

Normální bakteriální flora, alergie a účinky probiotik

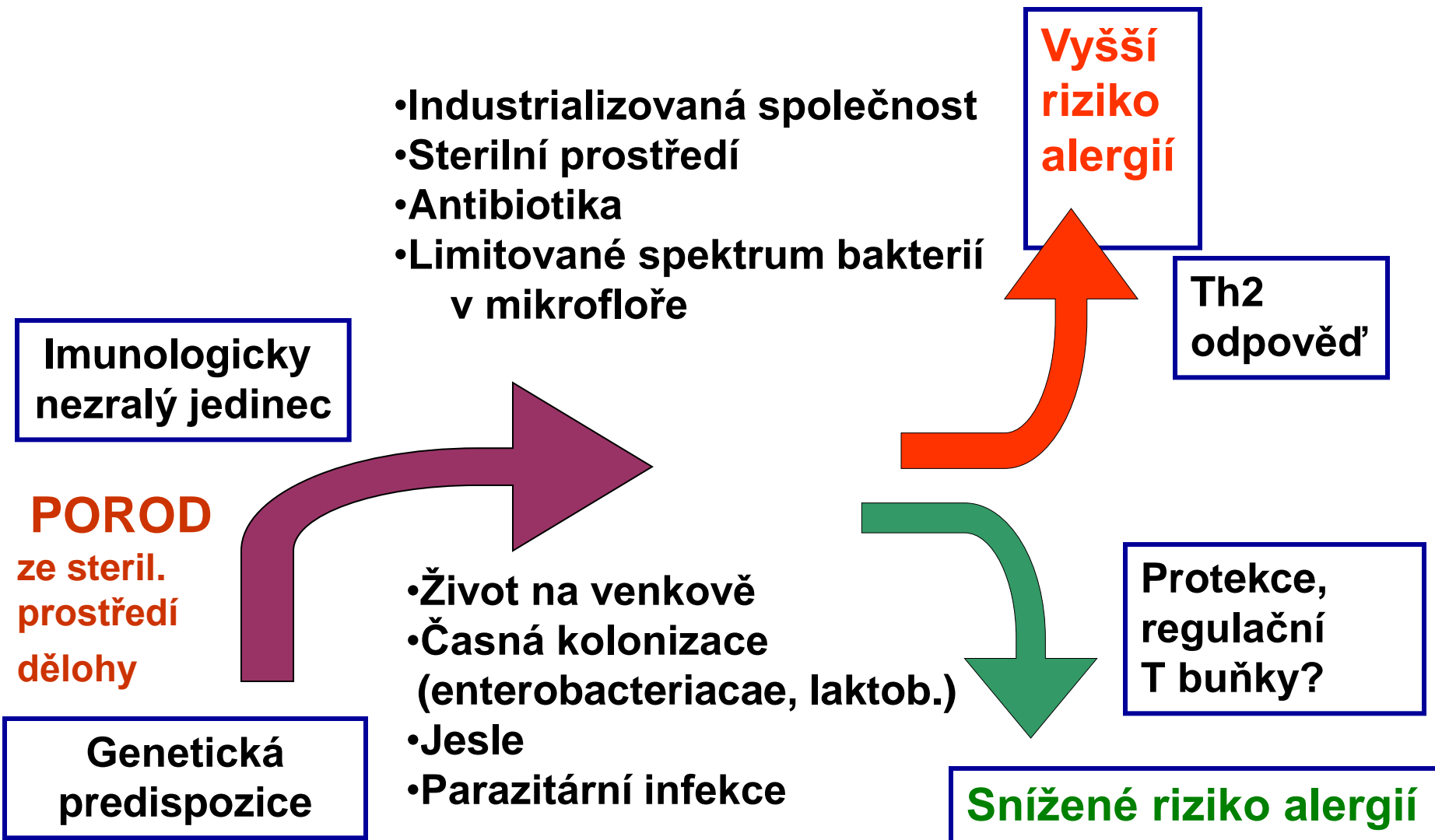
*H. Tlaskalová-Hogenová, R. Lodinová-Žádníková,
H. Kozáková, B. Cukrowska, R. Štěpánková, T.
Hudcovic, Kverka M., L. Tučková, A. Kokešová, J.
Bártová, Kopečný J., U. Wiedermann*

Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083,
Praha, ÚPMD Praha Podolí, 1. LF UK Praha,
Universita Vídeň

tlaskalo@biomed.cas.cz

Workshop on Atopic Dermatitis, 26.-28.květen 2006, Praha

Faktory ovlivňující vývoj imunity (alergie a jiné choroby): “Hygienická hypotéza”

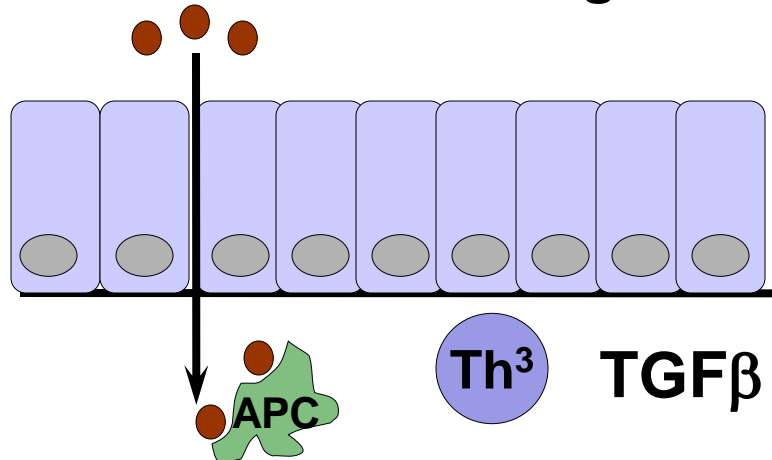


SLIZNICE - FUNKCE

- Kontakt s prostředím (transport živin, iontů, plynů)
- Bariarová funkce - nespec. a spec. faktory
- Zajištění nereaktivnosti např. potravinové antigeny („orální tolerance“)
- Komunikace mezi imunitním systémem různých sliznic a exokrinních žláz („společný slizniční systém“)
- Zajištění integrity epitelové vrstvy
- Komunikace sliznic s kůží a dalšími orgány (T buňky)

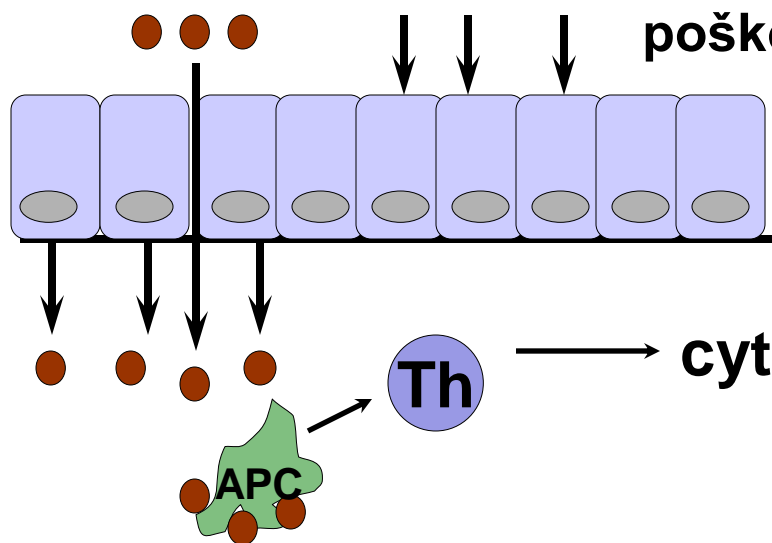
Slizniční (orální) tolerance

Indukce tolerance k antigenům potravy a mikroflory

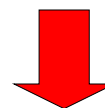


Útlum imunitní reakce

Porucha orální tolerance

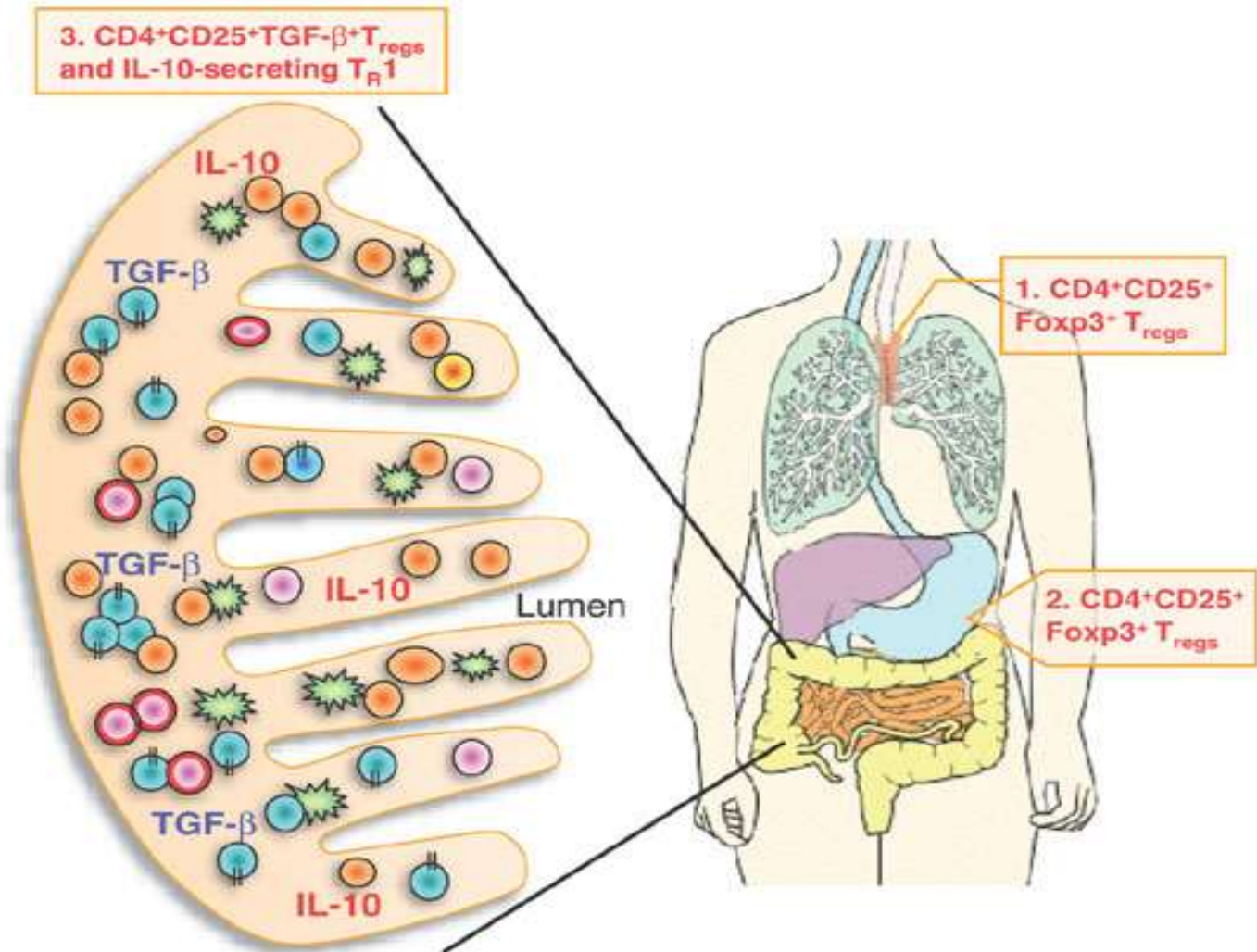


Slizniční a systémová hyperreaktivita



Nemoc

Typy regulačních T buněk



Presence of commensal flora in the human body

Microorganisms colonize most of the epithelial surfaces exposed to the environment („microbial organ“)

SKIN 10^{12}

Staph. aureus
Staph. epidermidis
Ps. aeruginosa
Propionibacterium acnes
Anaerobes

NOSE 10^8

Staph. aureus
Staph. epidermidis
Diphtheroids
Streptococci

THROAT

Staph. epidermidis
Haem. influenzae
Neisseria spp.
Strep. Pneumoniae
Strep. pyogenes

ORAL CAVITY 10^{10}

Strep. mutans
Por. Gingivalis plus
Some 700 other
species

URETHRA AND VAGINA 10^8

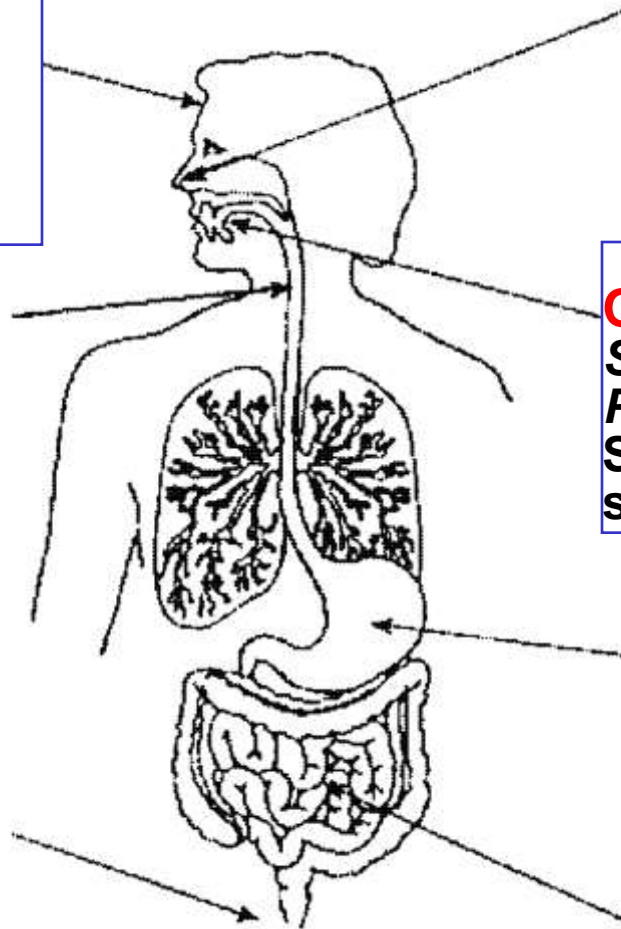
Staph. epidermidis
Streptococci
Lactobacilli
Veillonella
etc.

STOMACH 10^4

Hel. pylori

INTESTINES 10^{14} ~220g

Bacteroides spp.
Bifidobacter spp.
Bacillus spp.
Eubacteria
Ruminococcus albus
etc.



(Wilson et al, 2002)

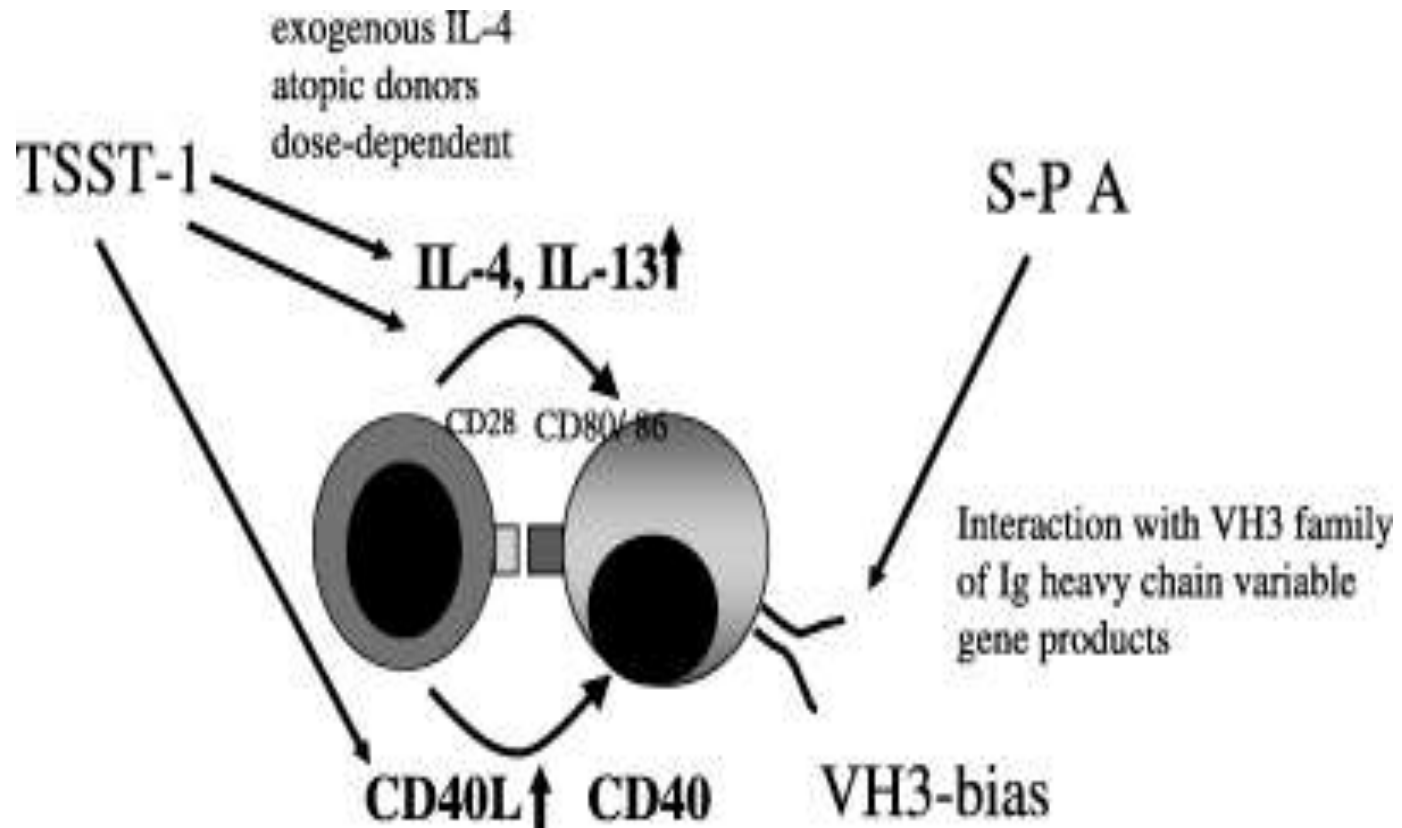
Mikroflora – komplexní ekosystém

- celkově kolem 10^{14} bakterií
- žije v nás a na nás “orgán”, který obsahuje 10x více buněk nežli naše tělo
- 500-1000 druhů - obrovská diversita
- převaha nekultivovatelných nebo obtížně kultivovatelných anaerobů (97%)
- kolem 60% bakterií nelze kultivovat vůbec
- nástup nových molekulárně biologických metod – detekce na základě specifických sekvencí ribozomální 16S RNA
- stabilní a transientní složky
- symbioza (výhodné soužití) se může změnit v patogenitu (“oportunní patogeny”)

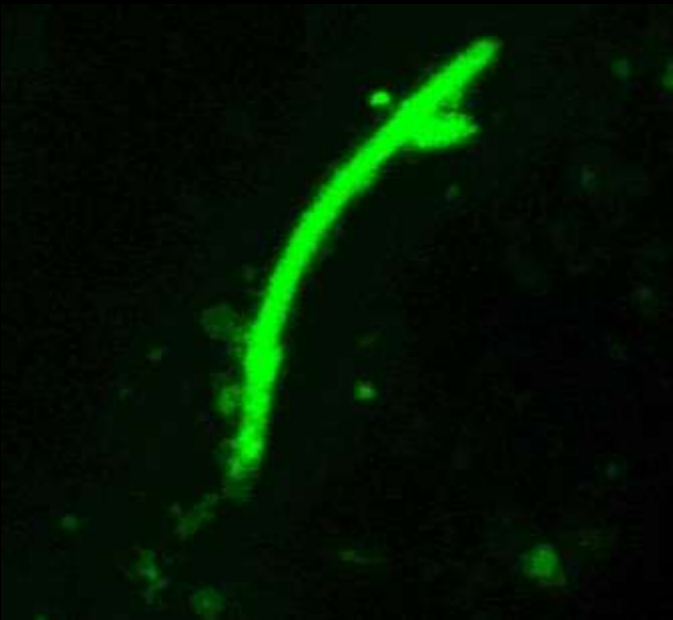
Proč komensální bakterie za určitých podmínek překonají imunitní mechanismy hostitele a vykazují patogenní účinky???

- **Poruchy rovnováhy ve složení mikroflory**
 - změny uvnitř bakteriální komunity (aplikace antibiotik, bakteriální přerůstání, mutace atd.)
- **Poruchy epitelové bariery**
- **Poruchy v regulaci slizniční imunity**

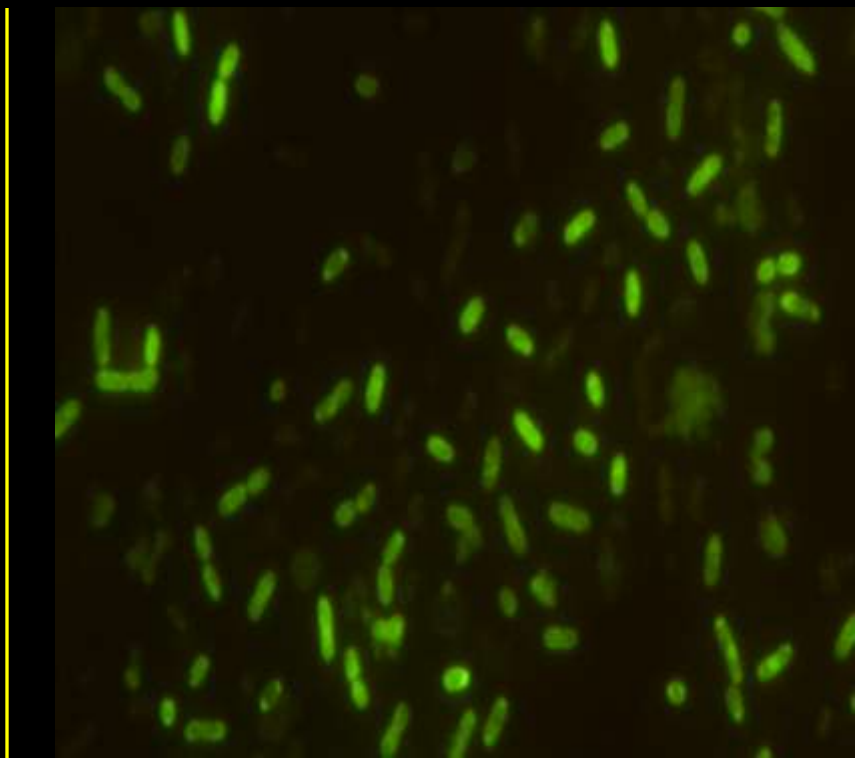
Superantigens komensálních bakterií se mohou účastnit v atopii



FISH – Fluorescence In Situ Hybridisation for identification of bacteria (16S ribosomal RNA probes)



Segmented Filamentous
Bacteria (SFB)

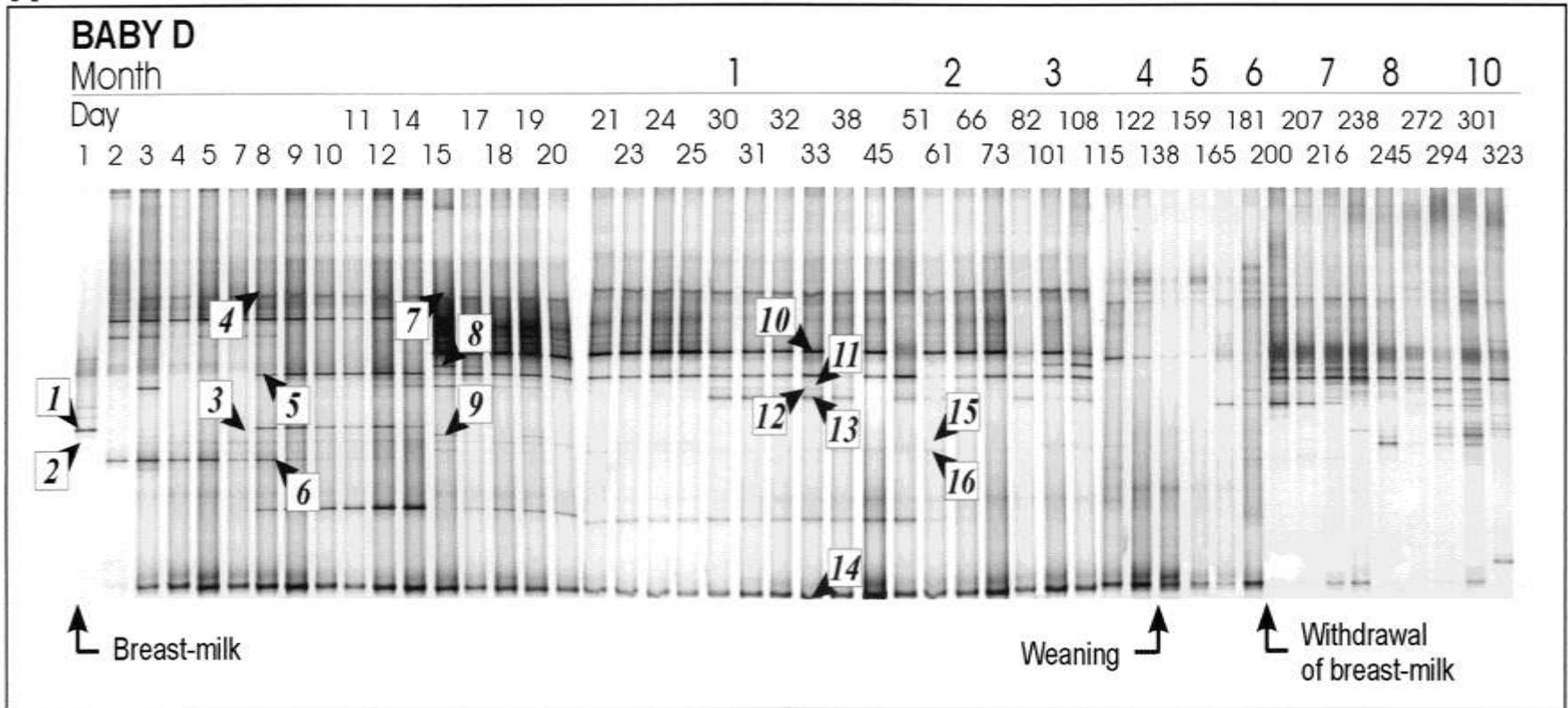


Bacteroides

(Sokol, Štěpánková, unpubl.)

Early postnatal development of fecal bacterial communities in human infants by determining the bacterial diversity using PCR-DGGE profiles (from Favier et al. 2002)

A



B

N	species	%	clones	GenBank	N	species	%	clones	GenBank
1	<i>E. coli</i>	97	D1A1	AF253328	9	<i>Veillonella atypica</i>	93	D13F	AF253336
2	<i>Veillonella dispar</i>	97	D1F	AF253329	10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	98	D26-2J	AF253337
3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	99	D6B	AF253330	11	<i>Clostridium neonatale</i>	97	D26E	AF253339
4	<i>Enterococcus raffinosus</i>	96	D8E	AF253331	12	<i>Clostridium neonatale</i>	93	D26A	AF253340
5	<i>Ruminococcus gnavus</i>	96	D8F	AF253333	13	<i>Clostridium neonatale</i>	98	D26K	AF253341
6	<i>Enterococcus avium</i>	99	D8D	AF253332	14	<i>Bifidobacterium breve</i>	98	D26B3	AF316538
7	<i>Streptococcus salivarius</i>	96	D13J	AF253334	15	<i>Veillonella dispar</i>	96	D29E	AF253342
8	<i>Clostridium paraputrificum</i>	91	D13L	AF253335	16	<i>Streptococcus salivarius</i>	98	D29A	AF253343

Normální mikroflora a imunita

Důležitá součást přirozené imunity

“kolonizační rezistence” brání usídlení patogenů (kompetice o výživu, produkce bakteriocinů atd.)

Výrazné efekty na imunitu

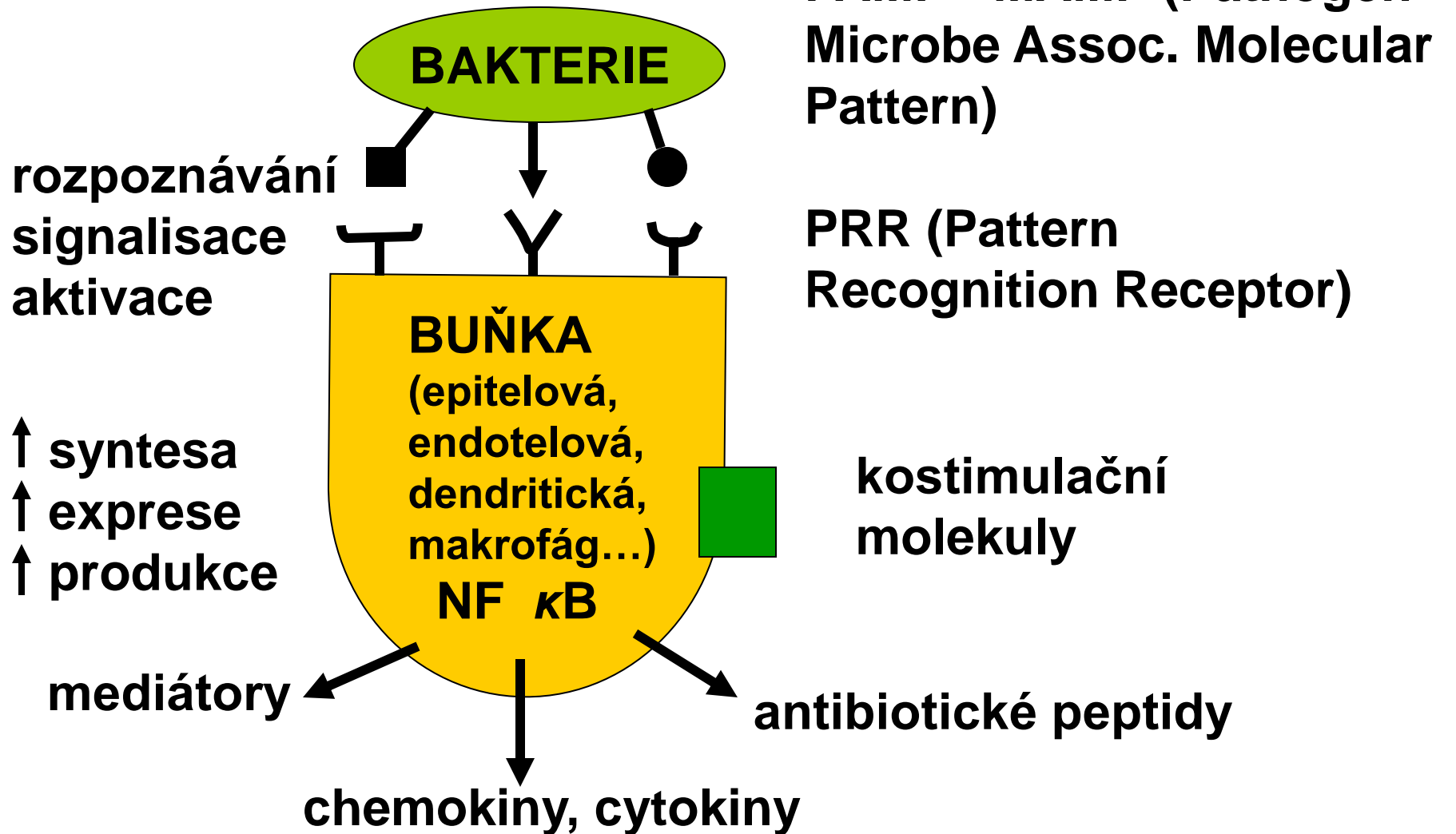
imunogenní (různost a kvantum antigenů)

imunomodulační ovlivnění

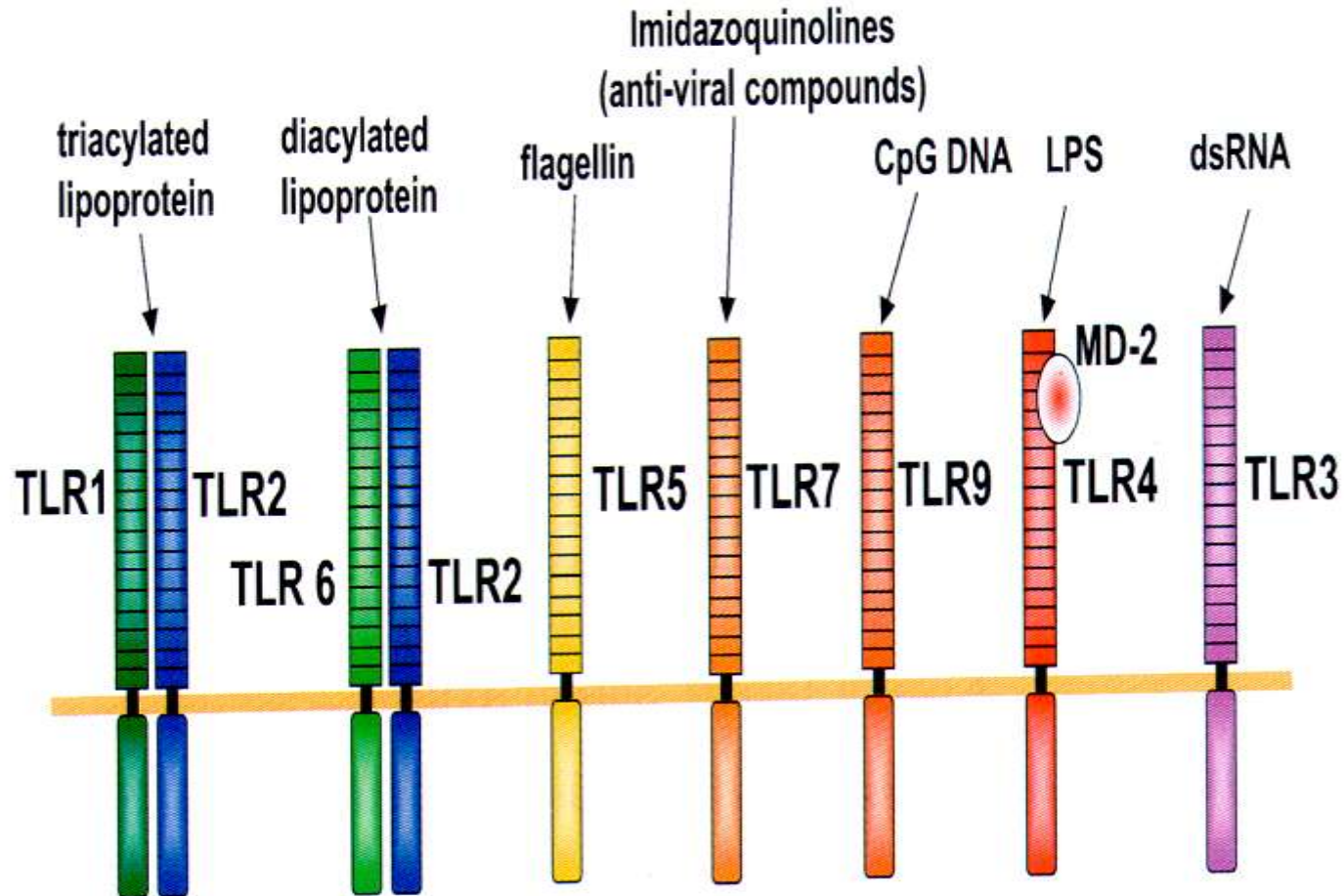
→ hlavní podnět pro rozvoj imunitního systému v období po narození

→ účast při udržení homeostázy

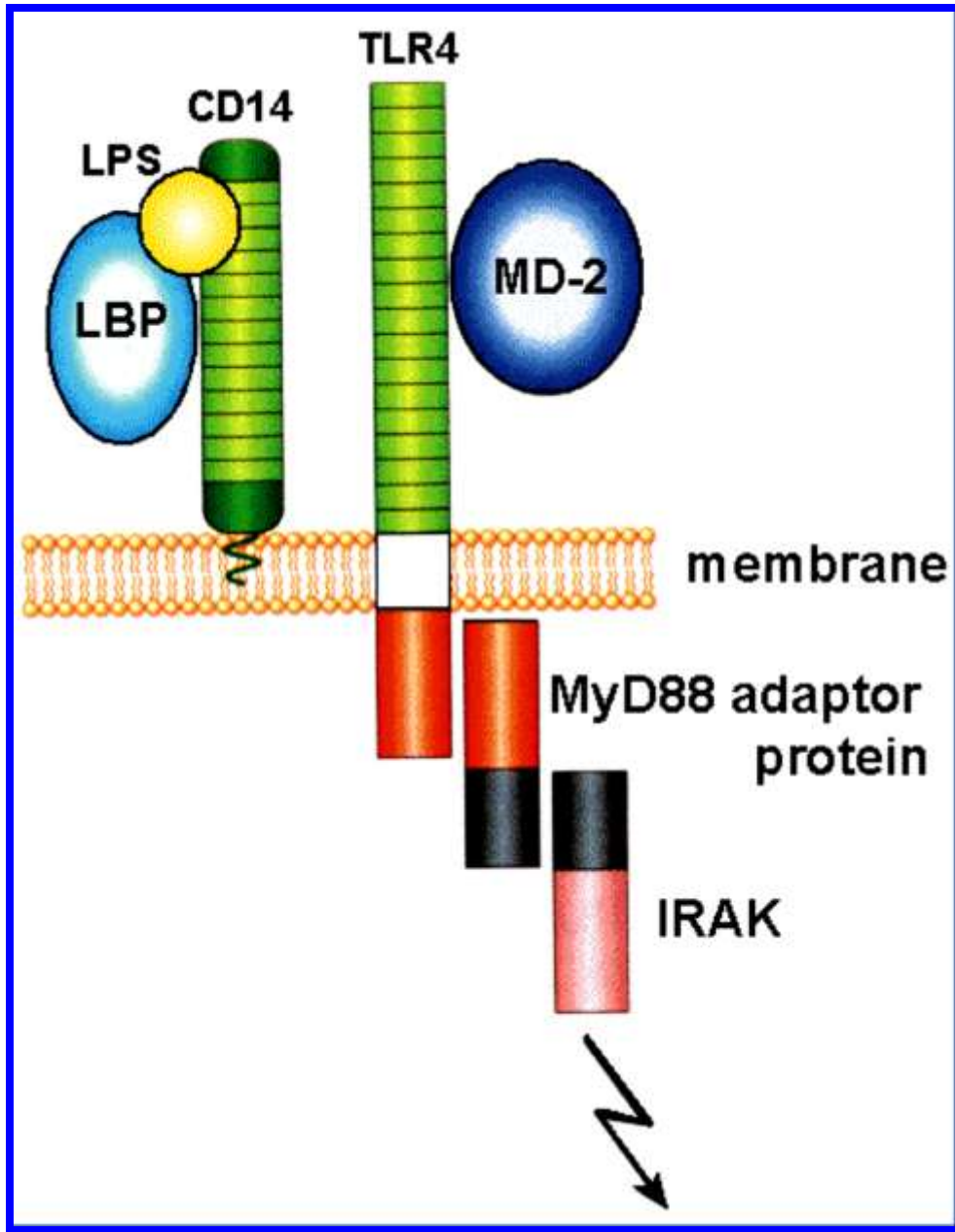
Interakce bakterií a buněk přirozené imunity



PRR (Pattern Recognition Receptors) TLRs (Toll Like Receptors) and their ligands



(Takeda, Akira, 2004)



**Recognition of LPS
by the cells of the
innate immune
system**

Význam a využití zvířecích modelů lidských chorob

1) Etiologie a vývoj chorob

Pacienti přicházejí až s projevy choroby, nedá se zjistit, co vzniku choroby předchází a jak nemoc vzniká

Přístupy: Indukce nemoci nebo využití geneticky definovaných, transgenních kmenů myší

2) Analýza patogenetických a efektorových mechanismů

3) Nové přístupy v léčbě

Úloha mikroflory v etiologii lidských chorob

Gnotobiologie – chov gnotobiotických zvířecích modelů bez bakteriální flory („bezmikrobní - germfree“ - GF) nebo s definovanou mikroflorou (techniky: císařský řez, sterilní vzduch, voda a potrava)



Plastikové izolátory pro odchov bezmikrobních myší (gnotobiol. lab. Nový Hradek)

Rozdíly ve fyziologických a imunologických parametrech bezmikrobních zvířat

- metabolismus** ↓
- střevní motilita** ↓
- váha céka** ↑
- plocha střevní sliznice** ↓
- obměna střevního epitelu** ↓
- myeloidní buňky ve střevě (IEL, LPL)** ↓
- hladina sekrečního IgA** ↓
- hladiny sérových imunoglobulinů** ↓

Myší model alergie na Bet v1 (alergen pylu břízy) (Valenta, Wiedermann et al. 1991)

Indukce tolerance vůči alergenu slizniční cestou a ovlivnění probiotiky (projekt EU „LABDEL“)

INTRAGASTRIC (IG) or INTRANASAL (IN)

rBet v 1

or no pre-treatment (-)

SUBCUTANEOUS

rBet v 1/Alum



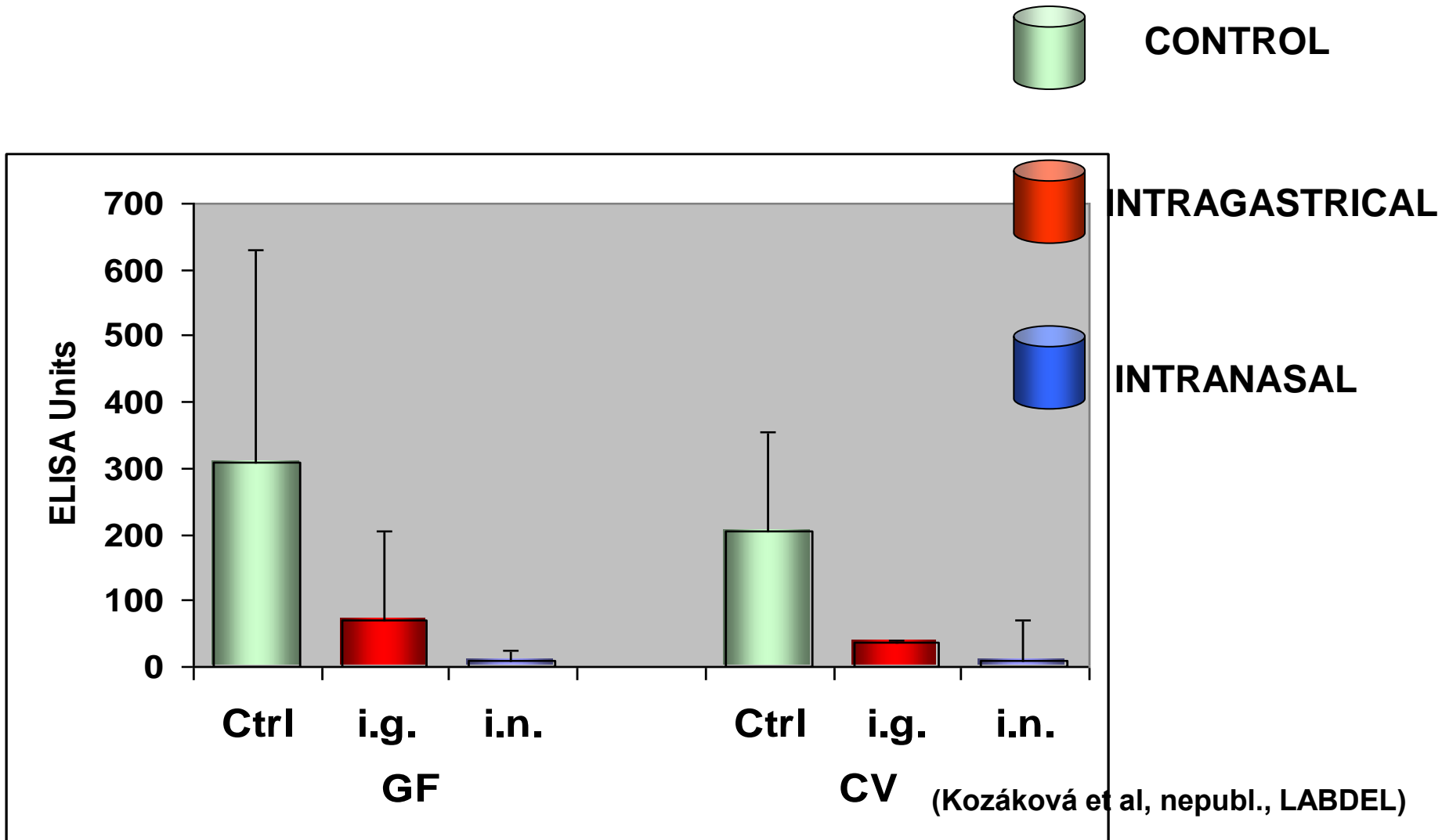
Tolerization

Sensitization

Blood
Spleens

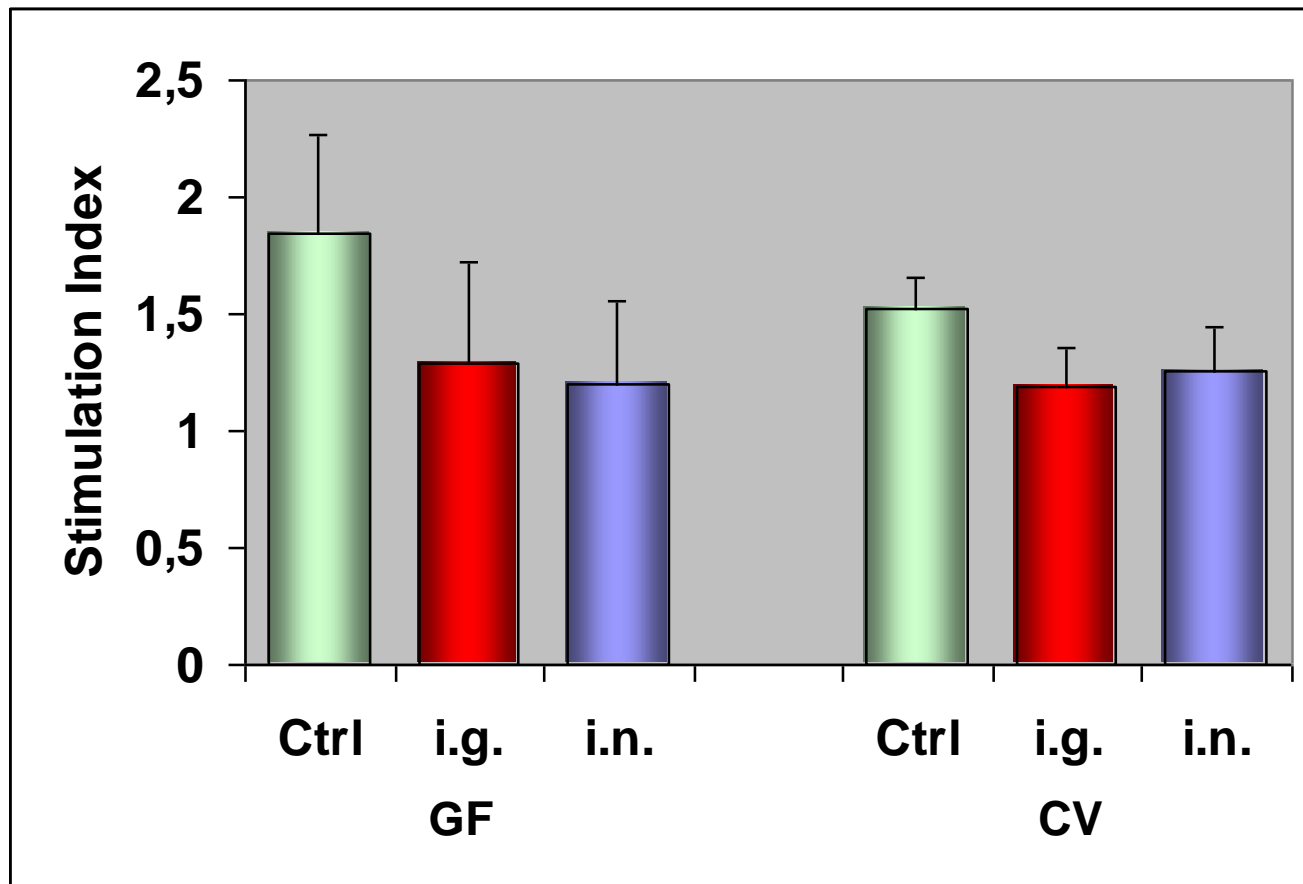


IgE antibody response to Bet v1 allergen in germfree and conventional Balb/c mice after induction of mucosal tolerance to allergen



Cellular response to Bet v1 allergen in germfree and conventional Balb/c mice after induction of mucosal tolerance to allergen and testing

Proliferation of spleen lymphocytes stimulated *in vitro* with Bet v1



(Kozáková et al, nepubl., „LABDEL“)

Probiotika

Definice: Živé mikroorganismy aplikované orálně (v dostatečném kvantu), vykazující zdraví prospěšné účinky u lidí a zvířat (Reid 2003).

Bakterie mléčného kvašení (Lactic Acid Bacteria - LAB) používány průmyslově pro produkci fermentovaných potravin (sýry, jogurty, kyselé zelí, olivy, ryby)
Některé typy těchto bakterií jsou součástí bakteriální mikroflory lidí i zvířat (bifidobakterie, laktobacily)
Určité kmeny jsou používány jako probiotika

Enterokoky

E. coli

- E. coli Nissle, E. coli O83

Kvasinky

Prokázané účinky některých probiotik

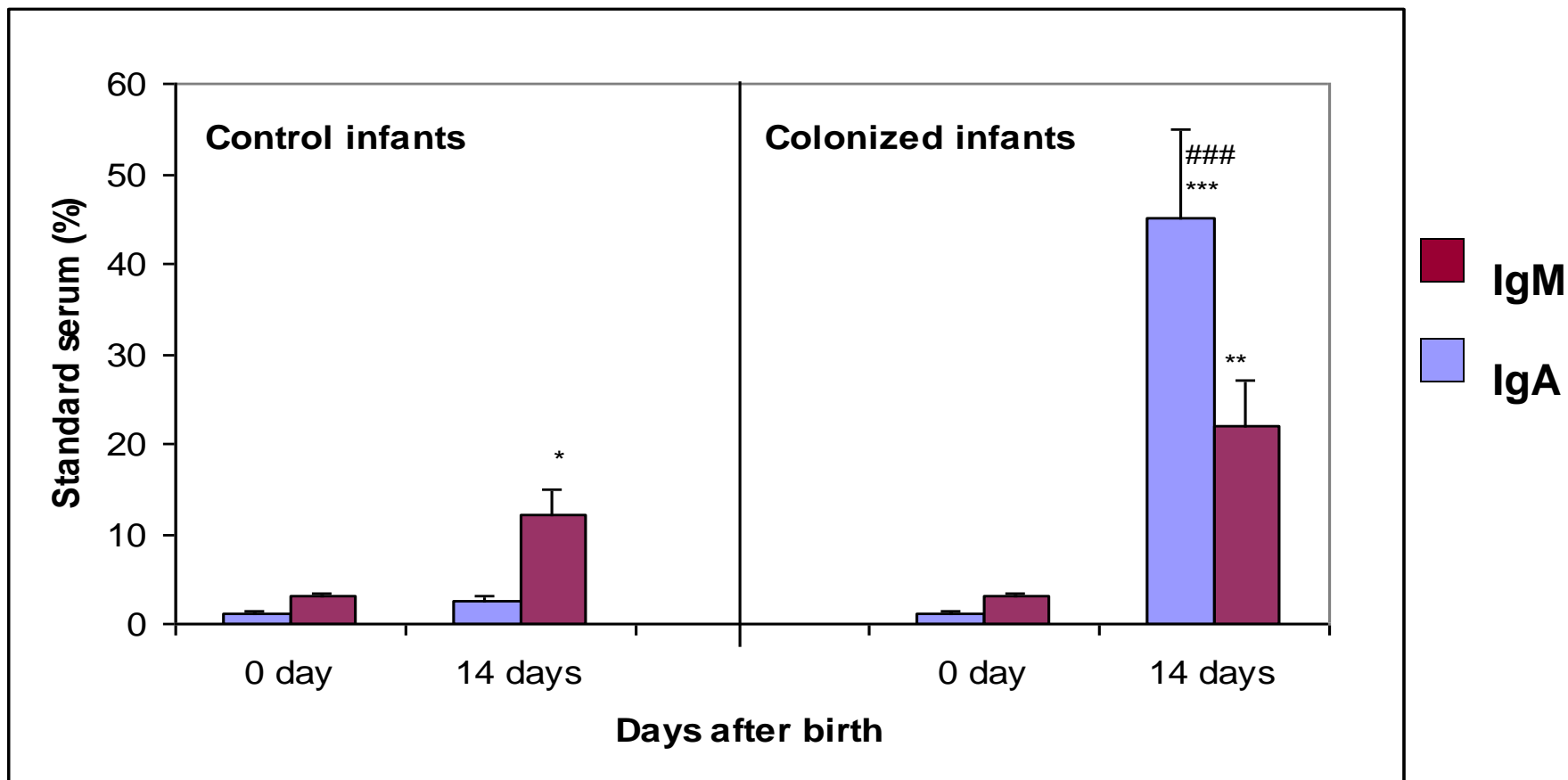
- úprava střevní mikroflory (inhibice patogenů, např. produkcí bakteriocinů)
- úprava bariérové funkce střevní sliznice
- zkrácení průchodu potravy střevem
- protizánětlivé působení
- imunomodulační působení
 - * stimulace fagocytozy
 - * stimulace funkce NK buněk
 - * inhibice alergické Th2 odpovědi
- antioxidační působení (enzymy např. katalaza)

Chybí srovnání účinnosti jednotlivých probiotických kmenů!!!

Chybí vyhledávací metody pro analýzu efektů!!!

Působení probiotického kmene *E. coli* na imunitní systém dětí

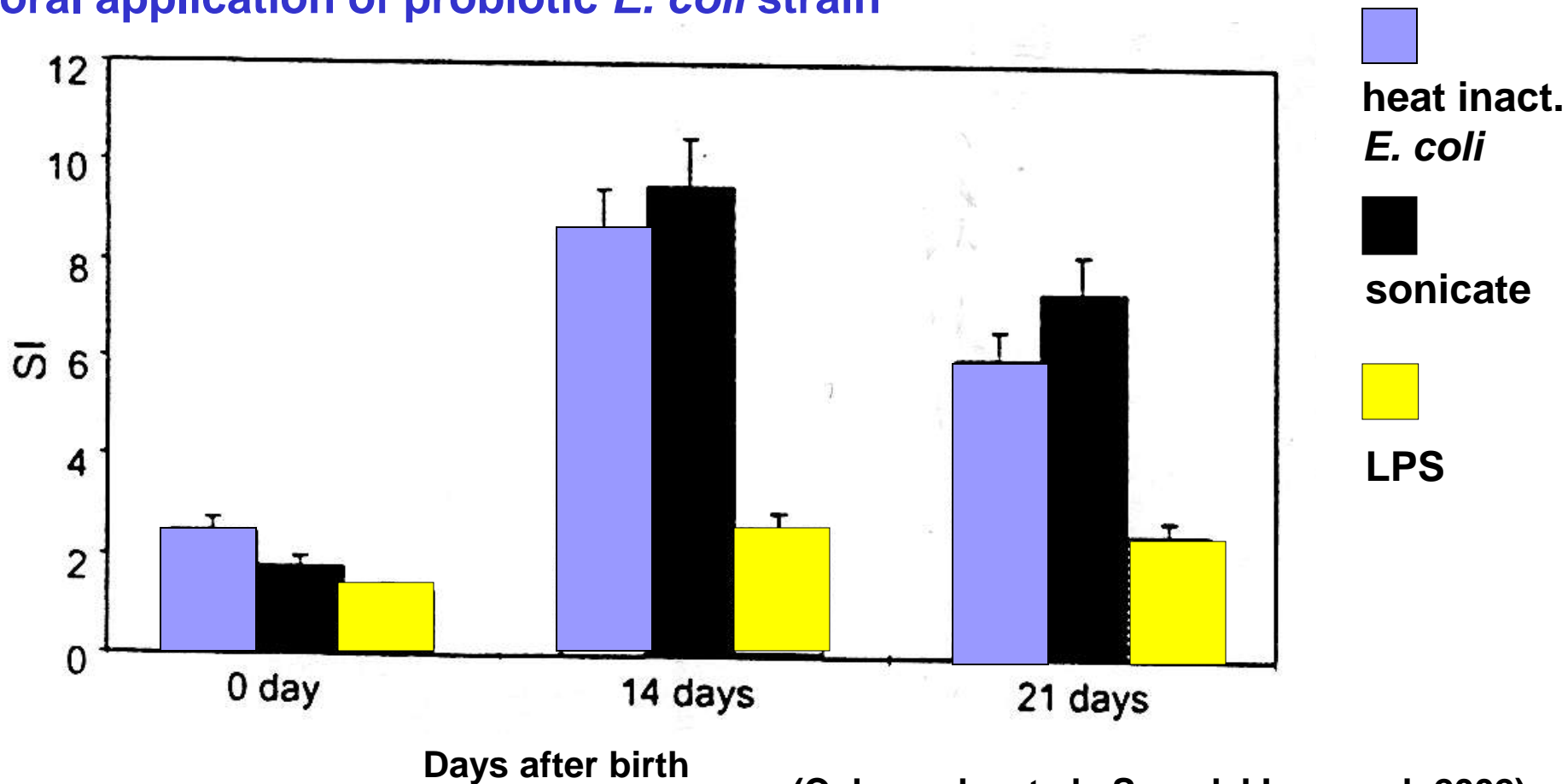
Specific anti-*E. coli* Nissle 1917 antibodies in the sera of preterm infants after oral application of probiotic *E. coli* strain (Mutaflor)



(Cukrowska et al., Scand.J.Immunol. 2002)

Působení probiotického kmene *E. coli* na imunitní systém dětí

Dynamics of the cellular response (H^3 incorporation) of cord and peripheral lymphocytes of premature infants after the oral application of probiotic *E. coli* strain



(Cukrowska et al., Scand.J.Immunol. 2002)

Dlouhodobé působení probiotik (*E. coli* - *Colinfant*) na imunitní systém dětí

Opakovaná orální aplikace nepatogenního kmene *E. coli* po porodu
redukovala incidenci alergií v pozdějším věku (10 a 20 let)

Clin. symptoms

After 10 years

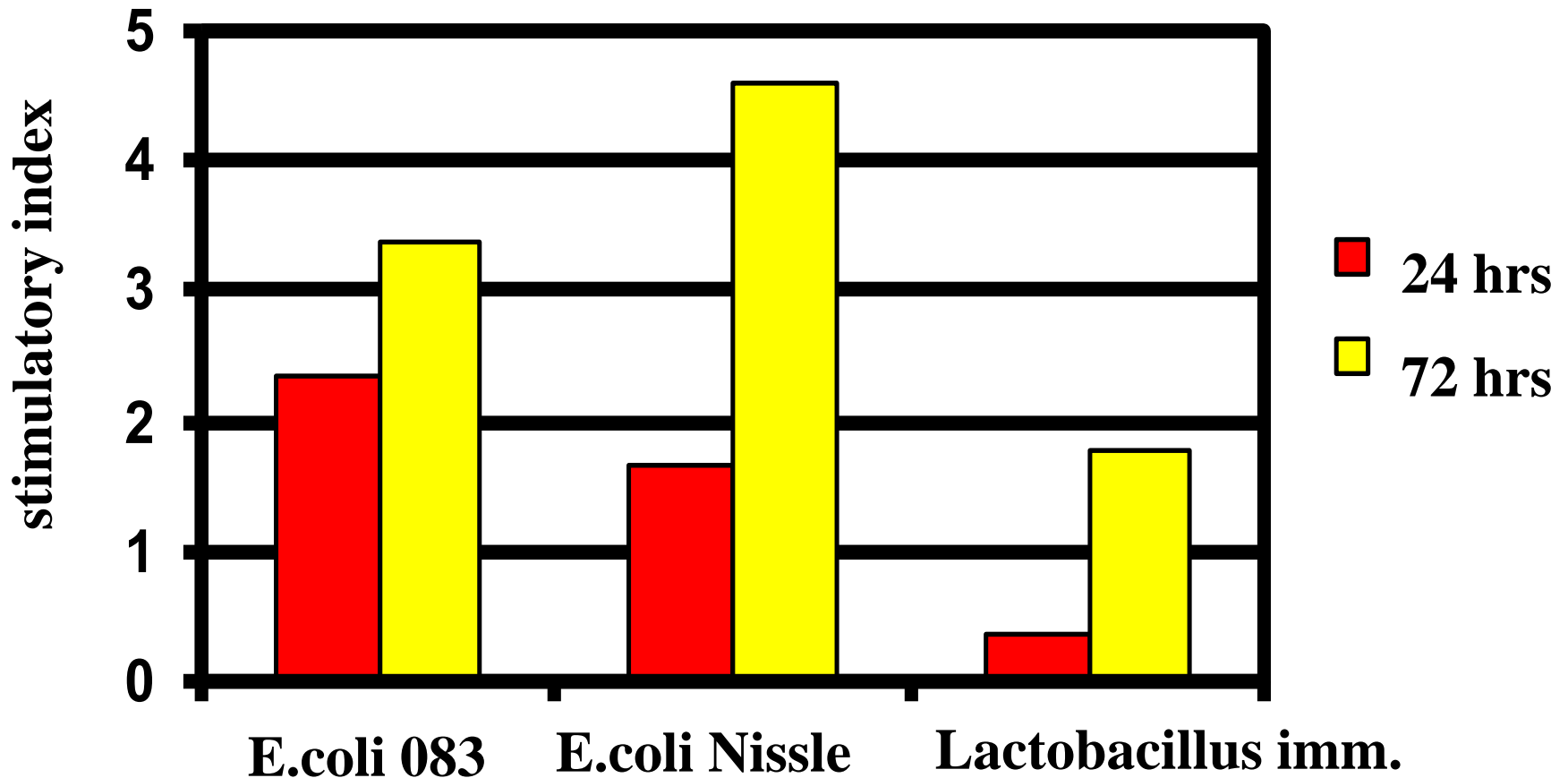
Colonized infants (n = 77)	12%* (9)
Control infants (n = 55)	33% (18)

After 20 years

Colonized infants (n = 150)	16% (24)
Control infants (n = 144)	32% (46)

*p < 0.01

Production of IL-10 by PBMC from healthy adults cultivated in vitro with various probiotic bacteria

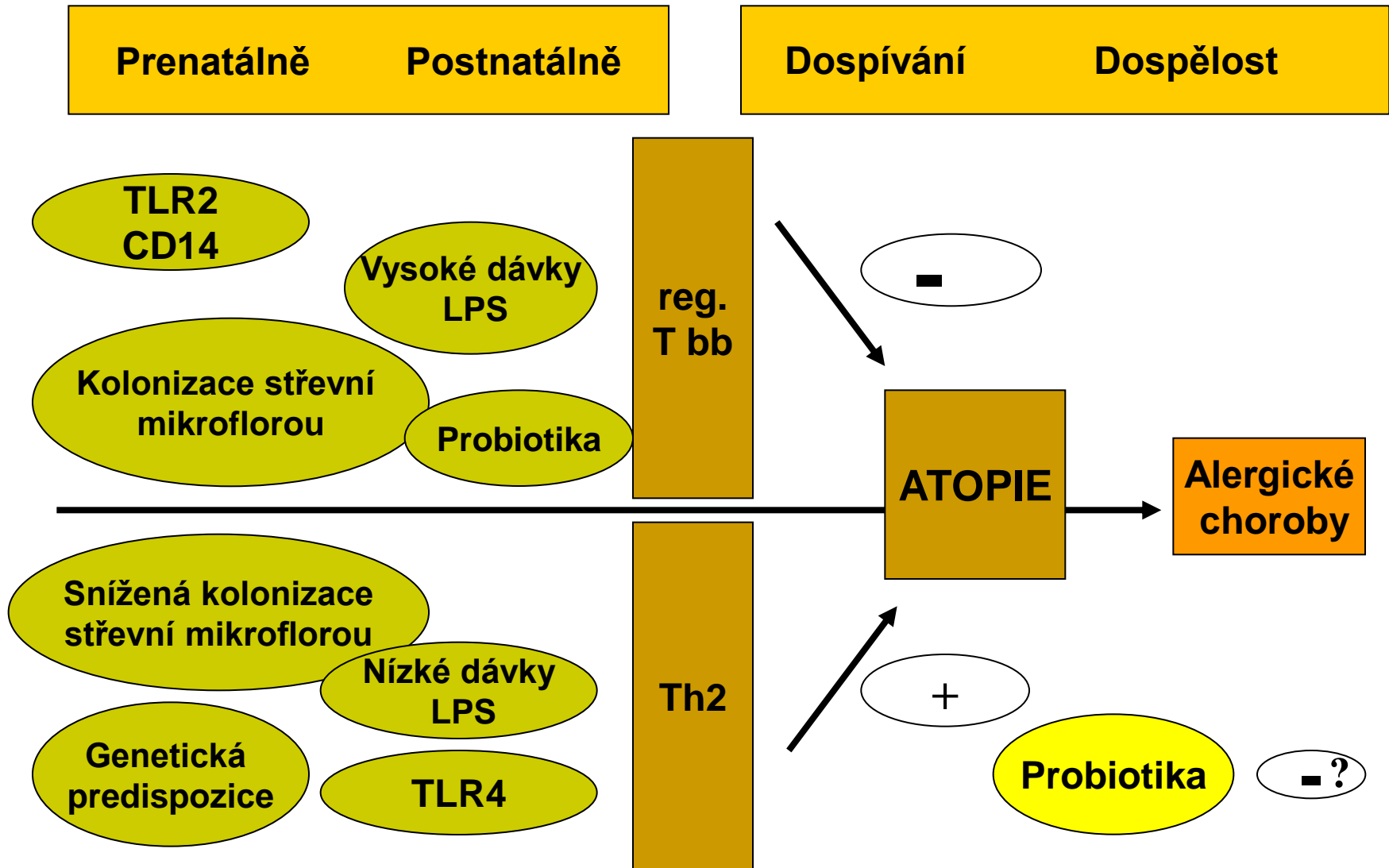


(Kokešová, Bártová et al, unpubl.)

Některé mechanismy, kterými působí probiotické bakterie na sliznicích protizánětlivě

- 1) Negativní regulace signalační cesty přes Toll Like Receptory (TLR) např. pomocí molekul IRAK-M, TOLLIP a další**
- 1) Interference s aktivací NFκB např. inhibicí degradace (ubikvitinace) IκB**
- 2) Produkce inhibičních cytokinů IL-10 a TGFβ. TGFβ signalizace indukuje inhibiční molekuly SMAD6 a SMAD7**
- 4) Zvýšená exprese molekul rodiny SOCS (supresory cytokinové signalizace), které zpětnou vazbou inhibují cytokinovou signalizaci vyvolanou vazbou na TLR**

Hypotetické působení mikroflory na vývoj alergických chorob



Obecné závěry

- Nejčastější formy alergie vznikají u geneticky predisponovaných jedinců na základě poruchy slizničních imunoregulačních mechanismů (porucha slizniční tolerance)
- Zátěž slizničního imunitního systému v časném období postnatálního života zřejmě určuje vývoj imunity a tím i vznik alergií
- Dosavadní výsledky výzkumu nasvědčují tomu, že stimulace slizničního imunitního systému (přirozená imunita – epitel, makrofágy, NK buňky atd. s jejich receptory např. TLR, CD14; adaptivní imunita – B, T lymfocyty a jejich receptory i produkty) např. probiotiky do jisté míry upravuje důsledky působení „civilizačních“ faktorů

PODĚKOVÁNÍ



Rája Lodinová-Žádníková*
Hana Kozáková
Božena Cukrowska
Renata Štěpánková
Tomáš Hudcovic
Ludmila Tučková
Alenka Kokešová
Jiřina Bártová**
Ursulla Wiedermann***

e-mail: tlaskalo@biomed.cas.cz

*Grafická úprava:
Veronika Patrovská*

*Odd. imunologie a gnotobiologie,
MBÚ AV ČR, Praha a Nový Hrádek
ÚPMD Praha*
I. LF UK Praha**
Universita Vídeň****

Podporováno granty NIH Fogarty Grant (USA) H135 936-03, EU Projekt QLK3-2000-00340, Institut Danone ČR a projekt GA AV ČR.