

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



**Identifikace buněčných populací v periferní krvi a  
*lamina propria* myši se střevním zánětem a jejich  
porovnání s populacemi u myši zdravých**

**Diplomová práce**

Autor:	<b>Bc. Patrik Hrubčík</b>
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.</b>
Rok:	2023



Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 25. 4. 2023

.....

Bc. Patrik Hrubčík

Rád bych poděkoval vedoucí práce Mg. Kateřině Zachové, Ph.D. za cenné rady, doporučení, připomínky, trpělivost, pozitivní náladu i přístup a odborné vedení při vypracování teoretické i experimentální části práce. Mé poděkování patří také Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého za možnost realizace experimentální části práce a výzkumné skupině imunomodulace za přátelský přístup a ochotu pomoci.

Zpracování této práce bylo podpořeno grantem IGA\_LF\_2022\_011.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Patrik Hrubčík
Název práce	Identifikace buněčných populací v periferní krvi a <i>lamina propria</i> myši se střevním zánětem a jejich porovnání s populacemi u myši zdravých
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav Imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt

Teoretická část práce je věnována buněčné složce imunitního systému. Jsou charakterizovány všechny významné imunitní typy buněk, a to jak po fenotypové, tak funkční stránce. Pozornost je zaměřena na principy spolupráce imunitních buněk při navozování slizniční obranyschopnosti trávicí trubice, především pak střev jako její výkonné části. Trávicí trubice díky svému spojení s vnějším prostředím představuje jednu z hlavních vstupních bran patogenů do organismu, kdy drtivá většina infekcí probíhá přes sliznice. Proti tomu si organismy vyvinuly řadu mechanismů souvisejících se strategickým rozmístěním imunitních buněk ve sliznici, jejichž životní funkcí je daný patogen identifikovat a v co největší míře eliminovat. V rámci střevní tkáně jsou imunitní buňky přítomny ve slizniční vrstvě *lamina propria* a struktury, které vytvářejí, souhrnně označujeme jako GALT. V práci je GALT charakterizována s anatomickým a histologickým popisem stavby střevní tkáně myši, jako modelového organismu pro studium nespecifických střevních zánětů. Doplněním je i porovnání s tkání humánní.

Experimentální část si klade za cíl vyizolovat, identifikovat a kvantifikovat imunitní buněčné populace z periferní krve a *lamina propria* tlustého střeva myši. Buňky myšního tlustého střeva byly podrobeny fenotypové analýze prostřednictvím světelné i fluorescenční mikroskopie. Hlavní analýza byla provedena pomocí spektrální průtokové cytometrie. Hledané buněčné populace byly identifikovány na bázi značení specifickými

protilátkami. Mezi sebou pak mohly být srovnávány populace myší periferní krve s odpovídajícími populacemi v myším tlustém střevě, a především pak populace tlustého střeva u vzorků zdravých kontrol se vzorky myších modelů, u nichž byl navozen nespecifický střevní zánět. Získaná data byla statisticky vyhodnocena programem FlowJo a GraphPad. Výsledky jsou cennou informací při výzkumu nových terapeutických přístupů k léčbě nespecifických střevních zánětů, jako je Crohnova choroba či Ulcerózní kolitida.

Klíčová slova	buněčná populace, <i>lamina propria</i> , sliznice střeva, myší model, nespecifický střevní zánět, GALT
Počet stran	88
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Patrik Hrubčík
Title	Identification of cell populations in peripheral blood and <i>lamina propria</i> of mice with intestinal inflammation and their comparison to populations of healthy mice
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Immunology Faculty of Medicine and Dentistry
Supervisor	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
The year of presentation	2023

### Abstract

The theoretical part of the thesis is devoted to the cellular component of the immune system. All important immune cell types are characterized, both phenotypically and functionally. Attention is focused on the principles of cooperation of immune cells in inducing the mucosal defences of the digestive tract, especially the intestines as its efficient part. The digestive tract, thanks to its connection with the external environment, represents one of the main gateways of pathogens into the organism, with the vast majority of infections taking place through the mucous membranes. Against this, organisms have developed a number of mechanisms related to the strategic positioning of immune cells in the mucosa, whose vital function is to identify the pathogen and to eliminate it as much as possible. Within the intestinal tissue, immune cells are present in the mucosal layer of lamina propria and the structures they create are collectively referred to as GALT. In the work, GALT is characterized with an anatomical and histological description of the structure in mice, as a model organism for the study of non-specific intestinal inflammations. The comparison with human tissue is also complementary.

The experimental part aims to isolate, identify and quantify immune cell populations from the peripheral blood and lamina propria of the mouse colon. The mouse colon cells were

subjected to phenotypic analysis by both light and fluorescence microscopy. The main analysis was performed by spectral flow cytometry. The cell populations were identified by specific antibody labeling. Among themselves, populations of the mouse peripheral blood could be compared with the corresponding populations in the mouse colon, and in particular the colon population in healthy control samples with mouse models in which intestinal inflammation was induced. The data obtained were statistically evaluated by FlowJo and GraphPad. The results are valuable information in the research of new therapeutic approaches for the treatment of non-specific intestinal inflammation such as Crohn's disease or Ulcerative colitis.

Keywords	cell population, <i>lamina propria</i> , intestinal mucosa, mouse model, nonspecific intestinal inflammation, GALT
Number of pages	88
Number of appendices	0
Language	Czech



## Obsah

<b>1 ÚVOD</b>	1
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	2
2.1 Imunitní systém	2
2.2 Charakteristika vybraných zástupců buněčné imunity	3
2.2.1 Makrofágy a monocyty	3
2.2.2 Eozinofilní granulocyty	8
2.2.3 Neutrofilní granulocyty	11
2.2.4 Vrozené lymfoidní buňky 2. typu a 3. typu	13
2.2.5 T lymfocyty	15
2.2.6 B lymfocyty	18
2.3 Myš jako modelový organismus pro studium střevních chorob	21
2.3.1 Anatomický popis stavby myšního střeva	21
2.3.2 Histologický popis stavby myšního střeva	23
2.4 Mukózní imunita střeva	25
2.4.1 Mikrobiota lidského střeva	25
2.4.2 Stavba a typizace GALT	26
2.4.3 Obranné mechanismy střevní sliznice	29
2.4.4 Princip fungování slizniční imunity	31
2.4.5 Patologie střevní sliznice	34
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	36
3.1 Materiál	36
3.1.1 Biologický materiál	36
3.1.2 Chemikálie a roztoky	37
3.1.3 Složení připravovaných roztoků	37
3.1.4 Komerční soupravy	38
3.1.5 Spotřební materiál	38
3.1.6 Přístroje	38
3.1.7 Software	39
3.2 Metody	40
3.2.1 Příprava vzorků pro srovnání klasické průtokové a spektrální cytometrie	40
3.2.2 Izolace imunitních buněk z <i>lamina propria mucosae</i> myšního tlustého střeva	40
3.2.3 Příprava vzorků pro cytometrickou analýzu	41
3.2.4 Příprava knihovny fluorochromů	42

3.2.5	Příprava mikroskopických preparátů imunitních buněk <i>lamina propria mucosae</i> myšního tlustého střeva	42
3.2.6	Barvení buněk preparátů Pappenheimovou panoptickou metodou	43
3.2.7	Barvení buněk preparátů Giemsovou metodou	43
3.2.8	Značení buněk preparátů fluorescenčně konjugovanými protilátkami	43
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>44</b>
4.1.1	Srovnání klasické průtokové a spektrální cytometrie	44
4.2	Mikroskopická analýza imunitních buněk <i>lamina propria</i> myšního tlustého střeva	47
4.3	Cytometrická analýza imunitních buněk periferní krve a <i>lamina propria</i> tlustého střeva myši	55
4.3.1	Srovnání imunitních buněčných populací mezi periferní krví a tlustým střevem myších modelů	55
4.3.2	Vliv různé doby podávání DSS myším na zastoupení imunitních buněk	59
4.3.3	Srovnání imunitních buněčných populací v <i>lamina propria</i> tlustého střeva mezi myšimi modely se střevním zánětem a zdravými kontrolami	62
<b>5</b>	<b>DISKUSE</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b>	<b>87</b>

# CÍLE PRÁCE

## Teoretická část

- základní funkce lymfocytů, makrofágů a eozinofilů
- popis zapojení buněk v zánětu
- mukózní imunita střeva (GALT), anatomie myšního střeva
- lokalizace a význam jednotlivých buněčných populací ve střevě

## Experimentální část

- seznámení se se spektrální cytometrií a její porovnání s klasickou průtokovou cytometrií
- optimalizace extrakce buněčných populací ze střevní mukózy
- příprava vzorků pro spektrální cytometrii
- analýza základních buněčných populací v periferní krvi a *lamina propria* myši
- vyhodnocení multiparametrických dat softwarem FlowJo
- statistické vyhodnocení výsledků programem GraphPad

# 1 ÚVOD

Imunitní systém je jedním ze základních homeostatických soustav pro udržení integrity organismu. Jeho bazální funkcí je navození obranyschopnosti, která je v různém stupni vývoje zásadní vlastností všech živočichů. Imunita je udržována prostřednictvím buněčných i humorálních mechanismů. Jednou z potenciálních hlavních vstupních bran patogenů do organismu je díky svému spojení s vnějším prostředím gastrointestinální trakt. Aby došlo k infekci výkonné části trávicí soustavy, tedy střev musí patogen překonat celou řadu obranných valů. Nejvýraznější obranu představují mechanismy tzv. slizniční imunity, kdy imunitní buňky, jejichž životním posláním je patogeny identifikovat a v co největší míře eliminovat, se nachází ve vysoké koncentraci ve slizniční vrstvě *lamina propria* těsně pod epitelovou bariérou. Imunitní buňky jsou strategicky rozmístěny ve strukturách jako Payerovy pláty, lymfoidní folikuly a další se sliznicí asociované lymfatické tkáně, které v gastrointestinálním traktu souhrnně označujeme jako GALT. Během zánětlivého procesu spolu imunitní buňky velmi intenzivně komunikují, vzájemně se ovlivňují, diferencují a směřují zánětlivou odpověď určitým směrem, který je dán konkrétním patogenem. V souvislosti s mechanismy střevní slizniční imunity jsou v současné době intenzivně studovány tzv. nespecifické střevní záněty, jejichž nejvýraznějšími představiteli jsou Crohnova choroba a Ulcerózní kolitida. Na aktuální léčbu asi 40–50 % takto postižených pacientů neodpovídá. Další výzkum v této oblasti je proto značně žádaným. Jedním z nejvíce využívaných modelů pro studium mechanismů střevní slizniční imunity je myš, kdy stavba a složení stěny trávicí trubice vykazuje s člověkem značnou podobnost. Modelově se jako činidlo pro navození střevního zánětu pro myši používá dextran sulfát sodný narušující epitelovou bariéru. Vhodnou metodou využívanou pro studium a charakterizaci buněčných typů je spektrální průtoková cytometrie, fungující na principu značení buněk specifickou protilátkou konjugovanou s příslušným fluorochromem, kdy získaný signál lze vyhodnotit a danou buněčnou populaci identifikovat a kvantifikovat. Získaná data jsou cennou a žádanou součástí komplexních výsledků při výzkumu nových efektivnějších terapeutických a medikamentózních přístupů k léčbě nespecifických střevních zánětů s cílem zvýšit úspěšnost léčby.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Imunitní systém

Imunitní systém je základní součástí všech vyšších organismů. Jedná se o jednu ze tří základních homeostatických soustav, kdy společně s nervovou a endokrinní soustavou pomáhá zajistit stálost vnitřního prostředí, tj. homeostázu. Jeho hlavní funkcí je obrana a udržování integrity organismu. Dokáže rozpoznat potenciálně nebezpečné substance, obecně označované jako antigeny a spustit mechanismy vedoucí k jejich eliminaci (Abbas *et al.*, 2012).

Imunitní systém se skládá ze 2 základních částí: vrozené a adaptivní imunity. Vrozená imunita rozpoznává možné nebezpečí skrze molekulární vzory, které jsou součástí antigenů, tzv. PAMPs (pathogen associated molecular patterns), DAMPs (damage associated molecular patterns) a MAMPs (microbe associated molecular patterns). Reaguje na ně stejnými principy, a to i při opakovaném setkání s daným patogenem. Evolučně vyšší adaptivní imunita (též získaná) cíleně, specificky rozeznává daný patogen a při opakovaném setkání s ním zahájí kroky k jeho eliminaci daleko rychleji a účinněji (tzv. imunologická paměť) (Abbas *et al.*, 2012; Krejsek *et al.*, 2016).

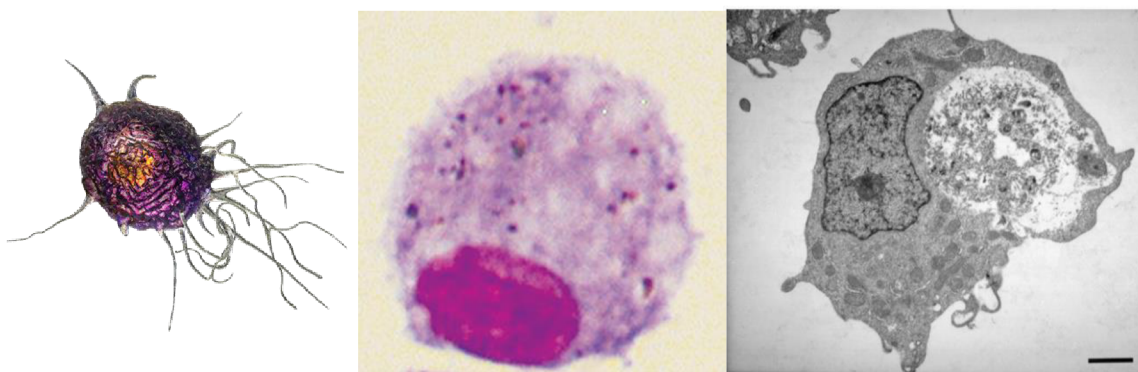
Oba imunitní typy využívají mechanismy humorální (látkové) a buněčně zprostředkované. Jedinečnost imunitního systému tkví také v tom, že na rozdíl od ostatních orgánových soustav je soustavou difuzní, tj. hlavní komponenty (buňky a molekuly) jsou rozptýleny v tělních tekutinách a samotné orgány (kostní dřeň, brzlík, slezina, lymfatické uzliny) mají spíše druhotné postavení. Mezi hlavní humorální složky imunitního systému patří imunoglobuliny (protilátky), antigenně specifické receptory (TCR, BCR), MHC (Major histocompatibility complex) I. a II. třídy, různé typy receptorů, cytokiny a další. Imunitní molekuly jsou obecně označovány systémem CD (cluster of differentiation) a často slouží také jako typické markery daných buněčných populací. Buněčnou složku vrozené imunity tvoří zejména makrofágy, monocyty, dendritické buňky a granulocyty (neutrofyly, eosinofyly, bazofyly). T a B lymfocyty jsou pak představiteli imunity adaptivní. Všechny imunitní buňky spolu velmi intenzivně spolupracují za vzniku velmi složité komunikační sítě pro zajištění maximální možné obrany proti škodlivým látkám a dalším antigenům (Abbas *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2017).

## 2.2 Charakteristika vybraných zástupců buněčné imunity

### 2.2.1 Makrofágy a monocyty

Makrofágy a monocyty jsou základní součástí vrozené části imunitního systému. Morfologicky makrofágy patří k největším leukocytům (Obr. 1). Jejich životnost se pohybuje v rozmezí měsíců až let (van Wilgenburg *et al.*, 2013). Velikost průměru buňky dosahuje i okolo 20  $\mu\text{m}$ . Jádro je většinou ledvinovité, až oválné, excentricky uložené. Můžou být pozorována 1 nebo 2 jadérka. Celkový fenotyp, a tedy i morfologie, velmi závisí na mikromilieu. Makrofágy jsou totiž extrémně dynamické a proměnlivé buňky s rozsáhlou lokální heterogenitou (Gordon, 2007). Monocyty jsou oválné buňky obdobné velikosti jako makrofágy s viditelnými azurofilními granuly v cytosolu a laločnatým jádrem ledvinovitého tvaru. Zralé monocyty se však velmi těžce odlišují od svých prekurzorů (Goasguen *et al.*, 2009).

Vývoj makrofágů probíhá ve 3 časově i prostorově překrývajících se vlnách produkce, kdy různé tkáňově specifické podmínky jsou příčinou značné funkční různorodosti makrofágů (Tab. 1). Jejich tvorba začíná již v embryonálním období a jedná se o jednu z prvních linií krevních buněk, objevujících se během hematopoézy (Davies *et al.*, 2013). První vlna, probíhající ve shlucích buněk (označovány jako krevní ostrovy) v nitru extraembryonálního žloutkového vaku, generuje unipotentní progenitory makrofágů spolu s bipotentními progenitory erytrocytů a megakaryocytů (Tober *et al.*, 2006). Tyto progenitory zůstávají v ostrůvcích, až do rozvoje krevního oběhu embrya. Poté jím začnou cirkulovat, současně pokračují v proliferaci a kolonizují vyvíjející se mozek embrya. Tyto progenitory, identifikované jako  $\text{c-Kit}^-$  (receptor tyrosine kinase),  $\text{CD45}^+$ ,  $\text{CX}_3\text{CR1}^+$  ( $\text{CX}_3\text{C}$  motif chemokine receptor 1), dávají vzniknout budoucím mikroglíím



Obr. 1: Makrofág, a) schématicky (převzato z *BioLegend*. <https://www.biologend.com/>), b) světelná mikroskopie (převzato z Gosens *et al.*, 2015), c) transmisní elektronová mikroskopie (převzato z Dedonder *et al.*, 2012).

(Hoeffel *et al.*, 2015). Pro jejich vývoj je rovněž důležitá signalizace TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), kdy u myšího modelu s deficitem TGF- $\beta$  nebyly mikroglie detekovány (Butovsky *et al.*, 2014). Druhá vlna produkce makrofágů vychází z multipotentních erytro–myeloidních progenitorových buněk (EMP) odvozených od homogenního endotelu vaskulatury žloutkového vaku. Jde o vysoce proliferativní progenitorové buňky expandující ve žloutkovém vaku. Nicméně po rozvoji embryonálního krevního řečiště osídlují vyvíjející se fetální játra a další embryonální tkáně. Tato skutečnost byla opět prokázána na myším modelu, kdy v důsledku deficitu krevního oběhu embrya byly EMP zadržovány ve žloutkovém vaku (Ginhoux *et al.*, 2010; Frame *et al.*, 2014). EMP ve fetálních játrech produkují první denukleované erythrocyty, bipotentní granulocyto/makrofágové progenitory a mastocyty, avšak pouze krátkodobě (Bertrand *et al.*, 2005). Vývojově důležité molekuly na povrchu EMP, sloužící zároveň jako buněčné markery, jsou c–Kit, CD41 a CD16/32. EMP jsou také CD93<sup>-</sup>. Druhá vlna tedy produkuje většinu tkáňově rezidentních makrofágů (Tab. 1). Třetí vlna vzniká z homogenního endotelu v oblasti aorta–gonáda–mezonefros (tzv. AGM oblast)

Tab. 1: Typy makrofágů s jejich tkáňovou lokalizací.

Tkáňově specifické reziduální makrofágy	
název	tkáň
alveolární makrofágy	plicní alveoli
makrofágy červené pulpy	červená pulpa sleziny
makrofágy marginální zóny	marginální zóna sleziny (rozhraní červené a bílé pulpy)
metalofilní makrofágy	slezina (přiléhající k bílé pulpě a okrajovému sinusu)
Kupfferovy buňky	játra, jaterní sinusoidy
mikroglie	mozek, CNS
peritoneální makrofágy	peritoneum
Langerhansovy buňky	epidermis
makrofágy intestinální <i>lamina propria</i>	velká a malá intestinální <i>lamina propria</i>
muskulární makrofágy	muskulární vrstva inestina
osteoklasty	kost
makrofágy subkapsulárního sinu	lymfatická uzlina
cardiotické makrofágy	srdce
histiocyty	pojiva

s obsahem hematopoetických kmenových buněk (HSC), které tedy mají spolu s EMP stejný původ. HSC se v důsledku odlišného vývoje však objevují ve shlucích v endoteliální výstelce s následnou migrací do vyvíjejících se jater plodu. Zde dochází k masivní proliferaci a střetu s druhou vlnou vývoje, tj. játra plodu jsou inokulována EMP ze žloutkového vaku a HSC z AGM. Poté dochází k opětovné migraci a následné kolonizaci kostní dřeně, kde vytváří zásobu pro vznik všech linií krevních buněk po celý život (Coskun *et al.*, 2014). Z hlediska vzniku makrofágů je důležité, že tato třetí vlna zahrnuje mezistupeň ve formě monocytů. Hematopoéza v játrech se tak přesouvá do kostní dřeně. V krvi cirkulující monocyty jsou schopny v případě potřeby vycestovat do tkání a pod vlivem GM-CSF (colony stimulating factor granulocyte/macrophage) a M-CSF (colony stimulating factor macrophage) se diferencovat a stávají se tak hlavním zdrojem nově dodávaných tkáňově rezidentních makrofágů. Obecně nejdůležitějším regulátorem vývoje všech makrofágů je CSF1 (colony stimulating factor 1), pro něhož makrofágové progenitorové buňky exprimují příslušný tyrosinkinasový transmembránový receptor (CSF1-R) (Lavin *et al.*, 2015).

Funkčně makrofágy odpovídají především za pohlcování a zpracování cizích, nefunkčních nebo mrtvých buněk či korpusek procesem fagocytózy a jejich následným rozkladem. Nicméně patří i k účinným antigen prezentujícím buňkám, podílí se na hemopoéze, hemostáze a regulaci zánětu. Makrofágy velmi ochotně mění svou genovou expresi v reakci na různé podněty. Tato plasticita transkripčních profilů vytváří vysokou specifitu pro danou tkáň na základě které, rozlišujeme různé typy makrofágů (Plowden *et al.*, 2004).

Makrofágy se při zánětlivé reakci vyvíjí z v krvi cirkulujících monocytů, které v dané situaci vycestovávají z krevních kapilár do tkání. Monocyty mají na rozdíl od makrofágů krátkou dobu přežití a denodenně podléhají apoptóze. Při zánětu je tento proces potlačen, monocyty přežívají a dávají vzniknout tkáňově rezidentním makrofágům (Ziegler-Heitbrock, 2000). Makrofágy na svém buněčném povrchu exprimují řadu receptorů pro ligandy zprostředkovávající poplašné signály nebezpečí. Funkční fenotypy makrofágů můžeme rozdělit na klasicky (M1) a alternativně (M2) aktivované (Italiani, P., & Boraschi, 2014). M1 jako prozánětlivé makrofágy vývojově vznikají v přítomnosti GM-CSF a aktivují se na základě stimulu PRR (pattern recognition receptors) vhodnými ligandy. Těmi mohou být např. bakteriální LPS (lipopolysacharid), některé cytokiny, kde má majoritní význam INF- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) (Banerjee *et al.*, 2013). Dochází tak k aktivaci signálních drah na bázi JAK/STAT (Janus kinases/signal transducer and aktivátor of



transcription pathway), které ovlivňují genovou expresi buňky. M1 jsou pak charakteristické produkcí prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 a IL-23), chemokinů (CCL5, CCL8, CXCL2 a CXCL4) a NO prostřednictvím exprese iNOS (indukovaná NOsynthasa). Směřují tak imunitní systém k Th1 odpovědi. Vykazují také zvýšenou schopnost prezentovat antigen T lymfocytům a aktivovat je díky zvýšené expresi MHC II (major histocompatibility complex II) a CD80/86 (Nazimek a Bryniarski, 2012). Makrofágy typu M2 jsou naopak protizánětlivé. Jejich aktivace je vyvolána především IL-4 (interleukin 4) a IL-13, produkovaných Th2 lymfocytů, žírnými buňkami a bazofily (Stein *et al.*, 1992). Tento typ aktivace, označovaný jako M2a, je v případě M2 makrofágů dominantní. IL-4 se s vysokou afinitou váže na membránový komplex tvořený IL-4R $\alpha$  (interleukin 4 receptor  $\alpha$ ) a IL-2R $\gamma$ . S nižší afinitou pak na heterodimerní komplex IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1. IL-13 se s nízkou afinitou váže na monomerní IL-13R $\alpha$ 1, s vysokou afinitou pak na IL-13R $\alpha$ 2 a komplex IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1. Vlivem působení obou interleukinů dochází v konečném důsledku ke snížení produkce prozánětlivých mediátorů (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, produkce ROS a další.), zvýšení exprese fibronektinu 1 (podpora fibrogenese) či IGF-1 (inzulin like growth factor 1) důležitého v signalizaci pro reparaci tkání (Gratchev *et al.*, 2001). Významný je i experimentálně potvrzený fakt, kdy M2a buňky neexprimují iNOS, ale arginase 1. Tomu odpovídá snížená produkce NO související se sníženou mikrobicidní schopností a naopak zvýšená produkce polyaminů a prolinu spojená s tvorbou kolagenu, růstem buněk a obnovou tkání (Scotton *et al.*, 2005). Dalším typem aktivace M2 je M2b. Takto aktivované makrofágy jsou stimulovány IL-1 $\beta$  nebo LPS skrze receptory TLR4 (toll like receptor 4) a IL-1R. Aktivace může být vyvolána i imunitními komplexy opsonizovanými IgG (imunoglobulin G), jejichž Fc (fragment crystallizable) část je rozpoznatelná Fc $\gamma$ R (Fc  $\gamma$  receptor) (Bowie & O'Neill, 2000). M2b se vyznačují intenzivní produkcí IL-10 a směřování k Th2 typu imunitní odpovědi. Produkují však také TNF $\alpha$ , IL-6 či IL-1 $\beta$ , což naznačuje, že se nejedná o rize antiinflamatorní buňky (Mantovani *et al.*, 2004). Posledním typem aktivovaných M2 je M2c. Tyto makrofágy jsou aktivovány především IL-10, TGF- $\beta$  nebo glukokortikoidy. Opět je společným znakem pro tyto buňky downregulace prozánětlivých cytokinů. IL-10 mimo jiné zásadně ovlivňuje dobu trvání a intenzitu imunitní zánětlivé reakce. Navozuje snížení exprese MHC II, a tedy sníženou prezentaci antigenu. Glukokortikoidy, uvolňované tkáněmi jako odpověď na různé stresové stimuly, jsou rozpoznávány příslušným receptorem až v jádře, kdy u M2c tato

signalizace silně potlačuje produkci prozánětlivých mediátorů (Bogdan *et al.*, 1992). U všech typů M2 má v signalizaci zásadní postavení dráha PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3-kinase/proteinkinase B pathway). Aktivované PRR aktivují PI3K, která fosforyluje PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) na PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) v membráně. K PIP3 se následně napojuje Akt, která je prostřednictvím rekrutace a aktivace mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) aktivována. Může pak fosforylovat a tím inaktivovat TSC1/2 (tuberous sclerosis protein 1/2), což vede k aktivaci mTORC1 (Covarrubias *et al.*, 2015). Ten pak funguje jako energetický senzor a regulátor syntézy proteinů včetně cytokinů (Vergadi *et al.*, 2017).

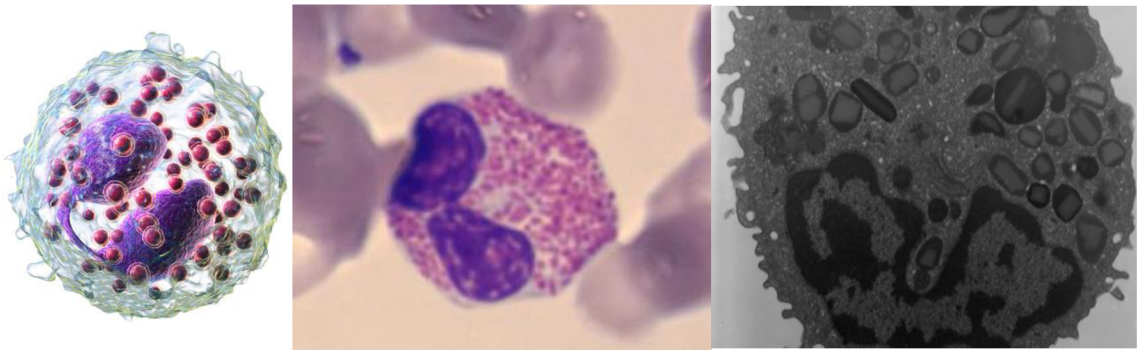
Fagocytóza je definována jako příjem částic větších než 5  $\mu\text{m}$ . Částečně se překrývá s příjmem naopak menších solubilních látek endocytózou. Existují různé varianty fagocytózy jako je efferocytóza (vychytávání apoptických buněk), nekroptóza, pyroptóza (oba tyto případy se liší svou závislostí na enzymech kaspasy, kdy nekroptóza je na nich nezávislá) (Gordon, 2016). Mezi tzv. profesionální fagocyty, tedy buňky, které využívají fagocytózu jako jednu ze svých hlavních životních rolí, patří kromě makrofágů i neutrofilů, monocytů a eozinofilů. Nicméně schopnost fagocytovat mají i ostatní imunocyty. Smrt buňky fagocytózou, označována jako fagoptóza, je jednou z nejdůležitějších obranných imunitních mechanismů (Brown, 1995).

Celý proces je fagocytující buňkou velmi striktně regulován (Brown *et al.*, 2015). Začíná heterofágií buňky či větší částice. K tomu jsou potřebné receptory v membráně fagocytu (typicky CD206, Fc $\gamma$ 3a, CD36, MARCO, ...) rozpoznávající své příslušné ligandy exprimované na povrchu buňky určené k zániku. Chemická struktura receptorů i ligandů je značně rozmanitá. Většinou jde o proteiny, ale jsou zde zahrnuty i glykokonjugáty či komplexní lipidy (Flannagan *et al.*, 2012). Patogeny si však vyvíjí řadu strategií, jak se rozpoznání fagocytem vyhnout. Jedním z nejvyužívanějších mechanismů je exprese ligandu pro inhibiční receptor, který fagocytózu zastaví (např. CD31). Dalším může být vazba sérových proteinů na ligand, čímž si patogen vytváří štít proti rozpoznání (Flannagan *et al.*, 2010). Klinický problém mohou představovat nanočástice a chirurgické implantáty, které mohou být vyhodnoceny jako cizorodý materiál a v reakci na jeho přítomnost se může rozvinout zánět. Např. částice titanu jsou částečně rozpoznatelné receptorem MARCO (Macrophage receptor with collagenous structure) (Arredouani *et al.*, 2005). Receptory se liší nejen chemicky a typem rozpoznávaného ligandu, ale i mechanismem signalizace, který spouští. Signalizační kaskády však obecně vedou ke shlukování receptorů za tvorby raftů. V membráně se přechodně lokálně zvyšuje syntéza

PI(3,4)P2 (přítomného v ramenu pseudopodia), který je dále fosforylován na PI(3, 4, 5)P3 a dostává se na dno fagocytárního pohárku, aby mohl být nakonec defosforylován na PI(4,5)P2 (Covarrubias *et al.*, 2015). Řada receptorů obsahuje v cytosolické části motiv ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), který po fosforylaci aktivuje kinasu Src spouštěcí kaskádu vedoucí k aktivaci GTPas z rodiny Rho (Johnson *et al.*, 1995). Ty štěpí GTP v aktinu, což je nezbytné pro zahájení jeho polymerizace a tvorby lamellipodia, jež objímá pohlcovanou částici. Nakonec dochází k fúzi membrány obou ramen lamellipodia za tvorby fagozomu (Flannagan *et al.*, 2010). Ten se postupně mění v silně mikrobicidní organelu. V membráně fagozomu je přítomen protein Rab 5 (Ras-associated binding protein 5), který spolu se SNARE proteiny (SNAP receptor) iniciuje fúzi s ranným endozomem (Duclos *et al.*, 200). Tím fagozom podléhá značné acidifikaci a obohacuje se o endozomální hydrolytické enzymy. Fagozom je také přes membránový protein RILP (Rab-interacting lysosomal protein), na který se váže molekulární motor dynein, asociován s mikrotubuly pro intracelulární pohyb (Johansson *et al.*, 2007). Později, splýváním s pozdními endozomy, fagozom opět mění svou proteinovou výbavu, kdy se v jeho membráně koncentruje v-ATPasa (vacuolar-type ATPase) a protein Rab7, důležitý pro následné spojení s lysozomy. Ranný fagozom tak přechází v pozdní fagozom a nakonec po spojení s lysozomem ve fagolysozom. Teprve fagolysozom je konečná mikrobicidní organela s plným enzymatickým vybavením pro degradaci pohlcené částice (Flannagan *et al.*, 2010). Dochází také k výrazné produkci ROS (reactive oxygen species) a RNS (reactive nitrogen species) díky aktivaci membránové NADPH-oxidasy. Tyto látky s vysokým oxidačním účinkem napomáhají při rozkladu obsahu fagolysozomu, ale i rozvoji zánětu. Výrazná acidita (pH 4–5) uvnitř fagolysozomu díky pumpování protonů prostřednictvím v-ATPasy je zásadní pro aktivaci kyselých hydrolytických enzymů. Ty mají za úkol rozložit vstřebaný obsah, který je následně buňkou využit (Flannagan *et al.*, 2010).

### **2.2.2 Eozinofilní granulocyty**

Eozinofily (Obr. 2) jsou jedním ze základních typů buněk vrozené části imunitního systému. Jako první je v roce 1879 popsal P. Ehrlich, který zjistil, že se barví acidofilními barvivami (Gleich & Loegering, 1984). Vytváří asi 1–3 % leukocytů, jejich životnost se pohybuje okolo 10 hodin v krevním řečišti a 8–12 dní v tkáních. Jde o zaoblené buňky s průměrem asi 15  $\mu\text{m}$  (McBrien & Menzies-Gow, 2017; Rothenberg & Hogan, 2005). Velmi charakteristické je jádro, které je segmentováno ve 2 laloky spojené tenkým



Obr. 2: Eozinofilní granulocyt, a) schématicky (převzato z Wikiversity. <https://en.wikiversity.org/>), b) světelné mikroskopie (převzato z Cellavision. <https://www.cellavision.com/>), c) transmisní elektronová mikroskopie (převzato z Dartmouth. <https://home.dartmouth.edu/>).

můstkem (Obr. 2). Tato jaderná morfologie je však závislá na druhu organismu. Dalším charakteristickým znakem a ústředním prvkem funkčních reakcí eosinofilů je přítomnost acidofilních granul v cytoplasmě. Granula mohou být ve skupinách po 10–40, kdy pak jsou mikroskopicky pozorovatelné jako kulovité váčky (Kay, 2015; Rothenberg & Hogan, 2005).

Eozinofilní leukocyty jsou produkovány z multipotentních hematopoetických krevních buněk v kostní dřeni. V eozinofilní vývojové linii je zapojena řada transkripčních faktorů a mediátorů. V raných fázích vývoje má zásadní význam faktor PU.1, kdy úroveň velikosti jeho exprese určuje, zda se buňka vydá myeloidní nebo lymfoidní vývojovou větví (McNagny & Graf, 2002). Synergicky s PU.1 v eozinofilním vývoji působí i GATA–1 (GATA–binding factor 1), ačkoliv obvykle je považován za jeho antagonistu (Du *et al.*, 2002). Z cytokinových mediátorů je zásadní kombinace IL–3, GM–CSF a IL–5. Právě IL–5 je vůbec nejspecifičtější pro eozinofilní vývojovou linii (Collins *et al.*, 1995). Eozinofily se diferencují ze společného prekurzoru granulocytů a makrofágů ( $CD34^+$ ,  $c-kit^+$ ,  $Scan-1^-$ ,  $Lin^-$ ), z něž se vyvíjí první charakteristický eozinofilní progenitor, identifikován jako  $IL-5R\alpha^+$ ,  $Singlec-F^+$ ,  $Pir A/B^+$  (paired immunoglobulin–like receptor A/B). Dalším vývojem dochází k expresi eotaxinového receptoru CCR3 (C–C motif chemokine receptor 3) (CD193) a pod vlivem IL–5 uvolňování zralých eozinofilních buněk do krevního oběhu. Ty již postrádají schopnost vstoupit do buněčného cyklu, a nemohou se proto množit (Geering *et al.*, 2013; Willebrand & Voehringer, 2017).

Funkčně jsou eozinofily odpovědné za boj proti mnohobuněčným parazitům a spoluřídí mechanismy spojené s alergiemi (Sanderson, 1992). Obsahují 2 typy granulí. Primární, azurofilní granula, společná všem granulocytům, která obsahují řadu rozkladných enzymů jako kyselá hydrolasy, myeloperoxidasu, elastasu, fosfolipázu A2 a

další. V zásadě se jedná o lysozomy s hydrolytickou aktivitou (Muniz *et al.*, 2014). Vedle nich jsou v cytoplazmě dominantně zastoupena tzv. sekundární, specifická, krystaloidní granula. Strukturně jde o membránové útvary s krystaloidním jádrem obklopeným matricí. Sekundární granula jsou charakteristická zásobou předem vytvořených kationtových proteinů. Mezi jejich hlavní zástupce patří ECP (eozinophilic cationic protein), MBP 1 + 2 (major basic protein), EPO (eozinophilic peroxidase) a řada dalších chemokinů, cytokinů či růstových faktorů (Acharya & Ackerman, 2012).

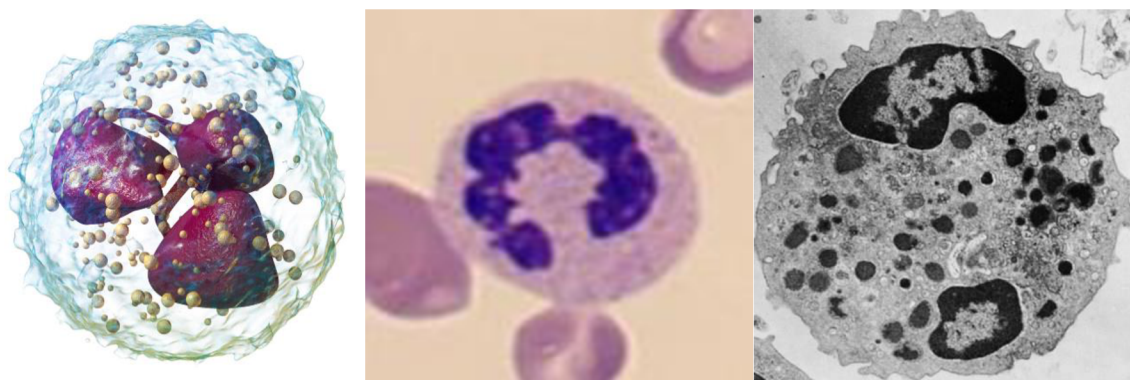
ECP, také známý jako RNasa-3, má výraznou antibakteriální a antiparazitární aktivitu, kdy cílem působení je tvorba pórů, jak v buněčné stěně, tak v plasmatické membráně, a je proto účinný proti gram<sup>+</sup> i gram<sup>-</sup> bakteriím (Rosenberg, 1995). S RNasovou aktivitou je pak spojena antivirová a neurotoxická funkce (Domachowske *et al.*, 1998). Má však i řadu necytotoxických aktivit jako je suprese odpovědi T lymfocytů, degranulace žírných buněk a další (Venge *et al.*, 1999). EPO využívá H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vzniklý z ROS při oxidačním vzplanutí eozinofilů, jako substrát pro tvorbu látek s vysokými oxidačními účinky (např. HO<sub>2</sub>SCN) (Wang *et al.*, 2006). MBP je bazickým proteinem s řadou toxických funkcí. Vyvolává deskvamaci epitelálních buněk dýchacích cest, ale také aktivuje neutrofilů či bazofilů. Předpokládá se, že svým vysokým kladným nábojem narušuje fosfolipidovou dvojvrstvu buněčného povrchu, čímž zvyšuje její permeabilitu (Wasmoen *et al.*, 1988; Acharya & Ackerman, 2012). Na rozdíl od ECP a EPO, které jsou lokalizovány v matrici granule je MBP umístěn přímo v krystaloidním granulárním jádře (Moy *et al.*, 1990). Uvolňování těchto granulových proteinů může nastat třemi způsoby. Základním je exocytóza, při níž granula splývají s plasmatickou membránou a je tak mobilizován jejich veškerý obsah (Muniz *et al.*, 2012). Nejčastější je však regulovaná sekrece zahrnující intracelulární signalizaci a transport proteinů v sekrečních váčcích, kdy tato cesta přináší možnost selektivního uvolňování konkrétních proteinů. Po přijetí signálu se daný protein uvolní z granula v kulaté či tubulární vezikule. Tubulární vezikuly jsou díky tendenci se kroutit se do obroučkovité morfologie nazývány jako „eosinofilní sombrero váčky“ (Melo *et al.*, 2008). Třetí, nejméně prozkoumanou možností je cytolýza eozinofilů, kdy se granula dostanou do extracelulárního prostředí po rozpadu buňky a jsou po určitou dobu schopné samostatné existence, dokonce s možností přijímání signálů (Muniz *et al.*, 2012). Eosinofil tak ovlivňuje imunitní reakci i po svém zániku. Význam zde má signalizace IFN $\gamma$  a eotaxinem, pro něž jsou v membráně eosinofilních specifických granul zanořeny receptory IFN $\gamma$ R a CCR3. Po stimulaci těchto receptorů ligandy dochází rovněž

k uvolnění granulárního obsahu, což napomáhá udržovat zánětlivou reakci. Detailní mechanismus však zatím přesně objasněn není (Neves & Weller, 2009).

### 2.2.3 Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty (Obr. 3) jsou nejhojnější cirkulující leukocytární populací v krvi. Jsou považovány za krátce žijící buňky s poločasem v oběhu asi 8–20 hodin (El Kebir *et al.*, 2013). Morfologicky se jedná o téměř kulovité buňky s průměrem 10–15  $\mu\text{m}$  (Prinyakupt *et al.*, 2015). Tvarově jsou však značně proměnlivé, zejména při jejich přestupu do tkání přes endotelovou cévní bariéru, kdy se buňka roztáhne s expanzí membrány a válí se po stěně cévy (Takashima & Yao, 2015). Cytoplazma je mírně acidofilní s výrazným zastoupením fialově se barvících granulí. Neutrofil jako hlavní zástupce granulocytů má typicky segmentované jádro. Počet segmentů je v průměru 3, může jich však být i 5 a více (Obr. 3). Množství segmentů narůstá se stářím neutrofilu (Oakes *et al.*, 2009).

Neutrofilny obsahují 4 typy granulí. Primární, azurofilní granula jsou úložištěm nejtoxičtějších látek jako myeloperoxidasa, katepsiny, defensiny či elastasa. Jejich degranulace má zásadní toxický účinek nejen na přítomné patogeny, ale i na okolní vlastní tkáň, což může být stav patologický, ale i žádaný. Např. elastasa je schopná narušovat elastin extracelulární matrix a usnadňovat tak neutrofilům průchod tkání (Häger *et al.*, 2010). Sekundární granula obsahují metaloproteasy, laktoferin nebo iNOS (Borregaard *et al.*, 1993). Terciální granula s extracelulární degranulací obsahují zejména kationtové antimikrobiální peptidy, ale také lysozym, laktoferin a jiné. Svým kladným nábojem interagují s negativně nabitými složkami membrány či buněčné stěny patogenů, což vede k tvorbě pórů nebo narušení signálních drah uvnitř mikroba. Patří mezi ně  $\alpha$ -defensiny či



Obr. 3: Neutrofilní granulocyt, a) schématicky (převzato z Wikiversity, <https://en.wikiversity.org/>), b) světelná mikroskopie (převzato z Cellavision, <https://www.cellavision.com/>), c) transmisní elektronová mikroskopie (převzato z Veterian Key, <https://veteriankey.com/>).

katelicidiny (nejznámější LL-37) (Choi *et al.*, 2012). Sekreční granula jsou typické váčky obsahující především molekuly vystavované na buněčném povrchu (Kjeldsen *et al.*, 1994).

Neutrofilů jsou produkovány z hematopoetických kmenových buněk kostní dřeně, které exprimují CD117 (c-Kit) a chemokinový receptor CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) pro CXCL12 (chemokine C-X-C motif ligand 12). CXCR4 postupně mizí, naopak narůstá exprese receptoru CXCR2 pro chemokiny CXCL1, 2, 3, 5, 6 a 8, které mobilizují myeloidní buňky k výstupu z kostní dřeně (Hopman & Dipersio, 2014; Nauseef & Borregaard, 2014). Významným regulátorem distribuce neutrofilů jsou dendritické buňky. Ty řídí produkci G-CSF a chemokinů CXCL1, CCL2 a CXCL10 nutných pro konečnou diferenciaci neutrofilů. Pro stárnoucí cirkulující neutrofil je charakteristická downregulace exprese CD62L a upregulace exprese CXCR4 a CD11b spolu s jadernou hypersegmentací (Nauseef & Borregaard, 2014; Schwartz *et al.*, 2009).

Aktivace neutrofilů zahrnuje řadu kroků. Jde o jednu z prvních buněk rekrutovaných do akutních zánětlivých míst. V reakci na invazi patogenů místní reziduální makrofágy vylučují TNF (tumor necrosis factor), IL-10 a další cytokiny, jimiž aktivují endoteliální buňky. Ty exprimují na svém povrchu adhezní molekuly ICAM-1 vázající neutrofilové integriny (jako je integrin  $\beta 2$ ) a fukosylované ligandy pro P, L a E selektiny neutrofilu (Allingham *et al.*, 2007; Nauseef & Borregaard, 2014). Tím se zahajuje proces diapedézy. Cirkulující neutrofil se vazbou selektinů a integrinů na endoteliální ligandy zpomaluje a začíná se rolovat po endotelu až do bodu, kdy je schopen přes něj projít do tkáně, což se děje v místě kontaktu 3 a více endotelových buněk, popř. transcelulární cestou (Abram & Lowell, 2009).

Proces emigrace neutrofilu ze systémového oběhu do infikované tkáně mění jeho funkční stav. Zvyšuje se aktivita NADPH-oxidasy a produkce prozánětlivých cytokinů jako IL-8 (Mayadas *et al.*, 2014). Samotná aktivace neutrofilů se v klasickém modelu děje na základě rozpoznání PAMP či DAMP signálů příslušnými receptory. Primárními receptory jsou mimo jiné PRR lektinové receptory typu C jako je dectin-1, TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1) nebo Fc $\gamma$ R pro Fc část opsoninů (Kennedy *et al.*, 2007). K likvidaci patogenů neutrofilů využívají 3 základní mechanismy. Prvním je fagocytóza antigenu po rozpoznání skrze receptory. Vytvořený fagozom se od typické fagocytózy odlišuje neutrálním pH (Jankowski *et al.*, 2002). To je důležité pro sestavení NADPH oxidasy, jejíž podjednotky jsou předem připraveny v membránách cytosolových váček. Splýváním membrán se podjednotky p47phox, p67phox a p40phox

napojí na membránový NOX2 (NADPH–oxidase 2), gp22phox a RAC2 (Ras–related C3 botulinum toxin substrate 2). NADPH–oxidasa se tak stává aktivní a produkuje ROS, které jsou díky svým mohutným oxidačním účinkům zásadní mikrobicidní reaktanty (Kuijpers & Lutter, 2012). Druhým obraným mechanismem je degranulace v cytoplazmě přítomných granulí. Sama fagocytóza s následnou tvorbou fagozomu není zcela dokonalý proces a při fúzi váčeků mohou primární i sekundární granula fúzovat se vznikajícím fagozomem, který se ještě neuzavřel a neoddělil od cytoplazmatické membrány. Může pak docházet k rozsáhlému poškození tkání z důvodu uvolnění granulárních agresivních látek (Faurischou & Borregaard, 2003). V pravém slova smyslu je však degranulace cílené splývání granulí s plazmatickou membránou neutrofilu a uvolnění jejich obsahu do extracelulárního prostředí. Degranulační proces vyžaduje přísun energie v podobě ATP, GTP a lokální zvýšení  $Ca^{2+}$ . Podílí se na něm řada proteinů jako src tyrosinkinasy nebo GTPasy související s Ras proteiny. Dochází k cílené remodelaci cytoskeletu pro umožnění splývání membrán (Lacy, 2006). Posledním mechanismem toxického působení neutrofilů je tvorba NETs (neutrophil extracellular traps). Neutrofil při tomto procesu do extracelulárního prostoru vytlačuje síť tvořenou dekonzenzovaným chromatinem, v níž jsou zachyceny enzymy a mikrobicidní látky z granulí (Mayadas *et al.*, 2014). Podmínkou k tvorbě takových sítí je deaminace histonů prostřednictvím PAD4 (protein arginine deiminase 4) a tvorba pórů v membráně (Wang *et al.*, 2009). NET pak představuje, jak mechanickou bariérní past, tak toxické prostředí s vysokou lokální koncentrací mikrobicidních látek. Má se za to, že proces je aktivován působením ROS či v důsledku signalizace způsobené přítomností vysoké hladiny patogenů. Neutrofil však tvorbou NETs ztrácí chromatin a hyne (Mayadas *et al.*, 2014).

#### **2.2.4 Vrozené lymfoidní buňky 2. typu a 3. typu**

Vrozené lymfoidní buňky (ILC) jsou skupinou buněk funkčně se řadících do vrozené části imunitního systému. Jde o určitou formu analogie T lymfocytů, neboť ILC jsou odvozeny od společného lymfoidního progenitoru, ale postrádají TCR (T–cell receptor) díky nedostatečné aktivaci genu *RAG* (Spits & Cupedo, 2012). Zároveň ILC buňky využívají transkripční a efektorové programy podobné programům, které využívají Th lymfocyty. Hlavní funkcí těchto buněk je produkce cytokinů modulujících ostatní buňky jak vrozeného, tak adaptivního imunitního systému. ILC1 produkcí  $INF\gamma$ , perforinů a granzinů, tvoří paralelu k Th1. ILC2 produkují IL–4, IL–5, IL–9 a IL–13, čímž odpovídají Th2 a ILC3 produkcí IL–22 a IL–17 pak Th17. Mezi ILC se řadí i NK (natural killers)



buňky, které byly původně považovány za představitele lymfoidní linie ve vrozené imunitě a LT<sub>i</sub> (lymphoid tissue inducer cells), o kterých se uvažuje jako o možné subpopulaci ILC3 (Shi *et al.*, 2021).

Vývoj ILC2 vychází ze společného lymfoidního progenitoru vznikajícího z hematopoetické krevní buňky a závisí na transkripčních faktorech GATA3 ROR $\alpha$ , Id2 a NFIL3. Jejich vlivem vzniká progenitorová buňka ILC2 (ILC2p), která se nachází v kostní dřeni a je charakteristická Lin<sup>-</sup>, Sca1<sup>hi</sup>, GATA3<sup>hi</sup>, CD90<sup>+</sup>, IL7R<sup>+</sup>, ID2<sup>+</sup> a IL2rg<sup>+</sup>. Zrání ILC2p pak závisí na TCF-7 (T-cell factor), ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), IL17R $\beta$  a IL2R $\alpha$ . Pod vlivem IL-33, který aktivuje NF $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) dráhu dochází k migraci ILC2p z kostní dřene a konečné maturaci působením IL-7 a IL-2 (Walker & McKenzie, 2013; Herbert *et al.*, 2019). ILC 3 lze odvodit od fetálních jaterních progenitorů Lin<sup>-</sup>, IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>, Flt3<sup>-</sup>,  $\gamma$ <sub>4</sub> $\beta$ <sub>7</sub><sup>+</sup>. Tyto buňky dalším vývojem postupně upregulovaly expresi Id2, CXCR6 a ROR $\gamma$ t. Právě ROR $\gamma$ t je pro linii ILC3 zásadním markerem a nepostradatelným vývojovým faktorem (Cherrier *et al.*, 2012). ILC3 jsou i mezidruhově heterogenní skupinou buněk, kdy u myši byly identifikovány 2 populace na základě odlišné míry exprese CCR6 (Klose *et al.*, 2013). CCR6<sup>-</sup> ILC3 mohou být dále děleny dle exprese NKp46 (natural killer protein 46). U člověka jsou téměř všechny ILC3 CCR6<sup>+</sup> podle NKp46 lze oddělit minimálně 2 subpopulace (Artis & Spits, 2015).

ILC2 představují funkční paralelu k Th2 lymfocytům produkcí cytokinů typu 2 a napomáhají tak v boji proti extracelulárním parazitům (hlísti, ...) a alergenům. Aktivaci ILC2 spouští IL-33 a IL-25. Naopak supresorové účinky na ILC2 má IL-27, IFN- $\beta$  a INF- $\gamma$ . IL-25 je produkován Tuft buňkami, přítomnými ve střevním epitelu. Aktivované ILC2 spouští produkci IL-13 dopřednou smyčku spojenou s expanzí Tuft buněk (von Moltke *et al.*, 2016). Zároveň je skrze receptor IL-4R $\alpha$  vyvolána hyperplazie pohárkových buněk (Mindt *et al.*, 2016). Předpokládá se, že IL-33 je produkován epitelovými buňkami v důsledku jejich poškození helmity. Aktivované ILC2 podporují aktivaci a množení dalších imunocytů produkcí příslušných cytokinů. IL-5 stimuluje B lymfocyty a napomáhá spolu s IL-9 v aktivaci eozinofilů (Jackson-Jones, 2016). IL-13 kromě navýšení produkce hlenu chemotakticky přitahuje eozinofily a podporuje B lymfocyty v produkci IgE. ILC2 exprimují MHC II a řadí se proto k APC (Fort *et al.*, 2001; Zhu, 2015).

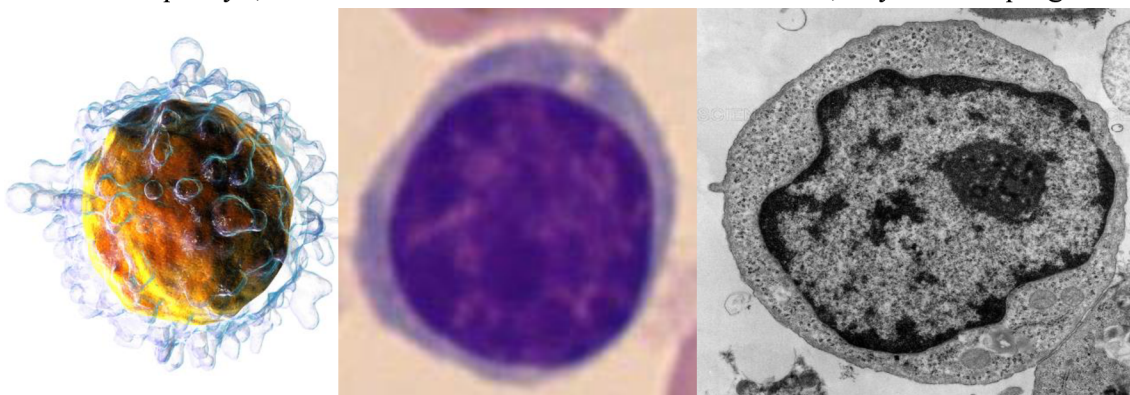
ILC3 podporují vrozenou imunitu vůči virům, intracelulárním bakteriím a houbám. To, že funkčně tvoří obdobu Th17 se projevuje především produkcí IL-17 (zejména pak

IL–17A) a IL–22 (Artis & Spits, 2015). IL–17 je typickým prozánětlivým cytokinem, který aktivuje řadu genů a stimuluje produkci chemokinů, které atrahují monocyty, neutrofile a další buňky do místa zánětu. IL–22 působí např. na epitelové buňky u nichž iniciuje tvorbu antimikrobiálních látek či se podílí na jejich fukosylaci, což mimo jiné přispívá k rezistenci vůči infekci *S. Typhimurium* (Goto *et al.*, 2014). ILC3 mohou interagovat s různými imunocyty, aby jejich prostřednictvím zabránily nadbytečnému šíření komenzálních bakterií. ILC3 navíc exprimují i MHCII, díky čemuž mohou prezentovat antigeny. Chybí jim však kostimulační molekuly k aktivaci T lymfocytů (Artis & Spits, 2015). Avšak u ILC3, jež byly izolovány ze sleziny byla *in vitro* pozorována exprese i těchto kostimulačních molekul, což poukazuje na jejich tkáňovou heterogenitu (von Burk *et al.*, 2014).

### 2.2.5 T lymfocyty

T lymfocyty (Obr. 4) jsou malé, kulovité (sférické) buňky s průměrem 8–11  $\mu\text{m}$  podle stupně zralosti. Představují asi 20–30 % cirkulujících leukocytů. Charakteristickým znakem je velké kulovité jádro (Obr. 4). Doba života T lymfocytu se pohybuje v širokém rozmezí 30–160 dnů (Macallan *et al.*, 2017). Může se však výrazně lišit, neboť množství T lymfocytů značně kolísá v reakci na aktuální stav organismu a přítomnost infekčních agens. Paměťové T lymfocyty také odpovídají za fenomén imunologické paměti, která může být v závislosti na typu onemocnění i celoživotní. Její vytvoření je hlavním cílem vakcinace (Macallan *et al.*, 2017; Strokov *et al.*, 2009).

Lymfopoesa začíná hematopoetickou kmenovou buňkou žloutkového vaku embrya. Tyto CD34<sup>+</sup> buňky kolonizují fetální játra, a nakonec i kostní dřeň, odkud probíhá hlavní vlna hematopoézy (Aberola–Ila *et al.*, 1996; Tavian *et al.*, 2001). Lymfoidní progenitor



Obr. 4: T lymfocyt, a) schématicky (převzato z Wikiversity, <https://en.wikiversity.org/>), b) světelná mikroskopie (převzato z Cellavision, <https://www.cellavision.com/>), c) transmisní elektronová mikroskopie (převzato z Science Source Images, <https://www.sciencesource.com/>).

je charakterizován expresí CD10, CD8, CD45Ra s downregulací c-kit. Následující stádium progenitoru je CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>. Taková progenitorová buňka vstupuje do kůry thymu, který představuje orgán konečné maturace T lymfocytů (Kohn *et al.*, 2012). Zde prochází čtyřmi stádii postupně měnícími expresi CD25 a CD44. Stále však nemá charakteristické markery CD4, CD8 ani TCR, proto se tato stádia označují DN (double negative). První stádium (DN1) je CD44<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup>, druhé (DN2) CD44<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, třetí (DN3) CD44<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup> a čtvrté (DN4) je CD44<sup>-</sup>, CD25<sup>-</sup> (Godfrey *et al.*, 1993; Gounari *et al.*, 2002). Stádia DN2–DN4 začínají exprimovat preTCR složený z dosud nepřeskupeného  $\alpha$  řetězce a  $\beta$  řetězce, k jehož rekombinaci jsou třeba produkty genů RAG1 a RAG2 (Kalman *et al.*, 2004). Na buněčném povrchu se začíná objevovat i CD3 koreceptorový komplex, který je důležitý svou signalizací pro zahájení rekombinace  $\alpha$  řetězce, což je spojeno až s 8–násobným dělením buňky (Germain, 2002). Asi 20 % thymocytů neexprimuje klasický TCR, ale  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce jsou nahrazeny  $\gamma$  a  $\delta$  řetězcem (Aberola–Ila *et al.*, 1994). DN4 stádium pak přechází na DP (double positive) díky syntéze CD4 i CD8. Tyto, tzv. DP thymocyty, interagují s MHC molekulami epitelových buněk kůry thymu. Jde o proces pozitivní selekce, kdy pokud DP thymocyt interaguje s MHC I molekulou stává se CD8<sup>+</sup> T lymfocyt, naopak pokud dochází k interakci s MHC II molekulou vzniká CD4<sup>+</sup> T lymfocyt (Gounari *et al.*, 2002; Germanin, 2002). Při nízkém stupni afinity k epiteálním MHC molekulám DP thymocyt apopticky hyne. Pozitivně diferencované T lymfocyty se přesouvají do dřeně thymu, kde probíhá proces negativní selekce. Medulární epitelové buňky thymu vystavují, díky přítomnosti faktoru AIRE (autoimmune regulator), vlastní antigeny, typické pro buňky periferních tkání. T lymfocyty reagující na tyto autoantigeny jsou odstraňovány apoptosou. Selektované T lymfocyty jsou pak z thymu uvolňovány a migrují do sekundárních lymfatických orgánů jako zralé naivní T buňky (Anderson & Su, 2011; Germain, 2002).

Aktivace T lymfocytů zahrnuje několik kroků. T lymfocyt není schopen rozpoznat naivní antigen, ale pouze jeho peptidové štěpy prezentované na MHC molekulách antigen prezentujících buněk (APC). Prvním signálem je rozpoznání antigenu na MHC pomocí TCR. Vysoký rekombinační potenciál jeho  $\alpha$  a  $\beta$  řetězců zajišťuje specifitnost pro daný antigen. Součástí TCR je CD3. Jde o komplex dimerních membránových proteinů, charakteristických, na rozdíl od  $\alpha$  a  $\beta$  řetězců, mohutnými intracelulárními doménami, prostřednictvím kterých dochází k zesílení a přenosu signálu do buňky (Abraham *et al.*, 2004). Následuje stabilizační vazba molekuly CD4 (v případě Th) na MHCII, či CD8 (v

případě Tc) na MHCI, dle toho, o jaký typ buněk jde (Veillette *et al.*, 1988). Poté je zapotřebí 2. signál v podobě vazby CD28 Th lymfocytu na CD80 nebo CD86 APC. To spouští mohutnou proliferaci T lymfocytů schopných reagovat na stejného patogena (Pages *et al.*, 1994). Aby byla možnost tento proces regulovat, pak 2. signál zároveň spouští expresi CD152, která kompetuje s CD28 o vazbu na CD80/86, čímž dochází k tlumení reakce (Gardner, 2014). Tc jsou méně závislé na CD28, ale vyžadují signály z CD70 a CD137. Tyto interakce spouští expresi dalších kostimulačních molekul (ICOS, OX42, ...) i jejich odpovídajících ligandů na APC. Díky tomu jsou T lymfocyty aktivovány jen v případě, že všechny tyto interakce proběhnou a nedochází tak ke zbytečné aktivaci. 3. signálem jsou instrukce ve formě cytokinů produkovaných buňkami v okolí zánětu. Cytokiny určují, jakým směrem konečného vývoje se T lymfocyt vydá. U Th vznikají v reakci na IL-12 Th1, na IL-4 Th2 nebo na IL-6 a IL-23 Th17 (Curtsinger, J. M., & Mescher, 2010).

CD8<sup>+</sup> T lymfocyty (Tc, cytotoxické T lymfocyty) jsou schopny zabít narušenou buňku. CD8 je heterodimer složený z CD8 $\alpha$  a CD8 $\beta$  řetězce. Je schopen vazby na konzervované místo MHCI, které jsou přítomny na všech jaderných buňkách. Jde o důležitý imunitní dohled nad intracelulárními patogeny i samotnými buňkami, protože na MHCI se vážou všechny buňkou syntetizované proteiny jako jejich výstupní kontrola (Zamoyska, 1998). V případě pozitivního signálu Tc jako efektorové funkce využívají produkci INF $\alpha$  a INF $\gamma$ , jež jsou schopné mimo jiné inhibovat proteosyntézu, a to i okolních buněk. Dalším mechanismem je uvolňování cytotoxických granulí s obsahem perforinů a granzinů. Perforiny vytváří v cílové membráně póry, kterými granzyny pronikají do intracelulárního prostředí a jako serinové proteasy štěpí buněčné proteiny (Trapani, J. A., & Smyth, 2002). Také mohou využít exprese FasL na povrchu aktivovaného Tc, který se váže na odpovídající Fas (Groscurth & Filgueira, 1998). Všechny mechanismy v konečném důsledku vedou k aktivaci apoptosy či destrukci buňky.

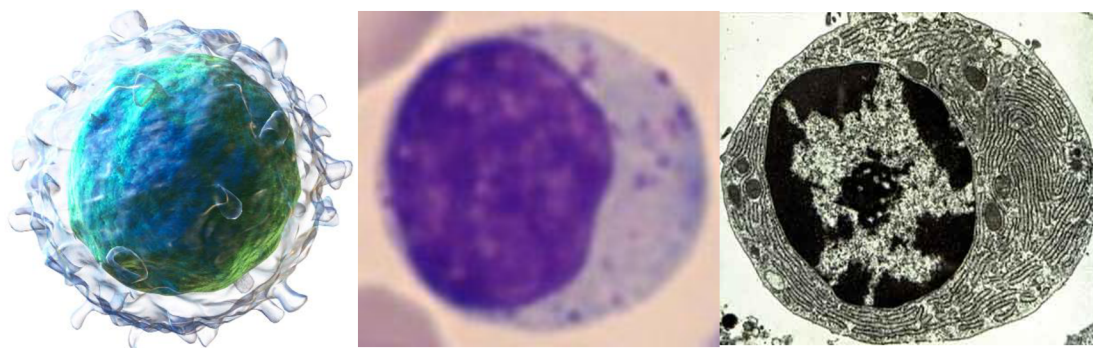
CD4<sup>+</sup> T lymfocyty (Th, pomocné T lymfocyty) jsou primárně modulátory imunitních reakcí skrze produkci cytokinů. Th se pod vlivem různých mediátorů vyvíjí v další typy. IL-12 vede přes svůj receptor spojený s faktory T-bet (T-box expressed in T cells) a STAT4, na naivních Th k diferenciaci subtypu Th1. Ty produkují IL-2 a INF $\gamma$ , kdy tímto mechanismem napomáhají aktivovat ostatní imunitní buňky (Ylikoski *et al.*, 2005). IL-4 a IL-2 vede k diferenciaci Th na Th2 přes klíčové faktory STAT6 a GATA3. Efektorovými cytokiny těchto buněk jsou IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 a IL-25. jejich

prostřednictvím napomáhají v aktivaci např. eozinofilů, ale zejména směřují B lymfocyty k diferenciaci v plazmatické buňky se syntézou protilátek (Jia & Wu, 2014). Díky rozdílné struktuře některých povrchových glykanů jsou Th2 méně náchylné vůči některým induktorům apoptozy než Th1 (Maverakis *et al.*, 2015). Pod vlivem TGF- $\beta$ , IL-6, IL-21 a IL-23 se signálními drahami spojenými s STAT3, ROR $\gamma$  a ROR $\alpha$  vyvíjí Th17. Tyto buňky produkují cytokiny rodiny IL-17, dále IL-21 a IL-22, čímž opět pomáhají v aktivaci ostatních imunitních buněk a mají roli v udržování tkáňové homeostázy (Weaver *et al.*, 2013). Zvláštní skupinou Th lymfocytů jsou Treg (T regulační lymfocyt), charakteristické expresí CD4, CD25 a jaderného transkripčního faktoru FoxP3. Potlačují aktivaci a proliferaci Th i Tc. Sami pak produkují látky se supresorovými účinky jako TGF $\beta$ , IL-10 nebo adenosin (Rudensky, 2011).

## 2.2.6 B lymfocyty

B lymfocyty (Obr. 5) patří mezi hlavní představitele adaptivního imunitního systému. Morfologicky jsou identické s T lymfocyty, kdy jasné odlišitelnosti lze dosáhnout až na základě značení protilátkami namířenými proti charakteristickým povrchovým znakům, které B lymfocyty od T lymfocytů odlišují. Při jejich aktivaci je charakteristické zvětšení velikosti buňky s navýšením počtu ribosomů a endoplasmatického retikula v cytoplazmě, což koresponduje s jejich hlavní funkcí v podobě produkce protilátek (Obr. 5).

Obdobně jako u ostatních lymfocytů i B lymfocyty jsou nejdříve produkovány v játrech plodu a vývoj se poté přesouvá do kostní dřeně (Shahaf *et al.*, 2016). Zde je pod vlivem cytokinů indukována v CD34<sup>+</sup> progenitorech syntéza TdT, RAG-1 (recombination-activating 1 gene) a RAG-2, díky čemuž dochází k přeskupování DJ segmentů těžkého řetězce imunoglobulinů na chromosomu 14q32 u lidí a chromosomu



Obr. 5: B lymfocyt, a) schématicky (převzato z Wikiversity, <https://en.wikiversity.org/>), b) světelná mikroskopie (převzato z Cellavision, <https://www.cellavision.com/>), c) b lymfocyt ve stádiu plasmacytu, transmisní elektronová mikroskopie (převzato z The Quilting Veterinarian, <https://theadventuresofbecky.wordpress.com/>).

14 u myši (Kirsch *et al.*, 1982). Tím se progenitory stávají ranými pro-B buňkami s expresí CD45 a MHCII. Závazek k B buněčné linii je dán i expresí Pax5 (Cobaleda *et al.*, 2007). Připojením V segmentu k DJ vzniká pozdní pro-B buňka typická expresí CD19, CD40, CD45R a MHCII (Saunderson *et al.*, 2008). Následuje stádium pre-B buněk, které již exprimují membránový  $\mu$  řetězec s náhradními lehkými řetězci v pre-B receptoru. Součástí pre-B receptoru jsou i molekuly signální transdukce  $Ig\alpha$  a  $Ig\beta$ , jež mají krátké cytoplazmatické konce obsahující 4 aminokyseliny dlouhý motiv ITAM, který se fosforyluje na základě vazby antigenu na BCR, čímž se signál přenáší do buňky (Storch *et al.*, 2007). Pre-B buňka zastavuje rekombinaci těžkého řetězce a začíná proliferovat do klonu buněk produkujících stejný  $\mu$  řetězec. Po proliferaci se buňky podrobí VJ rekombinaci lehkého řetězce. Po úspěšné syntéze je lehký řetězec exprimován spolu s  $\mu$  řetězcem na buněčném povrchu a pre-B buňka se stává nezralým B lymfocitem s expresí CD19, CD40, CD45R, IgM a MHCII (Chi & Li, 2020). Pokud se na tyto buňky naváže autoantigen, pak hynou apoptosou. Poté začínají exprimovat  $\delta$ -řetězec jako IgD a CD21. Jako stále nezralé B lymfocyty pak kostní dřeň opouští a vývoj dokončují ve slezině, kde se diferenciují do příslušných subtypů pomocí faktoru BAFF (B-cell activating factor) a expresí faktorů NOTCH2 (neurogenic locus notch homolog protein 2) či BTK (Bruton's tyrosine kinase) (Cerutti *et al.*, 2013).

B lymfocyty jsou tvořeny především 2 hlavními skupinami. B1 lymfocyty, charakterizovány jako CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup> a CD43<sup>+</sup> (Griffin *et al.*, 2011). Lokalizovány jsou především v peritoneální a pleurální dutině. Jde o nejpočetnější populaci B lymfocytů. Jejich hlavní funkcí je produkce běžných, sérových, nízkoafinitních IgM či IgA, zejména proti neproteinovým antigenům (Kantor *et al.*, 1993). Antigeny totiž rozpoznávají přímo skrze BCR bez podpory T lymfocytů. Snížená exprese blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) a CD138 podporuje tezi, že i přes produkci protilátek nedochází k diferenciaci na klasické plazmatické buňky (Tumang *et al.*, 2005). B2 lymfocyty můžeme rozdělit na další 2 subpopulace, a sice B2 lymfocyty marginální zóny (BMZ) a folikulární B2 lymfocyty, které jsou také označovány jako konvenční B lymfocyty (KB). BMZ jsou zadržovány ve slezině a funkčně se značně podobají B1 lymfocytům. Mohou se však podílet i na odpovědích na T-dependentní antigeny a vytvářet vysoce afinitní protilátky (Armon *et al.*, 2013). KB pak sídlí nejen ve slezině, ale i v dalších sekundárních lymfatických orgánech. Jejich

primární funkcí je produkce dlouhotrvajících, vysoce afinitních protilátek IgG i dalších izotypů na T-dependentní antigeny (Hofman *et al.*, 2016).

Aktivace B lymfocytů může mít v závislosti na povaze antigenu různou podobu. Na polysacharidové a glykolipidové antigeny reagují B1 a BMZ. Polymerní struktura těchto antigenů umožňuje integraci a navázání mnoha BCR, čímž v B lymfocytu vzniká dostatečný signál k aktivaci a není potřeba podpora ze strany T lymfocytů. Aktivace je podporována molekulami jako APRIL (A proliferation-inducing ligand), IL-6, IL-10 a IL-21 produkovanými ostatními imunitními buňkami. Výsledkem je omezená somatická hypermutace a diverzifikace protilátek, což vede zejména k produkci nízkoafinitních IgM (Cerutti *et al.*, 2012). Proteinové antigeny jsou rozpoznávány primárně KB. Aktivace je vícezkroková. BCR rozpoznává antigen a přenáší signál do buňky. Zároveň je vyvolána jeho fagocytóza, lysosomální rozklad na peptidy a prezentace na MHCII. Na tento signál reagují CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, které se tak aktivují a začnou produkovat cytokiny sloužící jako nutná podpora proliferace a diferenciaci B lymfocytů (Victora & Nussenzweig, 2012). Tento aktivační kontakt T a B lymfocytů má svou prostorovou organizaci v sekundárních lymfatických orgánech. Naivní B lymfocyty exprimují chemokinový receptor CXCR5. Díky jeho ligandu CXCL13, produkovaném dendritickými buňkami, jsou zadržovány v primárních lymfoidních folikulech (označovány také jako zóny B-buněk) (Cyster, 2005). Po rozpoznání antigenu B lymfocyty exprimují CCR7 a začnou být přitahovány k hranici folikulu sousedící se zónou T-buněk (Kerfoot *et al.*, 2011). T lymfocyty tímto kontaktem dozrávají v tzv. pomocné folikulární T lymfocyty (Thf), které se přemísťují do germinálního centra a produkují IL-21, kdy spolu s dalšími kostimulačními signály udržují proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů. Některé z aktivovaných B-lymfocytů exprimují Bcl6, díky němuž se vrací do germinálního centra folikulů a opět vyžadují kontakt s antigenem prezentovaném stále na Thf (Basso, & Dalla-Favera, 2012). Ostatní B-lymfocyty v zóně B-buněk jsou diferencovány na plazmatické či paměťové extrafolikulární GC independentní B-lymfocyty s nižší specifitou vůči aktivujícímu antigenu (Basso, & Dalla-Favera, 2012; Sau *et al.*, 2011). V důsledku aktivace cytidindeaminasy je spuštěn proces somatické hypermutace a rekombinace úseků DNA pro těžké řetězce i variabilní oblasti imunoglobulinů. Interakce B-lymfocytů s Thf v germinálním centru folikulu spouští také expresi IRF4, PRDM1, Blimp1 a dalších, které podporují, po represi Bcl6, diferenciaci do sekundárních GC dependentních plazmatických či paměťových buněk s vysokou specifitou vůči danému antigenu (Ochiai *et al.*, 2013; Hoffman *et al.*, 2016). Paměťové B-lymfocyty recirkulují a jsou

uchovávány, kdy v případě opětovné expozici antigenu vstoupí do GC a diferenciují se v plazmacyty, bez nutnosti předešlých aktivací a genových rekombinací. Plazmatické buňky jsou mohutnými producenty imunoglobulinů s vysokou specifitou a afinitou vůči antigenu, jež jejich produkci vyvolal (Pape *et al.*, 2011). Klíčovými cytokiny v různých fázích diferenciaci a aktivace B-lymfocytů jsou BAFF a APRIL produkované myeloidními buňkami (Hoffman *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2013).

B-lymfocyty mají, kromě majoritní funkce v rámci humorální imunity ve formě produkce protilátek i řadu funkcí dalších. Díky expresi MHCII molekul fungují jako APC a T lymfocytům poskytují kostimulační signály (Barr *et al.*, 2010). Produkuje cytokiny jako IL-10 a IL-35, které tlumí aktivaci T lymfocytů či prozánětlivé TNF $\alpha$  a INF $\gamma$  (Wojciechowski *et al.*, 2009). V neposlední řadě udržují architekturu sekundárních lymfatických orgánů a podporují tvorbu terciálních lymfatických struktur (Nolte *et al.*, 2004).

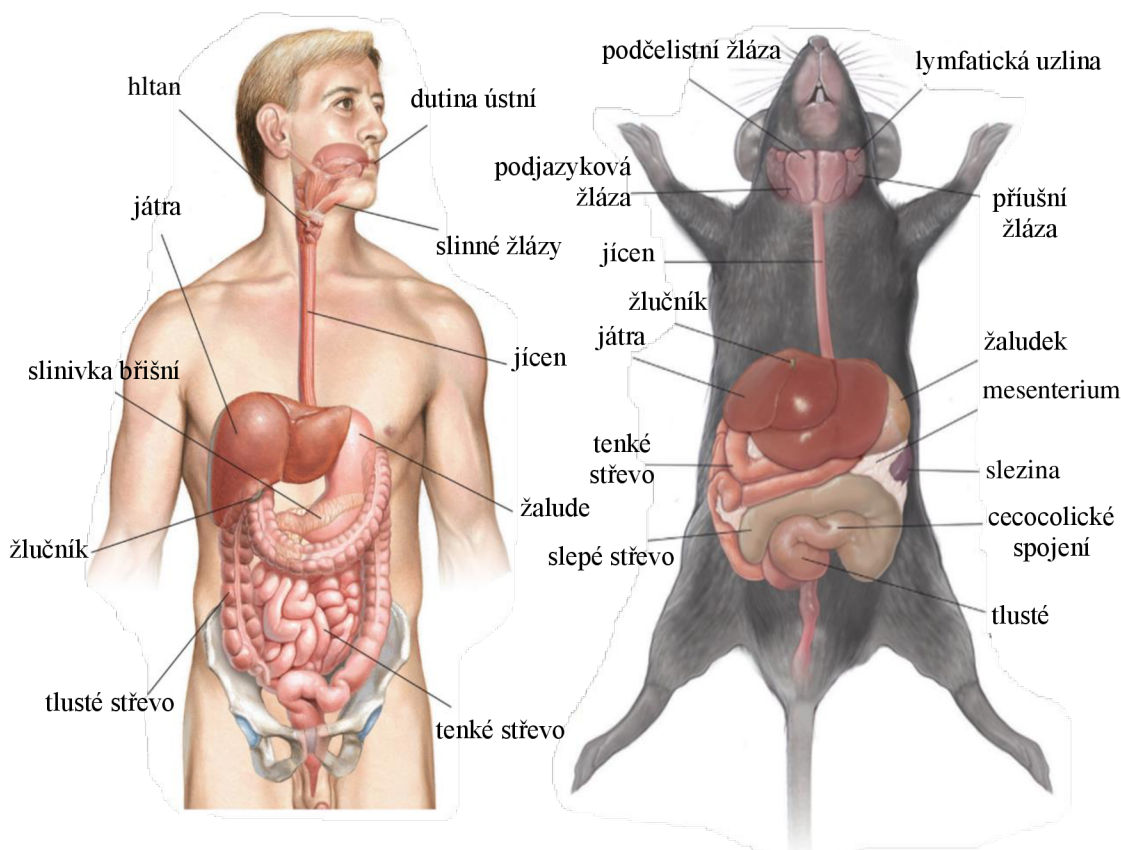
### **2.3 Myš jako modelový organismus pro studium střevních chorob**

Myš domácí (*mus musculus*) patří k nejběžněji užívaným modelovým organismům. Od počátku 20. st. až do současnosti byla vyšlechtěna řada kmenů vycházejících z evropské či asijské rodiny. Výhodou jejich využití ve výzkumu je, že jsou relativně malé, nenáročně chovatelné ve velkém počtu, rychle reprodukovatelné, inbrední i geneticky modifikovatelné, tak aby mohly být využity ke studiu různých lidských onemocnění (Vandamme, 2014). Přesto že myši a lidský genom jsou již přes 90 mil. let odděleny, asi 85 % genomových sekvencí zůstalo zachováno (Hugenholtz & de Vos, 2018). Avšak jeden z hlavních divergenčních prvků mezi oběma genomy je v regulačních sekvencích genů, na což se váže i odlišná genová exprese (Cheng *et al.*, 2014). Většina známých informací o principu a fungování střevního imunitního systému byla získána právě na myších modelech, kdy je však třeba vzít v úvahu, že nemusí být vždy k dispozici dostatek důkazů pro úplnou aplikaci na člověka (Hugenholtz & de Vos, 2018).

#### **2.3.1 Anatomický popis stavby myšního střeva**

Ve vztahu k výzkumu lidských střevních onemocnění je třeba brát zřetel na řadu anatomických, histologických a fyziologických rozdílů mezi gastrointestinálním traktem (GIT) člověka a myši (Obr. 6). Hlavním rozdílem je poměr velikosti zažívacího traktu ku velikosti celého těla. Pozoruhodná je u myši přítomnost neglandulárního předžaludku, vystlaného keratinizujícím dlaždicovým epitelem, sloužící jako rezervoár potravy



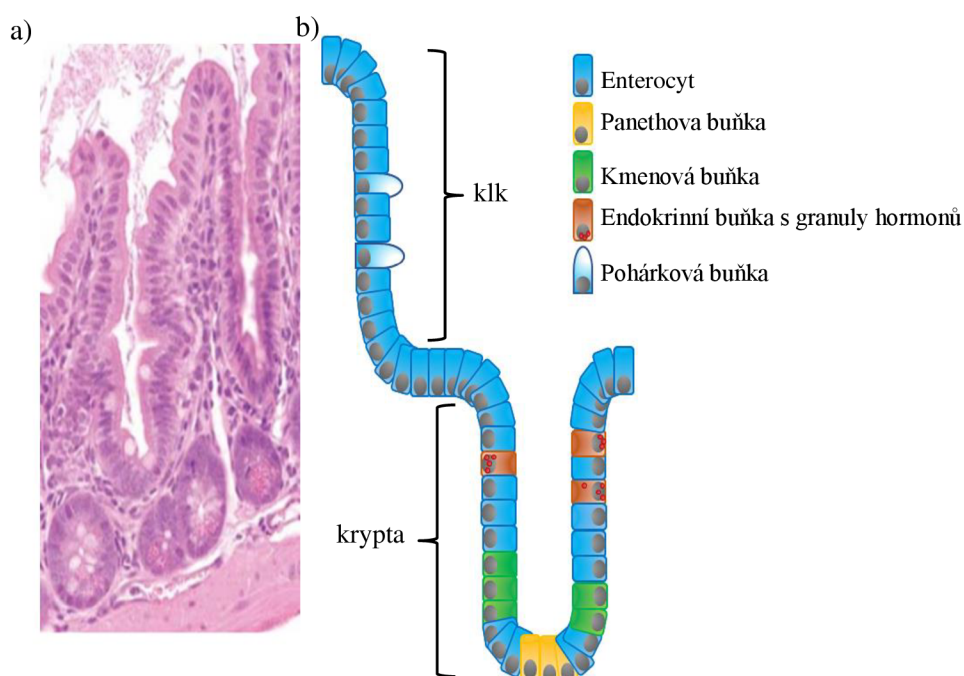


Obr. 6: Srovnání GIT člověka a myši (převzato a upraveno z Treuting *et al.*, 2012).

(Ghoshal & Bal, 1989). Epitel je pokryt biofilmem různých bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus*, které osídľují i samotný žláznatý žaludek, na rozdíl od lidského, který je kolonizován mnoha kmeny rodů *Streptococcus*, *Prevotella* či *Helicobacter pylori* (Bik *et al.*, 2006). Ústřední částí GITu je střevo. Stejně jako u člověka ho můžeme rozdělit na tenké (*instestinum tenue*) a tlusté (*intestinum crassum*). Na jejich pomezí se vyskytuje střevo slepé (*intestinum caecum*), považováno za součást střeva tlustého. Tenké střevo je se svou délkou asi 33 cm (oproti 700 cm u člověka) nejdelší částí GIT (Hugenholtz & de Vos, 2018). Při přepočtu na kilogram hmotnosti těla (za předpokladu průměrné hmotnosti myši 0,02 kg a člověka 70 kg) je délka tenkého střeva u myši  $1500 \text{ cm} \cdot \text{kg}^{-1}$  oproti  $10 \text{ cm} \cdot \text{kg}^{-1}$  u člověka (Hugenholtz & de Vos, 2018). Anatomicky se dělí do tří částí. Proximální část *duodenum*, následovaná *jejunem* (2/5 délky) a *ileem* (distální 3/5 délky). Zatímco povrch lidské střevní sliznice obsahuje záhyby zvané *plicae circulares*, myší sliznice je zdánlivě hladká, což může ovlivňovat mikrobiální složení (Treuting *et al.*, 2012; Scudamore *et al.*, 2014).

### 2.3.2 Histologický popis stavby myšího střeva

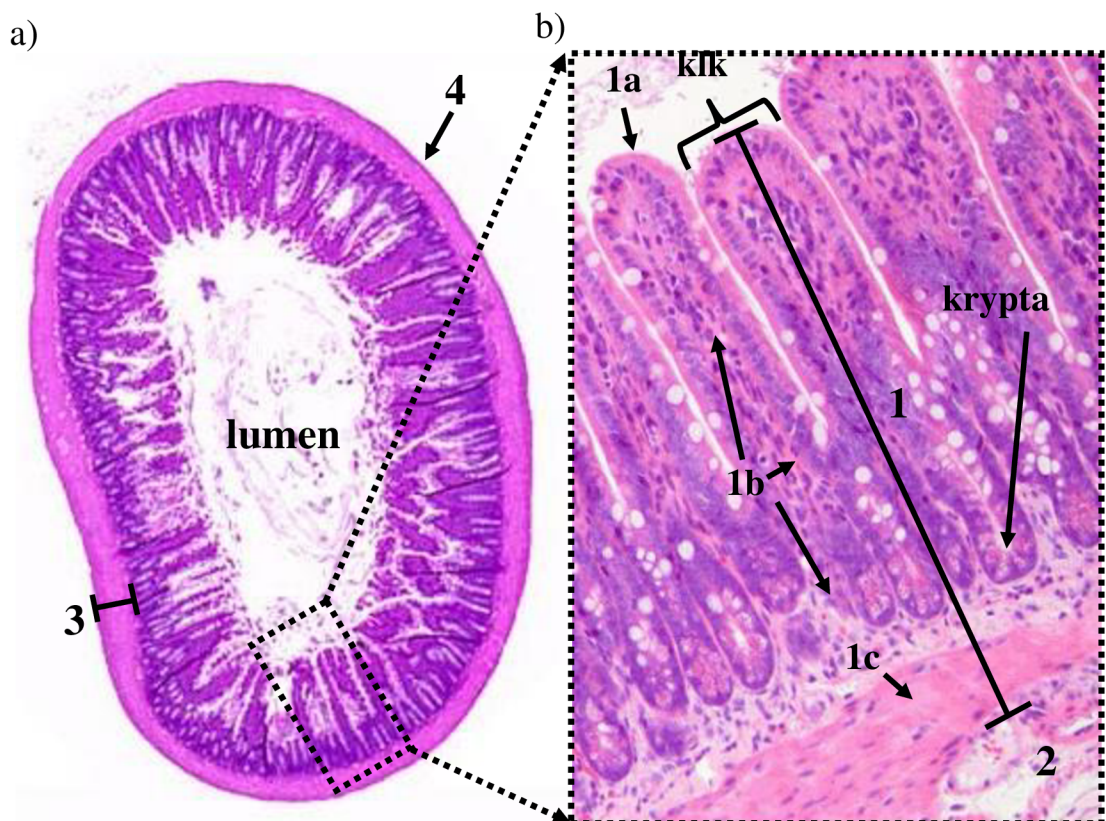
Střevní stěna se obecně skládá ze 4 vrstev (Obr. 8) a je u myši tenčí než u člověka. *Tunica mucosa* (sliznice) jako svrchní vrstva je tvořena především střevními polarizovanými buňkami nazývanými enterocyty, které vytváří jednovrstevný cylindrický epitel s kartáčovým lemem na apikálním povrchu. Sliznice je zvětšena tzv. klky (*villi*) s velikostí 0,5–1,5 mm, což je téměř dvojnásobná výška oproti klků člověka a zajišťuje tak dostatečné zvětšení sliznice i přes absenci *plicae*. Velikost klků se obecně od *duodena* směrem k *ileu* snižuje. Duodenální klky jsou velké a listovité, jejunální jsou pak spíše válcovité, stejně jako ileální, které jsou ale výrazně kratší. U člověka jsou duodenální klky krátké a jejunální vějířovité. U hlodavců se střevní epitel obnovuje každé 2–3 dny (u člověka je to 3–5 dnů), čímž se stává nejrychleji se obnovující tkání těla. Kmenové buňky jako buněčná zásobárna jsou rozmístěny strategicky okolo báze tzv. krypt, tedy záhybů mezi klky (Obr. 7). Na samotném dnu krypt jsou přítomny exokrinní Panethovy buňky vylučující řadu antibakteriálních látek, po stimulaci IL–22, čímž je zajištěna dostatečná ochrana kmenových buněk (Obr. 7). Buněčné zastoupení epitelu doplňují M–buňky (Microfold cells) pro transport antigenů, buňky s enteroendokrinní funkcí a buňky pohárkové (Treuting *et al.*, 2012; Scudamore *et al.*, 2014).



Obr. 7: Klky a krypty myšího jejuná, a) histologický preparát (převzato z Scudamore *et al.*, 2014), b) schématický popis.

Histologicky má i *tunica mucosa* 3 vrstvy (Obr. 8). Epiteliální (*lamina epithelialis*), následovaná *laminou propriou*, zakončená *laminou muscularis mucosae*. *Lamina propria*, jako vrstva vaziva, tvoří spolu s krevními a lymfatickými cévami stroma klku. Svalová *lamina muscularis* již do klku nezasahuje. Naopak, téměř až její úroveň dosahují krypty. Druhou vrstvou je *tunica submucosa*, kde se převážně jedná o řídké podslizniční vazivo. *Tunica muscularis externa* jako třetí úroveň obsahuje hladkou svalovinu tvořenou ze silnější vnitřní cirkulární a zevní longitudinální vrstvy. Mezi oběma hladkosvalovými vrstvami je umístěna nervová pleteň. Poslední úroveň je *tunica serosa*, která trávicí trubici kryje v peritoneální dutině. Je tvořena vrstvou kolagenního vaziva zakončenou jednovrstevným plochým epitelem (Lüllmann–Rauch, 2012; Scudamore *et al.*, 2014)

Každá část tenkého střeva má své místně charakteristické, histologické znaky. Duodenum se vyznačuje přítomností mucinozních, tuboalveolárních Brunnerových žláz, vyúsťujících na dně krypt. Aborálně se snižují klky, kdy v terminálním *ileu* prakticky chybí. Pro *ileum* je charakteristické nakupení lymfatických uzlíků známých jako Peyerovy plaky (Treuting *et al.*, 2012; Scudamore *et al.*, 2014).



Obr. 8: a) příčný řez myší trávicí trubici v oblasti *jejuna* (převzato a upraveno z Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003), b) detailní řez sliznicí myšího *jejuna* (převzato a upraveno z Fumikazu *et al.*, 2014) 1 tunica mucosa, 1a lamina epithelialis, 1b lamina propria, 1c lamina muscularis, 2 tunica submucosa, 3 tunica muscularis, 4 tunica serosa.

Tlusté střevo (*intestinum tenue*) již neobsahuje žádné klky, naproti tomu má četné krypty. U člověka jsou opět přítomny cirkulární řasy (*plicae semicirulares*), jejichž poloha se ale mění, protože vznikají pouze přechodně kontrakcí svaloviny. Epitel je jednovrstevný cylindrický, jehož buňky kolonocyty jsou vysoké s krátkými mikrokly. Kolonocyty doplňují ve vysokém zastoupení pohárkové buňky (Treuting *et al.*, 2012; Scudamore *et al.*, 2014).

## 2.4 Mukózní imunita střeva

Živé organismy jsou charakteristické oddělováním funkčních celků. Děje se tak již na subcelulární úrovni prostřednictvím plazmatické membrány, kdy vznikají organely, ale také na úrovni celého organismu. Jednotlivé orgány, tvořené charakteristickými typy buněk se svými specifickými funkcemi, od sebe musí být odděleny. Integritu organismu zajišťuje kůže a odděluje ho tak od vnějšího prostředí. Funkci vnitřního rozhraní v organismu přebírají epitely. Ty jsou součástí sliznice jako jedné z charakteristických vrstev stěny daného orgánu. Epitely primárně plní funkce dané orgánem, v němž se vyskytují. Z imunologického hlediska je však důležité, že staví přirozenou bariéru proti průchodu různým noxám a antigenům. Epiteliální buňky jsou velmi úzce propojeny prostřednictvím až 50 proteinových molekul tvořících tzv. těsné spoje (tight junction). Ve střevní stěně lze nalézt oválná a světlá ložiska lymfoidních buněk, které jsou součástí rozsáhlého obraného systému nazývaného gut-associated lymphoid tissue (GALT). (Abbas *et al.*, 2012; Krejssek *et al.*, 2016).

### 2.4.1 Mikrobiota lidského střeva

Člověk je neodmyslitelně spojen s mikrobiálním světem. Mikrobiota zahrnuje společenství symbiotických, komenzálních i patologických mikroorganismů. Patří mezi ně bakterie, viry, houby i archea (Pascal *et al.*, 2018). Odhaduje se, že lidská mikrobiota je tvořena až z  $10^{14}$  buněk, což může odpovídat i celkovému počtu vlastních buněk organismu (Gill *et al.*, 2006). Konkrétní složení je dnes zkoumáno především molekulárně genetickou analýzou 16S rRNA (ribosomální RNA), neboť všechny druhy mikrobioty nejsou kultivovatelné (Dethlefsen *et al.*, 2008; Luke *et al.*, 2012).

Mikrobiální osídlení je striktně individuální. Dáno je jak genetickou determinací, tak sumou různých vnějších faktorů. Už při vývoji *in utero* dochází zřejmě k osídlování mikroorganismy určenými matkou, nicméně skutečně první osídlovací vlna je spojena s průchodem porodními cestami, kdy dochází k inokulaci povrchu těla i průniku mikrobů

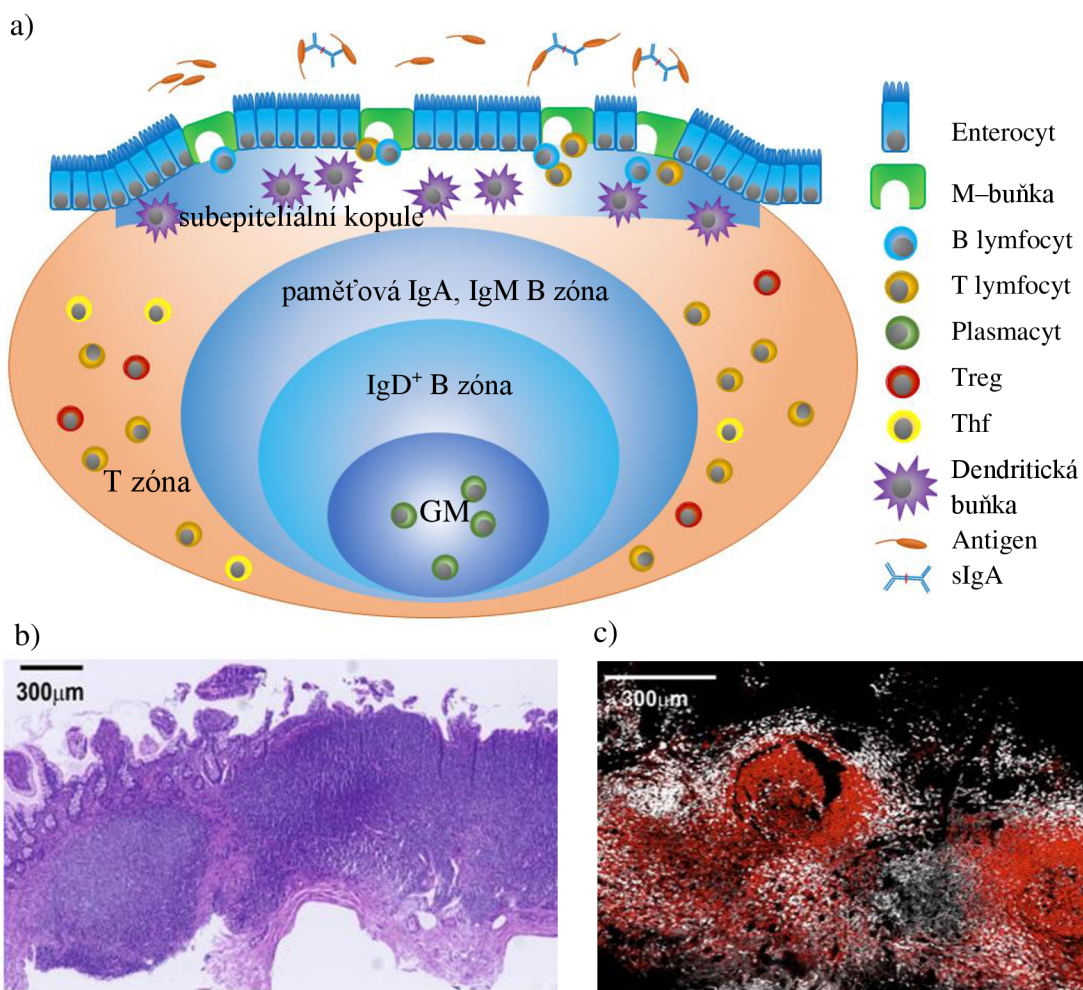
do organismu. Z tohoto pohledu je např. porod císařským řezem patologický. Následně má zásadní význam kojení, kdy prebiotické sacharidy v mateřském mléce stimulují a podporují rozvoj střevní mikrobioty (Hernández-Hernández *et al.*, 2012). Tato střevní mikroflóra obsahuje především bakterie kmene *Firmicutes* (s významnou čeledí *Lactobacillaceae*), *Actinobacteria* (s významnou čeledí *Bifidobacteriaceae*), *Bacteroidetes* a *Proteobacteria* (Rutayisire *et al.*, 2016). Mezi 4. až 6. měsícem by se postupně měla přidat i pevná strava pro nastavení tolerančních mechanismů na střevní sliznici. Tato strava pak vytváří definitivní osídlovací vzor pro zbytek života, který může jedinec pozitivně i negativně ovlivňovat svým stavováním (Krejsek *et al.*, 2016).

Mikrobiota ovlivňuje celou řadu důležitých procesů. Z imunologického hlediska je důležitá role v zabránění množení a růstu patogenních mikroorganismů. Tuto funkci označujeme jako kolonizační rezistence. Z biochemického pohledu se mikroorganismy, díky jedinečnému obsahu enzymů spolupodílí na trávení pro člověka jinak nestravitelných živin, které jsou součástí vlákniny. Výsledkem mohou být jak prospěšné, tak potenciálně škodlivé substance. Např. bakterie kmene *Firmicutes* tvorbou mastných kyselin s krátkým řetězcem (především propionát a butyrát) vyživují epitelální buňky (Cummings *et al.*, 1987). Vedlejším produktem je cytotoxický a genotoxický vodík, který je metanovými bakteriemi (např. rod *Methanobrevibacter*) přeměněn na uvolňující se metan. Mikrobiální působky mohou ovládat transkripční aktivitu epitelových buněk, ale dokonce i přepis mnoha genů určujících vývojové procesy v CNS (Cryan & Dinan, 2012). Aktivita mikrobioty pak může být spojena s obezitou, metabolickým syndromem, či nádorovou transformací (Eloe-Fadrosh & Rasko, 2013).

## 2.4.2 Stavba a typizace GALT

GALT jako komplexní soubor lymfoidní tkáně zahrnuje několik histologicky, popř. až anatomicky definovaných struktur. Řádíme zde multifolikulární Peyerovy plaky, červovitý výběžek slepého střeva a nejpočetněji zastoupené izolované lymfoidní folikuly (Brandtzaeg *et al.*, 2008). Buněčná organizace těchto útvarů je obdobná jako u periferních imunitních orgánů. Imunitní buňky zde musí vhodně tolerovat prospěšné mikroorganismy a naopak potlačovat mikroorganismy patogenní. Při porušení této homeostázy dochází k rozvoji nespecifických zánětlivých střevních onemocnění jako je Crohnova choroba či Ulcerózní kolitida (Mörbe *et al.*, 2021).

Peyerovy pláty (PP) jsou mikrovýklenky sliznice tenkého střeva (Obr. 9). Jde o shluky imunitních buněk tvořené až stovkami jednotlivých lymfoidních folikul. Jejich počet i



Obr. 9: Peyerův plát, a) schématické znázornění organizace Peyerova plátu, b) jejunální Peyerovy pláty, barvení hematoxilin–eosin (převzato z Mörbe *et al.*, 2021), c) jejunální Peyerovy pláty, imunohistochemické barvení CD19<sup>+</sup> B lymfocytů (červené) a CD3<sup>+</sup> T lymfocytů (bílé) (převzato z Mörbe *et al.*, 2021).

velikost se během života mění. V dětství jejich množství narůstá, až do období rané adolescence, kdy dosahuje hodnoty 240. Poté dochází k pozvolnému úbytku (Cornes, 1965). Rozmístěny jsou po celé délce tenkého střeva. Jejich hustota je však nejvyšší v jejunu (Van Kruiningen *et al.*, 2002). Epitel v oblasti PP obsahuje specializované M–buňky (Obr. 9). Luminální povrch M–buněk není natolik zvrásněný a v zásadě nemá glykokalix, což ho činí daleko přístupnější než povrch okolních enterocytů. Hlavní funkcí M–buněk je přesun antigenů, ať už volných nebo vázaných na IgA, mechanismem transcytózy z lumen střev do parenchymu PP. Na bazolaterální straně má M–buňka kapsu pro přímou interakci s dendritickou buňkou, CD4<sup>+</sup> T lymfocytem nebo B lymfocytem exprimujícím IgM (Farstad *et al.*, 1994). I epiteliální buňky včetně M–buněk dokážou, sice v menší míře než antigen prezentující buňky, prezentovat antigen na MHC

molekulách (Londei, 1984). V této oblasti tzv. subepiteliální kopule profesionální CD11b<sup>+</sup> dendritické buňky dominují. Bylo prokázáno, že některé z nich vysílají skrze specifické M–buněčné transcelulární póry dendrity, jimiž mohou odebírat vzorky lumenálních antigenů (Lelouard *et al.*, 2012). Dále zde jsou zastoupeny CD4<sup>+</sup> T lymfocyty a B lymfocyty izotypu IgA, IgM a IgG. B lymfocyty jsou aktivovány přes BCR antigenem od M–buněk. Tuto informaci přenáší dále do germinálního centra nacházejícího se ve středu PP (Obr. 9). Těsně okolo germinálního centra se nachází zóna paměťových IgD<sup>+</sup> B lymfocytů, na kterou směrem k periférii PP navazuje zóna dalších paměťových B buněk izotypu IgA a IgM. Zbylou periferní část PP tvoří perifolikulární zóny T buněk, kde jsou přednostně zastoupeny paměťové CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, FOXP3<sup>+</sup> Treg a pomocné folikulární T lymfocyty (Thf) (Mörbe *et al.*, 2021). Lymfocyty se obecně do PP dostávají díky expresi  $\alpha 4\beta 7$ , jež slouží jako ligand pro MAdCAM–1 (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1) vystavované na endoteliálních buňkách slizničních venul (Brandtzaeg *et al.*, 1999). Roli hrají také chemokiny CCL19 a CCL21, uvolňované z lymfoidních tkání a vázající se na receptor naivních T lymfocytů CCR7. B lymfocyty jsou přitahovány na základě vazby CXCL13, produkovaným germinálním centrem, na receptor CXCR5 (Baptista *et al.*, 2013). PP jsou místem pro generování střevní protilátkové odpovědi. B lymfocyty zde podstupují, po signalizaci zprostředkované CD4<sup>+</sup> T lymfocytem, somatickou hypermutaci a rekombinaci, což vede ke změně třídy sekrečních imunoglobulinů na IgA. PP jsou tak klíčovým zdrojem IgA<sup>+</sup> plazmatických buněk (Mörbe *et al.*, 2021).

Červovitý výběžek slepého střeva (*appendix vermiformis*, AV) je anatomickou strukturou vyčnívající ze slepého střeva. Imunohistologická stavba má obdobné uspořádání jako PP. Lze nalézt odlišnosti v zastoupení konkrétních buněčných typů. Vyšší zastoupení zde mají CD4<sup>+</sup> T lymfocyty a v germinálním centru se nachází B lymfocyty v různých stádiích vývoje. V podepiteliální kopuli jsou lokalizovány paměťové B lymfocyty a IgA<sup>+</sup> plazmatické buňky, což z appendixu činí induktivní imunologickou tkáň s možností přepínání izotypu imunologických tříd (Zhao *et al.*, 2018; Steiniger *et al.*, 2005).

Izolované lymfoidní folikuly (ILF) jsou tvořeny jediným folikulem s průměrem 0,1–1,3 mm. I když jsou podstatně menší než PP a AV, tak s celkovým počtem asi 30 000 tvoří hlavní kompartment GALT (Fenton *et al.*, 2020). Rozmístěny jsou po celé délce střeva, ale buněčné zastoupení, umístění a hustota se mezi jednotlivými střevními segmenty liší. Mezi dva základní typy ILF patří mukózní (M–ILF), ležící výhradně

v lamina propria, a submukózní (S-ILF), které do lamina propria mohou vyčnívat. Z větší části se ale nachází v submukózní slizniční vrstvě, což podmiňuje jejich menší kontakt s lumen střeva (Fenton *et al.*, 2020; Mörbe *et al.*, 2021). M-ILF se nachází především v ileu. Jsou menší, ale s větší subepiteliální kopulí a vyšším poměrem B:T buněk oproti S-ILF (Fenton *et al.*, 2020). S-ILF spoluvytváří tlusté střevo (Jørgensen *et al.*, 2021). Na jejich vývoj má vliv mikroprostředí, kdy ILF v tlustém střevě je podporováno IL-23, zatímco ve střevě tenkém je to především RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ -B ligand) a CXCL-13 (Donaldson *et al.*, 2015). S lumenálním prostředím jsou v kontaktu specializovaným epitelem s M-buňkami pod nímž se nachází subepiteliální kopule bohatá na CD11<sup>+</sup> antigen prezentující buňky. Centrální oblast s germinálním centrem, které však nemusí být vždy přítomno, je obsazena B-lymfocyty. Periferní T-zóna pozvolna přechází v okolní lamina propria. Samotný folikul tedy nemá jasně zřetelnou hranici. Bylo prokázáno, že v lidských ILF převažují T lymfocyty, což je odlišuje od myších ILF, které ve většině obsahují B-lymfocyty (Fenton *et al.*, 2020). Nenachází se zde však plazmatické buňky, pouze naivní a paměťové B-lymfocyty. Plazmatické buňky jsou lokalizovány až v okolní lamina propria, kde produkují imunoglobuliny izotypu IgA, IgM a IgG (Fenton *et al.*, 2020; Mörbe *et al.*, 2021).

Celkové zastoupení různých buněčných populací v jednotlivých kompartmentech, které jsou součástí GALT je odlišné (Tab. 2). Jejich strategické rozmístění v těchto útvarech je výhodné pro maximalizaci spolupráce buněk a tedy úspěšnosti eliminace buněk.

### 2.4.3 Obranné mechanismy střevní sliznice

Střevní sliznice představuje obrovskou plochu, která je neustále vystavována velkému množství antigenů a nox. V případě, že se tyto potenciálně nebezpečné substance dostanou i přes nízké pH žaludku a vystavení enzymům slinivky břišní (*pankreas*), až do střeva musí proti nim být vyvolána adekvátní reakce tak, aby nedošlo k přetížení celého systému. Zároveň však nesmí být odpověď nedostačující. Obrana na střevní sliznici je uskutečňována v několika úrovních (Krejsek *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2017).

Počáteční úroveň zajišťuje střevní mikrobiota omezující aktivity patogenů, ať už kompeticí o životní prostor či zdroje živin, nebo produkcí řady pro patogeny toxických působků. Druhou úroveň představují humorální mechanismy. Pohárkové buňky v kryptách produkují fosfolipidy a mukopolysacharidy tvořící hlen, který ve vrstvě silně asi 100  $\mu$ m pokrývá epitel v celém jeho rozsahu. V hlenu jsou zakotveny významné



Tab. 2: Zastoupení různých buněčných typů v jednotlivých kompartmentech lidské GALT. Výsledky jsou uváděny v procentech  $\pm$  směrodatná odchylka nebo rozmezí hodnot, ND neurčeno (převzato a upraveno z Mörbe *et al.*, 2021).

Buněčný typ	subset	Tenké střevo		Tlusté střevo		
		Peyerovy plaky	slizniční ILF	slepé střevo	submukózní ILF	slizniční ILF
T lymfocyt	CD3 <sup>+</sup>	35 $\pm$ 9	43 (20–69)	ND	54 (41–62)	59 $\pm$ 12
	CD4 <sup>+</sup>	82 $\pm$ 6	59 (37–77)	ND	69 (55–83)	81 $\pm$ 2
	naivní	7 $\pm$ 5	6 $\pm$ 6	23 $\pm$ 15	36 $\pm$ 18	8 $\pm$ 8
	centrální paměť	26 $\pm$ 11	49 $\pm$ 13	39 $\pm$ 15	52 $\pm$ 18	44 $\pm$ 14
	efektorová paměť	38 $\pm$ 12	45 $\pm$ 16	37 $\pm$ 18	11 $\pm$ 7	46 $\pm$ 29
	Tfh	5 $\pm$ 4	ND	ND	1 $\pm$ 1	ND
	Treg	8 $\pm$ 4	ND	ND	12 $\pm$ 5	ND
	CD8	18 $\pm$ 6	13 (9–38)	ND	12 $\pm$ 6	19 $\pm$ 2
	naivní	8 $\pm$ 10	4 $\pm$ 4	27 $\pm$ 17	28 $\pm$ 13	16 $\pm$ 19
	centrální paměť	6 $\pm$ 4	18 $\pm$ 13	7 $\pm$ 5	28 $\pm$ 12	23 $\pm$ 20
	efektorová paměť	65 $\pm$ 23	64 $\pm$ 21	62 $\pm$ 21	33 $\pm$ 9	52 $\pm$ 30
	TCR $\gamma$ 5	ND	1 (0–3)	ND	3 (0–6)	ND
B lymfocyt	CD19	57 $\pm$ 4	45 (24–57)	ND	32 $\pm$ 6	39 $\pm$ 8
	naivní	18 (8–48)	28 $\pm$ 19	25 (12–45)	23 (3–59)	11 $\pm$ 9
	paměť	50 (23–77)	58 $\pm$ 14	53 (24–73)	52 (13–78)	64 $\pm$ 32
	germinální centrum	12 (7–20)	9 $\pm$ 7	8 (1–24)	3 $\pm$ 3	7 $\pm$ 15
buňky vrozené imunity	žírné buňky	1,9 $\pm$ 1,2	1,5 $\pm$ 1	ND	0,5 $\pm$ 0,25	1 $\pm$ 1,25
	granulocyty	2,7 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2	ND	0,25 $\pm$ 0,25	1,25 $\pm$ 1
	dendritické buňky	0,024	0,75 $\pm$ 0,5	0,055	0,5 $\pm$ 0,25	1,5 $\pm$ 0,5
	monocyty/makrofágy	0,3 $\pm$ 0,25	0,5 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,5
	ILC3	0,5 $\pm$ 0,25	1,75 $\pm$ 1,25	ND	1,25 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 3,5

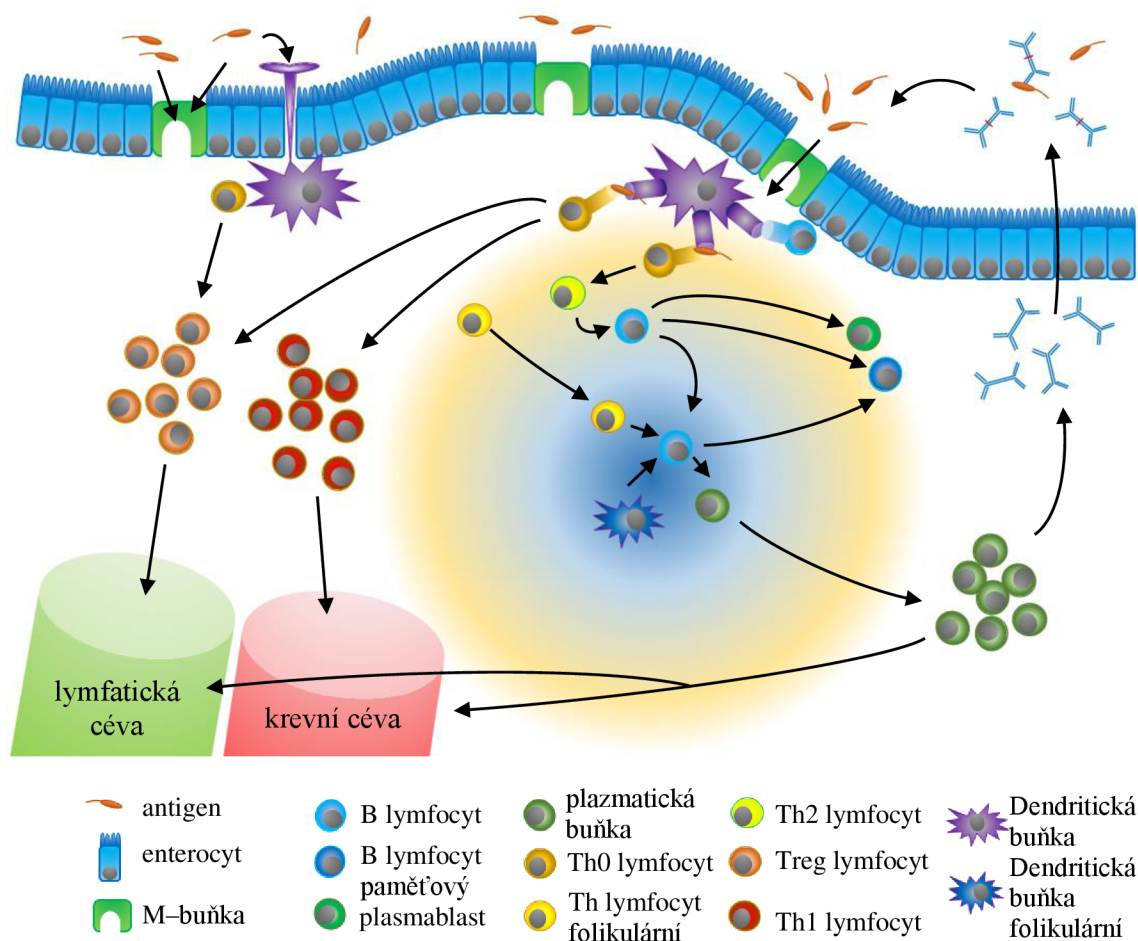
ochranné látky jako antimikrobiální peptidy (např.  $\alpha$  defenziny) nebo sekreční IgA (sIgA) podtřídy IgA<sub>2</sub>, které mohou patogeny přímo neutralizovat. Vnější vrstva hlenu je tvořena

mucinem, kde je přítomna mikrobiota (McGuckin *et al.*, 2011; Ouellette, 2011). Třetí úroveň jsou samotné epitelové buňky. Představují především funkci nepropustné mechanické bariéry díky tight junction. Na tomto těsném propojení enterocytů se podílí více než 50 proteinů. Příkladem mohou být okcludiny a klaudiny vázané dále na cytoskeletální aparát, což umožňuje provázanost s řadou vnitřních signálních drah. Širokým spektrem PRR receptorů (zejména TLR receptory) na apikálním povrchu buňky, ale také intracelulárních NOD receptorů, jsou schopny detekovat PAMP i DAMP motivy a v reakci na to produkovat pluripotentní prozánětlivé cytokiny (např. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , chemokiny) (Assimakopoulos *et al.*, 2011). Až čtvrtá úroveň zapojuje samotné imunitní buňky přítomné ve sliznici. Poslední úroveň je provázání slizniční obrany se systémovou imunitou díky cílené migraci aktivovaných T nebo B lymfocytů přes endotel postkapilárních venul a jimi dál do lymfatických uzlin. Do venul jsou drénovány i mizní cévy sbírající antigenní materiál v dané lokalitě. Všechny útvary GALT jsou drénovány lymfatickými cévami, kterými se aktivované imunocyty dostávají do efektorových míst, především spádových mesenterických lymfatických uzlin, patřících k největším v těle, kde se naplno rozvíjí systémová imunitní odpověď (Abbas *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2017; Mörbe *et al.*, 2021).

#### **2.4.4 Princip fungování slizniční imunity**

Patogenní mikroorganismy nebo nebezpečné molekuly jsou schopny vyvolat zánětlivá onemocnění po jejich proniknutí hlouběji do střevní stěny či rozpoznání imunitně aktivními buňkami (Obr. 10).

Přes epitel mohou proniknout dvěma cestami. Mechanismem transcytózy nebo paracelulárně rozvolněnými buněčnými spoji. Výše permeability epiteliální bariéry je tak zásadní pro rozvoj zánětu (Kimura, 2018). Infikovaná epiteliální buňka začne produkovat řadu prozánětlivých faktorů jako IL-1, IL-6 nebo neutrofilní chemoatraktantum CXCL8 či CCL2, 3, 4 a 5, které přitahují monocyty, eozinofily i T lymfocyty z krve. Mezi epiteliálními enterocyty jsou roztroušeny i tzv. intraepitelové CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, dobře identifikovatelné na základě exprese CD103, který napomáhá jejich retenci v epitelu. Funkcí těchto buněk je cytotoxicky likvidovat infikované epitelové buňky (Webb *et al.*, 2015). Těsně pod epitelem jsou přítomny dendritické buňky, které vysílají dendrity do střevního lumen, čímž imunitní systém dostává informaci o aktuálním stavu na sliznici a v lumen (Obr. 10). Spolu s dendritickými buňkami jsou těsně pod epitelem přítomny i CD64<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup> makrofágy, které odstraňují proniknuvší patogeny a staré či



Obr. 10: Zapojení buněčných složek slizniční imunity v *lamina propria*.

poškozené epiteliální buňky. Při identifikaci MAMPs fyziologické mikrobioty mohou dendritické buňky iniciovat diferenciaci přítomných T lymfocytů do subsetu Treg, které poskytují signály (v podobě především IL-17 a IL-22) pro navození tolerantní homeostatické rovnováhy, a to i na neškodné molekulární antigeny v potravě. V případě rozpoznání PAMP dochází k aktivaci a prezentaci antigenu T lymfocytům. Zároveň dendritická buňka produkuje celou plejádu kostimulačních molekul (IL-1, IL-6, IL-12, IL-23) (Neish, 2009).

Obdobná situace nastává v oblasti PP. Základní model zahrnuje rozpoznání a přenos antigenu transcytózou do PP, kde je rozpoznán, internalizován a prezentován dendritickými buňkami. Ty následně informaci přenáší dál a dle potřeb organismu řídí stimulaci a diferenciaci různých subsetů T lymfocytů (Obr. 10). Aktivovaná dendritická buňka může skrze lymfatickou cévu migrovat do spádových lymfatických uzlin, kde rovněž řídí diferenciaci T lymfocytů do různých subsetů. Ty se poté, již diferencované,

vrací do lamina propria k zajištění svých efektorových funkcí (Johansson-Lindbom *et al.*, 2003). Tento proces tzv. „střevního homingu“ je umožněn chemokinovým receptorem CCR9 pro CCL25 (Mora & von Andrian, 2009). Značný význam má aktivace Th2 a Th17. Tyto buňky navozují v antigenem aktivovaném B lymfocytu proces izotypového přesmyku směřující k produkci sIgA. sIgA jsou následně aktivně přenášeny transcytózou skrze epitel, díky vazbě na receptor Fc části imunoglobulinu (Obr. 10). Na apikálním pólu enterocyty se sIgA odštěpuje s částí receptoru známou jako sekreční komponenta, která má funkci ochrany sIgA před agresivním obsahem střevního lumen (Mörbe *et al.*, 2021; Neutra *et al.*, 1996; Neutra *et al.*, 2001). Rovněž může být aktivována odpověď Th1 pro rozvoj cytotoxické aktivity především při virové infekci (Neutra *et al.*, 2001).

Viry jsou obvykle inaktivovány již v žaludku nízkým pH. Pokud projdou do střeva mohou být neutralizovány sIgA. K proniknutí do buněk viry využívají interakci jejich specifického ligandu s odpovídajícím receptorem v membráně cílové buňky. Rychlou reakcí buňky na infekci virem je produkce interferonů I. třídy. Ty po vazbě na receptor v okolních dosud neinfikovaných buňkách navozují antivirový stav, charakteristický např. snížením intenzity proteosyntézy, čímž se virus nemůže dostatečně efektivně replikovat. Infikované buňky mohou také protektivním působením interferonů přejít do apoptózy. Většina virových infekcí se tak v tomto stádiu zastavuje. Z imunitních buněk mají v antivirové aktivitě význam zejména CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, jejichž cytotoxickou aktivitou pomocí perforinů a granzymů jsou poškozené buňky likvidovány. Infikovaná buňka se zároveň stává producentem prozánětlivých cytokinů, které modulují diferenciaci a aktivaci ostatních imunitních buněk. Význam zde má INF $\gamma$ , který podporuje diferenciaci T lymfocytů do subsetu Th2, důležitého pro podporu B lymfocytů k izotypovému přesmyku a somatické hypermutaci. Aktivovaný B lymfocyt se pak stává plazmatickou buňkou produkující vysoce afinitní protilátky proti danému virovému *agens* (Murphy *et al.*, 2017; Krejsek *et al.*, 2016).

Bakteriální infekce jsou oproti virovým podstatně komplexnější. Patologické mohou být sami o sobě nebo produkcí toxinů (*Vibrio cholerae*). Podstatná je také jejich schopnost adherovat na povrch epitelových buněk prostřednictvím sekrečních systémů či schopnost uniknout z fagozomu do cytoplazmy buňky a skrytě se zde množit. Tyto bakteriální schopnosti jsou kódovány tzv. geny patogenity, které mohou být umístěny i na plazmidu a bakterie si je tak mohou zcela běžně předávat mezi sebou (Figura & Tabaqchali, 1996; Bach, 2005; Cebra, 1995). Právě střevní mikrobiota zabraňuje adherenci bakterií na epitelový povrch. Zřejmě nejčastější příčinou bakteriálních infekcí

střevní stěny je narušení funkce mikrobioty z důvodu vystavení těla antibiotikům, negativnímu vlivu potravy, virové infekci či různým imunopatologickým procesům na sliznici (Axelrad *et al.*, 2020). Pro bakteriální růst je zásadní dostupnost  $\text{Fe}^{3+}$ , které jsou pro bakterie esenciálními růstovými faktory. V těle je přítomna řada bílkovin (transferin, ferritin, ...), schopných  $\text{Fe}^{3+}$  vyvazovat. Jde i o jednu z obraných strategií, kdy např. kalpronektin z granulí neutrofilů mimo jiné právě  $\text{Fe}^{3+}$  vyvazuje (Bullen *et al.*, 1978). Pokud bakterie proniknou všemi obranými bariérami až do nitra epitelových buněk či dál do *lamina propria* střevní sliznice, jsou časem odhaleny imunocyty díky svým PAMP a DAMP strukturám. Buňky v reakci na jejich přítomnost začnou produkovat prozánětlivé cytokiny, které dále modulují počínající zánětlivou imunitní reakci. V odpovědi je zahrnuto zpracování a prezentace antigenů transportovaných M–buňkami k buňkám dendritickým i aktivace lymfocytů. Ty pak produkují cytokiny a specifické protilátky, či odchází do systémového oběhu k navození systémové imunitní odpovědi (Abbas *et al.*, 2012; Cebra, 1995).

#### **2.4.5 Patologie střevní sliznice**

Patologické procesy na střevní sliznici mohou vést k narušení její fyziologické funkce a rozvoji zánětu. Mezi nejznámější zánětlivá onemocnění střevní stěny, označovaná jako nespecifické střevní záněty, patří Crohnova choroba a Ulcerózní kolitida. Jedná se o chronická autoimunitní onemocnění.

Crohnova choroba se vyznačuje postižením celé stěny střeva, segmentálním charakterem, kdy se střídají úseky zdravé tkáně s postiženou a přítomností i makroskopicky viditelných epiteloidních granulomů, které jsou tvořeny především makrofágy s T lymfocyty (Torres *et al.*, 2017). Dochází ke ztlustění stěny spojené se stenózou. Nemoc se objevuje hlavně u mladších lidí a její příčina je dosud neznámá (Bernstein *et al.*, 2006). Kromě GITu může docházet i k postižení očí, jater, kůže či ledvin. Nejčastějším projevem je pak bolest břicha, chronický průjem a tvorba fisur kolem konečníku. Nejzávažnější komplikací může být masivní krvácení nebo zvrát v karcinom (Baumgart & Sandborn, 2012).

Ulcerózní kolitida se také řadí mezi nespecifické střevní záněty. Od Crohnovy choroby se liší tím, že postižena není celá střevní stěna, ale pouze sliznice a podslizniční vazivo. K poškození navíc dochází pouze v tlustém střevě a konečníku. Poškození je kontinuální a makroskopicky je patrná kontrakce postiženého úseku. Sliznice je hypertrofická

s četnými vředy. Projevuje se bolestmi v podbřišku, bolestivým nucením na stolicí a průjmy s krví (Jewell *et al.*, 2010; Langan *et al.*, 2007).

Léčba akutních patologických stavů spojených se záněty střev je v současnosti řešena medikamentózními přístupy v podobě podávání různých imunomodulancí jako aminosalicyláty či kortikosteroidy pro tlumení zánětlivých imunitních reakcí. Ve vážných případech je pak nutná i hospitalizace a chirurgický zákrok (Akobeng *et al.*, 2016). V současnosti více než 40 % pacientů na aktuální léčbu neodpovídá (Rubbert-Roth & Finckh, 2009). Další výzkum pro pochopení patogeneze onemocnění a vývoje nových terapeutických přístupů je potřebným pro zvýšení efektivity léčby (Rubbert-Roth & Finckh, 2009).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

- vzorky tlustého střeva a krve myších modelů
  - myš domácí, kmen BALB/c, pohlaví samčí (Anlab, s.r.o.; ČR)
  - myš domácí, kmen C57BL/6, pohlaví samičí (Anlab, s.r.o.; ČR)
- protilátky
  - Brilliant Violet 510<sup>TM</sup> anti-mouse TCR  $\beta$  chain (BioLegend<sup>®</sup>, USA)
  - Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 anti-mouse TCR  $\gamma/\delta$  (BioLegend<sup>®</sup>, USA)
  - Brilliant Violet 570<sup>TM</sup> anti-mouse CD19 (BioLegend<sup>®</sup>, USA)
  - Brilliant Violet 605<sup>TM</sup> anti-mouse CD45.2 (BioLegend<sup>®</sup>, USA)
  - PE anti-mouse CD163 (BioLegend<sup>®</sup>, USA)
  - Pe/Cy7 anti-mouse CD16/32 (Sony Biotechnology, USA)
  - Brilliant Violet 750<sup>TM</sup> anti-mouse/human CD11b (BioLegend<sup>®</sup>, USA)
  - PE/Dazzle 594<sup>TM</sup> anti-mouse CD170 (singlec-F) (BioLegend<sup>®</sup>, USA)
  - Pacific Blue<sup>TM</sup> anti-mouse CD90.2 (Thy1.2) (BioLegend<sup>®</sup>, USA)
  - Brilliant Violet 711<sup>TM</sup> anti-mouse Ly-6C (BioLegend<sup>®</sup>, USA)
  - Brilliant Violet 650<sup>TM</sup> anti-mouse CD4 (Invitrogen Thermo Fischer, USA)
  - PerCP/cy5.5<sup>TM</sup> anti-mouse CD206 (Sony Biotechnology, USA)
  - PE-Cy<sup>TM</sup>5 anti-mouse Ly-6G (Invitrogen Thermo Fischer, USA)
  - PE anti-mouse ROR gamma (t) (eBioscience<sup>TM</sup>, USA)
  - PE Streptavidin (eBioscience<sup>TM</sup>, USA)
  - Streptavidin-FITC (SouthernBiotech, USA)
  - Streptavidin-TRITC (Southern Biotech, USA)
  - Rabbit anti-mouse IgG (FITC) (Invitrogen Thermo Fischer, USA)
  - Brilliant Violet 510<sup>TM</sup> anti-human CD3 (Sony Biotechnology, USA)
  - Brilliant Violet 785<sup>TM</sup> anti-human CD4 (Sony Biotechnology, USA)
  - PerCP/cy5.5<sup>TM</sup> anti-human CD8 (Sony Biotechnology, USA)
  - Biotin anti-mouse IgA (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, USA)
  - Fixable Viability Dye eFluor<sup>TM</sup> 450 (eBioscience<sup>TM</sup>, USA)

### 3.1.2 Chemikálie a roztoky

- ethylendiamintetraoctová kyselina (Serva, Německo)
- kyselina octová (Lach-Ner, ČR)
- kolagenasa (Sigma–Aldrich, USA)
- DNasa I (Sigma–Aldrich, USA)
- Streptavidin (TRITC) (Sigma–Aldrich, USA)
- ethanol (100%) (VWR International, USA)
- methanol (Lach:ner; ČR)
- Fetální bovinní serum (FBS, 10%) (Gibco™, USA)
- Dulbecco's PBS (Sigma–Aldrich, USA)
- Dulbecco's PBS with MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> (Sigma–Aldrich, USA)
- Trypanová modř (Sigma–Aldrich, USA)
- Montovací medium s DAPI (Vector, USA)
- Giemsov barvicí roztok (Lot: 111M4357; Sigma–Aldrich, USA)
- Permeabilizační roztok (Invitrogen Thermo Fischer, USA)
- Lyzační pufr červených krvinek (Red Blood Cell Lysing Buffer) (Sigma–Aldrich, USA)
- Eosyn Y (Sigma–Aldrich, USA)
- Methylenová modř (Sigma–Aldrich, USA)

### 3.1.3 Složení připravovaných roztoků

roztok	roztoky/chemikálie	množství (g)/objem (ml)
předtrávicí roztok (100 ml)	EDTA	0,186
	FBS (4%)	4,000
	HBSS	100,000
trávicí roztok (100 ml)	kolagenasa	0,100
	DNasa (50 U·ml <sup>-1</sup> )	0,166
	FBS (4%)	4,000
	D – PBS (s MgCl <sub>2</sub> a CaCl <sub>2</sub> )	100,000
FACS (100 µl)	roztoky/chemikálie	objem (µl)
	FBS	5,000
	PBS	95,000



### 3.1.4 Komerční soupravy

- AbC™ Total Antibody Compensation Bead Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Kit (BD Biosciences, USA)

### 3.1.5 Spotřební materiál

- automatické pipety
  - 1–5 ml, 2–20 µl, 1–10 µl; 0,2–1 µl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
  - 40–200 µl (Thermo LabSystems Inc, Waltham, USA)
- pipetovací špičky (AHN/iBioTech, ČR)
- 6–jamková destička (Eppendorftubes®, Německo)
- 1,5 ml mikrozkušavky (Eppendorftubes®, Německo)
- 2 ml mikrozkušavky (Eppendorftubes®, Německo)
- 15 ml kónické zkumavky (SPL Life Sciences co., Ltd., Korea)
- 15 ml propylenové zkumavky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- 50 ml konická zkumavka (SPL Life Sciences co., Ltd., Korea)
- 30 µm buněčné sítko (Miltenyi, Německo)
- 100 µm buněčné sítko (Miltenyi Biotec, Německo)
- Bürkerova komůrka
- krycí sklíčka (Menzel–Glaser, Německo)
- podložní sklíčka (VWR, USA)
- pinzeta
- nůžky
- ubrousky

### 3.1.6 Přístroje

- centrifuga stolní chlazená (Hettich, Německo)
- centrifuga multifunkční (MPW MED. INSTRUMENTS, Varšava, Polsko)
- vortex stolní IKA (Sigma-Aldrich, USA)
- spektrální buněčný analyzátor (cytometr) (Sony Biotechnology Inc., USA)

- klasický průtokový buněčný analyzátor (cytometr) (Sony Biotechnology Inc., USA)
- cytocentrifuga CytoFuge (LabWrench, Kanada)
- mikroskop světelný (Opton, Německo)
- mikroskop fluorescenční (Opton, Německo)
- třepačka včetně inkubátoru (Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Německo)

### **3.1.7 Software**

Microsoft Office Word 2016, Microsoft Office Excel 2016, Microsoft Office PowerPoint 2016, FlowJo (v10.8.1), GraphPad.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava vzorků pro srovnání klasické průtokové a spektrální cytometrie

Za účelem srovnání měření klasickou průtokovou a spektrální cytometrií byly využity vzorky zamražených lidských PBMC. Po rozmražení byl objem 2  $\mu\text{l}$  zředěn v 10 ml PBS. Po centrifugování 5 min, 250 g a 20 °C byla v Bürkerově komůrce pod mikroskopem určena koncentrace (bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  vzorku, zředěno 10  $\mu\text{l}$  PBS za přidání 20  $\mu\text{l}$  roztoku Trypanové modři a napipetování příslušného objemu na Bürkerovu komůrku). Koncentrace byla stanovena 20.10<sup>6</sup>/ml. Bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze (odpovídá 1 milionu buněk) za přidání 50  $\mu\text{l}$  FACS; 2,5  $\mu\text{l}$  roztoku každé protilátky (anti-CD3, anti-CD4 a anti-CD8) a 1  $\mu\text{l}$  FVD s následnou inkubací 30 min ve tmě. Poté byl vzorek promyt 1 ml PBS a peleta rozsuspendována ve 400  $\mu\text{l}$  PBS. Po 200  $\mu\text{l}$  byl vzorek rozdělen do dvou cytometrických zkumavek pro měření na klasickém průtokovém a spektrálním cytometru.

### 3.2.2 Izolace imunitních buněk z *lamina propria mucosae* myšího tlustého střeva

Vzorek tkáně tlustého střeva, vypreparovaný z myšího modelu, byl umístěn do jamky s 5 ml chladného PBS v 6-jamkové destičce. Vzorek byl poté za pomoci pinzety a nůžek podélně rozstříhnut a rozdělen na menší části, které byly přeneseny do 50 ml zkumavky. Pipetou bylo přidáno 7 ml předtrávicího roztoku předehřátého na 37 °C a suspenze byla inkubována 20 min při teplotě 37 °C za mírného třepání (40 g/100 o/min) v inkubační třepačce. Následně byla suspenze vortexována 15 s a přefiltrována přes 100  $\mu\text{m}$  buněčné sítko do 50 ml čisté falkony. Vzorek tkáně zachycené na sítku byl pinzetou přenesen do čisté 50 ml falkony a nůžkami ještě více rozmělněn. Následně k němu bylo přidáno 7 ml trávicího roztoku předehřátého na 37 °C a suspenze byla inkubována 20 min. při 37 °C na třepačce (40 g/100 o/min). Suspenze byla vortexována 20 s a přefiltrována přes 30  $\mu\text{m}$  buněčné sítko do 50 ml čisté falkony. Roztok byl centrifugován 10 min při 500 g a 20 °C, promyt 1 ml roztoku FACS a opět centrifugován 5 min při 500 g a 20 °C. Supernatant byl odsán a získaná peleta byla použita k dalším analýzám.

### 3.2.3 Příprava vzorků pro cytometrickou analýzu

Fc receptory na povrchu buněk byly blokovány 50  $\mu$ l zředěného roztoku Fc block (1  $\mu$ l Ab anti-16/32 + 49  $\mu$ l PBS) 10 min při 4 °C, promyty 1ml FACS a barveny 50  $\mu$ l roztoku protilátkami (Tab. 3) (30 min, 20 °C, ve tmě). Buňky byly promyty 3 ml PBS a centrifugovány 10 min, 500 g, 20 °C. Supernatant byl odsán a peleta byla rozsuspendována ve 100  $\mu$ l fixačního roztoku (4% paraformaldehyd) s 10 min inkubací. Následoval promývací krok, kdy získaná peleta byla poté rozsuspendována v 50  $\mu$ l permeabilizačního roztoku (45  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O + 5  $\mu$ l komerčního permeabilizačního roztoku) s inkubací 10 min při lab. teplotě. Do dalších 50  $\mu$ l permeabilizačního roztoku byly přidány 2,5  $\mu$ l protilátky anti-ROR $\gamma$ T a 2,5  $\mu$ l protilátky anti-GATA3. Celý objem pak byl přidán ke vzorku buněčné suspenze s následnou inkubací 30 min. Po promytí 1ml FACS byla získaná peleta buněk rozsuspendována ve 300  $\mu$ l FACS a přenesena do cytometrických zkumavek. Takto připravený vzorek byl připraven k měření.

Obdobný postup byl použit i pro vzorky periferní krve, které byly odebírány do mikrozkušavek s 10  $\mu$ l 2,57 mM roztoku EDTA. Objem odebrané krve byl asi 1,5 ml

Tab. 3: Složení barvicího roztoku.

roztok	objem ( $\mu$ l)
FACS	50,0
protilátka	objem ( $\mu$ l)
anti-CD90.2	1,0
anti-CD170	2,5
anti-CD11b	2,5
anti-TCR $\gamma\delta$	1,0
anti-Ly6G	2,5
anti-CD163	2,5
anti-CD4	2,5
anti-Ly6C	2,5
anti-CD19	2,5
anti-CD206	2,5
anti-FVD	1,0

(1 mikrozkušavka) na 1 myši model, kdy využity byly 3 myši modely. Vzorky krve byly přeneseny do 5 ml RBC lysis buffer a centrifugovány 5 min, 250 g a 20 °C. Supernatant byl odsán a peleta podrobena promytí 1 ml FACS s centrifugací 5 min, 250 g a 20 °C. Následný postup byl shodný s postupem pro buňky izolované ze střevní tkáně.

### **3.2.4 Příprava knihovny fluorochromů**

K experimentu byl využit komerční AbC™ Total Antibody Compensation Bead Kit. Před použitím byla láhev s kuličkami vortexována 10 s. Do každé z 10 mikrozkušavek byla přidána 1 kapka roztoku kuliček a 1 µl konkrétní značené protilátky. Pouze v případě FVD byla tato protilátka přidána ke vzorku rozmražených buněk (s kuličkami FVD neinteraguje), které byly zcentrifugovány (250 g, 20 °C, 5 min), supernatant byl odsán a peleta rozsuspendována v 50 µl FACS. Následovala 30 min inkubace ve tmě při lab. teplotě. Každá mikrozkušavka byla promyta 1 ml PBS (v případě FVD 1 ml FACS, neboť jde o vzorek s buňkami) s centrifugací 5 min, 250 g, 20°C. K peletě bylo přidáno 100 µl fixačního roztoku (4% paraformaldehyd) s 10 min inkubací ve tmě. Po promytí 1 ml PBS a centrifugací 5 min, 250 g, 20 °C byla získaná peleta rozsuspendována ve 100 µl permeabilizačního roztoku s inkubací 10 min a opět promyta 1 ml PBS za centrifugace 5 min, 350 g, 20 °C. Peleta byla opět rozsuspendována ve 300 µl FACS za přidání 1 kapky roztoku negativních kuliček a dobrého promíchání. Celý objem byl přenesen do cytometrických zkušavek. Jednotlivé vzorky byly měřeny spektrálním cytometrem, čímž byla získána excitačně–emisní spektra jednotlivých fluorochromů.

### **3.2.5 Příprava mikroskopických preparátů imunitních buněk *lamina propria mucosae* myšního tlustého střeva**

Peleta buněk získaná ze 2 vzorků tlustého střeva dle postupu 3.2.1 byla rozsuspendována v 1 ml FACS. Pro zjištění počtu buněk ve vzorku bylo z tohoto roztoku odebráno 20 µl suspenze buněk, které byly barveny s 20 µl methylenové modří a v Bürkerově komůrce pod mikroskopem počítány. Na základě sumy živých buněk byla získána buněčná koncentrace v původním vzorku. Pro další postup bylo využíváno optimální množství 200 tis. Buněk, čemuž odpovídaly objemy 28,9 µl VZ1 a 25,4 µl VZ2.

K oběma vzorkům bylo přidáno 9 ml PBS. Ze VZ1 bylo do plastových držáků se sklíčky v cytopsinu pipetováno 290 µl a ze VZ2 254 µl. Vlivem odstředivé síly v cytopsinu buňky přilehly ke sklíčku. Na každé sklíčko s buňkami bylo aplikováno 50

μl fixačního činidla (100% methanol nebo 5% kys. octová v methanolu) s 10 min inkubací. Po odsátí fixačního činidla bylo na fixované buňky nanášeno 80 μl PBS s 5 min inkubací. PBS bylo poté odsáto a sklíčka byla zmrazena (-20 °C). Bylo takto získáno celkem 48 preparátů (12 fixovaných 100% methanolem a 12 fixovaných 5% kys. octovou v methanolu pro každý vzorek).

### **3.2.6 Barvení buněk preparátů Pappenheimovou panoptickou metodou**

Pro barvení preparátu se na fixované buňky nanášelo 80 μl May–Grünwaldova roztoku s 5 min inkubací. Po odsátí roztoku byly buňky promyty 100 μl PBS (inkubace 1,5 min a vysušení na vzduchu). Buňky byly poté barveny 80 μl Giemsova barvicího roztoku (ředěn 1:20 ddH<sub>2</sub>O) 20 min. Oplachem v ddH<sub>2</sub>O (dokud viditelně docházelo k uvolňování barviva), zakápnutí barvených buněk PBS a přikrytí krycím sklíčkem byl vzorek mikroskopicky pozorován.

### **3.2.7 Barvení buněk preparátů Giemsovou metodou**

Giemsův barvicí roztok byl naředěn 1:20 ddH<sub>2</sub>O a 80 μl roztoku bylo přeneseno na buňky preparátu s 50 min inkubací. Poté byl vzorek opláchnut ddH<sub>2</sub>O (dokud viditelně docházelo k uvolňování barviva), vysušen a po zakápnutí PBS a přikrytí krycím sklíčkem mikroskopicky pozorován.

### **3.2.8 Značení buněk preparátů fluorescenčně konjugovanými protilátkami**

Na buňky preparátu bylo pipetováno 50 μl komerčního Fc blokačního roztoku (5 μl Fc block + 45 μl PBS) s 10 min inkubací. Následovalo 3x promytí PBS, tj. odsátí roztoku z fixovaných buněk a nanášení 60 μl dalšího dílu PBS s inkubací 5 min. Buňky byly značeny 50 μl barvicího roztoku (5% FBS v PBS + 0,5 μl protilátky; 60 min; lab. teplota; ve tmě). Po odsátí roztoku a 3x promytí PBS bylo na buňky pipetováno 20 μl montovacího média s DAPI za přikrytí krycím sklíčkem. V případě, kdy byla pro barvení využívána ještě sekundární protilátka, pak po promývacím kroku bylo na buňky pipetováno 50 μl barvicího roztoku s touto sekundární protilátkou (5% FBS v PBS + 0,1 μl sekundární protilátky; 30 min; lab. teplota; ve tmě). Poté byl vzorek 3x promyt PBS a po vysušení bylo na buňky pipetováno 20 μl montovacího média s DAPI za přikrytí krycím sklíčkem.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1.1 Srovnání klasické průtokové a spektrální cytometrie

Pro srovnání klasické průtokové a spektrální cytometrie byla využita analýza lymfocytů lidské krve. Hlavní rozdíl mezi oběma metodickými přístupy spočívá v principu zpracování získaného signálu. Klasická průtoková cytometrie je založena na principu „jeden detektor, jedna barva“, zatímco spektrální cytometrie získává celé emisní spektrum a separuje pak signály z jednotlivých fluorochromů. Pro klasickou průtokovou cytometrii je proto nezbytná optimalizace kombinace užitých fluorochromů, filtrů, detektorů a laserů (Tab. 4, Obr. 11) pro maximální minimalizaci překryvů a zvýšení citlivosti detekce.

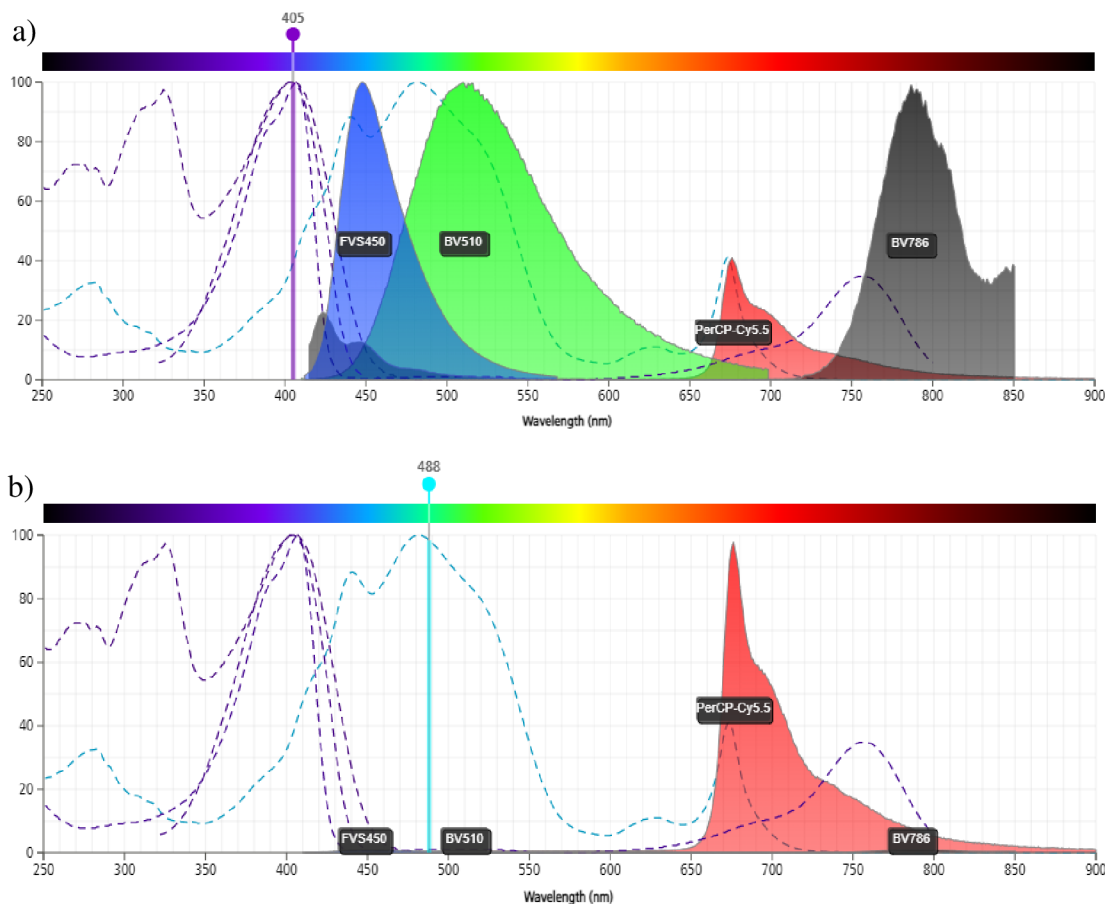
V provedeném experimentu byly užity protilátky konjugované s fluorochromy BV510, BV785 (Brilliant Violet), eFluor450 a PerCP CY 5.5 (peridinin chlorophyll protein). Fluorochromy BV510, BV785 a eFluor450 jsou excitovány světlem s vlnovou délkou laseru odpovídající fialové barvě (405nm), zatímco PerCP CY5.5 světlem s vlnovou délkou laseru odpovídající barvě modré (488nm) (Obr. 11). Vlnové délky emisního záření se však u všech fluorochromů liší a mohly proto být v experimentu využity.

Z dat byla obdobným principem jako u předešlých experimentů vytvořena strategie selekce v programu FlowJo (Obr. 12). Ve vzorcích byly určovány 2 základní typy T lymfocytů, a sice pomocné (Th) a cytotoxické (Tc). Celkově výsledné měření stejných vzorků oběma metodami přináší analogické výsledky (Tab. 5). Rozdíl tkví zejména

Tab. 4: Protilátky s příslušnými fluorochromy a odpovídajícími filtry zvolené při srovnávacím experimentu.

protilátka	anti-CD3	anti-CD4	anti-CD8	FVD
fluorochrom	BV510	BV785	PerCP Cy5.5	eFluor 450
filtr	525/50	785/60	720/60	450/50
barva (odpovídající excitací vln. délce)	fialová	fialová	modrá	fialová
barva (odpovídající emisní vln. délce)	zelená	hnědá/černá	červená	modrá

v jednodušším, méně náročném nastavení experimentu a vyšší citlivosti i přesnosti při spektrální cytometrii, která se tak stává, obecně vědeckou komunitou, preferovanější.



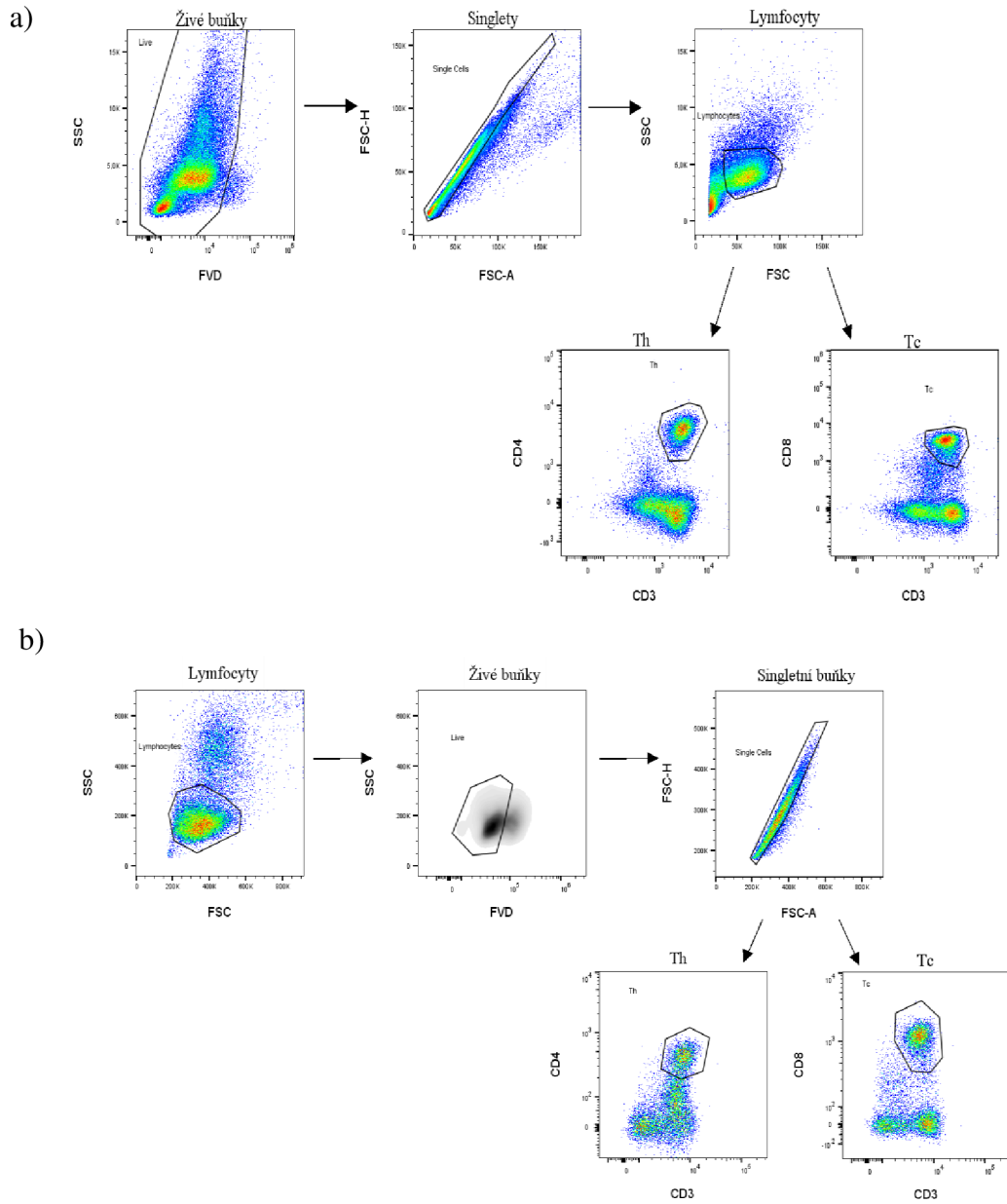
Obr. 11: Emisní spektra pro fluorochromy BV510, BV786 (analogue BV785), FSV450 (analogue eFluor450) a PerCP–Cy5.5 při excitaci a) zářením s vln. délkou odpovídající fialové barvě (405 nm), b) zářením s vln. délkou odpovídající modré barvě (488nm). (vytvořeno v *BD Spectrum Viewer–BD Biosciences*, <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/resources/bd-spectrum-viewer>)

Tab. 5: Výsledky analýzy T lymfocytů lidské periferní krve ve srovnávacím experimentu pro spektrální a klasickou průtokovou cytometrii.

T lymfocyty	charakteristika	typ cytometrie	
		spektrální (% lymfocytů)*	klasická průtoková (% singletních buněk)*
Th	CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup>	34,0	37,0
Tc	CD3 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup>	25,0	24,1

\*vzhledem ke zvolené strategii selekce není problémem, že v obou případech jsou výsledky procentuálním zastoupením různých populací, neboť celkově se vychází vždy ze stejných populací, jen v jiném pořadí





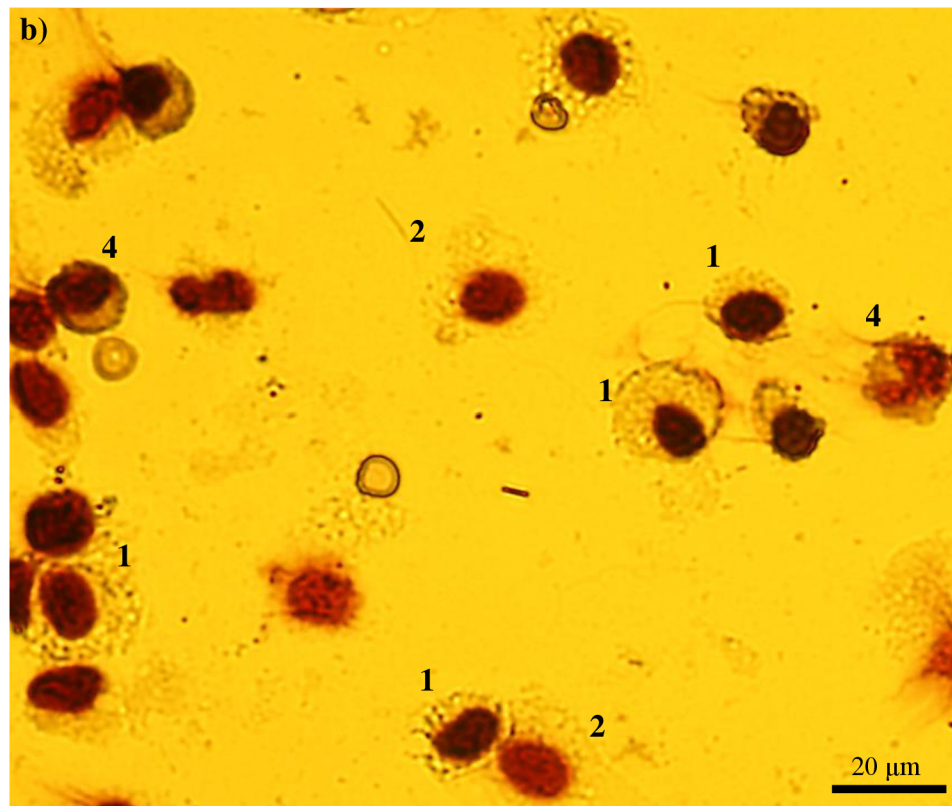
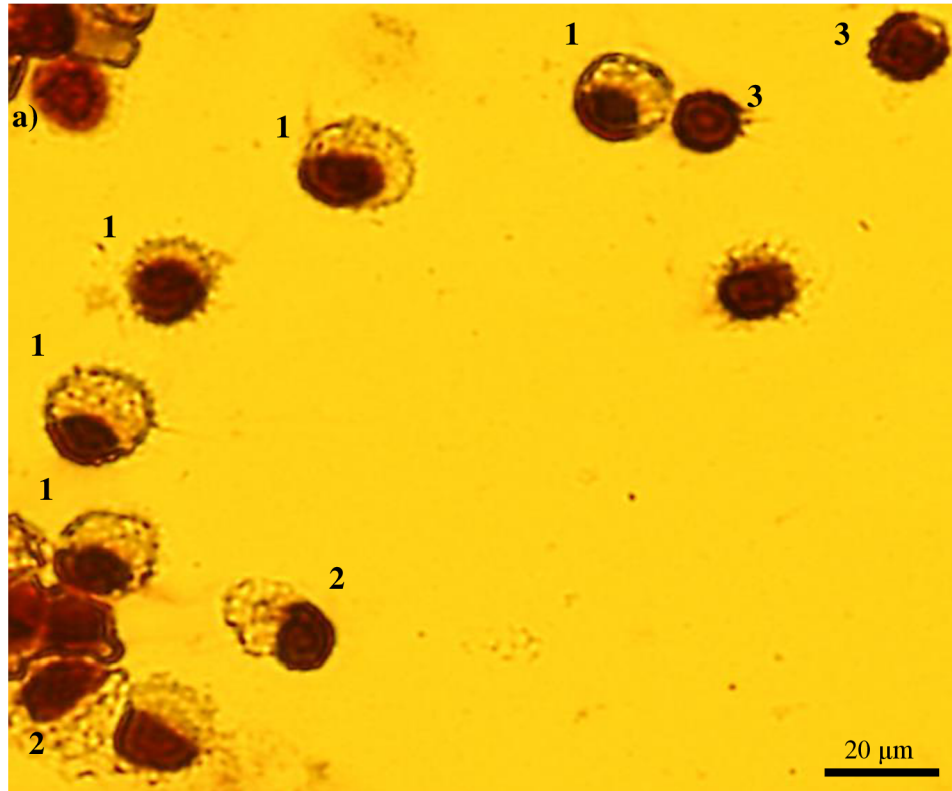
Obr. 12: Strategie selekce lymfocytárních buněk humánní periferní krve: a) spektrální cytometrie, b) klasická průtoková cytometrie.

## 4.2 Mikroskopická analýza imunitních buněk *lamina propria* myšního tlustého střeva

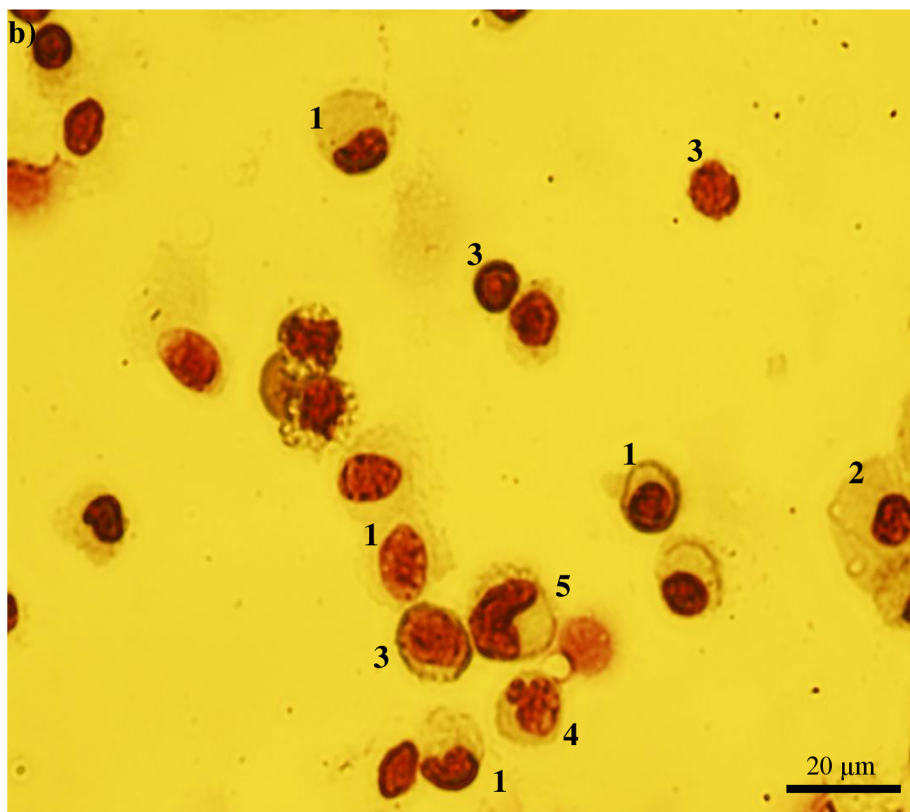
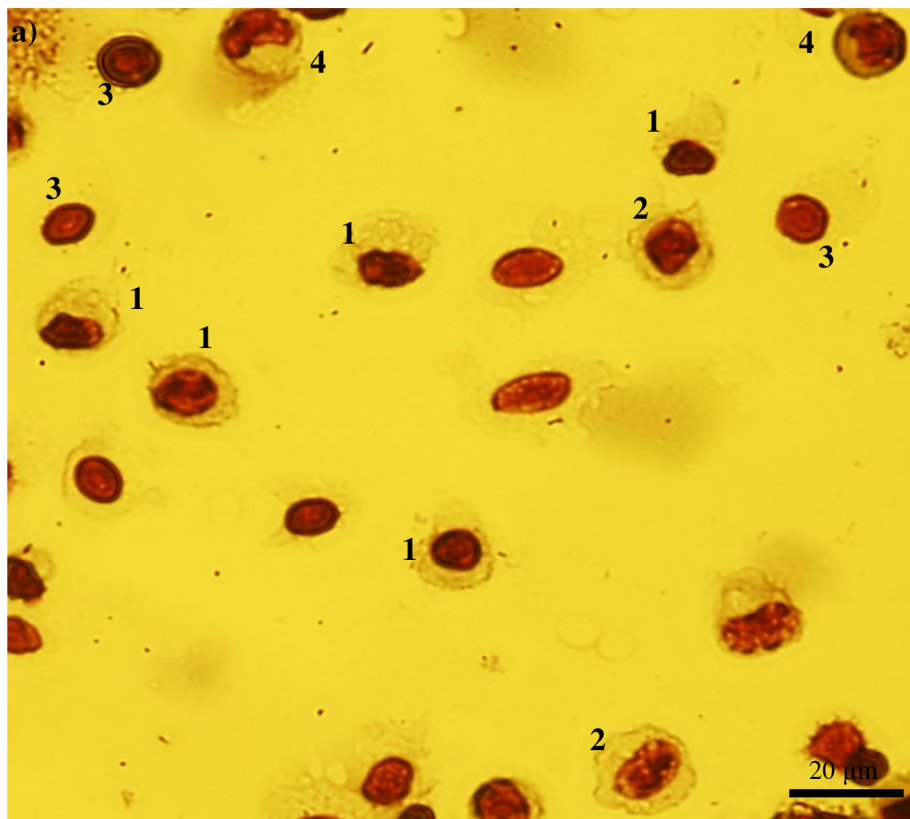
Buňky (izolovány z *lamina propria* tlustého střeva myšního modelu kmene BALB/c) imobilizované na sklíčku byly fixovány 2 činidly, a to 100% methanolem a 5% kys. octovou v methanolu. Také k samotnému barvení byly užity 2 barvicí metody, kdy byl využit Giemsov barvicí roztok (Giemsova metoda) (Obr. 13, Obr. 14) nebo Giemsov barvicí roztok v kombinaci s May–Grünwaldovým roztokem (Pappenheimova metoda) (Obr. 15, Obr. 16). Preparáty byly pozorovány pod světelným mikroskopem.

Při porovnání obou typů fixace spočívající ve využití jiných fixačních činidel nebyly mezi preparáty pozorovány významné rozdíly. Při srovnání obou barvicích metod je možné pozorovat světlejší odstíny fialové až růžové barvy jader u Pappenheimovy metody. Preparáty sloužily k morfologické charakterizaci jednotlivých buněčných typů imunitních buněk vyizolovaných z *lamina propria* tlustého střeva myších modelů. Zejména na základě charakteristické jaderné morfologie, (ne)granulované cytoplazmy, celkové velikosti a tvaru buněk je bylo možné přiřadit k daným typům imunitních buněk.

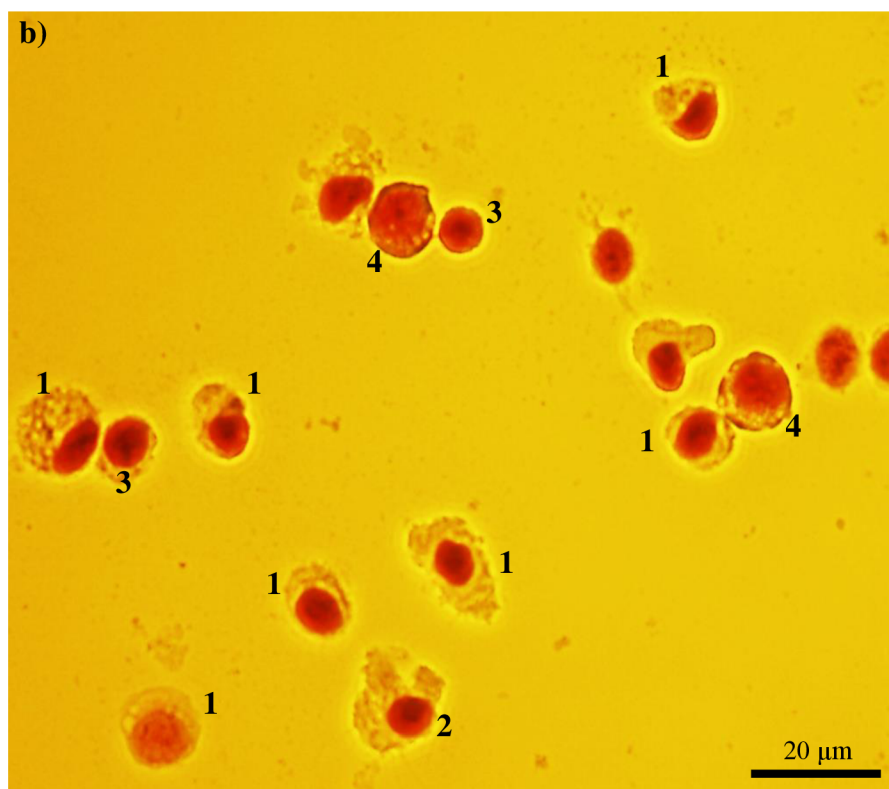
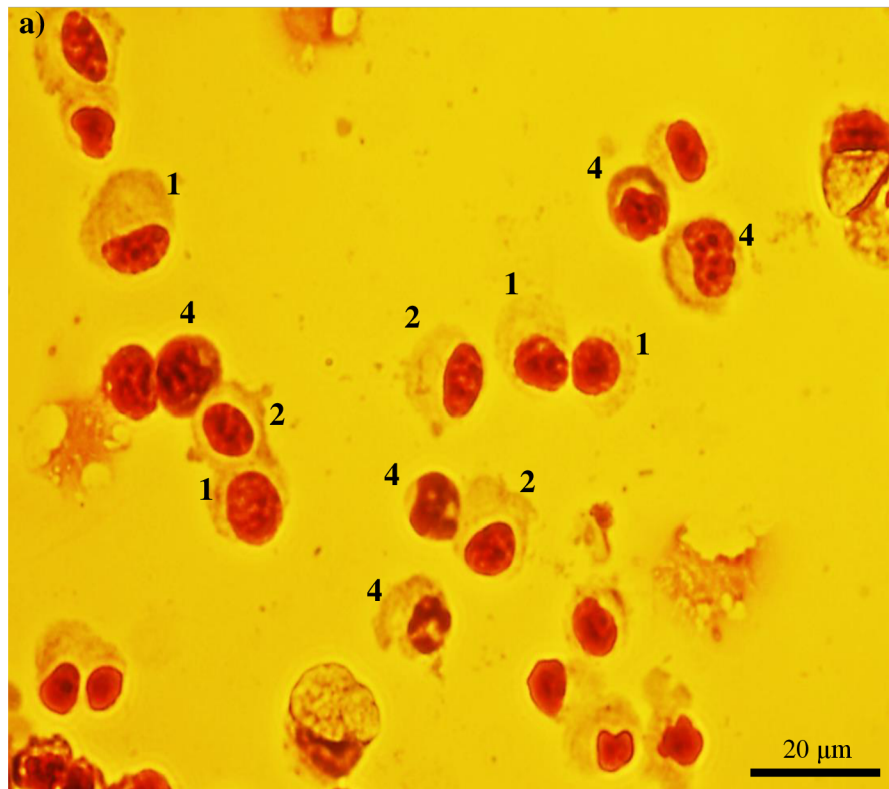
Z celkového počtu 80 snímků, napříč barvicími metodami i typem fixace, byla vypracována orientační analýza zastoupení buněk vrozeného a adaptivního imunitního systému (Obr. 17). Tato orientační analýza přibližně odpovídá výsledkům získaným při analýze imunitních buněk tlustého střeva spektrální průtokovou cytometrií. Na preparátech bylo možné zaznamenat i raritní situace, např. dělicí se buňky (Obr. 16a). Buňky s nejvyšší frekvencí zastoupení se na základě této analýzy jeví být monocyty/makrofágy.



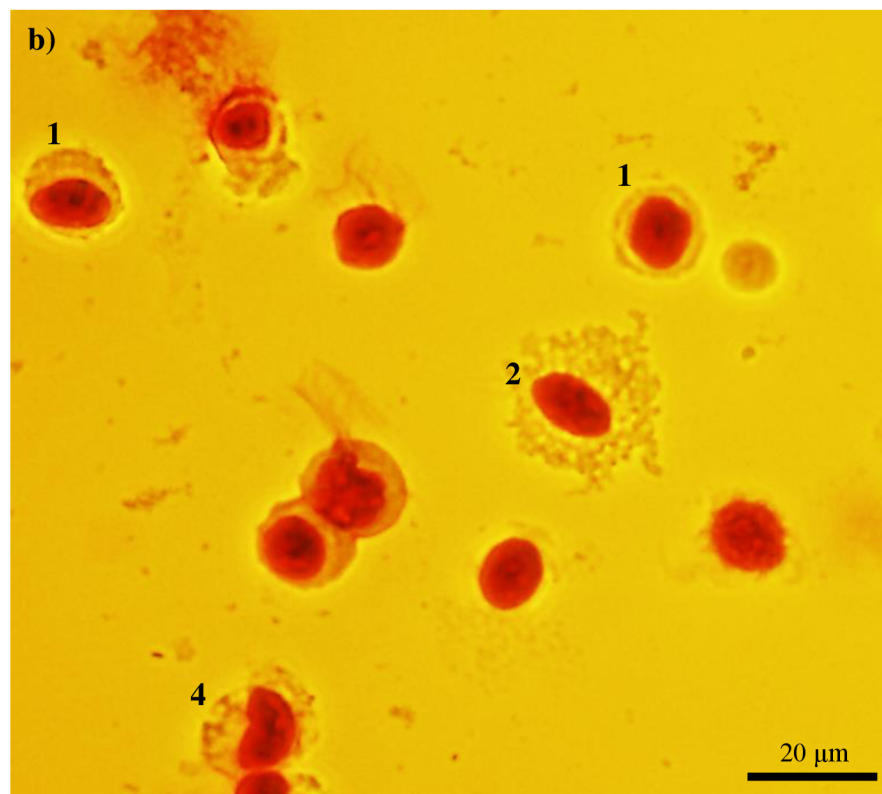
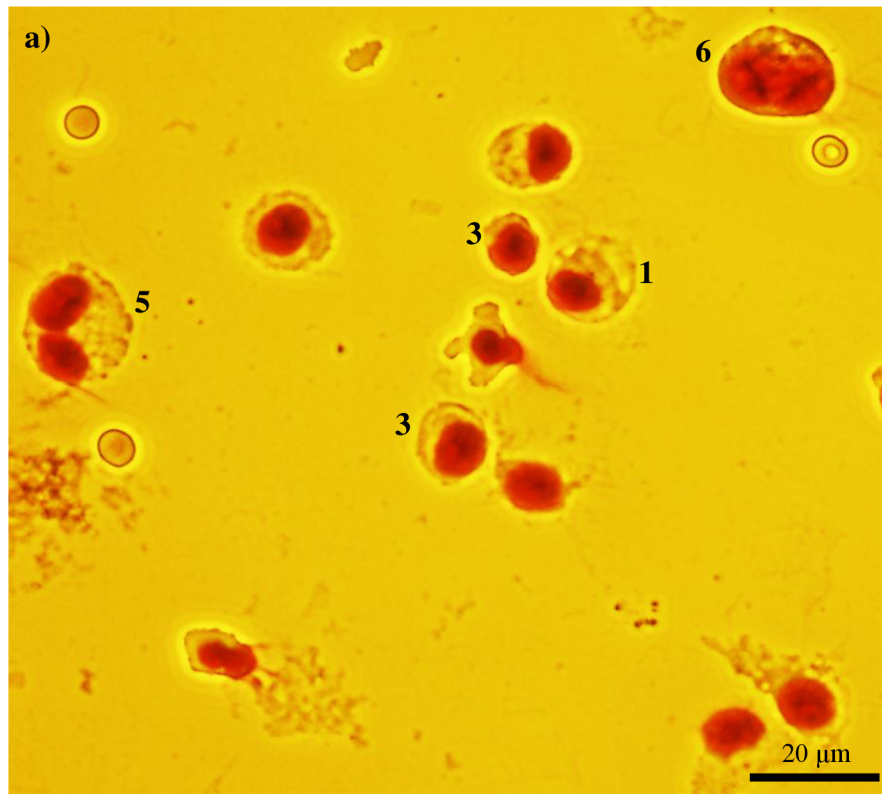
Obr. 13: a), b): Snímek (světelná mikroskopie) imunitních buněk z *lamina propria* myšího tlustého střeva barvených Giemsovou metodou za využití methanolu jako fixačního činidla. 1–monocyt, 2–makrofág, 3–lymfocyt, 4–neutrofil.



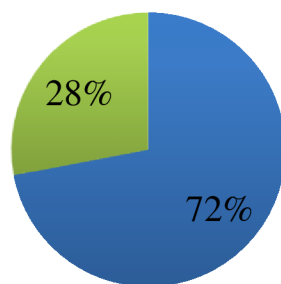
Obr. 14: a), b): Snímek (světelná mikroskopie) imunitních buněk z *lamina propria* myšního tlustého střeva barvených Giemsovou metodou za využití 5% kys. octové v methanolu jako fixačního činidla. 1–monocyt, 2–makrofág, 3–lymfocyt, 4–neutrofil, 5–eosinofil.



Obr. 15: a), b): Snímek (světelná mikroskopie) imunitních buněk z *lamina propria* myšího tlustého střeva barvených Pappenheimovou metodou za využití 5% kys. octové v methanolu jako fixačního činidla. 1–monocyt, 2–makrofág, 3–lymfocyt, 4–neutrofil.



Obr. 16: a), b): Snímek (světelná mikroskopie) imunitních buněk z *lamina propria* myšího tlustého střeva barvených Pappenheimovou metodou za využití methanolu jako fixačního činidla. 1–monocyt, 2–dendritická buňka, 3–lymfocyt, 4–neutrofil, 5–eosinofil, 6–dělicí se buňka.



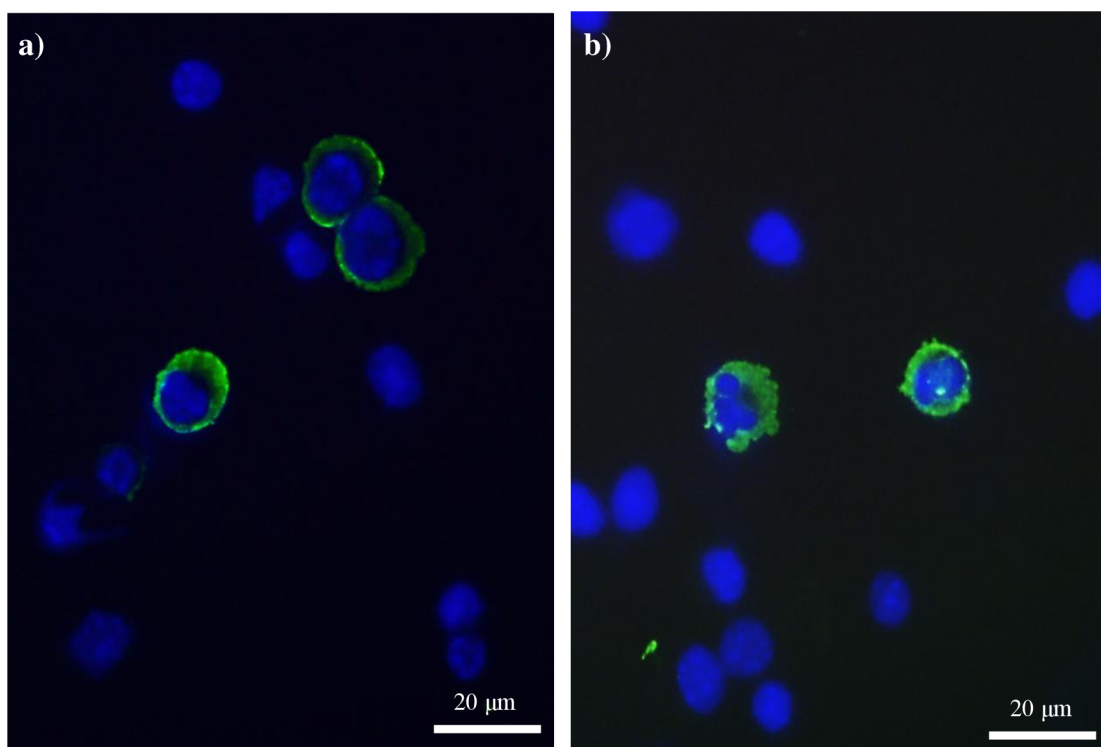
■ buňky vrozeného imunitního systému    ■ buňky adaptivního imunitního systému

Obr. 17: Analýza poměrného zastoupení buněk vrozeného a adaptivního imunitního systému *lamina propria* tlustého střeva myšího modelu.

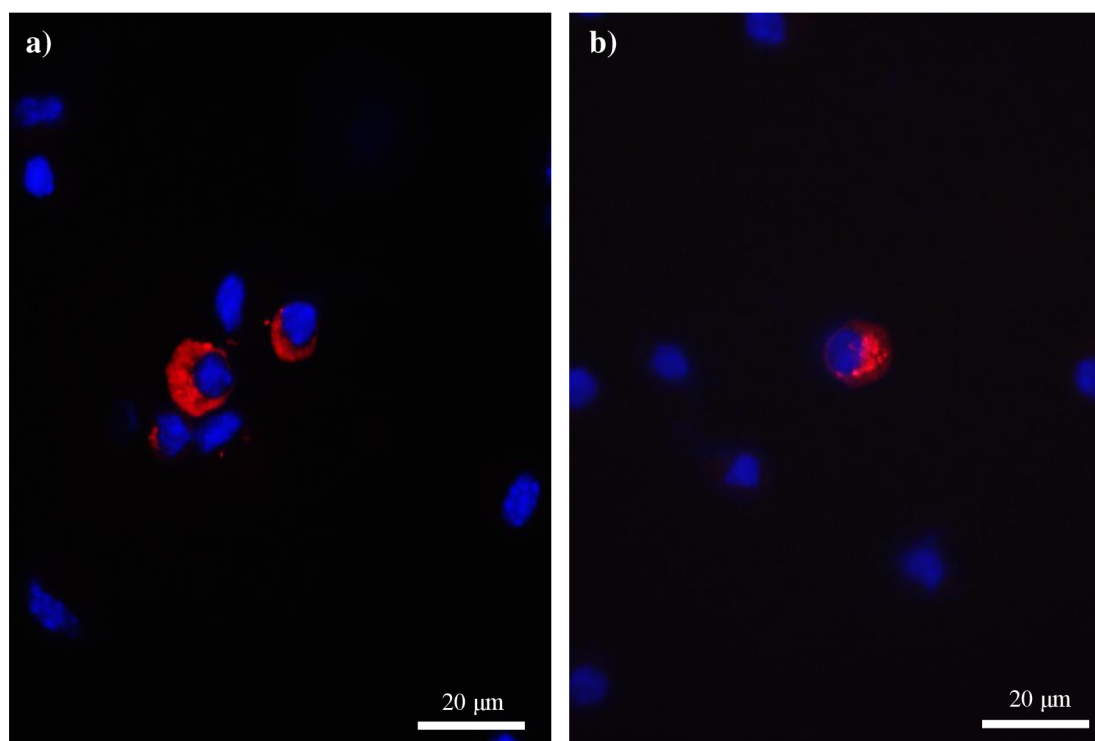
Preparáty byly také pro fluorescenční mikroskopii značeny prostřednictvím protilátek (Ab) (Tab. 6). Ab, konjugovány s fluorochromy, byly namířeny proti konkrétním molekulárním markerům. Využita byla trojice Ab: anti-CD206 (Obr. 18), anti-IgA (Obr. 19) a anti-CD163 (Obr. 20). Na tomto základě pak mohly být specificky identifikovány příslušné buněčné typy (Tab. 6). V mnoha případech bylo možné rozpoznat i subcelulární struktury jako v případě B lymfocytů pravděpodobné endoplazmatické retikulum (Obr. 19b) či granulovanou cytoplazmu makrofágů (Obr. 20b), popř. další lokalizace příslušného markeru. Bylo využito i dvojité barvení s použitím anti-CD206 a anti-IgA (Obr. 21). Na Obr. 21b byla zaznamenána 2 různá stádia vývoje B lymfocytu, a sice jako B lymfocyt (červený i zelený signál) a zralá plazmatická buňka (pouze červený signál).

Tab. 6: Protilátky použité pro vizualizaci příslušných buněčných typů.

protilátka	fluorochrom	barva	marker	specifita
myší anti-CD206	sekundární králičí anti-kryší (myší) Ab s fluorescein isothiokyanátem (FITC)	zelená	CD206 = manosový receptor	antigen prezentující buňky (B-lymfocyty, dendritické buňky, makrofágy)
anti-IgA	Ab biotiniovaná + streptavidin s tetramethylrhodaminem (TRITC)	červená	imunoglobulin třídy A	IgA <sup>+</sup> B lymfocyty (IgA plazmatické buňky)
anti-CD163	fluorescein isothiokyanát (FITC)	zelená	CD163 = receptor pro zachytávání komplexu hemoglobin-haptoglobin	monocyty, makrofágy

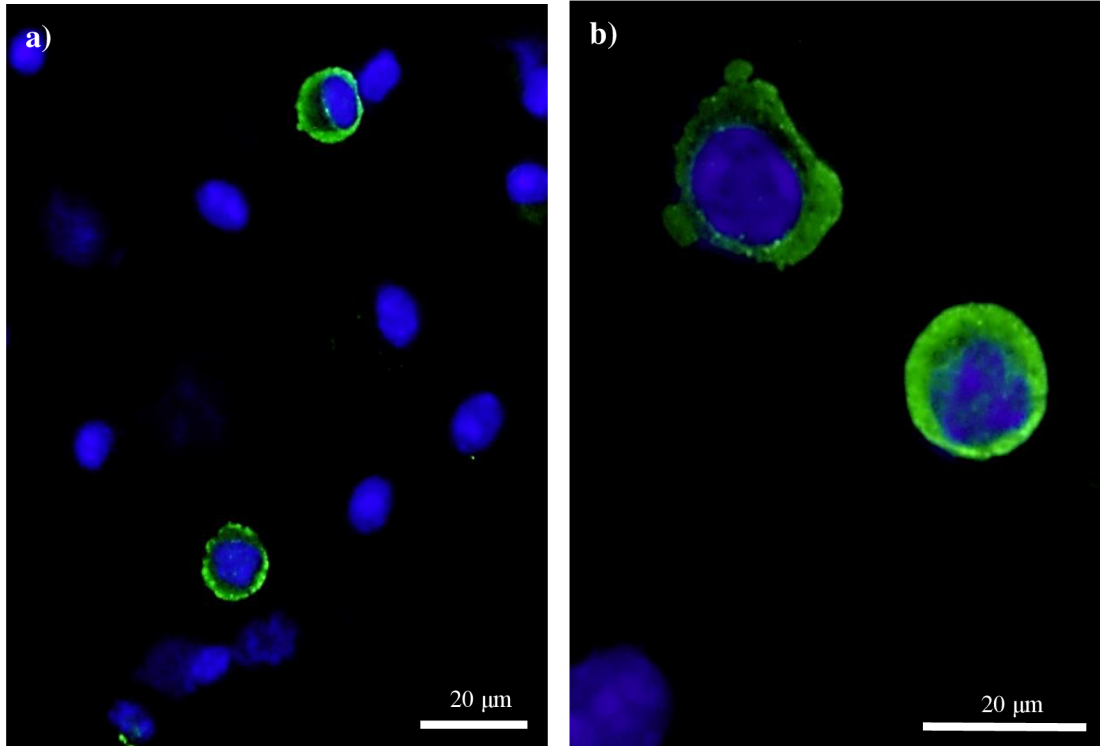


Obr. 18: a), b): Snímek (fluorescenční mikroskopie) imunitních buněk z *lamina propria* myšího tlustého střeva značených Ab anti-CD206 (zelený signál) a DAPI (modrý signál).

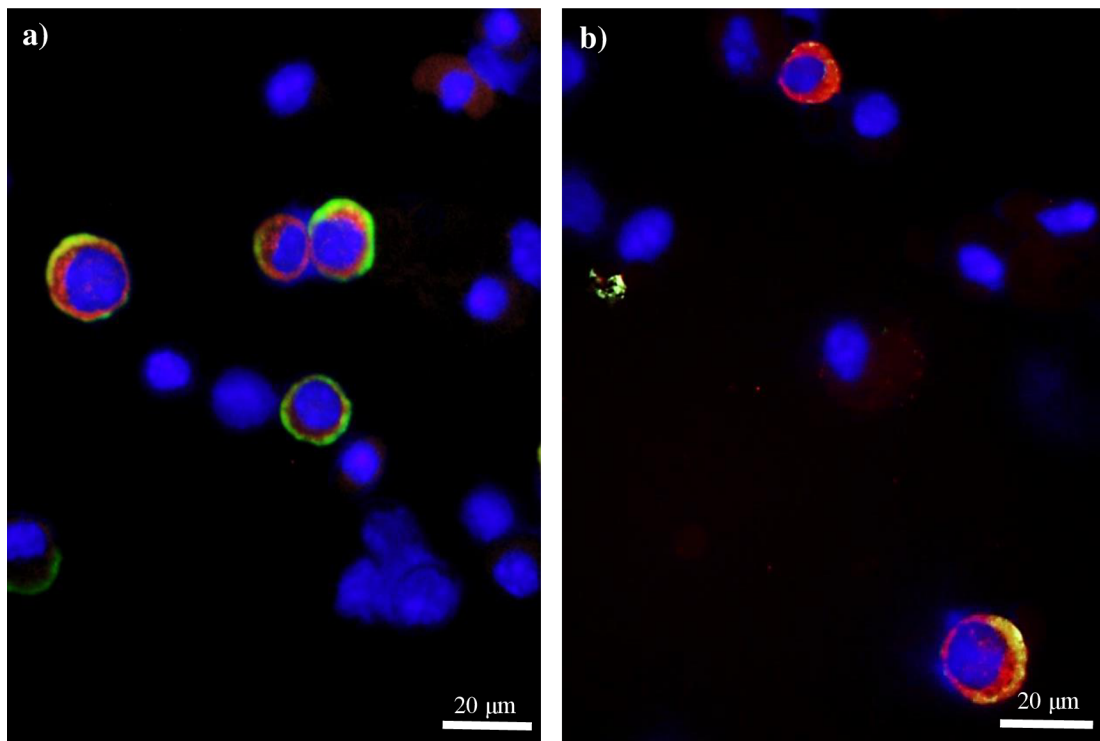


Obr. 19: a), b): Snímek (fluorescenční mikroskopie) imunitních buněk z *lamina propria* myšího tlustého střeva značených Ab anti-IgA (červený signál) a DAPI (modrý signál).





Obr. 20: a), b): Snímek (fluorescenční mikroskopie) imunitních buněk z *lamina propria* myšního tlustého střeva značených Ab anti-CD163 (zelený signál) a DAPI (modrý signál).



Obr. 21: a), b): Snímek (fluorescenční mikroskopie) imunitních buněk z *lamina propria* myšního tlustého střeva značených Ab anti-CD206 (zelený signál), anti-IgA (červený signál) a DAPI (modrý signál).

### 4.3 Cytometrická analýza imunitních buněk periferní krve a *lamina propria* tlustého střeva myší

Hlavní analýza imunitních buněk vyizolovaných z *lamina propria* tlustého střeva a periferní krve myší byla provedena pomocí spektrální průtokové cytometrie. K analýze byly využity myší modely, u nichž byl prostřednictvím působení dextranu sulfátu sodného (DSS) vyvolán nespecifický zánět tlustého střeva, spolu se zdravými kontrolami. Ve vzorcích byly pomocí specifických protilátek (konjugovaných s fluorochromy) namířeny proti konkrétním buněčným markerům charakteristickým pro dané buněčné typy (Tab. 7) identifikovány a kvantifikovány konkrétní buněčné populace. Pro optimální rozpoznání signálů fluorochromů s následnou kvantifikací buněk bylo třeba vytvořit knihovnu fluorochromů. U zdravých myších modelů byla provedena i izolace imunitních buněk z periferní krve.

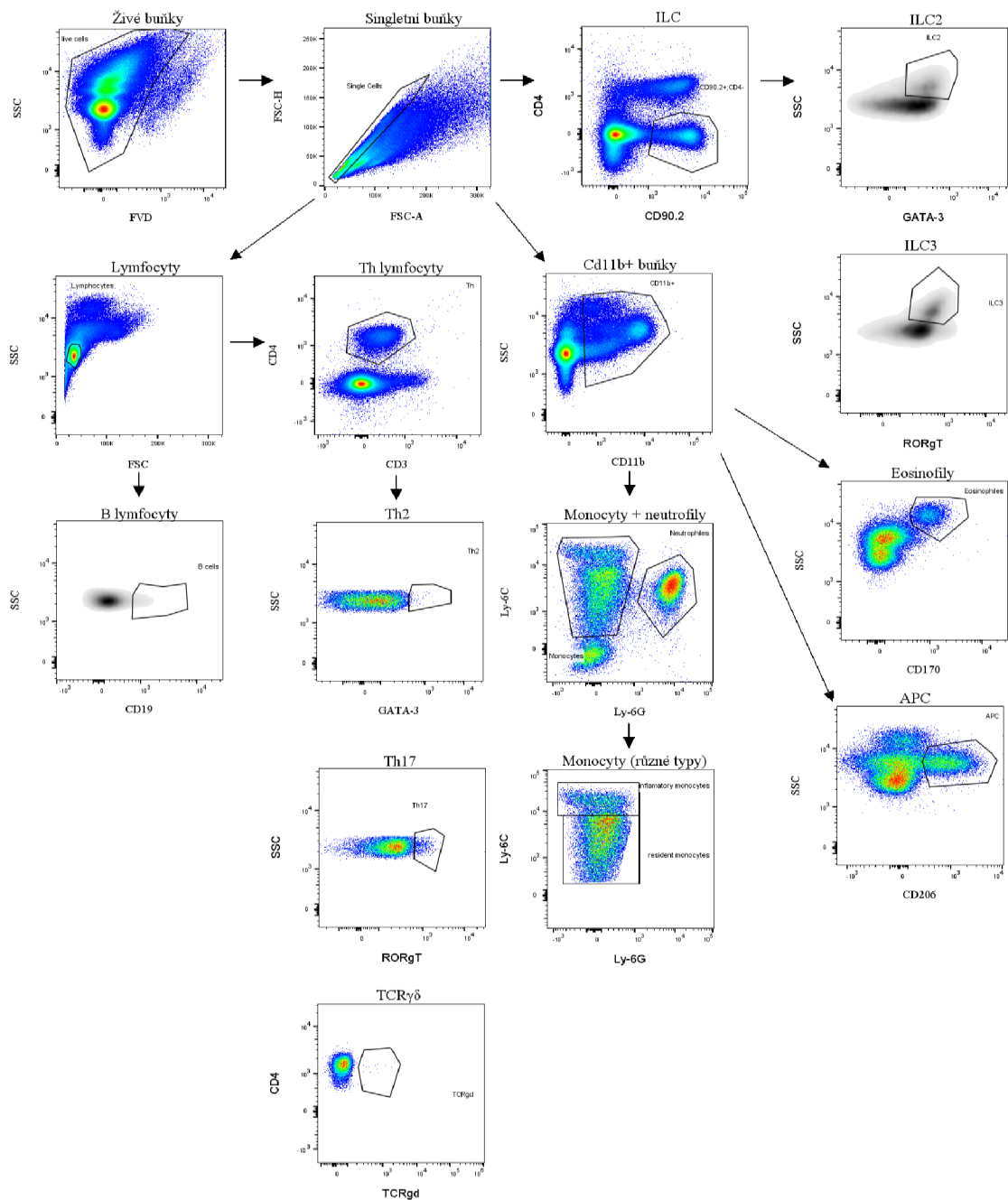
#### 4.3.1 Srovnání imunitních buněčných populací mezi periferní krví a tlustým střevem myších modelů

Imunitní buněčné populace vyizolované z periferní krve 3 myších modelů zdravých kontrol (kmen BALB/c) byly srovnávány s populacemi následně vyizolovanými z *lamina propria* tlustého střeva 4 myších modelů zdravých kontrol (kmen BALB/c).

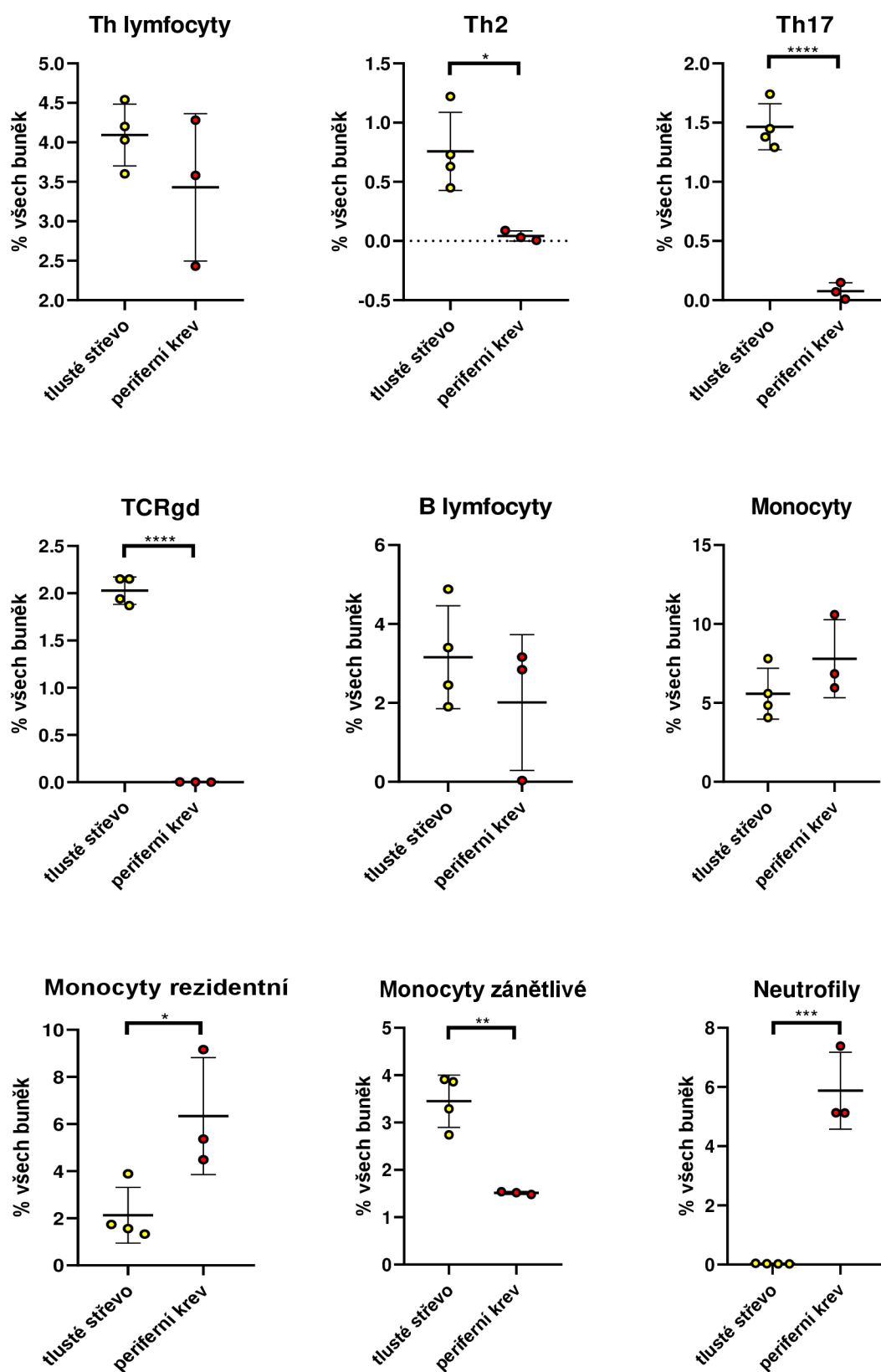
Tab. 7: Výchozí panel charakteristických markerů jednotlivých buněčných typů pro cytometrickou analýzu.

buněčné typy		marker
adaptivní imunitní systém	Th lymfocyty	CD4 <sup>+</sup>
	Th2	CD4 <sup>+</sup> , GATA-3 <sup>+</sup>
	Th17	CD4 <sup>+</sup> , ROR $\gamma$ T <sup>+</sup>
	B lymfocyty	CD19 <sup>+</sup>
vrozený imunitní systém	ILC	CD90.2 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup>
	ILC2	CD90.2 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup> , GATA-3 <sup>+</sup>
	ILC3	CD90.2 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup> , ROR $\gamma$ T <sup>+</sup>
	neutrofilly	CD11b <sup>+</sup> , Ly6-G <sup>+</sup> , Ly6-C <sup>+</sup>
	monocyty	CD11b <sup>+</sup> , Ly6-G <sup>-</sup> , Ly6-C <sup>+</sup>
	makrofágy	CD11b <sup>+</sup> , CD163 <sup>+</sup>
eosinofily	CD11b <sup>+</sup> , CD170 <sup>+</sup>	

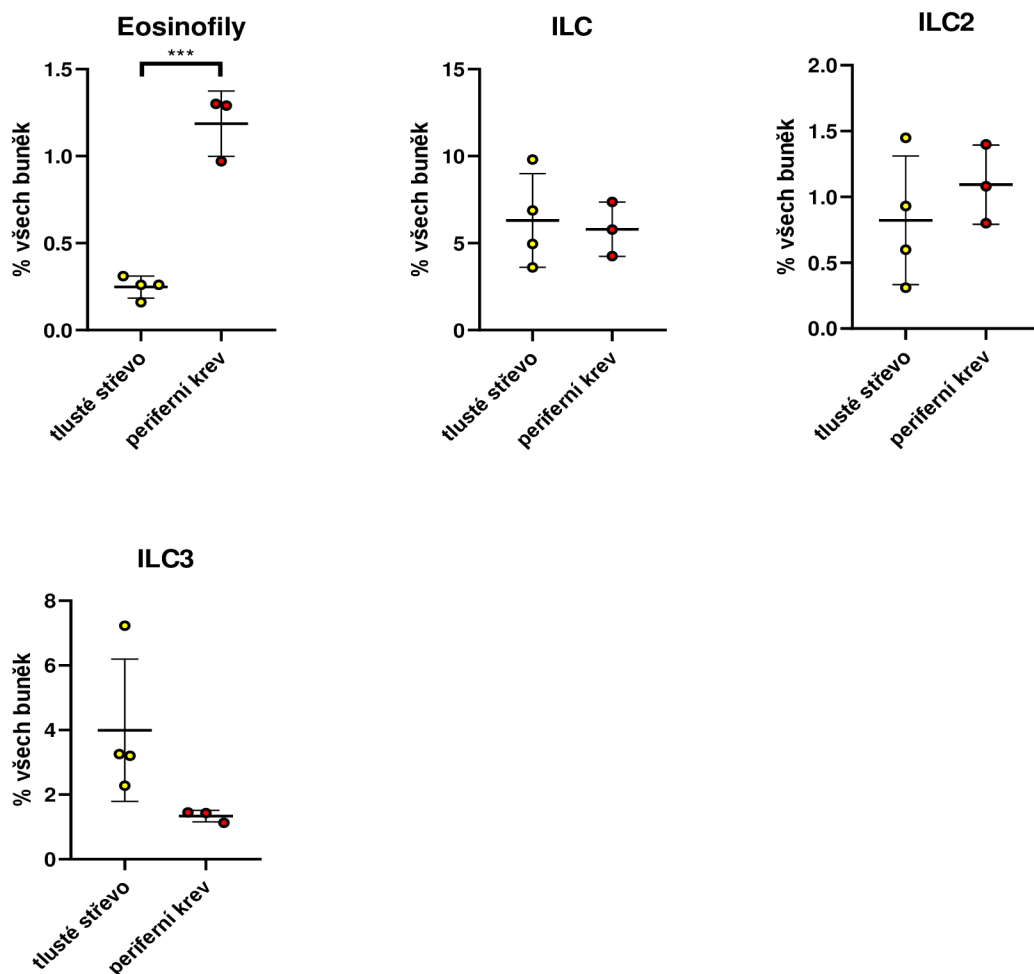
Pomocí multiparametrického softwaru FlowJo byly populace, na základě značení protilátkami proti konkrétním markerům (Tab. 7), vyselektovány za vytvoření „strategie selekce“ (Obr. 22). Data byla následně převedena prostřednictvím Microsoft Excel na číselné hodnoty procentuálního zastoupení daných buněčných populací v příslušné selektované oblasti a obě skupiny vzorků pak byly srovnány softwarem GraphPad za využití t-testu (Obr. 23).



Obr. 22: Strategie selekce imunitních buněk periferní krve zdravých myších modelů.



Obr. 23: Porovnání izolovaných imunitních buněčných populací mezi periferní krví a *lamina propria* tlustého střeva zdravých myších modelů.



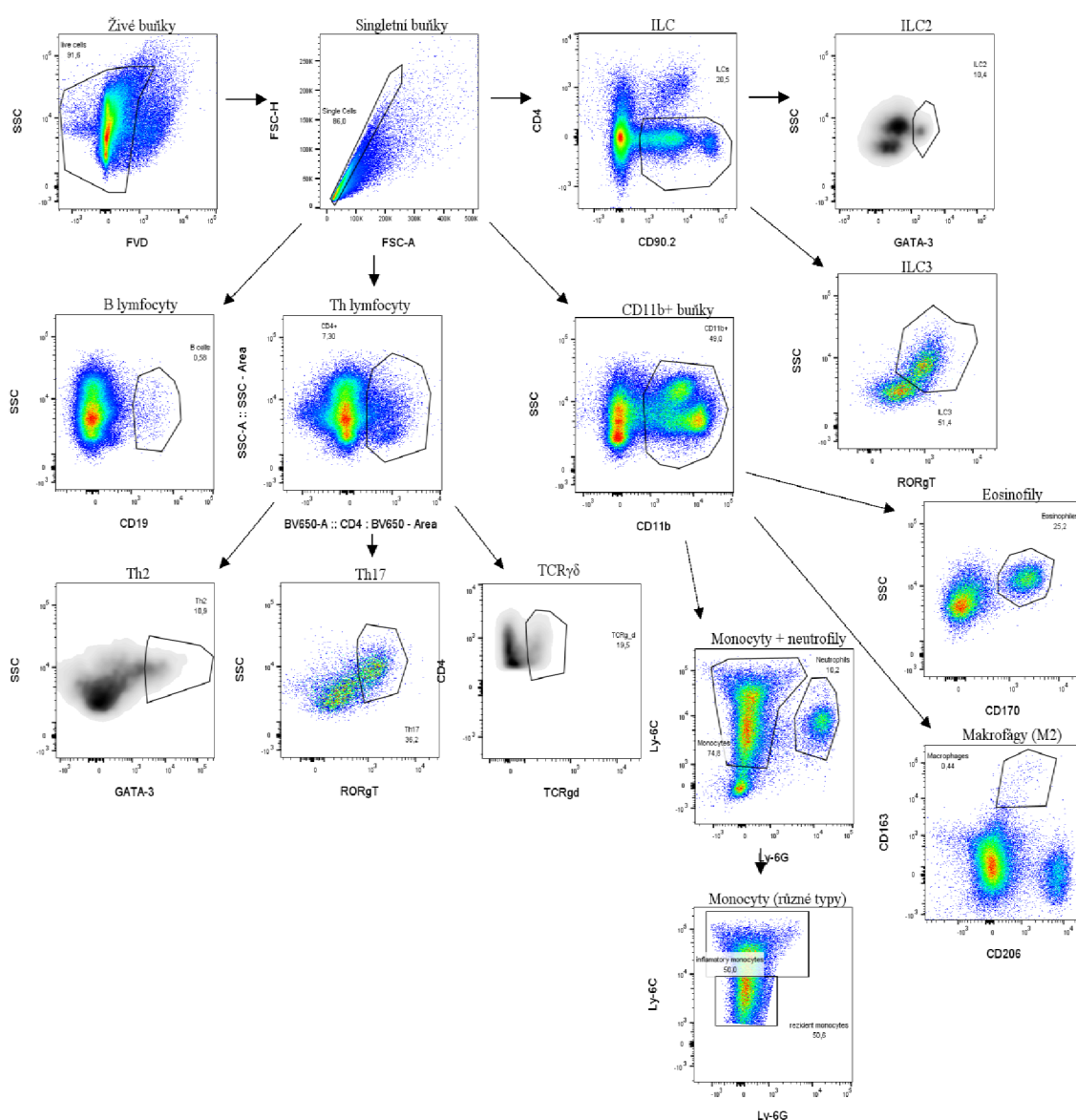
Obr. 23: Porovnání izolovaných imunitních buněčných populací mezi periferní krví a *lamina propria* tlustého střeva zdravých myších modelů (pokračování).

Signifikantní rozdíl v zastoupení populací mezi vzorky z myší periferní krve a *lamina propria* tlustého střeva byl zaznamenán u všech sledovaných subpopulací Th lymfocytů, tedy Th2, Th17 i TCR $\gamma\delta$ . Dále v zastoupení populací neutrofilů, eozinofilů a obou sledovaných subtypů monocytů (rezidentních i zánětlivých). Procentuálně největší rozdíl mezi zastoupením dané populace v myší krvi a ve sliznici tlustého střeva byl zaznamenán u neutrofilů. Výrazný byl i rozdíl v zastoupení Th subpopulací Th17 či TCR $\gamma\delta$ , které se v periferní krvi, na rozdíl od sliznice tlustého střeva, vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Zajímavá byla i změna poměru rezidentních ku zánětlivým monocytům, kdy v periferní krvi byla zaznamenána převaha rezidentních monocytů, zatímco ve střevní sliznici monocytů zánětlivých, což může souviset s potenciálně intenzivnějším primáním vystavením sliznice antigenům. Celkově jde o srovnání imunitních buněčných populací do velosti buněk 50  $\mu\text{m}$  bez erytrocytů či epitelíí, které byly filtrací odstraněny.

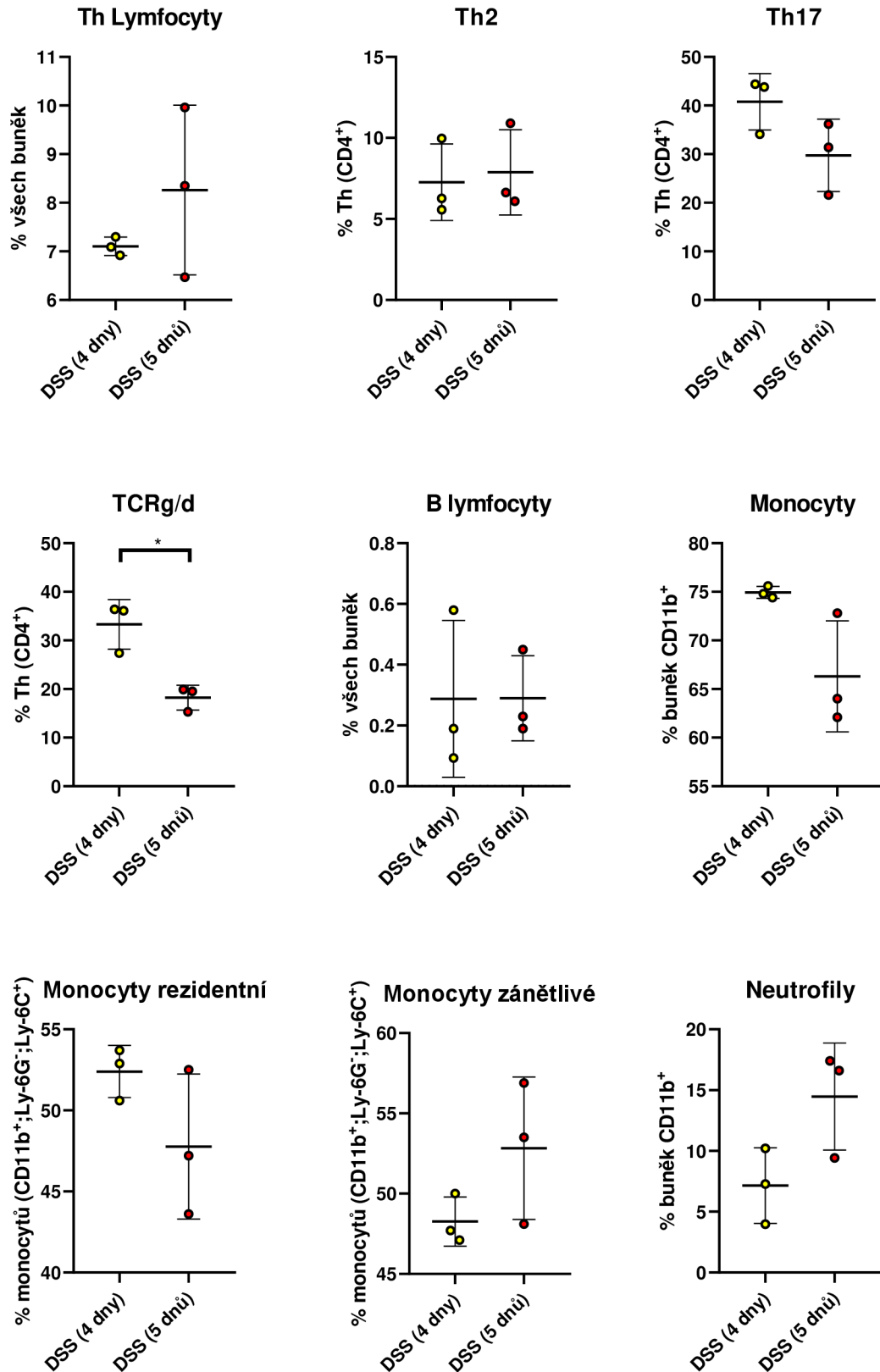
### 4.3.2 Vliv různé doby podávání DSS myším na zastoupení imunitních buněk

DSS jako iniciátor vzniku nespecifického zánětlivého onemocnění střev narušením epitelové mechanické bariéry, byl myším modelům podáván perorálně ve formě 5% (w/v) roztoku v pitné vodě. Myší modely (BALB/c) byly potravě s DSS vystaveny po dobu 4 a 5 dnů. Vzorky od těchto skupin, každá tvořena 3 modely, byly mezi sebou porovnávány.

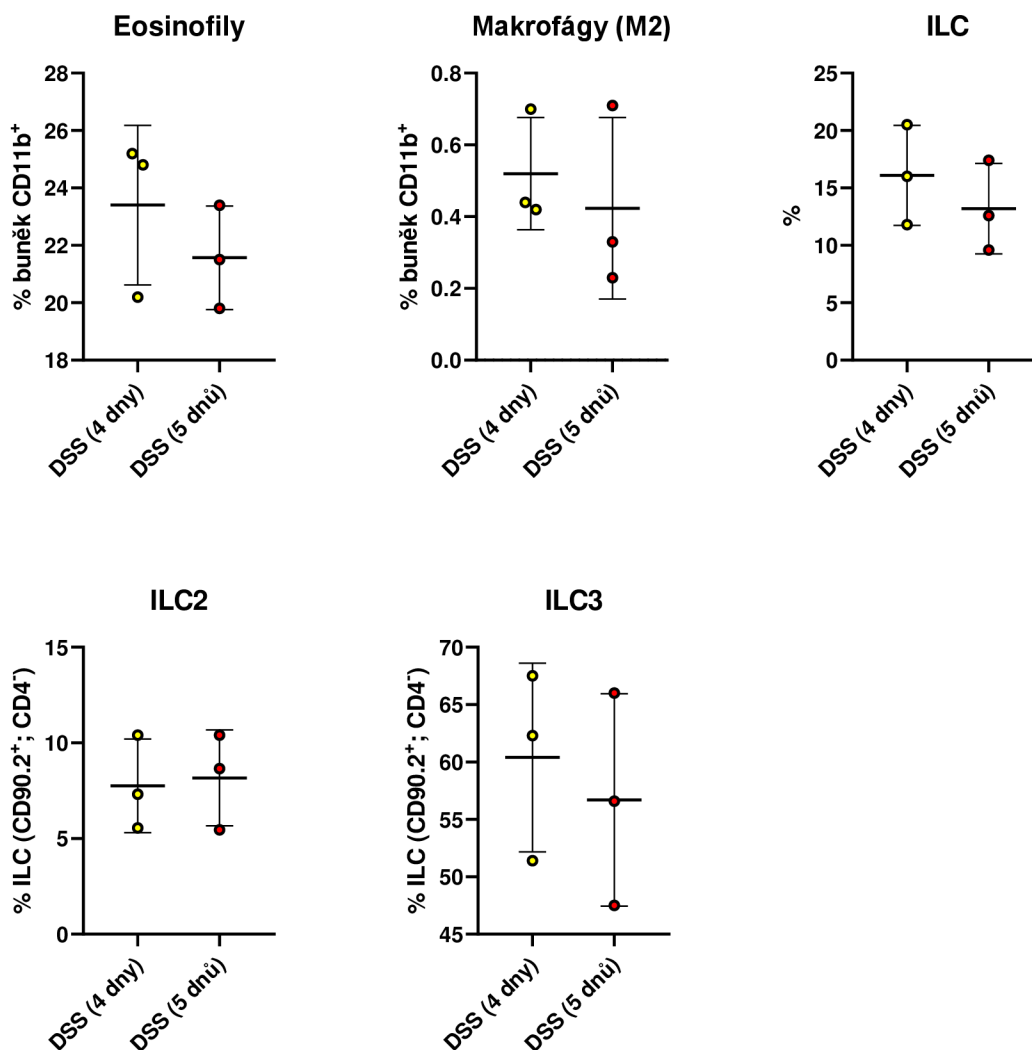
Získaná data byla opět vyhodnocena v softwaru FlowJo za vytvoření strategie selekce (Obr. 24), následně převedena přes Microsoft Excell a porovnána t–testem v softwaru GraphPad (Obr. 25).



Obr. 24: Strategie selekce imunitních buněk lamina propria tlustého střeva myších modelů krmených DSS.



Obr. 25: Porovnání izolovaných imunitních buněčných populací mezi vzorky myši kmených DSS po různě dlouhou dobu.



Obr. 25: Srovnání izolovaných imunitních buněčných populací mezi vzorky myši krměných DSS po různě dlouhou dobu (*pokračování*).

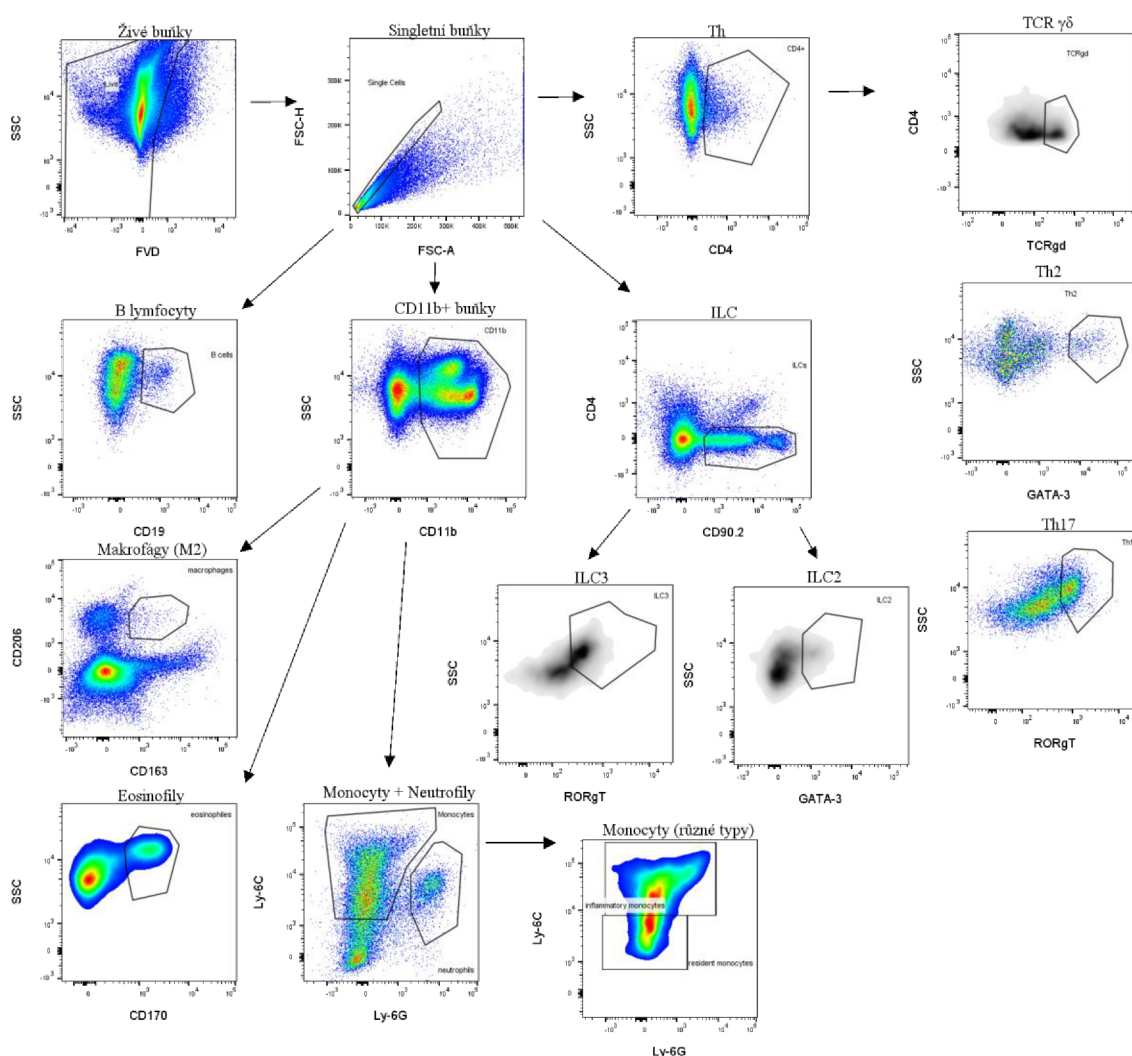
Signifikantní rozdíl v zastoupení různých buněčných populací *lamina propria* tlustého třeba u vzorků z myších modelů vystavených potravě s DSS po různě dlouhou dobu byl zaznamenán pouze u subpopulace Th lymfocytů TCR $\gamma\delta$ . V tomto případě vedla delší doba expozice potravě s DSS ke snížení procentuálního zastoupení této buněčné populace. Tento výsledek je v souladu s faktem, že populace Th lymfocytů TCR $\gamma\delta$  je právě ve stěvně sliznici ve vysoké koncentraci oproti jiným tkáním jako součást epitelu (patří mezi tzv. intraepitelové lymfocyty). Při destrukci sliznice působením DSS s následným rozvojem zánětu je předpoklad, že se tato populace bude snižovat. U všech ostatních sledovaných buněčných populací signifikantní rozdíl pozorován nebyl. Zvolená doba 4 a 5 dnů tedy nemá na eskalaci střevního zánětu výrazný vliv.



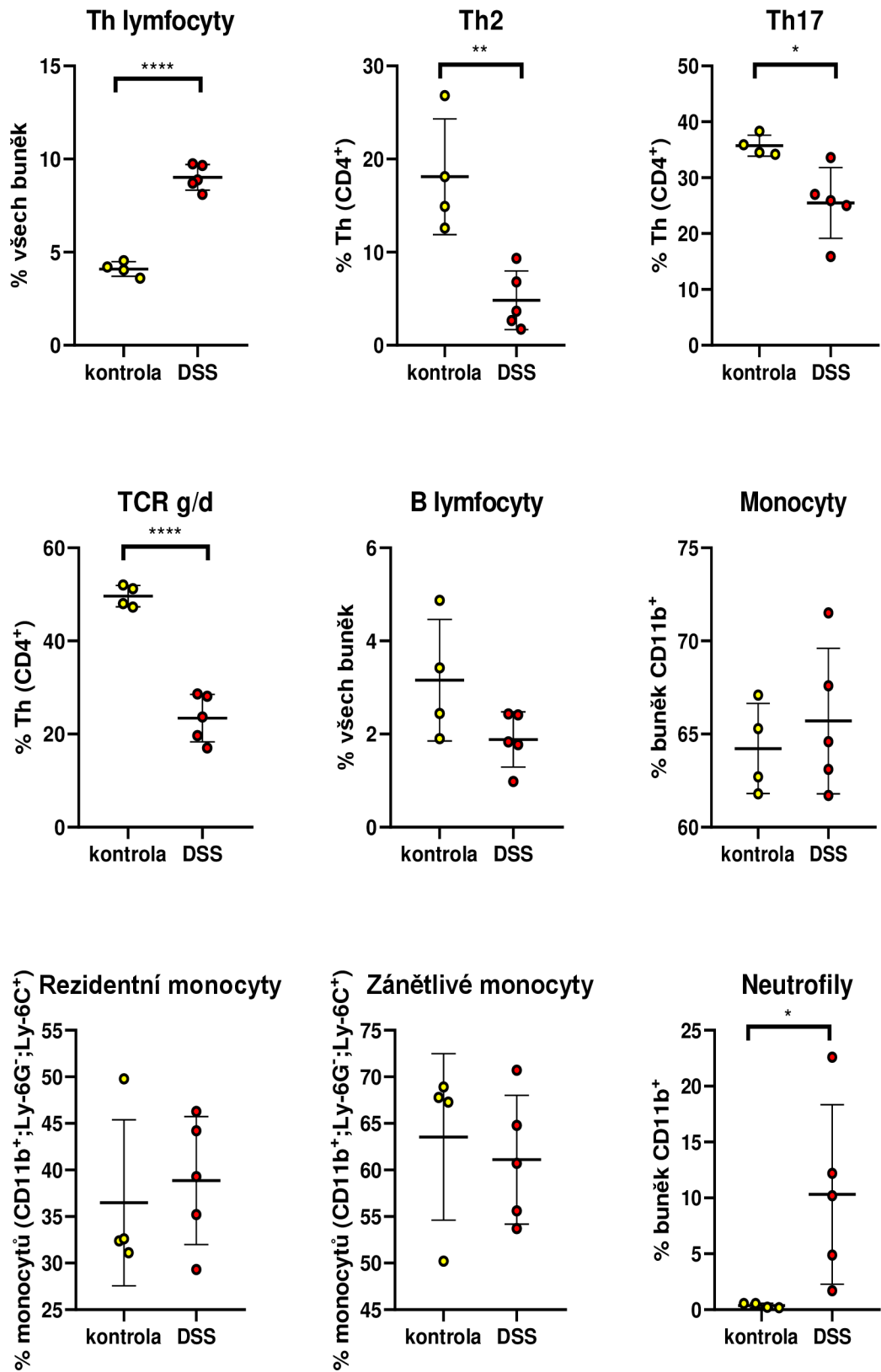
### 4.3.3 Srovnání imunitních buněčných populací v *lamina propria* tlustého střeva mezi myšmi modely se střevním zánětem a zdravými kontrolami

Experiment porovnává imunitní buněčné populace mezi 2 skupinami vzorků. První skupinu představovaly 4 zdravé kontroly, tedy myši nevystavované potravě s DSS. Druhou skupinou pak bylo 5 myších modelů, které byly vystaveny potravě s DSS (5% w/v roztok v pitné vodě) po dobu 4 dnů. Použité myši modely byly kmene C57BL/6.

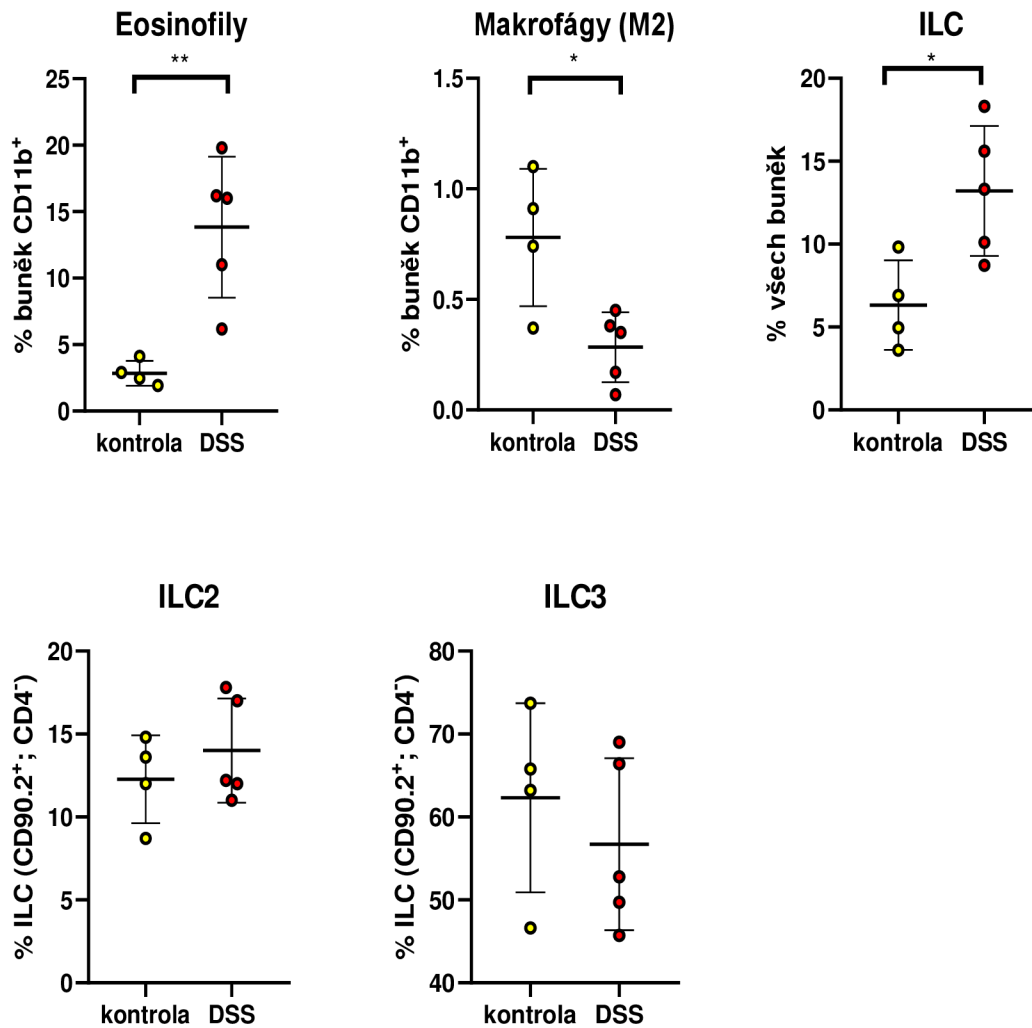
Obdobným způsobem jako u předešlých experimentů byla získaná data vyhodnocena v softwaru FlowJo za vytvoření strategie selekce (Obr. 26), následně převedena přes Microsoft Excell a porovnána t–testem v softwaru GraphPad (Obr. 27).



Obr. 26: Strategie selekce imunitních buněk *lamina propria* tlustého střeva myších modelů krměných DSS/zdravých kontrol.



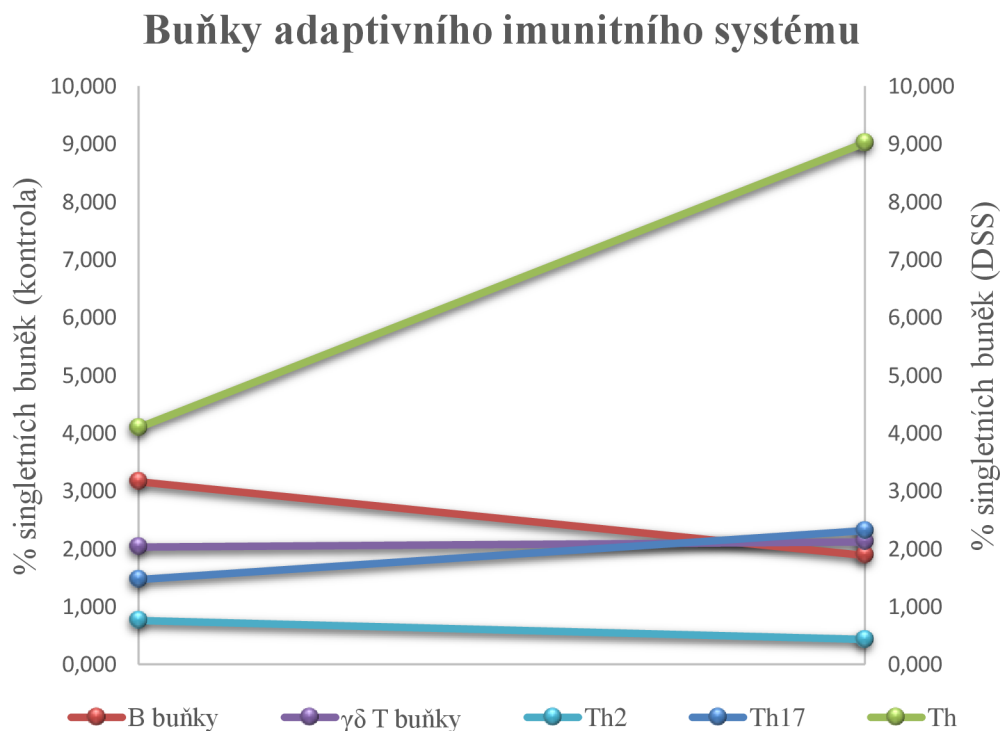
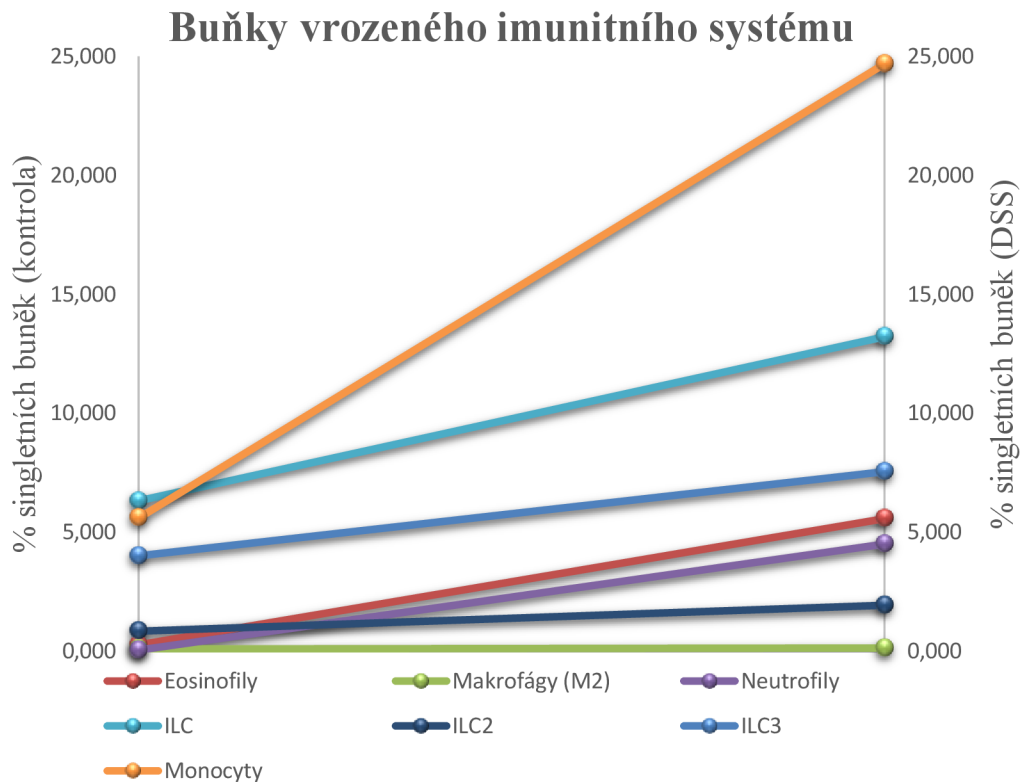
Obr. 27: Srovnání izolovaných imunitních buněčných populací mezi vzorky zdravých kontrol a myších modelů krměných DSS.



Obr. 27: Srovnání izolovaných imunitních buněčných populací mezi vzorky zdravých kontrol a myších modelů krměných DSS (*pokračování*).

V experimentu byla zaznamenána signifikantní změna u všech sledovaných buněčných populací, mimo populace B lymfocytů, monocytů (včetně subtypů) a subpopulací ILC2 a ILC3. V případě populace Th lymfocytů jako celku dochází k jejich nárůstu při zánětlivém procesu, avšak všechny sledované subpopulace (Th2, Th17 i TCR $\gamma\delta$ ) naopak klesají. To odkazuje na předpokládaný nárůst subpopulace Th1. Signifikantní pokles při zánětlivém stavu byl zaznamenán u subpopulace makrofágů typu M2, což je v souladu s obdobným snížením subpopulace Th2, které aktivují. Nárůst byl detekován u subpopulací neutrofilů, eozinofilů a ILC.

Ze získaných dat bylo vytvořeno grafické znázornění narůstající či klesající tendence hledaných buněčných populací při střevním zánětu (Obr. 28). Oba grafy byly vytvořeny na základě průměrných hodnot zastoupení jednotlivých populací ve vzorcích zdravých

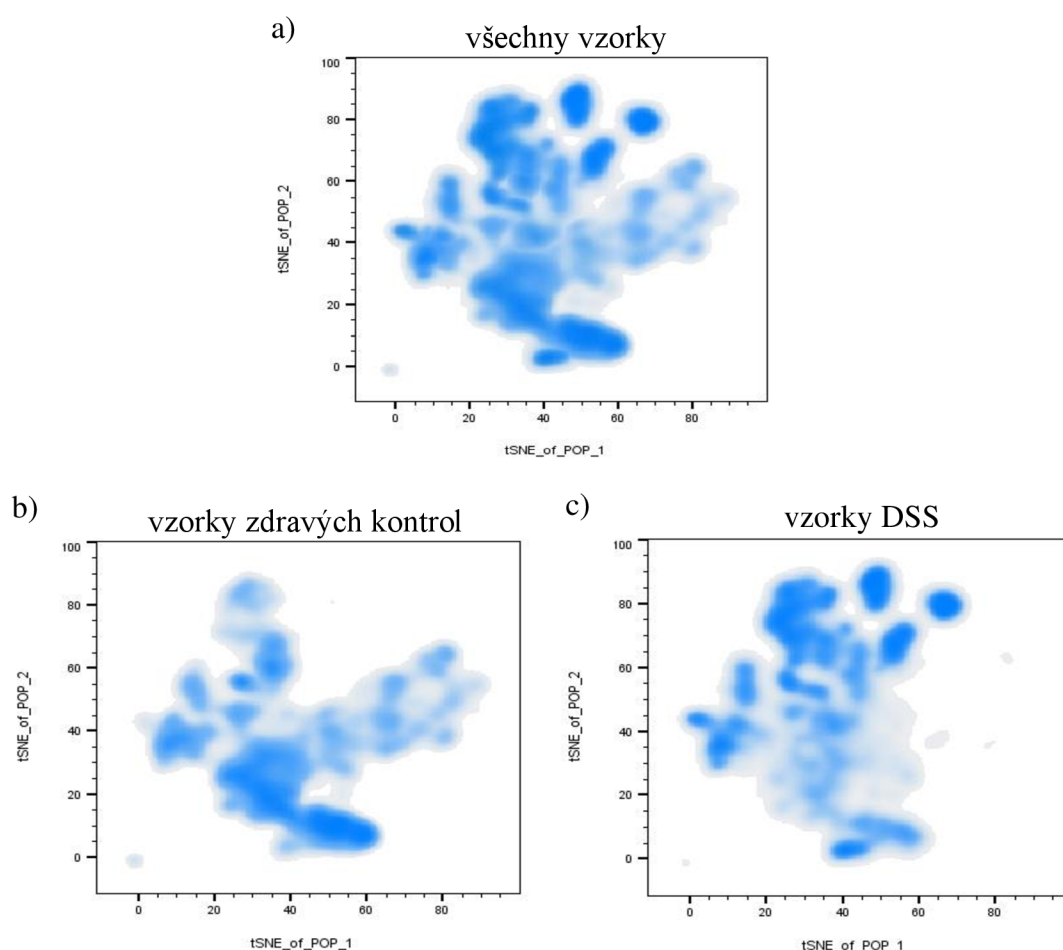


Obr. 28: Změny imunitních buněčných populací *lamina propria* myšního tlustého střeva při zánětu.

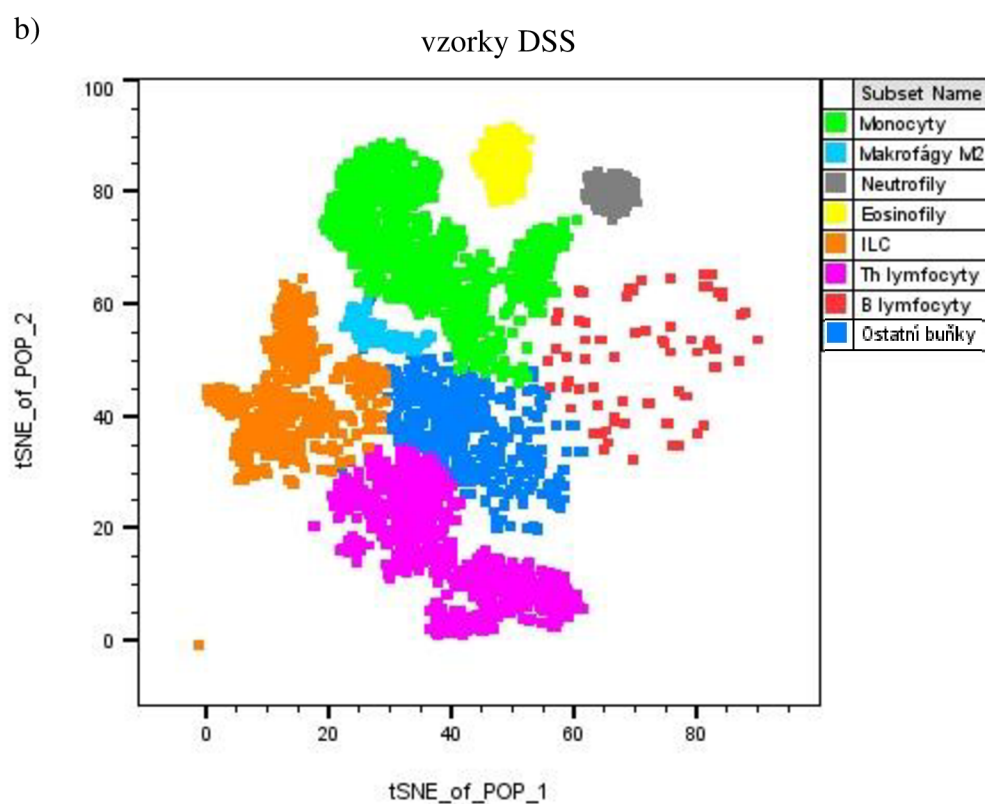
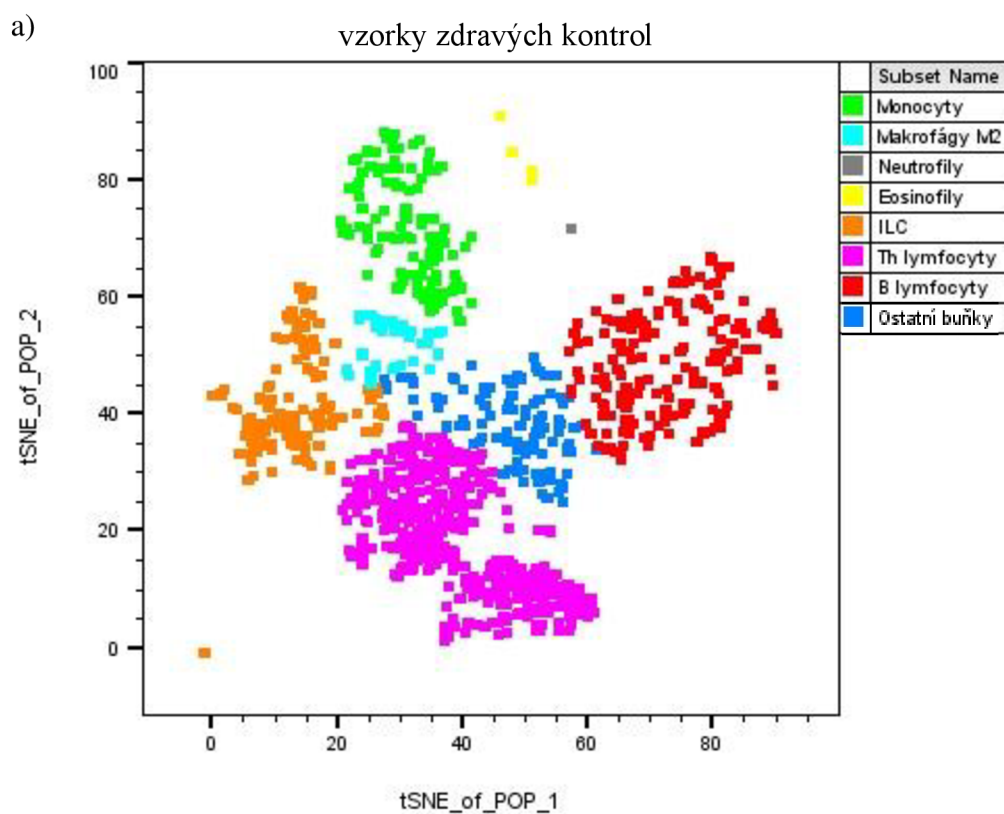
kontrol a vzorcích myších modelů krmených DSS. Na grafech je viditelný zejména nárůst populací vrozeného imunitního systému, odkazující na rychlou reakci, kterou vrozený imunitní systém zajišťuje. Adaptivní imunitní systém naproti tomu reaguje na indukci

zánětu výrazně pomaleji, neboť detekovaná změna populací jeho buněčných zástupců není tak výrazná.

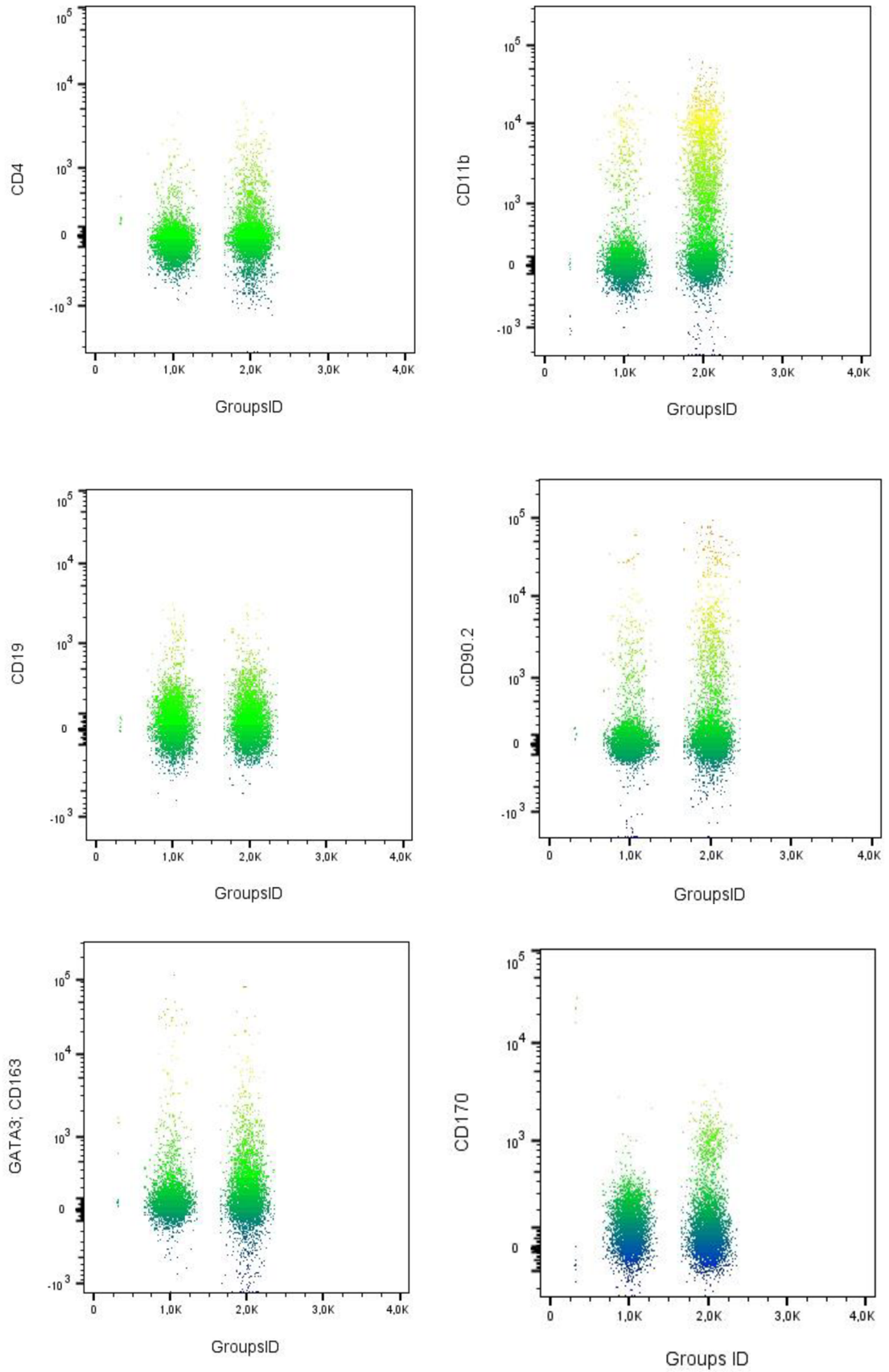
Naměřená data byla také vynesena do 2D grafu t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) pomocí programu FlowJo. Za využití této statistické metody je každé události (v tomto případě jde o buňky) nelineární redukcí rozměrů přiřazena poloha ve dvourozměrné mapě. Byla takto vytvořena „denzitní mapa“ zachycující data ze všech vzájemně proložených (zkonkatenovaných) vzorků (vzorky zdravých kontrol i myších modelů krmených potravou s obsahem DSS) jako vzájemně si různě příbuzné buněčné populace (Obr. 29). Vyznačením jednotlivých imunitních buněčných populací bylo možné proti sobě vynést 2 grafy t-SNE zobrazující nárůst či pokles daných buněčných populací v obou skupinách vzorků (Obr. 30). Obr. 31 pak zobrazuje intenzitu exprese jednotlivých buněčných markerů u obou skupin zkonkatenovaných vzorků ve formě „teplotní mapy“.



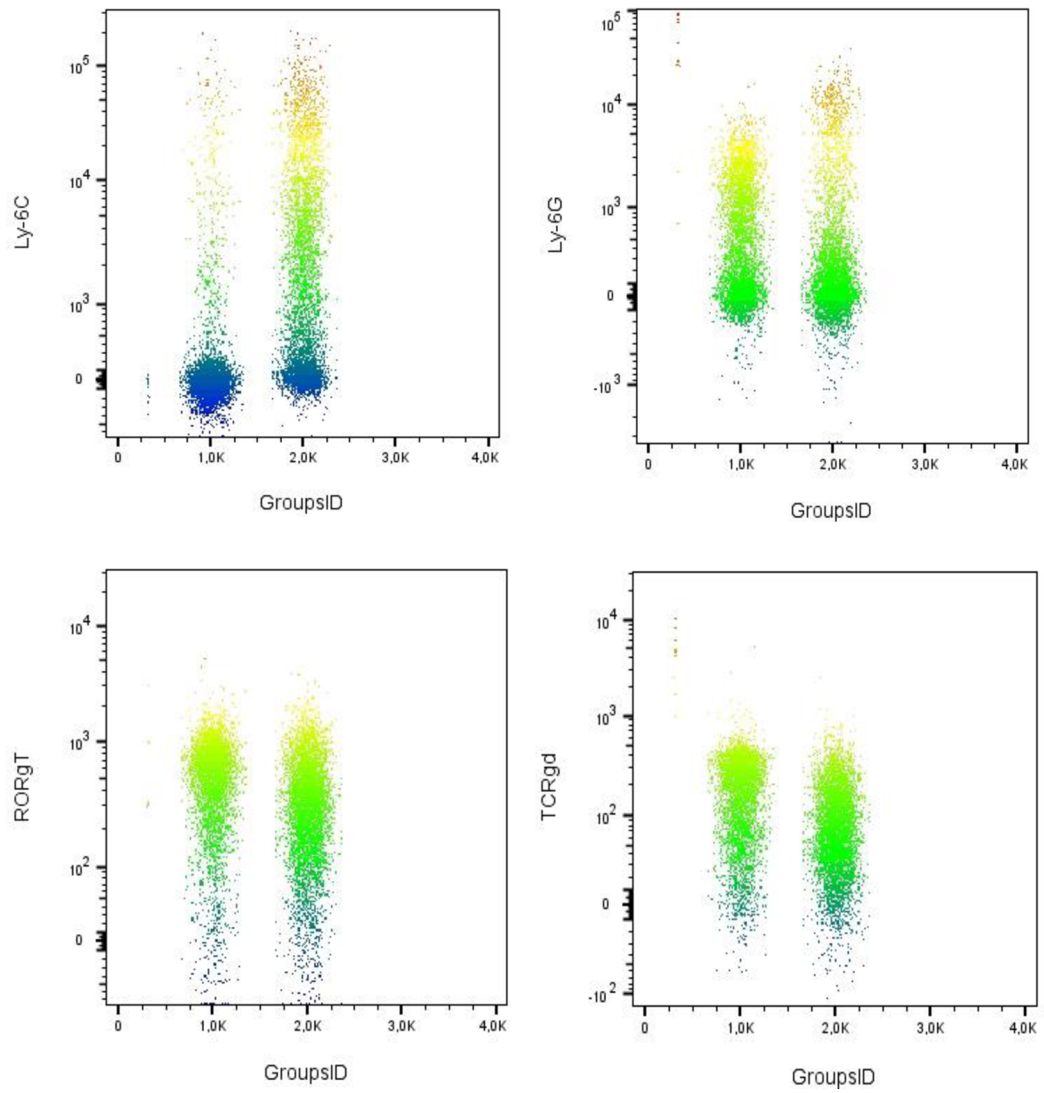
Obr. 29: Graf t-SNE zkonkatenovaných imunitních buněčných populací izolovaných ze vzorků *lamina propria* tlustého střeva zdravých kontrol i myších modelů krmených DSS (a). Znáznorněno je i vynesení pouze pro vzorky zdravých kontrol (b) a vzorky myších modelů krmených DSS (c).



Obr. 30: Graf t-SNE s vyznačením imunitních buněčných populací pro: a) zkoncatenované vzorky zdravých kontrol, b) zkoncatenované vzorky myších modelů krměných DSS.



Obr. 31: Intenzita exprese jednotlivých buněčných markerů mezi oběma skupinami konkatenovaných vzorků: skupina 1 je tvořena vzorky zdravých kontrol a skupina 2 vzorky myších modelů krměných DSS (osa x).



Obr. 31: Intenzita exprese jednotlivých buněčných markerů mezi oběma skupinami konkatenovaných vzorků (osa x): skupina 1 je tvořena vzorky zdravých kontrol a skupina 2 vzorky myšič modelů krmených DSS (*pokračování*).



## 5 DISKUSE

Nespecifické střevní záněty jsou v současné době intenzivně studovanou skupinou autoimunitních chorob, které v horším případě mohou vést až k chirurgickým zákrokům s resekcí částí střev, avšak s vysokým rizikem recidivy i po úspěšné operaci. Původ autoagresivity imunitního systému není spolehlivě vysvětlen a vysoké procento pacientů na aktuální medikamentózní léčbu adekvátně neodpovídá. Pro zajištění obranyschopnosti je naprosto klíčové správné fungování střevní slizniční imunity spolu se všemi sliznici ochraňujícími obrannými valy. Pro patogenezi onemocnění je zásadní selhání některé z těchto obranných složek, jakož i „chování“ jednotlivých buněčných typů (Rubbert-Roth & Finckh, 2009). V této oblasti byla provedena řada dřívějších studií na různých zvířecích i humánních vzorcích.

Experimentální část předložené práce poskytla data o spektru složení imunitních buněčných populací v periferní krvi a zejména *lamina propria* sliznice tlustého střeva jako zásadní oblasti lokalizace imunitních buněk nastolující obranyschopnost u myších modelů. Při vystavení myších modelů potravě s DSS po dobu 4 dnů dochází k iniciaci zánětu, což je patrné z rychlé odezvy a narůstající tendence buněk vrozeného imunitního systému, zatímco adaptivní systém reaguje pomaleji.

Při experimentech srovnávajících zastoupení imunitních buněčných populací mezi periferní krví a *lamina propria* tlustého střeva a v *lamina propria* tlustého střeva po různé době podání potravy s DSS byly využity myší modely kmene BALB/c samčího pohlaví, zatímco v experimentu srovnávajícím zastoupení imunitních buněčných populací v *lamina propria* tlustého střeva mezi myšími modely krmenými potravou s obsahem DSS a zdravými kontrolami byly využity myší modely kmene C57BL/6 pohlaví samičího. Oba kmeny se liší, i v rámci pohlaví, některými fenotypovými charakteristikami jako např. délka střeva, ale i drobnými strukturními odlišnostmi některých imunitních molekul. Odlišný kmen a pohlaví použitých myších modelů je pak příčinnou některých rozdílných výsledků mezi jednotlivými experimenty. Odlišné modely byly užity z důvodu návaznosti dalších experimentů jiných vědeckých skupin, které však nejsou předmětem této práce.

Srovnání velikosti imunitních buněčných populací mezi periferní krví a sliznicí tlustého střeva přineslo ucelenou představu o složení, resp. preferenci lokality výskytu jednotlivých sledovaných buněčných typů. Tyto výsledky byly vhodně doplněny fenotypovou charakteristikou osvědčenými postupy vizualizace buněk pro

mikroskopické pozorování ve světelném i fluorescenčním módu. V principu podobná studie z roku 2014 provedená u humánních vzorků naznačuje podobné výsledky v poměrném zastoupení populací daných buněčných typů (Globig *et al.*, 2014).

Všechny sledované populace buněk vrozeného imunitního systému mají obecně zvyšující se tendenci, až na makrofágy subtypu M2, které disponují protizánětlivými funkcemi a během iniciace zánětu se jejich populace snižuje. To je v souladu se snižující se populací Th2, neboť makrofágy subtypu M2 produkcí specifických cytokinů Th2 aktivují (Vergadi *et al.*, 2017). Retrospektivní studie archivovaných vzorků střevní slizniční biopsie pacientů s nespecifickým střevním zánětem potvrzuje nárůst populace eozinofilů. Podle studie navíc existuje souvislost mezi eozinofily a neutrofilů, kdy poznatkem je, že pacienti, jež měli zánět s převahou eozinofilů oproti neutrofilům, vykazovali lepší odpověď na léčbu (Alhmoud *et al.*, 2020). V uskutečněném experimentu byla u myších modelů zaznamenána lehká převaha eozinofilů. Pozoruhodné je i postavení neutrofilů, které jsou do místa poškozené tkáně rekrutovány jako jedny z prvních buněk. Jejich příspěvek v patogenezi nespecifických střevních zánětů zůstává neobjasněn a pravděpodobně se liší i mezi Crohnovou chorobou a Ulcerózní kolitidou (Fourrier & Parkos, 2012), kdy při Ulcerózní kolitidě byla zaznamenána zvýšená aktivace neutrofilů (Sedghi *et al.*, 1993), která však nebyla potvrzena u Crohnovy choroby (Comalada M. & Peppelenbosch, 2006). Řada studií provedených na zvířecích modelech je navíc v rozporu. Na potkanech byl delecí neutrofilů pomocí anti-neutrofilních protilátek prokázán zmírňující účinek na zánět (Buell & Berin, 1994; Natsui *et al.*, 1997), zatímco další studie poukazují na prospěšnou roli neutrofilů, kdy po jejich vyčerpání došlo u myši k exacerbaci zánětu (Kuhl *et al.*, 2007; Zang *et al.*, 2011). Někteří vědci předpokládají, že pacienti mající predispozice k obecně zvýšené aktivitě vrozeného imunitního systému jsou náchylnější i k získání střevního zánětlivého onemocnění, zatímco jiní se domnívají, že hlavní příčinou takových onemocnění může být právě nedostatečná odpověď vrozeného imunitního systému (Smith *et al.*, 2009; Vazeille *et al.*, 2015). Má se za to, že funkce neutrofilů je také úzce propojena s monocyty, popř. makrofágy, které spolu s dendritickými buňkami řídí infiltraci neutrofilů do zanícené tkáně (Qualls *et al.*, 2006). Ze získaných výsledků je patrné mnohonásobně vyšší zastoupení neutrofilů v periferní krvi oproti střevní tkáni spolu s nárůstem neutrofilních populací v *lamina propria* tlustého střeva během zánětu. Dualismus působení neutrofilů během nespecifických střevních zánětů z nich činí atraktivní cíl pro další zkoumání.

Předpokládá se, že i ILC mohou hrát roli při patogenezi nespecifických střevních zánětů. Ve sliznici tlustého střeva byla detekována zejména subpopulace ILC3 oproti subpopulaci ILC2, která byla lokalizována spíše v periferní krvi. Ve výzkumu zastoupení ILC u vzorků biopsie střevní sliznice od pacientů s nespecifickým střevním zánětem byl prokázán pokles subpopulace ILC3, naopak nárůst subpopulací ILC1 a ILC2 (Forkel *et al.*, 2019). Tyto závěry následují i získaná data z experimentu na myším modelu, kdy z průměru hodnot můžeme usuzovat klesající tendenci u subpopulace ILC3 a narůstající tendenci u subpopulací ILC2 a ILC1. Frekvence subpopulace ILC1, byť nebyla sledována, je s jistou mírou nepřesnosti matematicky odvoditelná.

Získaná data potvrzují, že obranná reakce je směřována k typu Th1, která je pro autoimunitní onemocnění, kde můžeme nespecifické střevní záněty zařadit, typická. To je dáno tím, že obecně nejzastoupenější subpopulace Th, tedy Th1 a Th2 jsou udržovány v určitém poměru a při zánětlivém procesu se jedna z populací výrazně zvyšuje na úkor druhé. V experimentu byl zaznamenán pokles sledované populace Th2, což odkazuje na evidentní nárůst subpopulace Th1. Zajímavé je i postavení subpopulace Th17. Podle Kobayashi *et al.* (2008) je poměr Th17/Th1 u humánních vzorků s Crohnovou chorobou asi 0,57; což je přibližně v souladu se získanými daty u myších modelů, i když poměr Th17/Th1 (asi 0,4) je nižší. Kugathasan *et al.* (2007) ve studii provedené na vzorcích ze střevní biopsie dětí s ranou a dlouhodobou Crohnovou chorobou poukazuje na diferenciaci naivních Th do subpopulace Th1 prostřednictvím signalizace IL-12 v časném období rozvoje Crohnovy choroby, zatímco v pozdních stádiích již tato polarizace Th na Th1 podporována není. To může poukazovat na možnost či potřebu delšího vystavení myších modelů potravě s DSS v proběhlém experimentu než zvolené 4 dny. Sledována byla i Th subpopulace TCR $\gamma\delta$ , která je v cirkulující krvi ve velmi nízkém zastoupení. Naproti tomu ve střevní sliznici je zastoupená hojně, kdy může tvořit až 40 % intraepitelových lymfocytů, a ačkoliv jde o lymfocytární buňky, je součástí první linie obrany při střevním zánětu (Catalan-Serra *et al.*, 2017). S tím pravděpodobně souvisí i zjištěný pokles jejich populace během rané fáze zánětu, protože z aktuálních poznatků je zřejmá protizánětlivá a proreparační funkce TCR $\gamma\delta$  Th lymfocytů. Na myších modelech byla prokázána ochrana před střevním zánětem TCR $\gamma\delta$  Th lymfocyty stimulací reparačních mechanismů pomocí exprese keratinového růstového faktoru (Chen *et al.*, 2002), spoluúčast na řízení infiltrace postižené tkáně neutrofily (Kuhl *et al.*, 2002) a zvýšení závažnosti, dokonce i úmrtnosti, delecí TCR $\gamma\delta$  Th lymfocytů pomocí monoklonálních protilátek (Hoffmann *et al.*, 2001).

Experimentálně zjištěná data předložené práce jsou vhodným doplněním komplexních výsledků při studiu nespecifických střevních zánětů. Poukazují na trendy změn populací významných imunitních buněk v tlustém střevě při vyvolání střevního zánětu u myších modelů. Data naznačují, že v případě vyvolání zánětu pomocí DSS, který je myším podáván po dobu 4 dnů, jde o relativně časnou fázi vznikajícího onemocnění. Pro další výzkum by bylo zajímavé myši modely vystavit potravě s DSS po delší dobu a získat tak údaje o složení buněčných populací z pozdějších fází nemoci. Výsledky jsou však nepochybným přínosem, využitelné při výzkumu vývoje a nových terapeutických přístupů při léčbě a snížení morbidit u nespecifických střevních zánětů.

## 6 ZÁVĚR

Předmětem zájmu práce byla problematika slizniční imunity vztažená zejména na „efektorovou část“ trávicí trubice, a sice střevo. Teoretická část popsala fenotypovou a především funkční stránku základních typů buněk vrozeného i adaptivního imunitního systému. Pozornost byla věnována principu spolupráce a komunikace buněk při zajištění obranných mechanismů proti a v zánětu, jakož i jejich důmyslné rozmístění ve střevní slizniční vrstvě *lamina propria* do histologicky a mnohdy až anatomicky definovaných struktur. Současně byl vytvořen anatomický a histologický popis střeva myši domácí, jako jednoho z hlavních zvířecích modelů pro studium imunitních dějů v organismu, v kontextu práce pak pro studium tzv. nespecifických střevních zánětů.

V rámci experimentální části byla provedena izolace a kvantifikace vybraných imunitních buněk z periferní krve a *lamina propria* tlustého střeva myších modelů. Vzorky byly získávány z myších modelů, u nichž byl střevní zánět vyvolán pomocí DSS, a ze zdravých kontrol. Srovnány byly výsledky zastoupení imunitních buněčných populací mezi periferní krví a střevní sliznicí, ve střevní sliznici při různě dlouhém vystavení myši potravě s DSS a mezi střevní sliznicí myši zdravých a myši vystavených potravě s DSS. Výsledky přináší údaje o lokalizaci a změnách v buněčných populacích při střevním zánětlivém onemocnění, což odkazuje na vzájemné propojení a funkce jednotlivých buněčných typů. Data byla doplněna fenotypovou charakterizací imunitních buněk mikroskopickým pozorováním po vizualizaci ověřenými postupy.

Získaná data mají potenciální využití při studiu nespecifických střevních zánětů jako je Crohnova choroba a Ulcerózní kolitida, kdy na aktuální léčbu vysoké procento pacientů neodpovídá a další výzkum v této oblasti je žádaný. Funkce jednotlivých buněk během střevního zánětu nejsou vždy zcela objasněny. Data naznačují, že i během samotného zánětu se tyto funkce jednotlivých buněk mohou měnit. Výsledky experimentální části práce přináší komplexní pohled na buněčné složení krevní a slizniční imunitní komponenty ve zdravé i zánětem postižené tkáni. Mnoho procesů a dějů však stále není objasněno a další výzkum v této oblasti je nezbytný pro pochopení patogeneze onemocnění, a tím směřovat nové možnosti léčby nespecifických střevních zánětů.

## 7 LITERATURA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Shiv Pillai. (2019). *Cellular and molecular immunology* (Nineth edition). Elsevier Butterworth Heinemann.
- Abram, C. L., & Lowell, C. A. (2009). The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 339-362. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132554>
- Acharya, K. R., & Ackerman, S. J. (2014). Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17406-17415. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.546218>
- Akobeng, A. K., Zhang, D., Gordon, M., & MacDonald, J. K. (2016). Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of medically-induced remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(9), 1-21. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003715.pub3>
- Alberola-Ila, J., Hogquist, K. A., Swan, K. A., Bevan, M. J., & Perlmutter, R. M. (1996). Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *Journal of Experimental Medicine*, 184(1), 9-18. <https://doi.org/10.1084/jem.184.1.9>
- Alhmoud, T., Gremida, A., Colom Steele, D., Fallahi, I., Tuqan, W., Nandy, N., Ismail, M., Aburajab Altamimi, B., Xiong, M. -J., Kerwin, A., & Martin, D. (2020). Outcomes of inflammatory bowel disease in patients with eosinophil-predominant colonic inflammation. *BMJ Open Gastroenterology*, 7(1), e000373. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2020-000373>
- Allingham, M. J., van Buul, J. D., & Burridge, K. (2007). ICAM-1-Mediated, Src- and Pyk2-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation Is Required for Leukocyte Transendothelial Migration. *The Journal of Immunology*, 179(6), 4053-4064. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.4053>
- Arnon, T. I., Horton, R. M., Grigorova, I. L., & Cyster, J. G. (2013). Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature*, 493(7434), 684-688. <https://doi.org/10.1038/nature11738>
- Arredouani, M. S., Palecanda, A., Koziel, H., Huang, Y. -C., Imrich, A., Sulahian, T. H., Ning, Y. Y., Yang, Z., Pikkarainen, T., Sankala, M., Vargas, S. O., Takeya, M., Tryggvason, K., & Kobzik, L. (2005). MARCO Is the Major Binding Receptor for Unopsonized Particles and Bacteria on Human Alveolar Macrophages. *The Journal of Immunology*, 175(9), 6058-6064. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.6058>
- Artis, D., & Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517(7534), 293-301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>
- Assimakopoulos, S. F. (2011). Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2(6), 123-137. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v2.i6.123>
- Axelrad, J. E., Cadwell, K. H., Colombel, J. -F., & Shah, S. C. (2020). Systematic review: gastrointestinal infection and incident inflammatory bowel disease, 51(12), 1222-1232. <https://doi.org/10.1111/apt.15770>
- Bach, J. -F. (2005). Infections and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 25, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2005.09.024>
- Banerjee, S., Cui, H., Xie, N., Tan, Z., Yang, S., Icyuz, M., Thannickal, V. J., Abraham, E., & Liu, G. (2013). MiR-125a-5p Regulates Differential Activation of Macrophages and Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35428-35436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426866>
- Barr, T. A., Brown, S., Mastroeni, P., & Gray, D. (2010). TLR and B Cell Receptor Signals to B Cells Differentially Program Primary and Memory Th1 Responses to Salmonella enterica. *The Journal of Immunology*, 185(5), 2783-2789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001431>
- Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunological Reviews*, 247(1), 172-183. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01112.x>
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *The Lancet*, 380(9853), 1590-1605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9)

- BD Spectrum Viewer–BD Biosciences.* <https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/bd-spectrum-viewer> (10. 4. 2023).
- Bernstein, C. N., Wajda, A., Svenson, L. W., MacKenzie, A., Koehoorn, M., Jackson, M., Fedorak, R., Israel, D., & Blanchard, J. F. (2006). The Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in Canada: A Population-Based Study. *The American Journal of Gastroenterology*, *101*(7), 1559-1568. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00603.x>
- Bertrand, J. Y., Jalil, A., Klaine, M., Jung, S., Cumano, A., & Godin, I. (2005). Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood*, *106*(9), 3004-3011. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0461>
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., Perez-Perez, G., Blaser, M. J., & Relman, D. A. (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(3), 732-737. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506655103>
- BioLegend.* <https://www.biologend.com/> (8. 8. 2022).
- Bogdan, C., Paik, J., Vodovotz, Y., & Nathan, C. (1992). Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(32), 23301-23308. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50091-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50091-0)
- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Bastholm, L., Nielsen, M. H., & Bainton, D. F. (1993). Human neutrophil granules and secretory vesicles. *European Journal of Haematology*, *51*(4), 187-198. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1993.tb00629.x>
- Bowie, A., & O'Neill, L. A. J. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, *67*(4), 508-514. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.4.508>
- Brandtzaeg, P., Farstad, I. N., Johansen, F. -E., Morton, H. C., Norderhaug, I. N., Yamanaka, T., Brandtzaeg, P., Farstad, I. N., Johansen, F. -E., Morton, H. C., Norderhaug, I. N., & Yamanaka, T. (1999). The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunological Reviews*, *171*(1), 45-87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01342.x>
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., & Russell, M. W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunology*, *1*(1), 31-37. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.9>
- Brown, E. J. (1995). Phagocytosis. *BioEssays*, *17*(2), 109-117. <https://doi.org/10.1002/bies.950170206>
- Brown, G., Vilalta, A., & Fricker, M. (2015). Phagoptosis - Cell Death By Phagocytosis - Plays Central Roles in Physiology, Host Defense and Pathology. *Current Molecular Medicine*, *15*(9), 842-851. <https://doi.org/10.2174/156652401509151105130628>
- Buell, M. G., & Berin, M. C. (1994). Neutrophil-independence of the initiation of colonic injury. *Digestive Diseases and Sciences*, *39*(12), 2575-2588. <https://doi.org/10.1007/BF02087693>
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., & Griffiths, E. (1986). Role of Iron in Bacterial Infection. *Modern Aspects of Electrochemistry* *80*(1), 1-35. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-66956-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-66956-9_1)
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L. P., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., & S. P. (2014). Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, *17*(1), 131-143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
- Catalan-Serra, I., Sandvik, A. K., Bruland, T., & Andreu-Ballester, J. C. (2017). Gammadelta T Cells in Crohn's Disease: A New Player in the Disease Pathogenesis? *Journal of Crohn's and Colitis*, *11*(9), 1135-1145. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx039>
- Cebra, J. J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *69*(5), 1046s-1051s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1046s>
- Cellavision.* <https://www.cellavision.com/> (16. 8. 2022).
- Cerutti, A., Cols, M., & Puga, I. (2012). Activation of B cells by non-canonical helper signals. *EMBO reports*, *13*(9), 798-810. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.111>

- Cerutti, A., Cols, M., & Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), 118-132. <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., & Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature Immunology*, 8(5), 463-470. <https://doi.org/10.1038/ni1454>
- Collins, P. D., Marleau, S., Griffiths-Johnson, D. A., Jose, P. J., & Williams, T. J. (1995). Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 182(4), 1169-1174. <https://doi.org/10.1084/jem.182.4.1169>
- Comalada, M., & Peppelenbosch, M. P. (2006a). Impaired innate immunity in Crohn's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), 397-399. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.005>
- Cornes, J. S. (1965). Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. *Gut*, 6(3), 225-229. <https://doi.org/10.1136/gut.6.3.225>
- Coşkun, S., Chao, H., Vasavada, H., Heydari, K., Gonzales, N., Zhou, X., de Crombrugge, B., & Hirschi, K. K. (2014). Development of the Fetal Bone Marrow Niche and Regulation of HSC Quiescence and Homing Ability by Emerging Osteolineage Cells. *Cell Reports*, 9(2), 581-590. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.013>
- Covarrubias, A. J., Aksoylar, H. I., & Horng, T. (2015). Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. *Seminars in Immunology*, 27(4), 286-296. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.08.001>
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P., & Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221-1227. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>
- Cyster, J. G. (2005). CHEMOKINES, SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE, AND CELL MIGRATION IN SECONDARY LYMPHOID ORGANS. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 127-159. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115628>  
Dartmouth. <https://home.dartmouth.edu/> (16. 8. 2022).
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, 14(10), 986-995. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>
- Dedonder, S. E., Cheng, C., Willard, L. H., Boyle, D. L., Ganta, R. R., & Munderloh, U. G. (2012). Transmission Electron Microscopy Reveals Distinct Macrophage- and Tick Cell-Specific Morphological Stages of Ehrlichia chaffeensis. *PLoS ONE*, 7(5), e36749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036749>
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., Relman, D. A., & Eisen, J. A. (2008). The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biology*, 6(11), e280. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280>
- Domachowske, J. B., Dyer, K. D., Adams, A. G., Leto, T. L., & Rosenberg, H. F. (1998). Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Research*, 26(14), 3358-3363. <https://doi.org/10.1093/nar/26.14.3358>
- Donaldson, D. S., Bradford, B. M., Artis, D., & Mabbott, N. A. (2015). Reciprocal regulation of lymphoid tissue development in the large intestine by IL-25 and IL-23. *Mucosal Immunology*, 8(3), 582-595. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.90>
- Du, J., Stankiewicz, M. J., Liu, Y., Xi, Q., Schmitz, J. E., Lekstrom-Himes, J. A., & Ackerman, S. J. (2002). Novel Combinatorial Interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBPε Isoforms Regulate Transcription of the Gene Encoding Eosinophil Granule Major Basic Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 43481-43494. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204777200>
- Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H., & Desjardins, M. (2000). Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Cell Science*, 113(19), 3531-3541. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.19.3531>



- El Kebir, D., & Filep, J. (2013). Targeting Neutrophil Apoptosis for Enhancing the Resolution of Inflammation. *Cells*, 2(2), 330–348. <https://doi.org/10.3390/cells2020330>
- Eloe-Fadrosh, E. A., & Rasko, D. A. (2013). The Human Microbiome: From Symbiosis to Pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 64(1), 145-163. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-010312-133513>
- Farstad, I. N., Halstensen, T. S., Fausa, O., Brandtzaeg, P. (1994): Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. *Immunology* 83, 457-464. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1415048/pdf/immunology00077-0131.pdf>
- Faurschou, M., & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5(14), 1317-1327. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.008>
- Fenton, T. M., Jørgensen, P. B., Niss, K., Rubin, S. J. S., Mörbe, U. M., Riis, L. B., Da Silva, C., Plumb, A., Vandamme, J., Jakobsen, H. L., Brunak, S., Habtezion, A., Nielsen, O. H., Johansson-Lindbom, B., & Agace, W. W. (2020). Immune Profiling of Human Gut-Associated Lymphoid Tissue Identifies a Role for Isolated Lymphoid Follicles in Priming of Region-Specific Immunity. *Immunity*, 52(3), 557-570.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.001>
- Figura, N., & Tabaqchali, S. (1996). Bacterial pathogenic factors. *Current Opinion in Gastroenterology*, 12(1), 11–15. <https://doi.org/10.1097/00001574-199601001-00003>
- Flannagan, R. S., Harrison, R. E., Yip, C. M., Jaqaman, K., & Grinstein, S. (2010). Dynamic macrophage “probing” is required for the efficient capture of phagocytic targets. *Journal of Cell Biology*, 191(6), 1205-1218. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007056>
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 61-98. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Forkel, M., van Tol, S., Höög, C., Michaëlsson, J., Almer, S., & Mjösberg, J. (2019). Distinct Alterations in the Composition of Mucosal Innate Lymphoid Cells in Newly Diagnosed and Established Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 13(1), 67-78. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy119>
- Fort, M. M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S. M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B., Lesley, R., Muchamuel, T., Hurst, S. D., Zurawski, G., Leach, M. W., Gorman, D. M., & Rennick, D. M. (2001). IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-Associated Pathologies In Vivo. *Immunity*, 15(6), 985-995. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00243-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00243-6)
- Fournier, B. M., & Parkos, C. A. (2012). The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunology*, 5(4), 354-366. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.24>
- Frame, J. M., McGrath, K. E., Fegan, K. H., & Palis, J. (2014). EMP Emergence from Hemogenic Endothelium in the Mammalian Yolk Sac Is Independent of Flow and Arterial Identity, but Is Regulated By Canonical Wnt Signaling. *Blood*, 124(21), 768-768. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.768.768>
- Fumikazu, K., Uchimoto, K., Fujii, H., Hamada, H., Ohashi, K., Nomi, T., Nakagawa, T., Nakamura, S., Ueda, T., & Nakajima, Y. (2014). Adenovirus-Mediated Bcl-XI Gene Therapy Combined with Pronase Treatment Protects the Small Intestine from Radiation-Induced Enteritis in Mouse Model. *Journal of Genetic Syndromes & Gene therapy*, 5(5), 239-247. <https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000239>
- Gardner, D., Jeffery, L. E., & Sansom, D. M. (2014). Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) Pathway and Its Implications for Costimulatory Blockade. *American Journal of Transplantation*, 14(9), 1985-1991. <https://doi.org/10.1111/ajt.12834>
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., & Simon, H. -U. (2013). Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in Immunology*, 34(8), 398-409. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.002>
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology*, 2(5), 309-322. <https://doi.org/10.1038/nri798>
- Ghoshal, N. G., & Bal, H. S. (1989). Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. *Laboratory Animals*, 23(1), 21-29. <https://doi.org/10.1258/002367789780886911>

- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*, *312*(5778), 1355-1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, *330*(6005), 841-845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Gleich, G. J., & Loegering, D. A. (1984). Immunobiology of Eosinophils. *Annual Review of Immunology*, *2*(1), 429-459. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.02.040184.002241>
- Globig, A.-M., Hennecke, N., Martin, B., Seidl, M., Ruf, G., Hasselblatt, P., Thimme, R., & Bengsch, B. (2014). Comprehensive Intestinal T Helper Cell Profiling Reveals Specific Accumulation of IFN- $\gamma$ +IL-17+Coproducing CD4+ T Cells in Active Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *20*(12), 2321-2329. <https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000210>
- Goasguen, J. E., Bennett, J. M., Bain, B. J., Vallespi, T., Brunning, R., & Mufti, G. J. (2009). Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica*, *94*(7), 994-997. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.005421>
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., & Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *The Journal of Immunology*, *150*(10), 4244-4252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.150.10.4244>
- Gordon, S. (2007). The macrophage: Past, present and future. *European Journal of Immunology*, *37*(S1), S9-S17. <https://doi.org/10.1002/eji.200737638>
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, *44*(3), 463-475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>
- Gosens, I., Kermanizadeh, A., Jacobsen, N. R., Lenz, A. -G., Bokkers, B., de Jong, W. H., Krystek, P., Tran, L., Stone, V., Wallin, H., Stoeger, T., Cassee, F. R., & Ryffel, B. (2015). Comparative Hazard Identification by a Single Dose Lung Exposure of Zinc Oxide and Silver Nanomaterials in Mice. *PLOS ONE*, *10*(5), e0126934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126934>
- Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I. I., Lamichhane, A., Takeyama, N., Kamioka, M., Sakamoto, M., Matsuki, T., Setoyama, H., Imaoka, A., Uematsu, S., Akira, S., Domino, S. E., Kulig, P., Becher, B., Renaud, J. -C., Sasakawa, C., et al. (2014). Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science*, *345*(6202), ec254-ec254. <https://doi.org/10.1126/science.1254009>
- Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C. E., Schledzewski, K., & Goerdt, S. (2001). Alternatively Activated Macrophages Differentially Express Fibronectin and Its Splice Variants and the Extracellular Matrix Protein  $\beta$ IG-H3. *Scandinavian Journal of Immunology*, *53*(4), 386-392. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2001.00885.x>
- Griffin, D. O., Holodick, N. E., & Rothstein, T. L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> CD70<sup>-</sup>. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(1), 67-80. <https://doi.org/10.1084/jem.20101499>
- Häger, M., Cowland, J. B., & Borregaard, N. (2010). Neutrophil granules in health and disease. *Journal of Internal Medicine*, *268*(1), 25-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x>
- Herbert, D. B., Douglas, B., & Zullo, K. (2019). Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2): Type 2 Immunity and Helminth Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9), 2276-2289. <https://doi.org/10.3390/ijms20092276>
- Hoefel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F. F., See, P., Beaudin, A. E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E. C., Poidinger, M., Zolezzi, F., Larbi, A., Ng, L. G., Chan, J. K. Y., Greter, M., Becher, B., Samokhvalov, I. M., Merad, M., et al. (2015). C-Myb Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*, *42*(4), 665-678. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>

- Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11(1), 137-154. <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>
- Hoffmann, J. C. (2001). Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after gammadelta T cell depletion and no effect of alphabeta T cell depletion. *Gut*, 48(4), 489-495. <https://doi.org/10.1136/gut.48.4.489>
- Hughenoltz, F., & de Vos, W. M. (2018). Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(1), 149-160. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2693-8>
- Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W. L., & Boismenu, R. (2002). Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14338-14343. <https://doi.org/10.1073/pnas.212290499>
- Cheng, Y., Ma, Z., Kim, B. -H., Wu, W., Cayting, P., Boyle, A. P., Sundaram, V., Xing, X., Dogan, N., Li, J., Euskirchen, G., Lin, S., Lin, Y., Visel, A., Kawli, T., Yang, X., Patacsil, D., Keller, C. A., Giardine, B., et al. (2014). Principles of regulatory information conservation between mouse and human. *Nature*, 515(7527), 371-375. <https://doi.org/10.1038/nature13985>
- Cherrier, M., Sawa, S., & Eberl, G. (2012). Notch, Id2, and ROR $\gamma$ t sequentially orchestrate the fetal development of lymphoid tissue inducer cells. *Journal of Experimental Medicine*, 209(4), 729-740. <https://doi.org/10.1084/jem.20111594>
- Jackson-Jones, L. H., Duncan, S. M., Magalhaes, M. S., Campbell, S. M., Maizels, R. M., McSorley, H. J., Allen, J. E., & Bénézech, C. (2016). Fat-associated lymphoid clusters control local IgM secretion during pleural infection and lung inflammation. *Nature Communications*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/ncomms12651>
- Jankowski, A., Scott, C. C., & Grinstein, S. (2002). Determinants of the Phagosomal pH in Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6059-6066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110059200>
- Jewell, D. P., Sutherland, L. R., McDonald, J. W., & Feagan, B. G. (2010). Ulcerative Colitis. *Evidence-Based Gastroenterology and Hepatology*, 232-247. <https://doi.org/10.1002/9781444314403.ch12>
- Jewell, D. P., Sutherland, L. R., McDonald, J. W., & Feagan, B. G. (2010). *Evidence-based gastroenterology and hepatology* (Third edition). John Wiley & Sons.
- Jia, L., & Wu, C. (2014). The Biology and Functions of Th22 Cells. *T Helper Cell Differentiation and Their Function*, 841(1), 209-230. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9487-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9487-9_8)
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V. M., & Neefjes, J. (2007). Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor  $\beta$ III spectrin. *Journal of Cell Biology*, 176(4), 459-471. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606077>
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Wurbel, M. -A., Malissen, B., Márquez, G., & Agace, W. (2003). Selective Generation of Gut Tropic T Cells in Gut-associated Lymphoid Tissue (GALT). *Journal of Experimental Medicine*, 198(6), 963-969. <https://doi.org/10.1084/jem.20031244>
- Johnson, S. A., Pleiman, C. M., Pao, L., Schneringer, J., Hippen, K., & Cambier, J. C. (1995). Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *The Journal of Immunology*, 155(10), 4596-4603. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.155.10.4596>
- Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., Mørbe, U. M., Riis, L. B., Jakobsen, H. L., Nielsen, O. H., & Agace, W. W. (2021). Identification, isolation and analysis of human gut-associated lymphoid tissues. *Nature Protocols*, 16(4), 2051-2067. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00482-1>
- Kalman, L., Lindgren, M. L., Kobrynski, L., Vogt, R., Hannon, H., Howard, J. T., & Buckley, R. (2004). Mutations in genes required for T-cell development: IL7R, CD45, IL2RG, JAK3, RAG1, RAG2, ARTEMIS, and ADA and severe combined immunodeficiency. *Genetics in Medicine*, 6(1), 16-26. <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000105752.80592.A3>
- Kantor, A. B., & Herzenberg, L. A. (1993). Origin of Murine B Cell Lineages. *Annual Review of Immunology*, 11(1), 501-538. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.002441>

- Kay, A. B. (2015). The early history of the eosinophil, *45*(3), 575-582. <https://doi.org/10.1111/cea.12480>
- Kennedy, A. D., Willment, J. A., Dorward, D. W., Williams, D. L., Brown, G. D., & DeLeo, F. R. (2007). Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *European Journal of Immunology*, *37*(2), 467-478. <https://doi.org/10.1002/eji.200636653>
- Kerfoot, S. M., Yaari, G., Patel, J. R., Johnson, K. L., Gonzalez, D. G., Kleinstein, S. H., & Haberman, A. M. (2011). Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Development Initiates in the Interfollicular Zone. *Immunity*, *34*(6), 947-960. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.024>
- Kimura, S. (2018). Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. *Anatomical Science International*, *93*(1), 23-34. <https://doi.org/10.1007/s12565-017-0418-6>
- Kirsch, I. R., Morton, C. C., Nakahara, K., & Leder, P. (1982). Human Immunoglobulin Heavy Chain Genes Map to a Region of Translocations in Malignant B Lymphocytes. *Science*, *216*(4543), 301-303. <https://doi.org/10.1126/science.6801764>
- Kirsch, I. R., Morton, C. C., Nakahara, K., & Leder, P. (1982). Human Immunoglobulin Heavy Chain Genes Map to a Region of Translocations in Malignant B Lymphocytes. *Science*, *216*(4543), 301-303. <https://doi.org/10.1126/science.6801764>
- Kjeldsen, L., Sengelov, H., Lollike, K., Nielsen, M. H., & Borregaard, N. (1994). Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood*, *83*(6), 1640-1649. <https://doi.org/10.1182/blood.V83.6.1640.1640>
- Klose, C. S. N., Kiss, E. A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., d'Hargues, Y., Göppert, N., Croxford, A. L., Waisman, A., Tanriver, Y., & Dieffenbach, A. (2013). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR $\gamma$ t innate lymphoid cells. *Nature*, *494*(7436), 261-265. <https://doi.org/10.1038/nature11813>
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M. T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., Isobe, K., & Hibi, T. (2008). IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, *57*(12), 1682-1689. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.135053>
- Kohn, L. A., Hao, Q. -L., Sasidharan, R., Parekh, C., Ge, S., Zhu, Y., Mikkola, H. K. A., & Crooks, G. M. (2012). Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin. *Nature Immunology*, *13*(10), 963-971. <https://doi.org/10.1038/ni.2405>
- Krejsek, J., Andrýs, C., Krčmářová, I. (2016). *Imunologie člověka* (1. vydání). Garamon s.r.o.
- Kugathasan, S., Saubermann, L. J., Smith, L., Kou, D., Itoh, J., Binion, D. G., Levine, A. D., Blumberg, R. S., & Fiocchi, C. (2007). Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut*, *56*(12), 1696-1705. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.116467>
- Kühl, A. A., Kakirman, H., Janotta, M., Dreher, S., Cremer, P., Pawlowski, N. N., Loddenkemper, C., Heimesaat, M. M., Grollich, K., Zeitz, M., Farkas, S., & Hoffmann, J. C. (2007). Aggravation of Different Types of Experimental Colitis by Depletion or Adhesion Blockade of Neutrophils. *Gastroenterology*, *133*(6), 1882-1892. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.073>
- Kühl, A. A., Loddenkemper, C., Westermann, J., & Hoffmann, J. C. (2002). Role of Gamma Delta T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Pathobiology*, *70*(3), 150-155. <https://doi.org/10.1159/000068147>
- Lacy, P. (2006). Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, *2*(3), 98. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-2-3-98>
- Langan, R. C., Gotsch, P. B., Krafczyk, M. A., & Skillings, D. D. (2007). Ulcerative colitis: diagnosis and treatment. *American family physician*, *76*(9), 1323-1330. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2007/1101/p1323.html>
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., & Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology*, *15*(12), 731-744. <https://doi.org/10.1038/nri3920>

- Lee, S. K., Rigby, R. J., Zotos, D., Tsai, L. M., Kawamoto, S., Marshall, J. L., Ramiscal, R. R., Chan, T. D., Gatto, D., Brink, R., Yu, D., Fagarasan, S., Tarlinton, D. M., Cunningham, A. F., & Vinuesa, C. G. (2011). B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1377-1388. <https://doi.org/10.1084/jem.20102065>
- Lelouard, H., Fallet, M., de Bovis, B., Méresse, S., & Gorvel, J. -P. (2012). Peyer's Patch Dendritic Cells Sample Antigens by Extending Dendrites Through M Cell-Specific Transcellular Pores. *Gastroenterology*, 142(3), 592-601.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.039>
- Londei, M., Lamb, J. R., Bottazzo, G. F., & Feldmann, M. (1984). Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigen to cloned human T cells. *Nature*, 312(5995), 639-641. <https://doi.org/10.1038/312639a0>
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). *Histologie* (překlad 3. vydání). Grada.
- Macallan, D., Borghans, J., & Asquith, B. (2017). Human T Cell Memory: A Dynamic View. *Vaccines*, 5(1), 1-12. <https://doi.org/10.3390/vaccines5010005>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677-686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M. E., Patel, F., Wilken, R., Raychaudhuri, S., Ruhaak, L. R., & Lebrilla, C. B. (2015). Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 57(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.12.002>
- Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. A. (2014). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9(1), 181-218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
- McBrien, C. N., & Menzies-Gow, A. (2017). The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in Medicine*, 4(1), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00093>
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 265-278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>
- McNagny, K., & Graf, T. (2002). Making Eosinophils Through Subtle Shifts in Transcription Factor Expression. *Journal of Experimental Medicine*, 195(11), F43-F47. <https://doi.org/10.1084/jem.20020636>
- Melo, R. C. N., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., & Weller, P. F. (2008). Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(2), 229-236. <https://doi.org/10.1189/jlb.0707503>
- Mindt, B. C., Fritz, J. H., & Duerr, C. U. (2018). Group 2 Innate Lymphoid Cells in Pulmonary Immunity and Tissue Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 9(1), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00840>
- Mora, J. R., & von Andrian, U. H. (2009). Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Seminars in Immunology*, 21(1), 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2008.08.002>
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*, 14(4), 793-802. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>
- Moy, J. N., Gleich, G. J., & Thomas, L. L. (1990). Noncytotoxic activation of neutrophils by eosinophil granule major basic protein. Effect on superoxide anion generation and lysosomal enzyme release. *The Journal of Immunology*, 145(8), 2626-2632. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.145.8.2626>
- Muniz, V. S., Weller, P. F., & Neves, J. S. (2012). Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(2), 281-288. <https://doi.org/10.1189/jlb.0212067>
- Muniz, V. S., Weller, P. F., & Neves, J. S. (2012). Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(2), 281-288. <https://doi.org/10.1189/jlb.0212067>

- Murphy, K., Mowat, A., Berg, L., Chaplin, D., & Weaver, C. (2017). *Janeway's immunobiology* (Ninth edition). Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Natsui, M., Kawasaki, K., Takizawa, H., Hayashi, S. I., Matsuda, Y., Sugimura, K., Seki, K., Narisawa, R., Sando, F., & Asakura, H. (1997). Selective depletion of neutrophils by a monoclonal antibody, RP-3, suppresses dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 12(12), 801–808. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1997.tb00375.x>
- Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15(7), 602–611. <https://doi.org/10.1038/ni.2921>
- Nazimek, K., & Bryniarski, K. (2012). The biological activity of macrophages in health and disease. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 66(1), 507–520. <https://doi.org/10.5604/17322693.1004080>
- Neish, A. S. (2009). Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65–80. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.080>
- Neutra, M. R., Mantis, N. J., & Kraehenbuhl, J. -P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature Immunology*, 2(11), 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/ni1101-1004>
- Neutra, M. R., Pringault, E., & Kraehenbuhl, J. -P. (1996). Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual Review of Immunology*, 14(1), 275–300. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.275>
- Neves, J. S., & Weller, P. F. (2009). Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. *Current Opinion in Immunology*, 21(6), 694–699. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.07.011>
- Nolte, M. A., Arens, R., Kraus, M., van Oers, M. H. J., Kraal, G., van Lier, R. A. W., & Mebius, R. E. (2004). B Cells Are Crucial for Both Development and Maintenance of the Splenic Marginal Zone. *The Journal of Immunology*, 172(6), 3620–3627. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3620>
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A. S., Klein, U., Dinner, A. R., Singh, H., & Sciammas, R. (2013). Transcriptional Regulation of Germinal Center B and Plasma Cell Fates by Dynamical Control of IRF4. *Immunity*, 38(5), 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.009>
- Ouellette, A. J. (2011). Paneth cell  $\alpha$ -defensins in enteric innate immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2215–2229. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0714-6>
- Pape, K. A., Taylor, J. J., Maul, R. W., Gearhart, P. J., & Jenkins, M. K. (2011). Different B Cell Populations Mediate Early and Late Memory During an Endogenous Immune Response. *Science*, 331(6021), 1203–1207. <https://doi.org/10.1126/science.1201730>
- Pascal, M., Perez-Gordo, M., Caballero, T., Escribese, M. M., Lopez Longo, M. N., Luengo, O., Manso, L., Matheu, V., Seoane, E., Zamorano, M., Labrador, M., & Mayorga, C. (2018). Microbiome and Allergic Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01584>
- Prinyakupt, J., & Pluempitiwiriwawej, C. (2015). Segmentation of white blood cells and comparison of cell morphology by linear and naïve Bayes classifiers. *BioMedical Engineering OnLine*, 14(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12938-015-0037-1>
- Qualls, J. E., Kaplan, A. M., Van Rooijen, N., & Cohen, D. A. (2006). Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(4), 802–815. <https://doi.org/10.1189/jlb.1205734>
- Rosenberg, H. F. (1995). Recombinant Human Eosinophil Cationic Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(14), 7876–7881. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.7876>
- Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). THE EOSINOPHIL. *Annual Review of Immunology*, 24(1), 147–174. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720>
- Rubbert-Roth, A., & Finckh, A. (2009). Treatment options in patients with rheumatoid arthritis failing initial TNF inhibitor therapy: a critical review. *Arthritis Research & Therapy*, 11(1), S1. <https://doi.org/10.1186/ar2666>
- Rudensky, A. Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological Reviews*, 241(1), 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x>

- Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, et al. (2003) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(2-3), 91-106. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00311>
- Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y., & Tao, F. (2016). The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterology*, 16(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0498-0>
- Sanderson, C. (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*, 79(12), 3101-3109. <https://doi.org/10.1182/blood.v79.12.3101.3101>
- Saunderson, S. C., Schuberth, P. C., Dunn, A. C., Miller, L., Hock, B. D., MacKay, P. A., Koch, N., Jack, R. W., & McLellan, A. D. (2008). Induction of Exosome Release in Primary B Cells Stimulated via CD40 and the IL-4 Receptor. *The Journal of Immunology*, 180(12), 8146-8152. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.8146>
- Science Source Images. <https://www.sciencesource.com/> (30. 8. 2022).
- Scotton, C. J., Martinez, F. O., Smelt, M. J., Sironi, M., Locati, M., Mantovani, A., & Sozzani, S. (2005). Transcriptional Profiling Reveals Complex Regulation of the Monocyte IL-1 $\beta$  System by IL-13. *The Journal of Immunology*, 174(2), 834-845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.834>
- Sedghi, S., Fields, J. Z., Klamut, M., Urban, G., Durkin, M., Winship, D., Fretland, D., Olyae, M., & Keshavarzian, A. (1993). Increased production of luminol enhanced chemiluminescence by the inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut*, 34(9), 1191-1197. <https://doi.org/10.1136/gut.34.9.1191>
- Shahaf, G., Zisman-Rozen, S., Benhamou, D., Melamed, D., & Mehr, R. (2016). B Cell Development in the Bone Marrow Is Regulated by Homeostatic Feedback Exerted by Mature B Cells. *Frontiers in Immunology*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00077>
- Shi, Z., Ohno, H., & Satoh-Takayama, N. (2021). Dietary Derived Micronutrients Modulate Immune Responses Through Innate Lymphoid Cells. *Frontiers in Immunology*, 12, 670632. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.670632>
- Schwartz, J., Leidal, K. G., Femling, J. K., Weiss, J. P., & Nauseef, W. M. (2009). Neutrophil Bleaching of GFP-Expressing Staphylococci: Probing the Intraphagosomal Fate of Individual Bacteria. *The Journal of Immunology*, 183(4), 2632-2641. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804110>
- Smith, A. M., Rahman, F. Z., Hayee, B., Graham, S. J., Marks, D. J. B., Sewell, G. W., Palmer, C. D., Wilde, J., Foxwell, B. M. J., Gloger, I. S., Sweeting, T., Marsh, M., Walker, A. P., Bloom, S. L., & Segal, A. W. (2009). Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *Journal of Experimental Medicine*, 206(9), 1883-1897. <https://doi.org/10.1084/jem.20091233>
- Spits, H., & Cupedo, T. (2012). Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 647-675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075053>
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine*, 176(1), 287-292. <https://doi.org/10.1084/jem.176.1.287>
- Steiniger, B., Timphus, E. -M., Jacob, R., & Barth, P. J. (2005). CD27 B cells in human lymphatic organs: re-evaluating the splenic marginal zone. *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02242.x>
- Storch, B., Meixlsperger, S., & Jumaa, H. (2007). The Ig- $\alpha$  ITAM is required for efficient differentiation but not proliferation of pre-B cells. *European Journal of Immunology*, 37(1), 252-260. <https://doi.org/10.1002/eji.200636667>
- Strokotov, D. I., Yurkin, M. A., Gilev, K. V., van Bockstaele, D. R., Hoekstra, A. G., Rubtsov, N. B., & Maltsev, V. P. (2009). Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? *Journal of Biomedical Optics*, 14(6), 1-12. <https://doi.org/10.1117/1.3275471>
- Tavian, M., Robin, C., Coulombel, L., & Péault, B. (2001). The Human Embryo, but Not Its Yolk Sac, Generates Lympho-Myeloid Stem Cells. *Immunity*, 15(3), 487-495. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00193-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00193-5)

- The Quilting Veterinarian*. <https://theadventuresofbecky.wordpress.com/> (2. 9. 2022).
- Tober, J., Koniski, A., McGrath, K. E., Vemishetti, R., Emerson, R., de Mesy-Bentley, K. K. L., Waugh, R., & Palis, J. (2006). The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood*, 109(4), 1433-1441. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-031898>
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. -F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, 389(10080), 1741-1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Treuting, P. M., Dintzis, S. M., & Montine, K. S. (2018). *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas* (Second edition). Elsevier/Academic Press, Cop.
- Tumang, J. R., Francés, R., Yeo, S. G., & Rothstein, T. L. (2005). Cutting Edge: Spontaneously Ig-Secreting B-1 Cells Violate the Accepted Paradigm for Expression of Differentiation-Associated Transcription Factors. *The Journal of Immunology*, 174(6), 3173-3177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3173>
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70, S38-S44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>
- Van Kruiningen, H. J., West, A. B., Freda, B. J., & Holmes, K. A. (2002). Distribution of Peyer's Patches in the Distal Ileum. *Inflammatory Bowel Diseases*, 8(3), 180-185. <https://doi.org/10.1097/00054725-200205000-00004>
- Vandamme, T. F. (2014). Use of rodents as models of human diseases. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 6(1), 2-9. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.124301>
- Vazeille, E., Buisson, A., Bringer, M.-A., Goutte, M., Ouchchane, L., Hugot, J.-P., de Vallee, A., Barnich, N., Bommelaer, G., & Darfeuille-Michaud, A. (2015). Monocyte-derived Macrophages from Crohn's Disease Patients Are Impaired in the Ability to Control Intracellular Adherent-Invasive Escherichia coli and Exhibit Disordered Cytokine Secretion Profile. *Journal of Crohn's and Colitis*, 9(5), 410-420. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv053>
- Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., & Bolen, J. B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell*, 55(2), 301-308. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90053-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90053-0)
- Venge, Byström, Carlson, Håkansson, Karawacjzyk, Peterson, Sevéus, & Trulsson. (1999). Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease, 29(9), 1172-1186. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00542.x>
- Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K., & Tsatsanis, C. (2017). Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *The Journal of Immunology*, 198(3), 1006-1014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601515>
- Victoria, G. D., & Nussenzweig, M. C. (2012). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 429-457. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>
- Vincent, F. B., Saulep-Easton, D., Figgett, W. A., Fairfax, K. A., & Mackay, F. (2013). The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity, 24(3), 203-215. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.04.003>
- von Burg, N., Chappaz, S., Baerenwaldt, A., Horvath, E., Bose Dasgupta, S., Ashok, D., Pieters, J., Tacchini-Cottier, F., Rolink, A., Acha-Orbea, H., & Finke, D. (2014). Activated group 3 innate lymphoid cells promote T-cell-mediated immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12835-12840. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406908111>
- Wang, J. -G., Mahmud, S. A., Thompson, J. A., Geng, J. -G., Key, N. S., & Slungaard, A. (2006). The principal eosinophil peroxidase product, HOSCN, is a uniquely potent phagocyte oxidant inducer of endothelial cell tissue factor activity: a potential mechanism for thrombosis in eosinophilic inflammatory states. *Blood*, 107(2), 558-565. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2152>
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., & Coonrod, S. A. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, 184(2), 205-213. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>



- Wasmoen, T. L., Bell, M. P., Loegering, D. A., Gleich, G. J., Prendergast, F. G., & McKean, D. J. (1988). Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. *Journal of Biological Chemistry*, 263(25), 12559-12563. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)37791-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)37791-3)
- Weaver, C. T., Elson, C. O., Fouser, L. A., & Kolls, J. K. (2013). The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs, and Skin. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8(1), 477-512. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130318>
- Webb, J. R., Milne, K., & Nelson, B. H. (2015). PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer Immunology Research*, 3(8), 926-935. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0239>
- Wéra, O., Lancellotti, P., & Oury, C. (2016). The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 5(12), 118. <https://doi.org/10.3390/jcm5120118>
- Wikiversity. <https://en.wikiversity.org/> (16. 8. 2022).
- Wilgenburg, B. van, Browne, C., Vowles, J., Cowley, S. A., & Covas, D. T. (2013). Efficient, Long Term Production of Monocyte-Derived Macrophages from Human Pluripotent Stem Cells under Partly-Defined and Fully-Defined Conditions. *PLoS ONE*, 8(8), e71098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071098>
- Willebrand, R., & Voehringer, D. (2017). Regulation of eosinophil development and survival. *Current Opinion in Hematology*, 24(1), 9-15. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000293>
- Wojciechowski, W., Harris, D. P., Sprague, F., Mousseau, B., Makris, M., Kusser, K., Honjo, T., Mohrs, K., Mohrs, M., Randall, T., & Lund, F. E. (2009). Cytokine-Producing Effector B Cells Regulate Type 2 Immunity to *H. polygyrus*. *Immunity*, 30(3), 421-433. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.006>
- Ylikoski, E., Lund, R., Kyläniemi, M., Filén, S., Kilpeläinen, M., Savolainen, J., & Lahesmaa, R. (2005). IL-12 up-regulates T-bet independently of IFN- $\gamma$  in human CD4 T cells. *European Journal of Immunology*, 35(11), 3297-3306. <https://doi.org/10.1002/eji.200526101>
- Zamoyska, R. (1998). CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 82-87. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80036-8](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80036-8)
- Zhang, R., Ito, S., Nishio, N., Cheng, Z., Suzuki, H., & Isobe, K. (2011). Up-Regulation of Gr1+CD11b+ Population in Spleen of Dextran Sulfate Sodium Administered Mice Works to Repair Colitis. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 10(1), 39-46. <https://doi.org/10.2174/187152811794352114>
- Zhao, Y., Uduman, M., Siu, J. H. Y., Tull, T. J., Sanderson, J. D., Wu, Y. -C. B., Zhou, J. Q., Petrov, N., Ellis, R., Todd, K., Chavele, K. -M., Guesdon, W., Vossenkamper, A., Jassem, W., D'Cruz, D. P., Fear, D. J., John, S., Scheel-Toellner, D., Hopkins, C., et al. (2018). Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. *Nature Communications*, 9(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06089-1>
- Zhu, J. (2015). T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*, 75(1), 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.010>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Ab	protilátka
AGM	oblast aorta–gonáda–mezonefros
AIRE	autoimmune regulator
APC	antigen prezentující buňky
APRIL	A proliferation–inducing ligand
AV	<i>appendix vermiformis</i>
BAFF	B–cell activating factor
blimp–1	B lymphocyte–induced maturation protein–1
BMZ	B2 lymfocyty marginální zóny
BTK	Bruton's tyrosine kinase
BV	Brilliant Violet
CCR3	C–C motif chemokine receptor 3
c–Kit	receptor tyrosie kinase
CSF1	colony stimulating factor 1
CSF1–R	colony stimulating factor 1 receptor
CX <sub>3</sub> CR1	CX <sub>3</sub> C motif chemokine receptor 1
CXCL12	chemokine C–X–C motif ligand 12
CXCR4	C–X–C chemokine receptor type 4
DN	double negative
DP	double positive
DSS	dextran sulfát sodný
ECP	eozinophilic cationic protein
EMP	multipotentní erytro–myeloidní progenitor
EPO	eozinophilic peroxidase
Fc	fragment crystallizable
Fc $\gamma$ R	Fc $\gamma$ receptor
FITC	fluoresceín isothiokyanát
GALT	gut–associated lymphoid tissue
GATA–1	GATA–binding factor 1
GM–CSF	colony stimulating factor granulocyte/macrophage
HSC	hematopoetické kmenové buňky
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
IGF–1	inzulin like growth factor 1
IgG	imnoglobulin G
IL–4	interleukin 4
IL–4R $\alpha$	interleukin 4 receptor $\alpha$
ILC	vrozené lymfoidní buňky
ILC2p	ILC2 progenitorová buňka
ILF	izolované lymfoidní folikuli
INF– $\gamma$	interferon $\gamma$
iNOS	indukovaná NOsynthasa
ITAM	immunoreceptor tyrosine–based activation motif
JAK/STAT	Janus kinases/signal transducer and aktivátor of transcription pathway
KB	konvenční B lymfocyty
LPS	lipopolysacharid
LTi	lymphoid tissue inducer cells
MAdCAM–1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1

MAMPs	microbe-associated molecular patterns
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
MBP	major basic protein
M–buňky	Microfold cells
M–CSF	colony stimulating factor macrophage
MHC II	major histocompatibility complex II
M–ILF	mukosální ILF
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
NETs	neutrophil extracellular traps
NFκB	nuclear factor κB
NK	natural killers
NKp46	natural killer protein 46
NOS	reactive nitrogen species
NOTCH2	neurogenic locus notch homolog protein 2
NOX2	NADPH oxidase 2
PAD4	protein arginine deiminase 4
PerCP	peridinin chlorophyll protein
PI3K/Akt	fosfatidylinositol–3–kinase/proteinkinase B parthway
PIP2	phosphatidylinositol 4,5–bisphosphate
PIP3	phosphatidylinositol 3,4,5–trisphosphate
Pir A/B	paired immunoglobulin–like receptor A/B
PP	Peyerovy pláty
PRR	patern recognition receptors
Rab5	Ras-associated binding protein 5
RAC2	Ras–related C3 botulinum toxin substrate 2
RAG1	recombination–activating 1 gene
RANKL	receptor activator of nuclear factor κ–B ligand
RILP	Rab-interacting lysosomal protein
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomální RNA
sIgA	sekreční IgA
S–ILF	submukózní ILF
SNARE	SNAP receptor
T–bet	T–box expressed in T cells
Tc	cytotoxický T lymfocyt
TCF–7	T–cell factor 7
TCR	T–cell receptor
TGFβ	transforming growth factor β
Th	pomocný T lymfocyt
Thf	pomocný folikulární T lymfocyt
TLR4	toll like receptor 4
TNF	tumor necrosis factor
Treg	T regulační lymfocyt
TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
TRITC	tetramethylrhodaminem
TSC1/2	tuberous sclerosis protein ½
t–SNE	t–distributed stochastic neighbor embedding
v–ATPasa	vacuolar–type ATPase