor and predictor for atopic diseases. *Clin Exp. Allergy*. 1998, 28,671-678.

Ryan, L., et al.: Predictors of cord blood IgE levels in children at risk for asthma and atopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol. 119, 1, 81-88.

Sensibilizace matky, sociální postavení a rasa matky, maternální věk a pohlaví dítěte mohou mít vliv na fetální produkci IgE. Žádnou souvislost nenašli mezi gestačním věkem nebo obdobím náběru pupečnickové krve. Hladina pupečnickového IgE může hrát centrální úlohu v riziku kojence pro atopická onemocnění.

Tariq, SM., et al.: Elevated cord serum IgE increases the risk of aeroallergen sensitization without increasing respiratory allergic symptoms in early childhood. *Clin Exp Allergy*. 1999, 29, 1042-1048.

Pesonen, M., et al.: Cord serum immunoglobulin E as a risk factor for allergic symptoms and sensitization in children and young adults. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2009, 20, 12-18.

Sadeghnejad, A., et al.: Raised cord serum immunoglobulin E increases the risk of allergic sensitisation at ages 4 and 10 and asthma at age 10. *Thorax*. 2004, 59, 936-942.

Gerasimov, S., et al.: Probiotic and prebiotic supplementation improves the symptoms of children with atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol*. 2010, 11, 5, 351-361.

Dermatitis posuzována podle SCORAD (Scoring of Atopic Dermatitis).

Léčeno 90 dětí s atopickou dermatitidou ve věku 1-3 let kombinací *Lactobacillus acidophilus*, *B.lactis* a oligosacharid 2x denně po dobu 8 týdnů. Děti dostávající probiotica měly pokles Scoradu 33 % ve srovnání se skupinou placebo 19 %. Také používání steroidů bylo v dané skupině signifikantně kratší. Absolutní počet CD 8 se zvýšil v probiotické skupině. Byla patrná korelace mezi CD 4, CD 25 a Scorad score. Hodnoty korespondujících lymfocytů korelovaly.

Siltanen, M.,et al.: Prematurity at birth reduces the long-term risk of atopy. *J. Allergy Clin Immunol.* 2001, 107, 229-234.

Cílem studie bylo zjistit vztah mezi předčasným narozením a atopickým ekzémem. Srovnávali děti s hmotnosti pod 1500 a nad 2500 g. Ve věku 10 let měly děti předčasně narozené signifikantně méně atopických onemocnění. Dvě protistrany uvažují každá rozdílně. Nicméně strana, která vnímá nezralost jako faktor snižující riziko rozvoje alergických chorob, tvrdí, že závažné bakteriální infekty, které se u nezralých vyskytují velmi často, stimulují protialergický Th 1 typ obranyschopnosti. Zvýšenou průchodnost nezralé střevní sliznice prezentují jako druhořadý problém.

## **5 Význam stanovení pupečnickového imunoglobulinu E ve vztahu k rodinné anamnéze alergie**

V naší práci, která začala před 18 léty, jsme v první fázi 1998-2010 projevíli snahu o vyjasnění problematiky pupečnickového IgE. Jednalo se nám o výtěžnost vyšetřování hodnot imunoglobulinu E nejen z krevního séra. Naším záměrem bylo mimo jiné ověřit údaje z literárních prací o vazbě mezi hodnotami IgE z pupečnicku a hodnotami IgE v krevním séru v následujícím kojenecko-batolecím věku, ale i v dalším období. Dále ověřit, zda hodnoty pupečnickového IgE jsou v průměru rozdílné u novorozenců z rodin, kde jeden nebo oba rodiči jsou alergici.

Dále pak jsme chtěli prozkoumat, zda hodnoty pupečnickového IgE jsou závislé na faktorech, jako je roční doba porodu a sezónnost. Kladli jsme si také za úkol, zda může být pupečnickový IgE dalším vhodným markerem ukazatele rozvoje alergie. Byli jsme při tomto vedení snahou o určení budoucnosti rozvoje této alergie. Byli jsme si také vědomi zvyšující se frekvence prací o důležitosti předpokládané úlohy střevní flóry dětského jedince. Zvláště pak při tvorbě imunitního stavu novorozence a kojence, kdy se výzkum etiopatogeneze zaměřuje na perinatální i prenatální období. Smyslem těchto prací byla pak co nejvčasnější možnost případného terapeutického zásahu a to i na bázi biotechnologických metod. Závěrem úvodu jsme chtěli zdůraznit, že jsme byli inspirováni publikacemi i akcentovanými medicínskými pohledy prof.MUDr V.Zavázala,DrSc., který nás do této tematiky zavedl.

Soubor novorozenců v této první fázi jsme rozdělili do dvou skupin ve dvou obdobích: 1998-2002 a 2003-2010. Odběry pupečnickové krve byly prováděny na stejném porodním sále, stejnými zaměstnanci, stejnou technikou. Před náběrem z pupečnicku u všech matek – rodiček byla prováděna podrobná rodinná anamnéza z hlediska alergie a nemocnosti. Na ambulanci byly matky již předem uvědomovány o této možnosti jednoduchého zcela netraumatizujícího, z hlediska novorozence nedotýkového vyšetřování. S uvedeným vyšetřováním vyslovily souhlas. Abychom vyloučili přítomnost krve matky, byla vyšetřována v tomto vzorku zároveň přítomnost imunoglobulinu A. Při jeho zcela náhodné pozitivitě byl vzorek vyřazen. Také sporadické vzorky nemocných novorozenců byly vyřazeny.

## 5.1 Metodika stanovení

Vyšetřování prováděno ve stejné laboratoři po celou dobu, zpracováváno a hodnoceno stejnými zaměstnanci na úrovni laboratoří i na úrovni novorozenecké i pediatrické.

V letech 1998-2002 jsme odebírali vzorky 2 ml pupečnickové krve bez protisrážlivého činidla a po její centrifugaci jsme stanovovali hladinu na chemiluminiscenčním analyzátoru Immulite. Od roku 2003 do roku 2010 bylo vyšetření prováděno metodou ELISA sety f.Radim. Od roku 2011 stanovení provádíme metodou chemiluminiscenční imunoanalýzy setem Beckman Coulter. Vyšetření byla prováděna vždy nejdéle do 24 hodin po porodu.

Hodnoty odpovídaly vždy dané metodice a příslušné kontrolní skupině.

## 5.2 Soubor a výsledky

Průměrné hladiny v první skupině od roku 1998-2002 tvořilo 962 vzorků pupečnickové krve. Podle rodinné anamnézy odebrané od matek, jsme rozdělili novorozence do 4 skupin.

A: 174 dětí s alergií obou rodičů

B: 577 dětí s alergií matky

C: 144 dětí s alergií otce

D: 67 dětí jako kontrolní soubor

Při statistickém zpracování nalezena mezi skupinami vždy statistická významnost na hladině 1 promile (Kruskal-Wallisův test, Mann-Whitneyův test).

Hodnoty pupečnickového IgE u jednotlivých skupin pacientů v prvním období jsou nejvíce patrné u první skupiny. Patrné nejvyšší hodnoty.

Ve skupinách v letech 2003-2010 vzorků bylo při vyšší porodnosti a tím relativně většímu počtu odebíraných novorozenců více (celkem 2657 vzorků pupečnickové krve).

A: 263 dětí s alergiemi obou rodičů

B: 1934 s alergiemi obou rodičů

C: 430 s alergií u otce

D: 30 dětí kontrolní soubor

Zde při Kruskal-Wallisově testu a Mann - Whitneově testu zjištěna i v této skupině statistická významnost na hladině 1 promile.

I zde ze statistického zpracování vyplynuly nejvyšší hodnoty IgE ve skupině novorozenců s alergií obou rodičů.

Z příložených grafů (Příloha 1) dokumentujících hodnoty IgE v jednotlivých měsících roku jsou patrné vzestupy hodnot podle pylové sezóny a kvality počasí. V prezentacích poukázány roky 1999, 2000, 2001, 2002, 2003-2008, 2009-2010 - hodnoty vlastně během celého desetiletí.

Pro ohodnocení skupin odebíraných novorozenců jsme si u rodičů novorozenců prováděli v osmi sledovaných letech v obou skupinách zjištění procentuálního rozložení nejčastěji anamnesticky

zjišťovaných alergií. Údaje byly v asociaci s dokumentacemi ze statistik z alergologických poradn. Nejčastější alergií v anamnézách nastávajících rodičů zjišťována alergie na pyly (ve 40 %) a prach (20-25 %) (Příloha 1).

Konstatováno, že rodinná alergická zátěž je nepochybně rizikovým faktorem alergie. Alergie se sdružuje s rodinnou anamnézou, i když nálezy nemusí být vždy jednoznačné. Prvé příznaky alergických projevů se v posledních desetiletích posunují do prvních let života. Dokonce se jeví, že ohrožení budoucího novorozence alergií je uvažováno v posledních 6 týdnech gravidity. Po dobu 2 let jsme měli dokonce možnost korelovat vyšetřené hodnoty s pylovým kalendářem. Z výsledků lze vyzdvihnout dominující roli obou rodičů při vzniku alergie. Tyto jsou statistiky významné na hladině 1 promile. (Příloha 1). Proto jsme se domnívali, že vysoká hodnota pupečnickového IgE jsou spolu s rodinnou anamnézou důvodem k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu.

## 5.3 Diskuze

V rámci diskuze studie ukázaly, že k ovlivnění imunitního systému může dojít již intrauterinně, kdy některé antigeny mají možnost procházet placentou [Příloha 1: 14]. Za kritické období, kdy vlivem vnějších faktorů může docházet k imunologickým změnám, a následnému vývoji atopie se považují první měsíce života. Imunitní systém novorozence je v prvních měsících nezralý. Novorozenec tvoří jen malé množství imunoglobulinů, schopnost buněk specifické imunity reagovat na antigeny je omezená. U novorozenců, jak je zdůrazněno v úvodních publikacích této práce, je primárně posunutá nerovnováha mezi Th1 a Th2 lymfocyty ve prospěch Th2 a tím je i vyšší možnost atopické senzibilizace. Také literárně uváděná možnost senzibilizace plodu již od 22. týdne gravidity, polygenní základ, zvýšená tvorba IgE, IL 4 a IL5 představují další rizikový faktor. Novorozenci mají také nedostatečně vyvinutou slizniční bariéru. Zvláště u dětí, z nichž jeden nebo oba rodiče jsou alergici, se dnes považuje za vhodné v novorozeneckém věku vyšetřit pupečnickovou krev na hodnoty IgE, případně krev z periférie na hodnoty IgE. Pokud je zjištěna vyšší hladina, je tento považován za potenciálního alergika [Příloha 1: 11, 21] zvláště v prvních měsících života. Genetická výbava jedince výrazně ovlivňuje vznik a průběh alergických reakcí.

K tomu si připomínáme vyjádření našeho plzeňského učitele prof.MUDr V.Zavázala,DrSc. o tom, že když se člověk zbavil těžkých epidemií infekcí, tak jeho imunitní systém, nemaje co na práci, začal reagovat na běžné věci, jako jsou pyly a podobně [Příloha 1: 23]. Alergická onemocnění jsou cenou za osvobození od infekčních a parazitárních chorob, jak udávají některé další informace.

Dá se očekávat rozdílný vliv genetického pozadí na vznik asthmatu, atopické dermatitidy a dalších. Důležitou roli hraje chromosom, kde je celá oblast obsahující geny pro řadu cytokinů, např. IL 4. Klíčovým mediátorem alergických reakcí je ale IgE [Příloha 1: 23]. Další důležitá genetická oblast, související s hladinou IgE, byla zjištěna na chromosomu 5 v oblasti molekuly CD14. Tento receptor zajišťuje směr imunitní odpovědi. Imunitní systém novorozence ale nemá specifickou imunitní paměť.

Tzv. hygienická hypotéza [Příloha 1: 15, 16] , jak je uváděno v teoretické části, vychází z názorů, že nedostatečná expozice mikrobiálním antigenům je faktorem, přispívajícím k rozvoji alergie. Hygienická hypotéza vychází z názorů, že včasná mikrobiální stimulace vede k Th1 lymfocytové imunitní odpovědi. Na druhé straně se ale uvádí, že prodělaná RSV infekce v raném dětství nebo prodělaná atypická pneumonie předkládá převahu Th2 lymfocytů.

Již na úrovni buněk pupečnickové krve je patrný alergický fenotyp, který upozorňuje na zvýšenou možnost pozdějšího vzniku alergie. Také významně vyšší množství IL 5 a IL 10 v kolostru alergických a také v pupečnickovém séru jejich dětí naznačuje převažující ladění TH2 imunitního systému. Také snížená exprese TGF-B u dětí alergických matek může přispívat k pomalejšímu

vyzrávání střevního epitelu novorozenců a tím usnadňovat průchod alergenů [Příloha 1: 2,3,6,7]. Nebyla zjištěna žádná korelace mezi sérem matky a novorozence. Imunitní systém dostává první alergické podněty v těhotenství, zvláště v jeho posledním trimestru.

CD4 T lymfocyty z pupečnickové krve dětí atopických rodičů produkují in vitro větší množství IL 4 než CD 4 lymfocyty od novorozenců neatopických rodičů. Jak uvádíme v četných předchozích teoretických i konkrétních publikacích jsou odpovědi na antigeny zevního prostředí vychýleny k Th2 cytokinovému profilu. U neatopických jedinců ale v průběhu prvního roku života imunitní systém dozrává k Th1 profilu. Na druhé straně u atopiků k této reorganizaci nedochází a naopak přetrvává Th2 typ odpovědi s uvolňováním IL 4 a IL 5. Tyto pak hrají klíčovou roli v regulaci tvorby IgE. Při deficitu imunoglobulinu A vzniká současně deficit blokujících protilátek, takže snadno sliznicí procházející antigen je ve tkáních s menší intenzitou vyvázan a pravděpodobně způsobí zvýšenou tvorbu IgE. Na té se podílí deficit T-supresorových lymfocytů, který je u alergických chorob prokázán.

## 5.4 Imunoglobulin E

IgE je imunoglobulin s relativní molekulovou hmotností 197 000 a poločasem katabolizmu v séru 2-3 dny. Byl objeven manžely Ishizakovými v roce 1966, kteří bezpečně prokázali, že je nositelem reaginové aktivity [Příloha 1: 23]. Sérová koncentrace IgE tvoří jen asi 41 % celkového množství v organismu, zbytek je vázán na receptory žírných buněk a basofilních granulocytů. Poločas vázaného IgE je 2 týdny.

Syntéza IgE je ovlivňována T lymfocyty, speciálně IL 4 a genetickým vybavením jedince. IgE se zúčastní imunopatologické reakce 1. typu, která vede ke klinickým projevům atopie.

K této reakci dochází u jedinců, kteří mají geneticky podmíněnou tendenci reagovat na přítomnost některých antigenů (alergenů) nadměrnou tvorbou protilátek izotypu IgE. Syntéza IgE v embryonálním stádiu byla prokázána od 11. týdne, takže jeho koncentrace v pupečnickové krvi je odrazem této tvorby. Hladiny IgE v séru matky nekorelují s hladinou u novorozence. V pupečnickové krvi byla také prokázána přítomnost lymfocytů nesoucích molekuly IgE.

V minulosti byla také sledována imunitní odpověď atopických žen a jejich plodů s vlivem potravinových alergenů v pozdním těhotenství [Příloha 1: 8]. Úpravy mateřské stravy v posledním trimestru gravidity mají v předcházení atopické senzibilizace menší vliv na plod, než se předpokládalo [Příloha 1: 4].

Stanovení IgE v pupečnickové krvi má nepříznivý význam pro ohrožení alergií v dalším období [Příloha 1: 7, 9] jestliže obsah IgE přesahuje o dvě směrodatné odchylky nad stanovený normální průměr. Některé práce poukazují na určitou kontroverznost tohoto parametru [Příloha 1: 15].

Riziko senzibilizace je v prvních 6 měsících značné. Je dáno nízkou hladinou trávicích enzymů v zažívacím traktu, nezralým slizničním imunitním systémem, nedostatečně vyvinutou schopností orální tolerance a relativně neomezenou absorpcí makromolekul ze střevního lumina.

Orální tolerance je aktivní proces probíhající v oblasti slizničního imunitního systému. Jde o specifickou inhibici imunitní odpovědi po jejím předchozím navození kontaktem určitého antigenu s regulačními T buňkami usídlenými v oblasti sliznice střeva. Tolerance je vlastně jedna z aktivních funkcí imunitního systému zprostředkovaná supresorovým mechanismem a realizovaná prostřednictvím inhibičně působících lymfokinů produkovaných regulačními lymfocyty.

Pozitivní ovlivnění abnormální imunologické aktivity u dětí se zvýšeným rizikem rozvoje alergie zprostředkované IgE protilátkami může preventivně působit proti vzniku atopie. Kmeny bifidobakterií alergických jedinců (atopiků) se podobají spíše složení bifidobakterií dospělých jedinců, než zdravých dětí. Tyto nálezy dovoluují předpokládat, že odchylky ve složení střevní

mikroflóry předcházejí vzniku atopie [Příloha 1: 6, 10]. Právě zde je místo předpokládaného efektu probiotika. Navíc některá probiotika redukuje riziko akutních infekcí [Příloha 1: 13].

**Za rizikové faktory jsou pokládány:**

1. rodinná dispozice
2. polygenní základ
3. zvýšené pupečnickové IgE
4. vysoká koncentrace IgE v prvních týdnech života
5. zvýšená dispozice k tvorbě specifických protilátek
6. pozitivní kožní testy
7. pozitivita specifických IgE protilátek
8. eozinofilie v krvi
9. snížení hladiny CD8 lymfocytů

K vlastní zvýšené tvorbě IgE se uvádí [Příloha 1: 11], že sliznicí proniklý antigen je vyvážen ve tkáních a pravděpodobně způsobí zvýšenou tvorbu IgE. Na tom se údajně podílí i deficit T-supresorových lymfocytů.

Další zajímavý údaj v předložených grafech je nápadná sezónnost vysokých a zvýšených hodnot IgE v závislosti na probíhajícími ročními obdobími a jejich charakteru. Z grafů (Příloha 1) je patrné, jak velký vliv na hladiny pupečnickového IgE má počasí a koncentrace pylů v prostředí. Hodnoty IgE u novorozenců z rodin s výraznou pozitivní anamnézou alergie vykazují oproti kontrolním skupinám výrazné rozdíly. Je dokonce možné uvažovat i o plánování porodu v rodinách s výraznou alergií na mimo sezónní období.

## **6 Kolonizace nepatogenním E.coli v léčbě a prevenci morbidit a alergie u novorozenců s vysokou hodnotou pupečnickového IgE**

V práci, která začala před 18 léty (1998) a pokračovala do roku 2010 jsme ve dvou obdobích 1998-2002 a 2003-2010 ověřovali hodnoty IgE z pupečníku, následně v 1. roce věku a ve 3 letech z periférie. Vyšetřovaný soubor byl veliký, vyšetření byla prováděna celoročně. Dospěli jsme k několika závěrům, ze kterých bylo patrné, že alergie se velmi výrazně sdružuje s rodinnou anamnézou (významnost 1 promile). První příznaky alergických chorob se posunují do prvních let života. Pravděpodobně literárně poprvé jsme graficky znázornili v desetiletém období rozdíly v sezónnosti (Příloha 1). Došli jsme k hodnocení, že vysoké hodnoty pupečnickového IgE jsou důvodem spolu s rodinnou anamnézou, k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu. Vycházeli jsme při tom z četných literárních odkazů, především finských autorů. Tito prezentovali mnoho publikací o vlivu různých probiotik při léčebném ovlivnění recidivujících onemocnění horních cest dýchacích, astmatu, otitis media, atopické dermatitidy, gastroenteritid bakteriálních i virových, nekrotisující enterocolitidy nezralých dětí až po ulcerosní

colitidy v dětském věku. Vycházeli jsme nejen z důležitého našeho přesvědčení o významu vyšetřování pupečnickového IgE a o následných souvislostech ve vazbě na další imunoglobuliny, především IgA i IgG. Při významu vyšetřování pupečnickové krve jsme literárně sledovali vlastnosti cytokinů, faktory humorální a celulární imunity novorozenců, faktory imunologické nezralosti. S tím následně souvisí opsonizační a fagocytární aktivita. Dále pak reakce imunitního slizničního systému trávicího traktu a podpora přirozené obranyschopnosti novorozenců a kojenců modulací střevní mikroflóry. Také genetická komponenta obou imunopatologií (alergických a autoimunitních onemocnění) je velmi komplexní. Reakce mezi alergen specifickými Th2 lymfocyty a Th1 lymfocyty při velké ploše sliznic slizničního mikrobiota (mikroflóry) spojená s vlivem sekrečního a slizničního IgA. Také v současné době zdůrazňovaný vliv regulačních T lymfocytů v pupečnickové krvi. Zdůrazňovaná je nerovnováha mezi Th2 a Th1 lymfocyty v počátečních obdobích života. Také úloha pomocných Th lymfocytů, u kterých antigen vyvolá tvorbu IL 4 a IL 5, které pak navedou B lymfocyty k tvorbě IgE a způsobí eosinofilii.

Právě výše uvedený případný kontakt s fyziologickou mikroflórou vede k indukci regulačních T lymfocytů, které tvorbou cytokinů s protizánětlivým působením (IL 10) optimalizují slizniční odpověď a indukují slizniční toleranci [Schmidt-Weber 2005].

Opakovaná expozice sliznic antigenním podnětům nevede obvykle k zesílení slizniční odpovědi, ale naopak k utlumení imunitní reakce. Tento fenomen tzv. indukce slizniční tolerance je mimořádně komplexní se spoluúčastí regulačních T lymfocytů (Treg). Vycházíme z četných literárních odkazů, že expozice antigenům na střevní sliznici vede k rozvoji antigen specifické imunologické tolerance (orální tolerance).

Literárně uvádíme v přehledu časové rozvrstvení zásadních prací o používání probiotik [Saavedra 2007].

Dříve než se budeme zde zabývat námi používaným probiotikem, fyziologickým kmenem E.coli, prezentujeme zde z literatury uváděné fyziologické a terapeutické účinky probiotik [17, 33, Frühauf 2006, Nevorál 2012, Saavedra 2007] a dále mikrobiologické terapie [22].

Došli jsme k závěru, jak je prezentováno na začátku, že vysoké hodnoty pupečnickového IgE spolu s rodinnou anamnézou jsou důvodné k preventivní intervenci ovlivněním mikrobiální flory gastrointestinálního traktu. Začali jsme ve stále širším záběru používat české patentované probiotikum, preparát Colinfant Newborn, perorální vakcínu. Jedná se o lyofilizovaný nepatogenní kmen E.coli. Uvedený kmen podáváme od roku 2005 novorozencům, u kterých při pozitivní alergologické rodinné anamnéze byly nalezeny zvýšené a vysoké hodnoty imunoglobulinu E v pupečnickové krvi.

Charakteristiku probiotika Colinfant Newborn a jeho způsob podávání přikládáme.

Podotýkáme, že jsme se nikdy nesetkali s vedlejšími účinky této kapkové vakcíny, nezjistili jsme žádné známky intolerance. Jedná se o živou perorální vakcínu, lyofilizovaný nepatogenní kmen E.coli. Je schopen vytěsnit osídlení střevního traktu patogenními kmeny. Vyroben původně Ústavem sér a očkovacích látek, obsah je 12 lahviček. Každá lahvička obsahuje E.coli sérotyp 083:K24:H31min.0,8 x 10<sup>9</sup>. Je představitelem skupiny bakterií, které jsou součástí normální střevní mikroflóry. Použití kmene a příprava vakcíny byly patentovány v roce 1989 pod číslem 2645722. Vakcína byla registrována v SÚKluv roce 1997 pod registračním číslem 59/762/97-C. E.coli, ze kterého je připravována vakcína je nepatogenní kmen s výše uvedeným serotypem. Je vysoce selektovaný, citlivý na běžná antibiotika, netvoří enterotoxin a nemá plasmid. Nepatří mezi žádné skupiny enteropatogenních E.coli. Jeho výborná kolonizační schopnost je zajištěna i přítomností fimbrií prokázaných hemaglutinací. Kmen má výborné kolonizační vlastnosti, obsazuje receptory střevní sliznice, brání adhezenci patogenů a vytlačuje přítomné enteropatogenní kmeny. Indukce vlastní tvorby sekrečního IgA je zvláště významná, protože nahrazuje zčásti deficit tohoto imunoglobulinu. Prokázalo se, že po osídlení novorozenců vymizí jejich bakteriální patogeny ze



stolice, krku, nosu [Příloha 3: 26]. Při testech přetrvával vakcinační kmen po dobu 16 týdnů, ale byl i prokázán po několika létech.

Přítomnost kmene stimuluje tvorbu specifických i nespecifických protilátek, prokazatelnou ve střevním traktu, ve slinách i v séru. Ukázal se velmi důležitý fakt, že specifické kmeny střevní flóry mohou podporovat ochranu hostitele nejen proti sensibilizaci a alergii, ale i proti infekci! Toto je zcela s našimi již více než desetiletými zkušenostmi o velkém efektu vakcíny v prevenci infekcí a výrazném snížení nemocnosti u léčených dětí do 4 let věku. Tyto závěry jsme si ověřili s rodiči při kontrolách dětí po 1. roce a po 3. roce věku podrobnou konkrétní anamnézou a i u všech léčených dětí kontrolami krevního biochemismu (imunoglobuliny G, A, E, KO diff, CRP, metabolismus Fe, vyloučení osídlení patogenními mikroby).

Vlastní vakcína je dodávána v balení 1x 12 lahviček. Toto balení je určeno pro pacienta ve věku do jednoho roku bez ohledu na jeho hmotnost. Je zásadně podávána perorálně, obsah lahvičky se rozpustí v 1 ml tekutiny-voda, čaj. Podává se 3x týdně 1 lahvička po dobu 4 týdnů. Výdej je vázán na lékařský předpis pediatra.

## 6.1 Soubor a výsledky

V první skupině léčených pacientů s vysokým pupečníkovým IgE a následně kontrolovaných v letech 2005-2007 jsme zjistili normalizaci hodnot IgE (porovnávaných s laboratorní normou) u 106 ze 116 pacientů. Průměrná hodnota u těchto pacientů byla 25,7 U/ml.

Další skupina léčených pacientů byla vyšetřena v letech 2007-2008. Graficky v práci znázorněno. Z toho vyplývá, že normalizace hodnot IgE v dané skupině po léčbě nastala u 87 % pacientů (Příloha 2).

Vzhledem k tomu, že jsme na základě podrobné anamnézy byli rodiči upozorňováni na nápadně nízkou nemocnost vakcínou přeléčených pacientů, zpracovali jsme u všech pacientů průměrné hodnoty IgG a zánětlivé ukazatele a metabolismus Fe. Hodnoty IgG znázorněny na grafu 2 (Příloha 2). Výsledky srovnávány se skupinou zdravých dětí. Překvapující pro nás byly velmi dobré hodnoty IgG v léčených ročních skupinách. Následně vše bylo zpracováno statisticky.

Byly zpracovány nejen hodnoty IgG a IgE, ale i IgA. Hodnoty se změnily u léčených Colinfantem v novorozeneckém věku mezi 1.-3. rokem a to na hladině významnosti 1 promile.

IgG u nemocných se zvýšilo v mediánu ze 4,55 na 6,87, IgA u nemocných se zvýšilo v mediánu z 0,26 na 0,62 a IgE u nemocných se optimálně zvýšilo v mediánu jen z 8,87 na 17,09. Ve 3 letech věku statisticky významně koreluje IgG s IgA na hladině významnosti 1 promile.

Léčba Colinfantem přispěla k tomu, že výsledné IgE u léčených dětí se statisticky významně nelišily od příslušných veličin zdravých dětí.

Nemocnost Colinfantem léčených dětí versus kontrolní skupina neléčených sourozenců je graficky v pracích znázorněna na kruhovém grafu č.3 a č.4 (Příloha 2 a 3).

## 6.2 IgE

Japonští autoři uzavírají [Matsamura 1967], že nejlepším prediktorem alergie je u novorozence pozitivní rodinná historie a elevace pupečníkového IgE. Také včasné podávání antibiotik, zvláště v prvním roce věku přispívá alergii, pravděpodobně ovlivněním střevní flóry. Také si ověřovali pomocí hodnot pupečníkového IgA potenciální kontaminaci s mateřskou krví.

V druhé části práce jsme se zabývali literárně uváděnými zkušenostmi s nejčastějšími probiotiky a našimi zkušenostmi s preventivní intervencí. Probiotika jsou podle WHO z roku 2001 živé mikroorganismy, převážně lidského původu, které aplikovány v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele. Osídlení slizničních povrchů určitým typem bakterií má příznivé účinky nutriční i imunologické. Dokáží snížit adhezi patogenů na povrch střeva. Jejich působením dochází ke snížení intraepiteliálních regulačních lymfocytů T ve střevní sliznici. Na enterocytech zvyšují expresi MHC molekul II. třídy, čímž zvyšují jejich schopnost prezentovat antigen. Významně i stimulují syntézu slizničního IgA. Pravděpodobně se jedná o určitý typ polyklonální aktivace. Možnost ovlivnění střevní flory probiotiky je uváděna v řadě prací [Příloha 3: 2, 7, 8, 10, 19, 22, 30, 49]. Pro zařazení mezi probiotika musí splňovat celou řadu kritérií.

Samotná genová typizace byla prováděna zatím jen u 3 druhů probiotik. Jedná se o E.coli typ Nissle preparát Mutaflor, E.coli typ 083 preparát Colinfant a dále Lactobacillus casei spec. Rhamnossus GG a Sacharomyces boullardi. Tento poslední ale není humánního původu a tak nepatří mezi pravá probiotika. Bakteriální kmeny musí být izolované ze stejného živočišného druhu, jako je předpokládán příjemce, nesmí být toxické ani patogenní. Forma, ve které je probiotikum do zažívacího ústrojí aplikováno, musí obsahovat dostatečné množství životaschopných bakterií. Tyto musí mít schopnost přežít v zažívacím ústrojí a být dostatečně metabolicky aktivní. Probiotika pro klinické použití by měla být vždy izolována z lidských materiálů. Probiotika ze zvířecích materiálů mohou v sobě skrývat faktory rizikové pro lidský organismus. Ačkoliv běžně nepředstavují pro zdravého člověka žádné riziko, u oslabených pacientů byly pozorovány ojediněle nežádoucí účinky [Příloha 3: 46]. Jedná se o děti, které jsou imunosuprimovány, trpí chronickými onemocněními nebo mají zavedenu nějakou medicínskou pomůcku. Dokud nebudou eliminována bezpečnostní rizika pro velmi vážně nemocné děti, neměla by být u nich léčba zaváděna. Sem patří stavy po chemoterapii, radioterapii, po biologické léčbě autoimunních onemocnění a po orgánových transplantacích. Z možných vedlejších účinků terapie nepatogenním E.coli byl registrován literárně pouze meteorismus a u našeho Colinfantu vyrážka, která po ukončení terapie vymizela, a nebylo možno speciálně vazbu na preparát určit.

Vlastní smysl léčby probiotiky spočívá podle nás v přesměrování imunologické odpovědi od Th2 fenotypu k Th1 ještě dříve, než je ustavena imunitní odpověď na antigeny z okolního prostředí. Imunitní systém v časném dětském věku je v nedostatečném kontaktu s mikroby a alergeny, které jsou důležité pro stimulaci a regulační funkce i k léčbě průjmů. Mnoho autorů se shoduje, že takto nedochází k jeho dostatečnému „vyzrání“ a důsledkem je vychýlení imunitní reakce k reakci Th2 typu. Uplatňuje se zde navíc ještě mechanismus navození imunologické tolerance do 2-3 let věku. Ze studií se ukazuje, že z podávání probiotik profitují především děti s IgE zprostředkovanou alergií [Příloha 3: 4].

Z historického hlediska probiotický kmen E.coli strain Nissle poprvé podávali v roce 1917 [Příloha 3: 11, 41]. Termín probiotika byl po prvé použit v roce 1965 [Příloha 3: 24], pro popis látky vylučované organismy, které stimulují růst jiných organismů. V Plzni a vůbec zřejmě poprvé i v Československé republice jej používali v nemocniční studii Kneifl (LFUK Plzeň – katedra hygieny) spolu s Vlčkem na DO nemocnice v Klatovech –Lactobacillus (LAT) s velmi dobrým efektem při podpůrné léčbě kojeneckých průjmů. Osobně jsem mohl tento efekt sledovat po nástupu po promoci do praxe. Plzeňská LF UK má tak zřejmě ne historicky dostatečně proklamované prvenství v léčbě kojeneckých průjmů probiotikem i v mezinárodním měřítku. Začali již v roce 1965. Poněkud s nadsázkou je možné tak ku prospěchu medicíny sdělit, že by se mohlo jednat o 50 leté sledování. Mnozí autoři [Příloha 3: 1] tvrdí, že probiotika redukuje incidenci IgE asociovaného ekzému u kojenců. Další k tomu dodávají [Příloha 3: 10], že i zvyšují fekální hladinu IgA, které tak může přispívat ke zvýšení mucosální rezistence proti GIT infekci. Tyto pohledy jsou také v soulase s našimi klinickými výsledky i laboratorními nálezy hodnot sérového IgA u léčených pacientů.

Kromě toho je prokázáno, že některá bifidobakteria také stimulují produkci IgA in vitro [Příloha 3: 10].

Z možného působení probiotik je vhodné uvádět uznávanou úpravu střevní permeability a stimulaci imunitní odpovědi na patogeny a to uznávaným zvýšením produkce sekrečního i sérového IgA, ale i námi prokázané normalizace hodnot sérového IgG i IgA. V literatuře pak i zvýšením protizánětlivě působících cytokinů IL10, TGF Beta [Příloha 4: 5, 42]. Opakovaná aktivace Th2 lymfocytů vede kromě stimulace tvorby IgE též prostřednictvím IL4 k útlumu aktivity Th1 lymfocytů. Tímto indukuje převahu regulačních Th3 lymfocytů, které snižují systémovou zánětlivou odpověď. Pro navození tolerance má velký význam i prezentace antigenu prostřednictvím APC (antigen prezentujících buněk). V četných pracích [Příloha 4: 36] je uváděn nesporný vliv probiotik na prevenci GIT problémů u kojenců, léčbu a rychlejší úpravu rotavirových i bakteriálních gastroenteritid.

Také někteří autoři se zabývali klinickými obrazy novorozeneckého věku, ale i možným ovlivněním prenatálního období. Podávání probiotik matkám prenatálně i po porodu, podávání prebiotických oligosacharidů v prvním půlroce života, omezováním alergenů ke konci těhotenství vedlo jen ke sporným nebo ne dokladovatelným výsledkům. ESPGHAN [Příloha 3: 9] se shodují nyní, pokud nekojí, v rodinách alergiků na podávání částečně hydrolyzovaných mlék do 4. měsíce věku.

Thon [Příloha 3: 47], Björksen [Příloha 3: 2], Isolauri [Příloha 3: 14], Lilly [Příloha 3: 24] a mnoho dalších uvádí pozitivní ovlivnění střevní mikroflory přes mechanismy imunitního systému GALT [Příloha 3: 31, 36, 37].

Právě v první práci 1998-2010 jsme si dali za cíl zjištění diagnostického a léčebného postupu. Studie zahrnula 3619 novorozenců. Diagnostická část byla provedena z valné části. Zbytek jsme dovyšetřili v letech 2010-2015, a to 412 novorozenců.

Do druhé části práce týkající se léčebného efektu používaného preparátu Colinfant jsme zařadili pacienty – novorozence z rodin s pozitivní rodinnou anamnézou a hodnotami pupečnickového IgE přesahujícími 2 směrodatné odchylky. Musíme zde také zdůraznit dlouhodobost této studie a vývoj medicínských pohledů vzhledem ke klinickým studiím. Chceme také zdůraznit nesmírnou klinickou náročnost laboratorního vyšetřování dětí daného věkového období zahrnujícího novorozenecký, kojenecký, batolecí a i část předškolního věku. S tím souvisela nesmírná anamnestická pečlivost středního zdravotnického personálu, která se týkala kolem – porodního období, souhlasu matek rodiček a i časného pobytu novorozenců a matek. Vše se řešilo cílenými anamnestickými dotazy, (ne jakoukoliv formou dotazníkové korespondenční akce). Zvláště pak v rodinách, kde se sledovala nemocnost sourozence.

Výsledkové hodnoty pupečnickového novorozeneckého IgE jsme měli k dispozici po náběrech vždy již druhý den po porodu. K dispozici jsme měli při každé z 3 metodik během sledovaných 20 let výsledky kontrolní skupiny a porovnávali s normálními hodnotami. K vyloučení přítomnosti krve matky jsme vyšetřovali v příslušném vzorku přítomnost IgA. Pokud zde byl přítomen v měřitelných hodnotách, vzorek jsme vyřazovali. Těchto vzorků však bylo zcela zanedbatelné minimum.

## 6.3 Vlastní terapie

Probiotikum Colinfant, živá perorální vakcína, liofyzovaný nepatogenní kmen E.coli, v krabičce 12 ampulí, byl podáván od 10. dne věku, přesně podle písemného návodu relativně na lačno. Aplikován per os třikrát v týdnu. Zároveň u matek, v případě, že nekojily, nebylo doporučováno používat ke stravování citrusových plodů, aromatického ovoce, ořechů. Pokud nekojily, do 4 měsíců bylo doporučováno podávání hypoalergenního mléka. Po měsíci podávání Colinfantu bylo ukončeno jeho spotřebováním.

## 6.4 Nemocnost

V 1 roce věku a ve 3 letech věku jsme děti s podávaným Colinfantem anamnesticky a laboratorně vyšetřily. Překvapením pro nás byly většinou již spontánní údaje rodičů o velmi minimální nemocnosti v uvedených předchozích obdobích. Zajímavé byly a jsou údaje rodičů o nápadně lehkém průběhu dotyčného v době virových epidemií (nebo zcela zdravém). Porovnávali jsme tyto děti se sourozenci. Rozdíly v obou náhodně vybraných léčených skupinách se skupinou kontrolní jsou velmi významné a uvedené v kruhových grafech (Příloha 2 a 3).

## 6.5 Imunoglobulin IgE

V laboratorních hodnotách v prvních létech po léčbě kontrolovány hodnoty původně jen IgE v roce a ve 3 letech. Normalizace patologických novorozeneckých hodnot IgE v roce věku nastala u 91,3 % a ve druhé skupině u 87 % pacientů. Ve stejných procentech se pohybovaly anamnestické údaje ohledně projevů alergie. S tím jsou i uvedeny hodnoty ve sloupcových grafech (Příloha 2 a 3). Předmětem našeho dalšího sledování je vždy skupina čítající kolem 10 % daného léčeného souboru, jejichž projevy alergie jsou v relaci s klinickými obrazy skupiny, ale vyšetřované hodnoty IgE v séru v 1 roce a ve 3 letech jsou v hodnotách přesahující laboratorní normu. Danou diferenci si zatím vysvětlujeme možností přítomných regulačních protilátek.

## 6.6 Imunoglobulin G

Postupně jsme sledovali nápadnou normalizaci hodnot Imunoglobulinu G v jednotlivých létech vždy v 1. roce věku (2005-2008). Zde dále prezentujeme i poslední třetí skupinu vyšetřenou na IgG v 1 roce i ve 3 letech věku (2010-2014). Uvádíme velmi dobré výsledky, které jsou stejně jako předcházející vyšší než hodnoty kontrolní skupiny a zcela souhlasí se sdělovanými údaji rodičů o minimální nemocnosti těchto dětí.

## 6.7 Imunoglobulin A

Také v této třetí skupině průměrná hodnota IgA ve skupině léčených dětí ve 3 letech věku (2010-2014) se pohybovala v normě.

## **7 Závěry**

### **7.1 1. část studie (1998-2010) - diagnostická**

Klinická studie provedená u velkého souboru 3169 novorozenců trvala 12 let s těmito závěry:

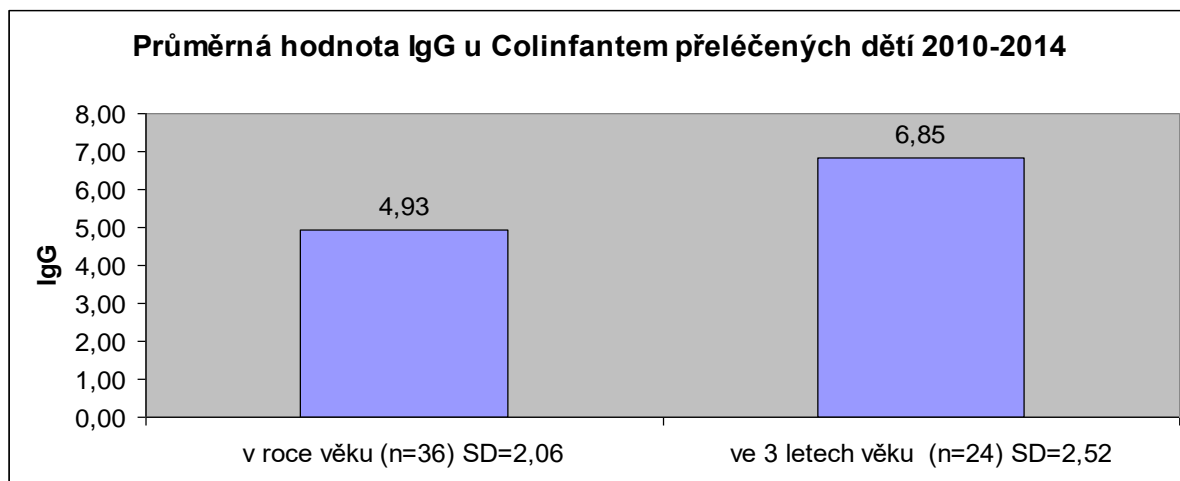
- důležitost podrobné alergologické anamnézy rodiček před porodem, prováděná v porodnici se zaměřením na celou rodinu připravenými cílenými otázkami
- kvalitní odběr a zpracování pupečnickové krve u pozitivních anamnéz vyšetřených ve dvou skupinách dětí dvěma metodikami v různých časových intervalech
- základním rizikovým faktorem rozvoje alergie je zřejmě rodinná zátěž, lze vyzdvihnout dominující roli obou rodičů při vzniku alergie, tyto jsou statisticky významné na hladině 1 promile
- nejvýznamnější alergie obou rodičů nebo matky – významnost na hladině 1 promile
- prvé příznaky alergických projevů se v posledních desetiletích posunují do prvních let života
- sezónnost hodnot pupečnickového IgE v závislosti na jednotlivých ročních obdobích je velmi nápadná, tento závěr by mohl sloužit i pro plánování termínu konce těhotenství a doby plánovaného porodu

### **7.2 2. část studie (2005-2015) - převážně terapeutická**

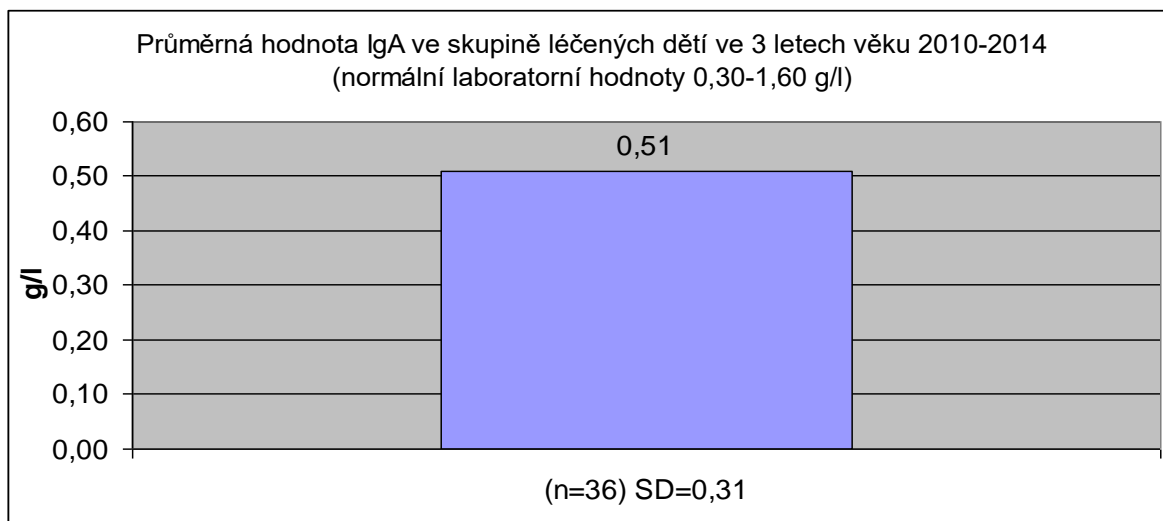
(2005-2010 druhá skupina a 2010-2015 třetí skupina)

- došli jsme k hodnocení, že vysoké hodnoty pupečnickového IgE jsou důvodem spolu s rodinnou anamnézou k preventivní intervenci mimo jiné ovlivněním mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu
- použili jsme výše uvedený preparát Colinfant Newborn
- z výsledků v letech 2005-2008 vyplývá, že u léčených pacientů s primárně zvýšenými hodnotami IgE z pupečnickové krve se tyto hodnoty v roce věku normalizovaly v 90 %
- zjišťovali jsme vliv léčby na hodnoty ostatních imunoglobulinů IgG a IgA vzhledem k nápadně snížené nemocnosti léčených pacientů

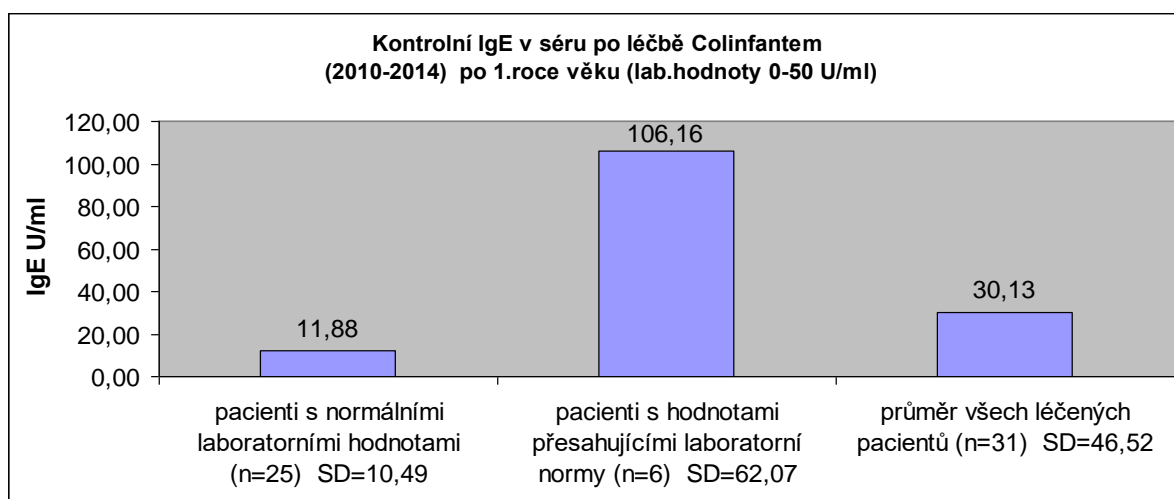
- zjistili jsme vliv léčby Colinfantem na hodnoty imunoglobulinů G a A v 1. a ve 3. roce věku, celý soubor jsme statisticky zpracovali, hodnoty korelují na hladině významnosti 1 promile
- z výsledků je patrné, že léčba Colinfantem měla pozitivní účinek v tom smyslu, že výsledné IgE se statisticky významně nelišily od příslušných veličin zdravých dětí. Hodnoty se v čase změnily u léčených mezi 1.-3. rokem na hladině významnosti 1 promile
- IgG a IgA byly v mediánu zcela v hodnotách normality. Tomu odpovídá zanedbatelná následná nemocnost novorozenců léčených uvedeným probiotikem
- na druhé straně u léčených se IgE mezi 1.-3. rokem zvýšilo v mediánu jen na zcela normální hodnoty v rámci předpokládaného protialergického efektu léčby
- velmi příznivý efekt terapie na nemocnost dětí oproti kontrolní skupině v předem definovaném souboru stejného věkového období je graficky znázorněn (Příloha 2 a 3)
- i ve třetí skupině naposledy zpracovávané v letech 2010-2014 bylo dosaženo ještě lepších výsledků v hodnotách sledovaných imunoglobulinů v soulase s velmi nízkou nemocností – viz obrázky 1, 2 a 3
- velkým kladem je prakticky výborná tolerance preparátu



Obrázek 1 – Průměrná hodnota IgG u Colinfantem přeléčených dětí 2010-2014

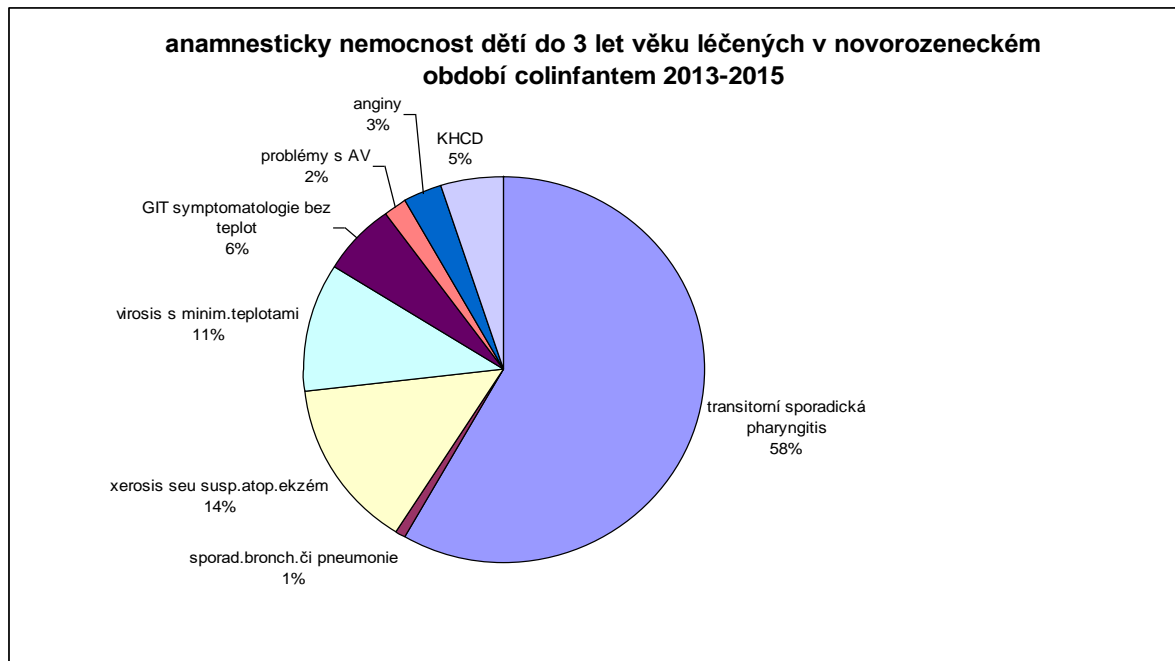


Obrázek 2 – Průměrná hodnota IgA ve skupině léčených dětí ve 3 letech věku 2010-2014



Obrázek 3 – Kontrolní IgE v séru po léčbě Colinfantem 2010-2014 po 1. roce věku

Kruhový graf nemocnosti dětí po Colinfantu (z další skupiny sledovaných dětí 2013-2015).



Obrázek 4 – Anamnesticky nemocnost dětí do 3 let věku léčených v novorozeneckém období Colinfantem 2013-2015

Z obrázku 4 vyplývá do tří let věku v 58 % dětí prakticky zdravých, výjimečně jen transitorní zanedbatelnou nemocnost i s velmi lehkými průběhy. I v ostatních klinických obrazech jsou popisována redukovaná onemocnění bez závažnější etiologie. Také z hlediska kožní nebo respirační složky alergie se jedná většinou jen o redukované, velmi lehké průběhy alergie, z kožního hlediska správně popisované s dg. jen xerosis. Nezaznamenali jsme jedinou dg. astmatu, recidivujících asthmoidních bronchitid nebo klasického atopického ekzému. Pro zajímavost uvádíme, že z posledního 36 členného souboru dětí bylo po domluvě alergologa a pediatra vzhledem k rodinné anamnéze preventivně testováno celkem 11, vždy s negativními nálezy.

Závěrem můžeme shrnout výborný efekt uvedeného preparátu na výrazné snížení nemocnosti dětí raného věku založené na cílených anamnestických i laboratorních důkazech. Pravděpodobně z toho vycházel zájem prezentace dané práce na 7 th International Conference on Drug Discovery & Therapy a 4 th Biotechnology World Congress v Dubai-Sharjah, United Arab Emirates (15-18.2.2016). Následný písemný zájem o prezentaci práce v zahraničním odborném tisku a nyní i již požadovaná, odeslaná a umístěná práce - poster na Drug Discovery and Therapy World Congress 22.-25.8.2016 v Bostonu v USA.



## 8 Použitá literatura

- [1] Hrdý, J., et al: *Vox Ped.* 2007, říjen, 8, ročník 7, 32.
- [2] Šedivá, A.: Genetika alergie. *Alergie.* 2004/4.
- [3] Miler, I.: Ontogeneze imunity plodu u novorozence. *Čs.Pediat.* 33, 1978, 5, 295-301.
- [4] Mocková, A.: Ovlivnění vývoje imunity v prenatálním a perinatálním období. *Pediatr. praxi.* 2014, 15(4), 197–200.
- [5] Mísařovičová, Z.: Některé faktory humorální a celulární imunity u novorozenců *Č.Pediat.* 35,1980,8,416-418.
- [6] Tlaskalová-Hogenová, H.: Imunita na sliznicích. *Forum imunologie.* 1/94.
- [7] Pařízková, E.: Imunologická nezralost novorozence a kojence. *Alergie, Supplementum.* 3/2002, str. 14.
- [8] Ouwehand, AC., et al: Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. *J.Allergy Clin Immunol* 2001, 108, 144-145. Functional foods forum, Universiti, Turku, 2004.
- [9] Kayserová, J.: autoreferát doktorské disertační práce 2013. Ústav imunologie 2.LFUK Praha.
- [10] Pozler, O.: Střevní mikroflora. Symposium o morfologii střeva. Staré Splavy, 2004, 4, 3-4 Abstr.
- [11] Tlaskalová-Hogenová, H.: Střevní imunitní systém a komensální bakterie. *Medical Tribune.* 11/2008.
- [12] Zavázal, V.: Alergické stavy a mechanismy jejich vzniku. *Forum imunologie.* 6/94, 223-226.
- [13] ABC symposium 1996 Solnohrad, *Allergy.* 54, suppl 49, 103, str. 199.
- [14] Tomášová, H. et al: Koncentrace eosinofilního kationického proteinu v séru donošených novorozenců. *Neonatologické listy.* 2000, č. 4, ročník 6.
- [15] Tlaskalová, H., Městecký, J.: Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii. *Alergie.* 2/2012, 124-133.
- [16] Krejsek, J.: Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. *Pediatr. pro Praxi.* 2007, 3, 156–162.
- [17] Frič, P.: Probiotika, prebiotika a atopie. *Pediatr. pro Praxi.* 2008, 9(1), 46–50.
- [18] Vernerová, E.: Slizniční imunita u dětí, možnosti imunomodulace a alergie. *Pediatr. pro Praxi.* 2008, 9(3), 164–168.
- [19] Šrůtková, D.: Charakterizace a využití složek střevní mikroflóry. Mikrobiologický ústav AV ČR, Dizertační práce 2015.
- [20] Lukáš, M.: Prebiotika, probiotika a střevní mikroflora. *Interní med.* 2015, 17, 1, 14-17
- [21] Zbořil, V.: Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů. *Alergie.* 2004, 3, 151-155. ISSN 1212-3536.
- [22] Zbořil, V.: Fyziologie mikroflory trávicího ústrojí jako základ probiotické terapie. *Postgraduální medicína.* 2002, 8, 824-827.

- [23] Thon, V.: Intestinální mikroflóra v raném dětství – úloha při rozvoji infekčních a alergických chorob. *Pediatr. praxi.* 2011, 12, 4, 252–256.
- [24] Zavázal, V.: Hladiny imunoglobulinů G, A, M, D a E v běžné dětské populaci. *Čs.Pediat.* 1974, 29, 5, 249-252.
- [25] Lodinová – Žádníková, R.: Probiotika v pediatrii: Snížení rizika nosokomiálních infekcí perorálním osídlením probiotickým kmenem E.coli po narození a jeho vliv na frekvenci opakovaných infekcí a alergií po 10 a 20 letech. *Alergie.* 2002, 4, 275-279.
- [26] Frůhauf, P.: Racionální užití probiotik v pediatrii. Zdroj [www.edukafarm.cz](http://www.edukafarm.cz).
- [27] Fuchs, M.: Potravinové alergie. *Pediatric po promoci.* 2004, 1, 26-35.
- [28] Jeseňák, M., et al: Diagnostický algoritmus potravinové alergie v dětském věku. *Čs.Ped.* 2008, 5, 272-282.
- [29] Vernerová, E.: Potravinová alergie v dětském věku. *Pediatr. pro Praxi.* 2007, 8, 5, 269-272.
- [30] Fukushima, Y., et al: Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology.* 1998, 42, 39-44.
- [31] Hlavatá, A., et al: Environmentalne rizikové faktory vývoje atopie u dětí. *Čes slov. Pediat.* 2007, 62, č. 12, 674-683.
- [32] Nováková, D.: Riziko rozvoje alergických onemocnění v dětském věku – role časně výživy pro ustanovení vyvážené slizniční imunity zažívacího traktu. *Čs.Pediat.* 2009, 7-8.
- [33] Nevoral, J.: Probiotika a prebiotika. *Medical Tribune.* 13/2008.
- [34] Bronský, J.: Využití probiotik v pediatrii. *Lékařské listy.* 2008.
- [35] Tláškal, P.: Využití probiotik v pediatrii. *Pediatr. pro Praxi.* 2008, 9(5), 288–292.
- [36] Vernerová, E.: Výživa a alergie. *Pediatr. pro Praxi.* 2007, 3, 168–172.
- [37] Sochorová, V.: Podávání a účinky aplikace Colinfantu u nedonošených dětí. *Vox.Ped.* 2003, 9, 7, 3, 26-27.
- [38] Saavedra, JM., et al: Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanismus of action and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice.* 2007, 22, 351-365.
- [39] Végh, V., Végh, T.: Přehled doplňkové imunomodulace v pediatrii.: *Pediatr. pro praxi.* 2008, 9(6), 388–392.
- [40] Rembacken, BJ., et al: Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet.* 1999, 354, 635-639.
- [41] Ezendam, J.: Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutrition Reviews.* Jan 2006, 64, 1, 1-14.
- [42] Kalliomäki, M., et al: Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet.* Vol.357, April 7, 2001, 1076-1079.
- [43] Bystroň, J.: Využití bakteriálních lyzátů v klinické praxi. *Pediatr. praxi.* 2011, 12(6), 398–404.
- Abrahamson, TR., et al.: Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Alerg. Clin. Immunol.* 2007, 119, 5, 1174-1180.
- Baker, BS.: The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2006, 144, 1–9.
- Barnes, MJ., et al.: Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity.* 2009, 31, 3, 401-411.

- Bartůňková, J.: Bakteriální imunomodulátory. *Causa subita*. 2003, 6, 384–386.
- Bednář, M., et al.: Lékařská mikrobiologie. eds.1996, Marvil Praha.
- Belkaid, Y., et al.: Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014, 157, 1, 121-141.
- Bennet, R., et al.: Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. *Infection*. 1987, 15, 5, 332-336.
- Benno, E., et al.: Development of intestinal microflora in humans et animals: *Bifidobacteria and Microflora*. 1986, 5, 13-25.
- Brouwer, ML., Wolt-Pomplen, SA., Dubois, AE., et al.: No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy*. 2006, 36, 899–906.
- Burrows, B.: Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J med*. 1989, 2, 320(5), 271-277.
- Bystroň, J.: Imunomodulace u recidivujících infekcí dýchacích cest. *Klin Farmakol*. 2005, 19, 235–238.
- Calder, PC.: Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2008, 52, 885–897.
- Codex alimentarius comission. Joint FAO/ WHO Food standarts programme. Codex commitee for specially dietary uses. July 2002., CX/NFSDU02/2.
- Cukrowska, B., Lodinová-Žádníková, R., Enders, C., et al.: Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with non-pathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol*. 2002, 55, 204–209.
- Cunningham-Rundles, S., McNeeley, DF., Moon, A.: Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J. Allergy Clin Immunol*. 2005, 115, 1119–1128.
- Červenková, D., Kliment, M., Ketys, P.: Probiotiká a atopická dermatitída. V: Kuchta M, Pružinec P: Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne. *Bonus CCS. Bratislava*, 2006, 98–106.
- Dai, D., Walker, WH.: Protective nutrients and bacterial colonization in the premature human gut. *Adv Pediatr*. 1999, 46, 353–382.
- Damsgaard, CT., Lauritzen, L., Kjaer TM, et al.: Fish oil supplementation modulates immune function in healthy infants. *J Nutr*. 2007, 137, 1031–1036.
- Dunstan, JA., Hale, J., Breckler, L., et al.: Atopic dermatitis in young children is associated with impaired interleukin-10 and interferon- $\gamma$  responses to allergens, vaccines and colonizing skin and gut bacteria. *Clin Exp Allergy*. 2005, 35, 1309–1317.
- Enck, P., et al.: The effects of maturation on the colonic microflora in infancy and childhood. *Gastroenterol Res Pract*. 2009, 1-7.
- Eyles, JE.: Therapeutic use of molecules that mimic pathogen danger signals. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2007, 7, 177–186.
- Favier, CF., et al.: Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol*. 2002, 68, 219-226.
- Feleszko, W., et al.: Probiotic-induced suppression of alergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp. Allergy*. 2007, 37, 4, 498-505.

- Frič, P.: Probiotika a prebiotika – renesance terapeutického principu. I. Teorie a experimentální doklady. *Postgrad medicina*. 2005, 7, 472–477.
- Frühauf, P., Fuchs, M., Polášková, S., Vernerová, E., Zlatohlávková, B.: Alergie kojeneckého věku, Nestlé Nutrition. *Olomouc: Solen print*. 2006, 3–59.
- Fuchs, M.: Potravinová alergie. *Postgraduální medicína*. 2004, 5, 546-549.
- Gibson, GR., et al.: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 1995, 125, 1401-1412.
- Gotoff, SP.: Neonatal immunity. *J. Pediatr.* 1974, 85, 149.
- Grönlund, G., et al.: Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999, 28, 19-25.
- Grubb, R., et al.: Editors, Conway PL., Lactobacilli: Fact and fiction, in the regulatory and protective role of the normal microflora. *Macmillan press. Hampshire*, 1989, 263-281.
- He, F., Morita, H., Hashimoto, H., et al.: Intestinal Bifidobacterium species induce varying cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2002, 109, 1035–1036.
- Hanauer, SB.: Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel, Dis.* 2006, 12, 3-9.
- Helgeland, L., et al.: Development and function of intestinal B and T cells. *Microb Ecol Health Dis.* 2000, 11, 110-127.
- Hoffjan, S., et al.: Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004, 113, 511-518.
- Holgate, ST.: The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev.* 2011, 242, 205-219.
- Holt, PG., Jones, CA.: The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy.* 2000, 55(8), 688–697.
- Chen, K., Huang, J., Gong, W., et al.: Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol.* 2007, 7, 1271–1285.
- Ismail, IH., et al.: Probiotic effects in allergic disease. *J.Paediatr Child health.* 2013, 49, 9, 709-715.
- Isolauri, E., Majamaa, H., Arvola, T., et al.: *Lactobacillus casei* strain LGG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology.* 1993, 105, 1643–1650.
- Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., et al.: Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy.* 2000, 30, 1604–1610.
- Isolauri, E., et al.: Probiotics: effects of immunity. *Am J Clin Nutr.* 2001, 73, suppl.2, 444-450.
- Isolauri, E.: Dietary modification of atopic disease: use of probiotics in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004, 4, 270–275.
- Jeřábková, M.: Střevní mikroflóra – součást slizničního imunitního systému. *TIGIS*, 2008, 12, 23–44.
- Jones, CA.: Does atopic disease start in foetal life? *Allergy.* 2000, 55, 2-10.
- Kalliomäki, M., et al.: Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J. Allergy Clin Immunol.* 1999, 104, 1251-1257.

- Kalliomäki, M., et al.: Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin Immunol.* 2001, 107, 129-134.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., et al.: Probiotics in primary prevention of atopic disease. *Lancet.* 2001, 357, 1076–1079.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., et al.: Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2003, 361, 1869–1871.
- Kalliomäki, M., et al.: Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, 87, 534-538.
- Kalliomäki, M., et al.: Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotics. *J. Nutr.* 2010, 140, 3, 713S-21S.
- Kirjavainen, PV., Apostolou, E., Arvola, T., et al.: Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001, 32, 1–7.
- Kirjavainen, PV., Arvola, T., Salminen, SJ., et al.: Abberant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut.* 2002, 51, 51–55.
- Kniker, TW.: Delayed and non-IgE mediated reactions in: Frieri M, Kettelhut, B. Food hypersensitivity and adverse reactions. *Marcel Dekker, Inc.* 1999, 165-193.
- Kudsk, KA.: Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *Am J Surgery.* 2002, 183, 390–398.
- Kukkonen, K., et al.: Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2007, 119, 1, 192-198.
- Laitinen, K., Kalliomäki, M., Poussa, T., et al.: Evaluation of diet and growth in children with and without atopic eczema: follow-up study from birth to 4 years. *Br J Nutr.* 2005, 94, 565–574.
- Lee, JAB., Seto, DBA., Bielary, L.: Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008, 121, 116–121.
- Levy, O.: Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7(5), 379–390.
- Lodinova-Zadnikova, R., Slavikova, M., Tlaskalova-Hogenova, H., et al.: The antibody response in breast-fed and non-breast-fed infants after artificial colonization of the intestine with E. coli O83. *Pediatr Res.* 1991, 29, 31–39.
- Lodinova-Zadnikova, R., Tlaskalova-Hogenova, H., Bartakova, Z.: The antibody response in infants after colonization of the intestine with E. coli O83. Artificial colonization used as prevention against nosocomial infections. *Adv Exp Med Biol.* 1991, 310, 329–333.
- Lodinova-Zadnikova, R., Cukrowska, B., Tlaskalova-Hogenova, H.: Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (10 and 20 years). *Int Arch Allergy Immunol.* 2003, 131, 209–211.
- Lochman, I., et al.: Úskalí v laboratorní diagnostice alergických onemocnění. *Vox Paediatricae.* 2002, 6, 28-29.
- Majamaa, H., Isolauri, E.: Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1997, 99, 179–185.
- Malmgren, R., et al.: Lowered glutathione-peroxidase activity in asthmatic patients with food and aspirin intolerance. *Allergy.* 1986, 41, 43-45.

- Marques, AH., et al.: The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci.* 2013, 7, 120.
- Martin, E., et al.: Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 2003, 14, 754-758.
- Matsamura, T., et al.: Studies on congenital sensitization. 1. Detection of food antigens and antibodies in the maternal serum, umbilical cord serum, the serum and the 1st voided urine of newborn infants, amniotic fluid and meconium. *Arerugi.* 1967, 16, 12, 858-65.
- Mebius, RE.: Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol.* 2003, 3(4), 292–303.
- Miettinen, M., et al.: Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12, IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun.* 1998, 66, 6058-62.
- NASPGHAN Nutrition Report Committee et al: Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus of children. NASPGHAN Nutrition Report Committee. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006, 43, 550-557.
- Neaville, VA., et al.: Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunological expression of atopy during the first year of life. *J. Allergy Clin Immunol.* 2003, 112, 740-746.
- Nevoral, J.: Prebiotika a probiotika v pediatrii. *Pediatr. praxi* 2012, 13, 3, 167-173.
- Niers, LE., Timmerman, HM., Rijkers, GT., et al.: Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin Exp Allergy.* 2005, 35, 1481–1489.
- Noverr, MC.: The microflora hypothesis of allergic diseases. *Clin Exp. Allergy* 2005, 35, 12, 1511-1520.
- Ogden, NS., Bielory, L.: Probiotics: a complementary approach in the treatment and prevention of pediatric atopic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005, 5, 179–184.
- Okada, H., et al.: The ‘hygiene hypothesis’ for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol.* 2010, 160(1), 1–9.
- Olivares, M., et al.: Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. *J. Appl Microbiol.* 2006, 10, 72-79.
- Orrhage, K., et al.: Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr.* 1999, 88, 47-57.
- Ouwehand, AC., Isolauri, E., He, F., et al.: Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. *J. Allergy Clin Immunol.* 2001, 108, 144-145.
- Parracho, H., et al: Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proc Nutr. Soc.* 2007, 66, 3, 405-411.
- Pelech, T., Frič, P., Fixa, B., et al.: Srovnání Mutafloru a mesalazinu v udržovací léčbě neaktivní idiopatické proktokolitidy. *Prakt Lékař.* 1998, 78.
- Perdigon, G., et al.: Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect.Immun.* 1986, 53, 404-410.
- Perdigon, G., et al.: The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *J.Food Protection.* 1990, 53, 404-410.
- Perdigon, G., et al.: Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 1999, 82, 6, 1108-1114.

- Perrier, C., et al.: Gut permeability and food allergies. *Clin Exp Allergy*. 2010, 41, 20-28.
- Pessi, T., Sutas, Y., Hurme, M.: Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG: *Clin Exp Allergy*. 2000, 30, 1804–1808.
- Peters, JL., et al.: Prenatal negative life events increases cord blood IgE: interactions with dust mite allergen and maternal atopy. *Allergy*. 2012, 67(4), 545–551.
- Petrů, P., Špičák, V. a kol.: Vývoj alergie v průběhu života. *Alergologie*. Galén, 2004, 149-151.
- Platts-Mills, TA.: The role of allergens in the induction of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002, 2, (2), 175-180.
- Platts-Mills, TA., et al.: Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma? *Allergy*. 2005, 79, 60, 25-31.
- Platts-Mills, TAE.: Indoor allergens. In: Adkinson NFJR, Yunginger JW, Busse WW., et al. *Middleton's Allergy Principles & Practise*. Philadelphia, Pennsylvania. Mosby. 2003, 568.
- Prescott, SL., Dunstan, JA., Hale, J., et al.: Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma response in very young children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2005, 35, 1557–1564.
- Pruzzo, C.: Short chain fatty acids, menaquinones and ubiquinones and their effects on the host. *Microb Ecol in Health and disease*. 2009, 12, 209-215.
- Rautava, S., Kalliomäki, M., Isolauri, E.: Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol*. 2002, 109, 119–121.
- Rautava, S., Ruuskanen, O., Ouwehand, A., et al.: The hygiene hypothesis of atopic disease – an extended version. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004, 38, 378–388.
- Romagnini, E., et al.: Increased numbers of Th2-like CD4+ T cells in target organs and in the allergen-specific repertoire of allergic patients. Possible role of IL-4 produced by non-T cells. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol*. 1991, 94 (1-4), 133-136.
- Romangani, S.: The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1999, 105, 399–408.
- Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, SD., et al.: Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003, 111, 389–395.
- Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Valerius, NH., et al.: Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J Pediatr*. 2004, 145, 612–616.
- Saavedra, JM., et al.: Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanismus of action and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice*. 2007, 22, 351-365.
- Salvatore, S., Keymolen, K., Hauser, B., Vandenplas, Y.: Intervention during pregnancy and allergic disease in the offspring. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005, 16, 558–566.
- Sartor, RB.: Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2008, 105, 43, 16413-16414.
- Schmidt-Weber, CB., Blaser, K.: New insights into the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005, 5, 525–530.
- Sistek, D., Kelly, R., Wickens, K., et al.: Is the effect of probiotics on atopic dermatitis confined to food sensitized children? *Clin Exp Allergy*. 2006, 36, 629–633.

- Sjogren, YM., et al.: Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy*. 2009, 39(12), 1842–1851.
- Smetana, K., et al.: A further contribution to the demonstration of RNA and nucleoli of blood cells in smear preparations. *Folia haematologica*. 1969, 91(4), 381-394.
- Smits, HH., Engering, A., van der Kleij, et al.: Selective probiotic bacteria induce Il-10-producing regulatory T-cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2005, 115, 1260–1267.
- Spilková, J.: Echinacea sp. – obsahové látky a léčebné využití. *Prakt. lékařem*. 2006, 2, 89–92.
- Strachan, DP.: Hay fever, hygiene and household size. *BMJ*. 1989, 299, 1259-1260.
- Strimas, JH., et al.: Signifikance of IgE level in amniotic fluid and cord blood for the prediction of allergy. *Ann Allergy*. 1988, 61, 133-136.
- Sudo, N., et al.: The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunol*. 1997, 159, 1739-1745.
- Sýkora, J., et al.: Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J. Clin. Gastroenterology* 2005, 39(8), 692-698.
- Szajewska, H., et al.: Probiotics in gastrointestinal diseases in children. Hard and not-so hard evidence of efficacy. *J. of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2006, 42, 454-475.
- Špičák, V.: Hygienická hypotéza-možnost nebo dogma. *Alergie*. 2005, 3, 180-183.
- Thon, V.: Imunologické principy bezpečného očkování dětí. *Pediatr. pro Praxi*. 2010, 11, 6, 354-357.
- Traskalová-Hogenová, H., et al.: Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2004, 93, 2-3, 97-108.
- Traskalová-Hogenová, H., Tučková, L., Lodinová-Zádníková, R., Štěpánková, R., Cukrowska, B., Funda, DP., et al.: Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002, 128, 77–89.
- Traskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Tučková, L., Farre, MA., Funda, DP., Verdu, EF., et al.: Autoimmunity, immunodeficiency and mucosal infections: chronic intestinal inflammation as a sensitive indicator of immunoregulatory defects in response to normal luminal microflora. *Folia Microbiol*. 1998, 43, 545–50.
- Toh, ZQ., et al.: Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease. *Front. Pharmacol*. 2012, 3, 171.
- Turnbaugh, P.: The human microbiome project. *Nature*. 2007, 449, 804-810.
- Uksila, J., et al.: Development of natural killer cell function in the human fetus. *J Immunol*. 1983, 130(1), 153–156.
- Vandenbulcke, L., et al.: The innate immune system and its role in allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005, 139, 159-165.
- Vandenplas, Y.: Microorganism administered for the Benefit of the host. Facts and Myths. *Pediatric Gastroenterology and Nutrition in Clinical Practice*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 2002.
- Viljanen, M., Kuitunen, M., Haahtela, T., et al.: Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005, 16, 65–71.
- Viljanen, M., et al.: Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy*. 2005, 60, 4, 494-500.



Walker, WA., et al.: Progress in the science of probiotics: from cellular microbiology and applied immunology to clinical nutrition. *Eur. J. Nutr.* 2006, 45, Suppl 9, 1-18.

Walker, WA.: Role of Nutrients and Bacterial Colonization in the Development of Intestinal Host Defense. *J of Ped Gastroenterol and Nutr.* 2000, 30, S2-S7.

Weston, S., Halbert, A., Richmond, P., et al.: Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomized controlled trial. *Arch Dis Child.* 2005, 90, 892–897.

Wuthrich, B.: Food allergy, frequency of symptoms and of food allergens among 402 patients with food allergy. *Allergologie.* 1993, 16, 280-287.

Yasui, H., et al.: Detection of bifidobacterium strains that induce large quantities of IgA. *Microb. Ecol. Health Dis.* 1992, 5, 155-162.

Yazdanbakhsh, M., et al.: Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science.* 2002, 296, 490-494.

Zieger, RS: Development and prevention of allergic diseases in childhood. In: Middleton E., et al, eds, *Allergy Principles and Practices*, 4th ed., 1993, vol. 11, pp 1137-1171.

## 9 Publikované práce k habilitačnímu tématu

### Habilitační téma:

Význam stanovení pupečnickového imunoglobulinu E ve vztahu k rodinné anamnéze alergie.

Kolonizace nepatogenním E.coli v léčbě a prevenci morbidity a alergie u novorozenců s vysokou hodnotou pupečnickového IgE.

1. Liška, J. a spol.: Vyšetřování IgE v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie. IV. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie. Hradec Králové, 1999.
2. Liška, J., Holeček, V., Zavázal, V.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie, *Čs. Pediatrie.* 2000, suppl. 1, p.S 41, ISSN 0069-2328, Indexed in embase (Excepta Medica).
3. Liška, J., Holeček, V., Zavázal, V. a spol.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska možnosti předpovědi vzniku alergie. Vztah jednotlivých ročních období k nalezeným hodnotám. *Neonatologické listy.* 7(3), 2001, 1.
4. Liška, J. a spol.: Vyšetřování IgE v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie Postgraduální lékařské dny Plzeň, vědecká konference, 15.-16. 2. 2001, Plzeň.
5. Liška, J. a spol.: Vyšetřování IgE v pupečnickové krvi ve vztahu k ročním obdobím, XIX. Neonatologické dny, Srní na Šumavě 31. 10. 2001.
6. Liška, J., Holeček, V., Zavázal, V.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska možnosti předpovědi vzniku alergie *Čs.Pediatr.*, III. Slovenský pediatrický kongres s mezinárodní účastí Martin, Suppl. 1/2001 s 56/p 22, ISSN 0069-2328 Indexed in embase (Excepta Medica).
7. Liška, J., et al.: Estimation of immunoglobulin E of the cord blood from the view of the possibility to prerecognize the development of allergy. Abstracts of Program P95/1. 5th. Czech Pediatric Congress with international participation. ISBN: 80-238-9194-4 Teplice, September 5-7.2002.

8. Liška, J. a spol.: Význam vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie. Postgraduální lékařské dny. Plzeň, 2004.
9. Liška, J., Holeček, V., Kepková, M. a spol.: Vyšetřování imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska predikce alergie, *ČS. Pediatrie*. 2006, č. 5, r. 61, 293-294, ISSN 0069-2328, Indexed in embase, Excerpta Medica.
10. Liška, J., Kepková, M., a spol.: Stanovení imunoglobulinu E v pupečnickové krvi z hlediska možnosti předpovědi vzniku alergie. *ČS. Pediatrie*. 2008, r. 63, č. 7-8, str. 388, ISSN 0069-2328.
11. Liška, J., Holeček, V., Kestranek, Z., Jahnova, H., Zavazal, V., Sobotova, S., Kepkova, M., Culakova, B., Krnoulova, E.: Estimation of immunoglobulin E in the cord Blood from the view of the possibility to prerecognize the development of allergy. Presentations, Europaediatrics, 2008 June 14-17, Istanbul, Turkey. Programme-Book, s88, PP-468.
12. Liška, J., Holeček, V., Kepková, M., Sobotová, Š.: Význam stanovení pupečnickového imunoglobulinu E ve vztahu k rodinné anamnéze alergie. *ALERGIE*. 14, 2012, č.1, 25-32.
13. Liška, J., Holeček, V., Sobotová, Š., Kepková, M., Šefrna, F.: Léčba novorozenců s vysokými hodnotami IgE v pupečnickové krvi perorálním osídlením nepatogenním *E.coli* a jeho vliv na imunitní systém a zabránění rozvoje alergické reakce. *ALERGIE*. (v tisku 2013, 10-19).
14. Liška, J., Holeček, V., Sobotova, S., Racek, J., Trefil, L.: Oxygen radicals in cord serum from the viewpoint of family history of allergy-the first information. Mulac hospital Plzen, Faculty hospital Plzen, Plán: Bentham Science Publishers.
15. Liška, J. a spol.: Vliv včasné léčby novorozenců perorálním osídlením nepatogenním *E.coli* na vývoj jejich imunoalergického systému, *Vox.Pediatricae*. 2014, č.6.
16. Liška, J., Siala, K., Holeček, V., Sobotová, Š., Kepková, M., Šefrna, F.: Effect of Early Treatment of Newborns by Peroral Colonization Using Non-pathogenic *E. coli* on the Development of Their Immuno-allergic System. *Clinical Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Drugs*. 2014, 1, 111-121.
17. Liška, J., Holeček, V., Siala, K., Sobotová, Š., Sýkora, J., Racek, J., Trefil, L., Šefrna, F.: Early neonatal markers related to allergy prediction in newborn. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*. (k tisku 2016, IF 0,69)
18. Liška, J., Siala, K., Holeček, V., Sobotová, Š., Šefrna, F.: Significance of immunoglobulin E in umbilical blood in relation to an allergic family history, it's relation to seasonality, immunity and possibility of pre- and postnatal consequences. The remarkable subsequent effects of altering gastrointestinal flora in treated newborns. *Journal of Life Sciences*. Invite article, 2016, IF 3,6.

## **10 Přílohy**